

1. **ชุดโครงการวิจัย** : แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของ
ชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยสำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การคัดแยกและศึกษาศักยภาพการก่อโรคในหนูศัตรูพืชของ
โปรโตซัวสกุล *Isospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) จากหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* และ *Mus* ที่พบ
ในประเทศไทย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Isolation and pathology in rats of *Isospora* species
(Apicomplexa: Eimeriidae) from *Rattus* spp. and *Mus* spp. in Thailand.

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : วิชาญ วรธนะไกววัล กลุ่มกีฏและสัตววิทยา
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ปราสาททอง พรหมเกิด สมเกียรติ กล้าแข็ง และทรงทัฬห แก้วตา
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ** : การคัดแยกและศึกษาศักยภาพการก่อโรคในหนูศัตรูพืชของโปรโตซัวสกุล
Isospora (Apicomplexa: Eimeriidae) จากหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* และ *Mus* ที่พบในประเทศไทย
ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2561 ได้ดำเนินการดักหนูศัตรูพืช
สกุลหนูท้องขาว (*Rattus*) 133 ตัว และสกุลหนูหริ่ง (*Mus*) 104 ตัว รวมทั้งหมด 237 ตัว สามารถ
คัดแยกโอโอซิสต์จากมูลหนูที่ดักได้ จำนวน 58 โอโอซิสต์ เป็นโอโอซิสต์ของโปรโตซัว *Eimeria*
55 โอโอซิสต์ และ *Isospora* 3 โอโอซิสต์ จากพื้นที่เกษตร จำนวน 17 แหล่ง (15 จังหวัด) ใน
5 ภูมิภาคของประเทศไทย และพบโอโอซิสต์ของเชื้อ *Eimeria* จำนวน 7 โอโอซิสต์ ที่ระดับความ
เข้มข้น 500, 5,000 และ 50,000 โอโอซิสต์ มีศักยภาพสามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้
ร้อยละ 20-40 ภายใน 2-10 วัน หลังจากได้รับเชื้อ (days p.i.) ผลการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา
ของโอโอซิสต์ร่วมกับการศึกษาทางชีวโมเลกุล พบว่าเป็น *Eimeria* sp. ทั้ง 7 โอโอซิสต์ ได้แก่
Eimeria sp. ex. *Rattus andamanensis* isolates R.an KW03, *Eimeria* sp. ex.
Rattus andamanensis isolates R.an MJ04, *Eimeria* sp. ex. *Rattus norvegicus* isolates R.n.
Bkk02, *Eimeria* sp. ex. *Mus pahari* isolate M.pa MJ01, *Eimeria* sp. ex. *Rattus rattus* isolate
R.r K11 no 01, *Eimeria* sp. ex. *Mus cervicolor* isolate M.ce NKW05 และ *Eimeria*
sp. ex. *Mus cervicolor* isolate M.ce NKW04 ตามลำดับ

Abstract : Isolation and pathology in rats and mice of *Isospora* species
(Apicomplexa: Eimeriidae) from *Rattus* spp. and *Mus* spp. in Thailand was conducted
during October 2016 to September 2018. Total isolation of oocyst 58 isolates, from 237

rodent pests, 133 and 104 *Rattus* and *Mus* species respectively were captured from agricultural of 17 localities (15 provinces) in 5 regions of Thailand, was revealed *Eimeria* oocyst 55 isolates and *Isospora* oocyst 3 isolates. In this study 7 isolates of *Eimeria* oocysts caused severe clinical illness and mortality, 20-40%, occurred in rats and mice an infectious dose of 500, 5,000 and 50,000 oocysts at the 2-10 days postinfection (days p.i.). Using a combination of the morphology sporulated oocyst and molecular analysis, we describe *Eimeria* sp. such as *Eimeria* sp. ex. *Rattus andamanensis*

isolates R.an KW03, *Eimeria* sp. ex. *Rattus andamanensis* isolates R.an MJ04, *Eimeria* sp. ex. *Rattus norvegicus* isolates R.n. Bkk02, *Eimeria* sp. ex. *Mus pahari* isolate M.pa MJ01, *Eimeria* sp. ex. *Rattus rattus* isolate R.r K11 no 01, *Eimeria* sp. ex. *Mus cervicolor* isolate M.ce NKW05 and *Eimeria* sp. ex. *Mus cervicolor* isolate M.ce NKW04 respectively.

6. คำนำ : Phylum Apicomplexa เป็นกลุ่มปรสิตโปรโตซัว ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Alveolata (alveolates) ซึ่งกลุ่ม Alveolates นั้น ประกอบไปด้วยโปรโตซัวหลายชนิด ได้แก่ โปรโตซัวใน Phylum Dinoflagellata (dinoflagellates), Phylum Ciliophora (ciliates) และ Phylum Apicomplexa (apicomplexans) โปรโตซัวกลุ่มนี้ เป็นกลุ่มที่มีจำนวนสมาชิกมากและมักพบเป็นปรสิตโปรโตซัวในสัตว์ชนิดต่างๆ

คือคoccidia โปรโตซัว (coccidia protozoa) อยู่ใน Phylum Apicomplexa เป็นโปรโตซัวที่มีเซลล์เดียว อาจมีวงจรชีวิตอยู่ภายในสัตว์อาศัยเพียงชนิดเดียว (homoxenous coccidia) หรือมีวงจรชีวิตอยู่ภายในสัตว์อาศัยมากกว่าหนึ่งชนิด (heteroxenous coccidia) ในกรณีที่มีสัตว์อาศัยสองชนิด วงจรชีวิตของโปรโตซัวมักเริ่มจากระยะติดเชื้อ โดยสปอร์โรซีสต์หรือโอโอซิสต์ของเชื้อจะถูกขับออกมาพร้อมกับมูลของสัตว์อาศัยสุดท้ายซึ่งมักเป็นกลุ่มสัตว์นักล่าหรือสัตว์กินเนื้อ (carnivore) และเชื้อเข้าสู่สัตว์อาศัยตัวกลางโดยปนเปื้อนกับน้ำและอาหารที่กินเข้าไป หลังจากที่ได้รับโอโอซิสต์ (oocysts) ที่ปนเปื้อนในน้ำและอาหารเข้าสู่สัตว์อาศัยตัวกลางซึ่งมักเป็นกลุ่มสัตว์ที่เป็นเหยื่อหรือสัตว์กินพืชตามธรรมชาติ (herbivore) จะพัฒนาไปเป็นระยะ merozoites และเข้าสู่ระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือ gamonts ซึ่งในระยะนี้พัฒนาต่อไปและสร้าง gametes เมื่อเกิดการปฏิสนธิระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย จะทำการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เพื่อพัฒนาเป็นสปอร์โรซีสต์หรือโอโอซิสต์เซลล์ใหม่ต่อไป (ยูลักษณ์ และคณะ, 2544) ส่วนในกรณีที่มีสัตว์อาศัยชนิดเดียว วงจรชีวิตทั้งหมดจะเกิดขึ้นในสัตว์อาศัยเพียงชนิดเดียวเท่านั้น

สารชีววินทรีย์กำจัดหนู (bio-rodenticide) ที่ทางกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ผลิตขึ้นจากปรสิตโปรโตซัว

Sarcocystis singaporensis Zaman & Colley (1976) ที่มีความจำเพาะต่อสัตว์อาศัยหนูและงูเหลือมนั้น (ยวลักษณะ และคณะ 2539a, ยวลักษณะ และคณะ 2539b, ยวลักษณะ และคณะ 2540 และ Jaekel และคณะ, 1996) วงจรชีวิตของโปรโตซัวชนิดนี้มีการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศในสัตว์อาศัยสุดท้าย ซึ่งเกิดขึ้นภายในเซลล์บุผิวลำไส้ของงูเหลือมและสปอร์โรซิสต์ (sporocysts) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการเจริญเติบโตจะปะปนออกมาพร้อมมูลสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก และเข้าสู่สัตว์อาศัยตัวกลางได้แก่ หนูในสกุลท้องขาว (*Rattus*) และสกุลพุก (*Bandicota*) โดยปนเปื้อนในน้ำและอาหารที่กินเข้าไป หลังจากที่โปรโตซัวชนิดนี้เข้าสู่ในร่างกายของหนูแล้ว จะขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศในเซลล์บุผิวหลอดเลือดในอวัยวะสำคัญเช่น ปอด หัวใจ ตับ ไต เป็นต้น และสุดท้ายเจริญพัฒนาเป็น bradyzoites ซึ่งปรากฏฝังตามกล้ามเนื้อลำตัวหนู (sarcocysts) (Beaver and Maleckar, 1981; Jaekel et al., 1996)

ด้วยความจำเพาะต่อสัตว์อาศัยสองชนิดซึ่งก็คือ งูเหลือมและหนูท้องขาวและหนูพุกเพียง 2 สกุลเท่านั้น ซึ่งยังเหลือสกุลหนูหริ่ง (*Mus*) อีก 1 สกุล ที่ยังไม่มีสารชีวภัณฑ์กำจัดหนูที่จำเพาะต่อหนูชนิดนี้ ซึ่งหนูหริ่งนั้นเป็นศัตรูสำคัญของธัญพืชที่สำคัญในประเทศไทย เช่น ในแปลงปลูกถั่วเหลือง ถั่วเขียว นาข้าว และโรงเก็บธัญพืชต่างๆ เป็นต้น อีกทั้งการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูจากปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในปัจจุบันนั้น ต้องมีการเลี้ยงงูเหลือมและหนูเพื่อใช้ในการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู ซึ่งการเลี้ยงงูเหลือมจัดเป็นงานที่มีภาระต้องรับผิดชอบสูงมากทั้งในเรื่องค่าใช้จ่ายบุคลากร รวมไปถึงสถานที่เลี้ยง

โปรโตซัวสกุล *Isospora* Schneider, 1881 เป็นค็อคซิเดียโปรโตซัว อยู่ในวงศ์ (family) Eimeriidae ใน Phylum Apicomplexa ปัจจุบันพบ 248 ชนิด ถูกพบครั้งแรกเมื่อปี 1986 (Lindsay and Blagburn, 1994; Berto et al., 2009) เป็นโปรโตซัวที่ต้องการสัตว์อาศัยเพียงชนิดเดียว (monoxenous host หรือ homoxenous coccidian parasites) โดยอาศัยในระบบทางเดินอาหารของสัตว์อาศัย มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศบริเวณลำไส้ ในระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโตมีการสร้างโอโอซิสต์ (oocysts) ซึ่งเป็นระยะติดเชื้อที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ โดยจะถูกขับออกมาพร้อมกับมูลของสัตว์อาศัยสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก พร้อมทั้งจะเข้าสู่ร่างกายของสัตว์อาศัยตัวใหม่โดยการปนเปื้อนในน้ำและอาหารของสัตว์อาศัยตามธรรมชาติ เพื่อเริ่มวงจรชีวิตใหม่ต่อไป (Wasae, 2004) สัตว์อาศัยของโปรโตซัวสกุลนี้โดยมากพบในกลุ่มสัตว์ปีก เช่น กลุ่มนกเกาะคอน (passerine birds) พบประมาณ 90% ของค็อคซิเดียโปรโตซัวทั้งหมด รวมถึงสามารถพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หนู กระต่าย หมู ม้า วัว ลิง สัตว์ในตระกูลสุนัขและแมว เป็นต้น โปรโตซัวในสกุลนี้มีหลายสปีชีส์ที่มีหนูเป็นสัตว์อาศัย

(rodent hosts) อาทิเช่น *I. hammondi* พบในหนู marsh rice rat, *Oryzomys palustris* (Barnard et al., 1971) *I. masoni* sp. n. พบในหนู cotton rat, *Sigmodon hispidus* (Upton et al., 1985.) *I. uralica* พบในหนู field mouse, *Apodemus sylvaticus* และ *I. ordubadica* พบในหนู gerbil, *Meriones persicus* โดยที่โปรโตซัวในกลุ่ม homoxenous coccidia parasites นั้นมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของสัตว์อาศัยในระดับสกุล (genus specific) (Levine, 1982; Long and Joyner, 1984) ซึ่งสัตว์อาศัยที่มีการติดเชื้อโปรโตซัวสกุลนี้พบว่า มักมีอาการท้องเสียและเป็นโรคในระบบลำไส้ สามารถพบได้ในสัตว์อาศัยในกลุ่ม สัตว์เลี้ยงคลาน (Modry et al., 1998) สัตว์อาศัยในกลุ่มสัตว์ปีก (Ball & Daszak, 1997 และ Upton et al., 2001) และสัตว์อาศัยในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Sayd & Kawazoe, 1998 และ Mundt et al., 2003) เป็นต้น

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการคัดแยกชนิดและศึกษาศักยภาพของโปรโตซัวสกุล *Isospora* จากหนูศัตรูพืชใน 2 สกุล ได้แก่ สกุนหนูท้องขาว (*Rattus*) และสกุนหนูหริ่ง (*Mus*) จากภูมิภาคต่างๆ ในประเทศไทย เพื่อเป็นทางเลือกในการนำมาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนู ซึ่งหากพบว่าโปรโตซัวชนิดนี้ มีประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองได้ จะต้องมีการทดลองเพิ่มเติมถึงจำเพาะเจาะจงกับชนิดของหนู และความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมของเชื้อต่อไป เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและกำจัดหนูศัตรูพืชควบคู่กับการใช้เหยื่อโปรโตซัว *S. singaporensis* และการป้องกันกำจัดหนูศัตรูพืชโดยชีววิธีด้วยวิธีอื่นๆ อันจะนำไปสู่การขยายผลการป้องกันและกำจัดหนูแบบบูรณาการต่อไป

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างหนูศัตรูพืชจากธรรมชาติ ได้แก่ สกุนหนูท้องขาว (*Rattus*) และสกุนหนูหริ่ง (*Mus*)
2. เครื่องปั่น (centrifuge) Hettich รุ่น universal 16A และตู้เย็น (4-10°C)
3. ตะแกรงกรองละเอียด (ขนาดความละเอียด 6-8 ไมครอน)
4. Blood counting chamber
5. หลอดปั่นขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
6. สารเคมี ได้แก่ Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$), QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN, Germany), Thermo scientific phusion hot start II high-fidelity DNA polymerase (Thermo scientific), Thermo scientific generuler 100 bp plus DNA ladder (Thermo scientific), ชุดสกัด gel elution kit (GeneMark, Taiwan), loading dye (bromphenol blue 25%, glycerol 30%) และ Agarose gel
7. ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด

8. Auto pipette และ Tips
9. กรงเลี้ยงเดี่ยวสำหรับหนูทดลองขนาด 23x52x22 เซนติเมตร และกรงดักหนู
10. จานแก้วเพาะเชื้อ (petridish)
11. ให้อาหารโดยตรงจากปากสู่กระเพาะ (feeding tube)
12. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยายสูง (light microscope)
13. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermal cycler)
14. เครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)
15. เครื่อง U.V. Electronic U.V. Transilluminator (Alphadigidoc™, EEC)

- วิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

ดักหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* และ *Mus* จากธรรมชาติ ด้วยกรงดักชนิดจับเป็น จากพื้นที่ทำการเกษตรในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย เพื่อนำมาคัดแยกเชื้อ จำแนกชนิด และทดสอบศักยภาพในการก่อโรคในหนูทดลอง ของโปรโตซัวสกุล *Isospora* ที่คัดแยกได้

การคัดแยกและจำแนกชนิดคือคหิเตียโปรโตซัวสกุล *Isospora* โดยวิธีทางสัตววิทยา

ทำการผ่าหนู เก็บตัวอย่างบริเวณลำไส้และมูลหนู ตรวจสอบโปรโตซัวสกุล *Isospora* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ โดยเก็บในสารละลาย potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ความเข้มข้น 2-2.5% ตามวิธีของ Duszynski and Wilber 1997

เพิ่มความเข้มข้นของเชื้อและลดจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยวิธีการปั่นตกตะกอน ดังนี้

- ชั่งมูลหนูหรือตัดชิ้นเนื้อบริเวณลำไส้ของหนูที่ดักมาได้ 5 กรัม ละลายในน้ำ 30 มิลลิลิตร

- กรองผ่านตะแกรงกรองละเอียด

- ปั่นสารแขวนลอยที่ผ่านการกรองแล้วด้วยความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 2 นาที

- เทส่วนใสทิ้ง ปั่นสารแขวนลอยซ้ำ 2-3 ครั้ง

- เทส่วนใสด้านบนของสารแขวนลอยทิ้ง เก็บสารแขวนลอยเหนือตะกอน ลงในหลอดทดลอง

ที่อุณหภูมิ 4-10 °C เพื่อทำการจำแนกชนิดทางสัตววิทยา โดยการตรวจดูลักษณะโอโอซิสต์ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) ทดสอบศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคในหนูทดลอง และการทดสอบทางชีวโมเลกุล

การทดสอบศักยภาพในการก่อโรควักับหนูทดลองของเชื้อ

นำเชื้อโปรโตซัวสกุล *Isospora* ที่คัดแยกได้จากหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* และ *Mus* จากธรรมชาติ มาทำการทดสอบศักยภาพของเชื้อ โดยทดสอบกับหนูทดลอง 2 ชนิด ได้แก่ หนูท้องขาวบ้าน (*R. rattus*) และหนูหริ่ง (*Mus spp.*)

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 10 ซ้ำ
ซ้ำละ 1 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว) 4 กรรมวิธี ดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 ให้โอโอซิสต์โดยตรงทางปากกับหนูจำนวน 500 โอโอซิสต์
- กรรมวิธีที่ 2 ให้โอโอซิสต์โดยตรงทางปากกับหนูจำนวน 5,000 โอโอซิสต์
- กรรมวิธีที่ 3 ให้โอโอซิสต์โดยตรงทางปากกับหนูจำนวน 50,000 โอโอซิสต์
- กรรมวิธีที่ 4 ให้น้ำกลั่นโดยตรงทางปากกับหนูเป็นตัวเปรียบเทียบ (control)

- วัดขนาดและชั่งน้ำหนักหนูก่อนทำการทดสอบ แยกหนูที่ใช้ทดลองใส่กรงทดลอง งดน้ำและอาหารเป็นเวลา 1 คืน ก่อนการทดสอบ

- ทดสอบศักยภาพในการก่อโรครักกับหนูท้องขาวบ้านและหนูหริ่งตามกรรมวิธี
- หลังจากทำการทดสอบกับเชื้อทดลองแล้วให้อาหารและน้ำตามปกติ
- บันทึกระยะเวลาการตายของหนูและพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น ในกรณีหนูที่ทำการทดสอบตาย

ทำการตรวจหาโอโอซิสต์จากซากหนูและมูลหนู 3.5 เมื่อครบ 14 วัน ทำการผ่าหนูทดลองที่เหลือ ตรวจหาโอโอซิสต์และบันทึกพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น

- หาร้อยละการตายของหนูทดลองและนำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม

การจำแนกชนิดโปรโตซัวสกุล *Isoospora* โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

การออกแบบไพรเมอร์

- สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของยีนต่างๆที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ของโปรโตซัวสกุล *Isoospora* และโปรโตซัวกลุ่มอื่นที่ใกล้เคียงกันเพื่อใช้เปรียบเทียบอ้างอิง

- ทำการออกแบบไพรเมอร์จากฐานข้อมูล GenBank บริเวณไซโตโครม ซี ออกซิเดส (cytochrome C oxidase subunit I, *coxI*) ในไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์ มีลำดับเบส ดังนี้ IE *coxI* for: 5'-GTW ACT AAT GGT GCA AAA CCA TGG TG-3' และ IE *coxI* rev: 5'-ATA AAA CTT ARA GCA TAC CAA RTA TC-3' และหาลำดับเบสเพื่อยืนยันชนิดของโปรโตซัวที่พบและคัดแยกได้

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของโอโอซิสต์ที่มีศักยภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตาย จากสารแขวนลอยโอโอซิสต์ที่คัดแยกได้จากลำไส้และมูลของหนูจากธรรมชาติที่ดักได้ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

- ทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR รวมถึงการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่ใช้

- เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ul ในหลอดขนาด 0.2 ml โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของค็อกชิตเดียโปรโตซัวที่คัดแยกได้ 2 ul ผสมกับ 5x PCR buffer, 10 mM dNTPs, เอนไซม์ hot start taq DNA polymerase 1 ยูนิต และไพรเมอร์ชนิดละ 10 mM แล้วเติมน้ำกลั่น จนครบปริมาตร 20 ul ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturing)	98	30 วินาที
2. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (denaturing)	98	30 วินาที
3. ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	55	45 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension)	72	60 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ รอบสุดท้าย (final extension)	72	10 นาที

หมายเหตุ : อุณหภูมิของปฏิกิริยาไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ปรับอุณหภูมิเพิ่มและลดตามค่า T_m ของไพรเมอร์ที่ใช้ และทำปฏิกิริยาซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด ประมาณ 30 - 40 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 °C

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ทำการจำแนกชนิดของค็อกชิตเดียโปรโตซัวที่คัดแยกได้โดย ตรวจสอบจากขนาดของแถบดีเอ็นเอ (PCR product) ที่ได้โดยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เปรียบเทียบกับ DNA marker ดังนี้

- นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 5 ul มาผสมกับ loading dye และสีย้อม gel star ปริมาณอย่างละ 1 ul

- วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% อะกาโรสใน 0.5xTAE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เวลาประมาณ 25-30 นาที

- ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตแล้วทำการบันทึกผลการทดลองที่ได้

การถอดรหัสทางพันธุกรรม (DNA sequencing)

- ตัดแถบ ดีเอ็นเอ ที่มีขนาดตรงกับที่คำนวณไว้และทำให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัด gel elution kit (GeneMark, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เพื่อส่งไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอกับหน่วยงานภายนอก

- ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสที่ได้

การจำแนกชนิด การวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree)

- เมื่อได้ลำดับเบสและตรวจสอบความถูกต้องแล้วนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อตรวจสอบว่าลำดับเบสที่ได้นั้นเป็นโปรโตซัวชนิดใด

- หลังจากตรวจสอบลำดับเบสที่ได้และรวบรวมแต่ละ contig เป็นสายเดี่ยว

- จัดเรียงและเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสใช้โปรแกรม BioEdit

(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) ในการเปรียบเทียบลำดับเบสเพื่อจัดกลุ่ม (haplotype) ของค็อคซิเดียโปรโตซัวที่คัดแยกได้ จากตัวอย่างหนูศัตรูพืช ในการศึกษาครั้งนี้กับลำดับเบสที่มีในฐานข้อมูล GenBank

- วิเคราะห์ความหลากหลายและสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) 3 วิธี ได้แก่ Neighbor-joining (NJ), Maximum likelihood (ML) และ Bayesian inference (BI) การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี neighbor-joining (NJ; Saitou and Nei, 1987) คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างหนูตัวอย่างแต่ละคู่ ด้วยแบบจำลอง kimura 2-parameter distance models (Kimura, 1980) โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 software (Kumar *et al.*, 2016) วิธี Maximum likelihood (ML; Felsenstein, 1981) คำนวณหา best fit model โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 software และดำเนินการโดยใช้โปรแกรม PAUP v. 4.0b8 (Swofford, 2001) โปรแกรมโดยใช้ค่า AICc value (Akai information criterion, corrected) กำหนดให้หาสัญญาณที่ดีที่สุดโดย heuristic search ทำ branch swapping ผลการคำนวณใช้แบบจำลอง tamura 3-parameter (Tamura, 1992) ในขณะที่วิธี Bayesian inference ดำเนินการโดยใช้โปรแกรม MrBayes version 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck., 2003) ด้วยวิธี markov chain monte carlo (mcmc) numerical method โดยตัดค่า burn-in 25% วิเคราะห์ด้วยแบบจำลอง GTR+I+G evolutionary model สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสุดท้าย (final tree) โดยใช้โปรแกรม TreeView version 1.6.6 (Page, 1996) ทั้ง 3 แผนภูมิดังกล่าวนั้น ทำการวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 รอบ ขณะที่ markov chain ตั้งค่าที่ 1,000,000 generations โดยที่ค่าทางสถิติที่ได้จะถูกนำมาแสดงเพื่อเพิ่มระดับความเชื่อมั่นของแผนภูมิที่ได้ โดยเปรียบเทียบกับค็อคซิเดียโปรโตซัวใกล้เคียงกันที่มีในฐานข้อมูล โดยใช้

Toxoplasma gondii (JX473256) และ *Neospora caninum* (JX473256) เป็นโปรโตซัวนอกกลุ่ม (outgroup) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณไซโตโครม ซี ออกซีเตส

- วิเคราะห์ผลจากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree)

เปรียบเทียบผลร่วมกับผลทางสัณฐานวิทยาของโอโอซิสต์แต่ละชนิดที่พบ แล้วนำมาสรุปเป็นผลการทดลองที่ได้

- เวลาและสถานที่

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2561 ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร โรงเรียนหนุ ของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และพื้นที่เกษตรตามภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย จำนวน 17 แห่ง (15 จังหวัด) ได้แก่ นาข้าวอำเภอบ้านสร้าง จังหวัดปราจีนบุรี นาข้าวอำเภอเมืองชัยนาท จังหวัดชัยนาท นาข้าวอำเภอเมือง จังหวัดนครนายก แปลงตะไคร้อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี แปลงถั่วเหลืองอำเภอบรรพตพิสัย จังหวัดนครสวรรค์ แปลงถั่วลิสงอำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี นาข้าวอำเภอหนองยาง จังหวัดอุทัยธานี สนามหลวงเขตพระนคร กรุงเทพฯ แปลงมะคาเดเมียสถานีทดลองเกษตรที่สูงแม่จอนหลวงและแปลงมะคาเดเมียเกษตรหลวงเชียงใหม่ (ขุนวาง) จังหวัดเชียงใหม่ นาข้าวอำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน นาข้าวอำเภอพาน จังหวัดเชียงราย แปลงมะคาเดเมีย อำเภอน้ำหนาวและนาข้าวอำเภอล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ แปลงข้าวโพดอำเภอสี่คิ้ว จังหวัดนครราชสีมา นาข้าวอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และสวนปาล์มน้ำมันอำเภอสวี จังหวัดชุมพร

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง :

การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อ

การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2561 ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างโดยใช้กับดักชนิดจับเป็น (live trap) ดักหนูสกุลท้องขาว (*Rattus*) และสกุลหนูหริ่ง (*Mus*) ศัตรูพืชในพื้นที่เกษตรตามภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย จำนวน 17 แห่ง 5 ภูมิภาค (15 จังหวัด) เขตภาคตะวันออก จำนวน 1 จังหวัด ได้แก่ นาข้าวอำเภอบ้านสร้าง จังหวัดปราจีนบุรี เขตภาคกลาง จำนวน 8 จังหวัด ได้แก่ นาข้าวอำเภอเมืองชัยนาท จังหวัดชัยนาท นาข้าวอำเภอเมือง จังหวัดนครนายก แปลงตะไคร้อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี แปลงถั่วเหลืองอำเภอบรรพตพิสัย จังหวัดนครสวรรค์ แปลงถั่วลิสงอำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี นาข้าวอำเภอหนองยาง จังหวัดอุทัยธานี สนามหลวงเขตพระนคร กรุงเทพฯ เขตภาคเหนือ จำนวน 4 จังหวัด

(6 แหล่งพื้นที่เกษตร) ได้แก่ แปลงมะคาเดเมียสถานีทดลองเกษตรที่สูงแม่จอนหลวงและเกษตรหลวง เชียงใหม่ (ขุนวาง) จังหวัดเชียงใหม่ นาข้าวอำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน นาข้าวอำเภอบ้านฝาง จังหวัด เชียงราย แปลงมะคาเดเมีย อำเภอน้ำหนาวและนาข้าวอำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ เขตภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 1 จังหวัด ได้แก่ แปลงข้าวโพดอำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา เขตภาคใต้ จำนวน 2 จังหวัด ได้แก่ นาข้าวอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และสวนปาล์มน้ำมัน อำเภอสวี จังหวัดชุมพร (figure 1) รวมได้ตัวอย่างหนูในการทดลองครั้งนี้ ทั้งสิ้น 237 ตัว สามารถ คัดแยกโอโอซิสต์ ได้ทั้งหมด 58 ไอโซเลท (isolates) คิดเป็นร้อยละ 24 จากตัวอย่างหนูทั้งหมด โดย หนูท้องขาว 133 ตัว สามารถคัดแยกโอโอซิสต์ได้ 27 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 20 จากตัวอย่าง หนูท้องขาวทั้งหมด และเป็นหนูหริ่ง 104 ตัว สามารถคัดแยกโอโอซิสต์ได้ 31 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 30 จากตัวอย่างหนูหริ่งทั้งหมด (table 1) โดยแปลงมะคาเดเมีย ที่เกษตรหลวงเชียงใหม่ (ขุนวาง) จังหวัดเชียงใหม่ นั้นเป็นพื้นที่ที่สามารถคัดแยกโอโอซิสต์ได้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 67 จาก หนูป่าอินโดจีน (*R. andamanensis*) จำนวน 6 ตัว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในพื้นที่ดังกล่าว มีความชุกของ โอโอซิสต์ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่อื่นๆในการทดลองครั้งนี้ ในขณะที่เดียวกันที่สวนปาล์ม น้ำมันอำเภอสวี จังหวัดชุมพร นั้นไม่พบโอโอซิสต์จากหนูป่ามาเลย์ (*R. tiomanicus*) ที่ดักมาได้ ทั้งหมด 12 ตัว

ถึงแม้ว่าการทดลองในครั้งนี้สามารถคัดแยกโอโอซิสต์ ได้ทั้งหมด 58 ไอโซเลท (ร้อยละ 24 จาก ตัวอย่างหนูทั้งหมด) แต่เป็นโอโอซิสต์ของโปรโตซัว *Isoospora* เพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้น คิดเป็น ร้อยละ 5 จากโอโอซิสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด ในขณะที่เหลืออีก 55 ไอโซเลท เป็นโอโอซิสต์ของ โปรโตซัว *Eimeria* คิดเป็นร้อยละ 95 จากโอโอซิสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลท ของ โปรโตซัว *Isoospora* ที่คัดแยกได้นั้น คัดแยกได้จากหนูนาใหญ่ (*R. argentiventer*) ในนาข้าวอำเภอ เมือง จังหวัดชัยนาท หนูหริ่งนาหางสั้น (*M. cervicolor*) ในแปลงตะไคร้อำเภอเมือง จังหวัด กาญจนบุรี และหนูหริ่งนาหางยาว (*M. caroli*) ในแปลงข้าวโพดอำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโปรโตซัว *Isoospora* ที่มีหนูสกุลท้องขาวและหนูหริ่ง เป็นสัตว์อาศัยใน ประเทศไทยนั้น เป็นกลุ่มเชื้อที่มีโอกาสพบได้น้อย (rare species) คิดเป็นร้อยละ 5 จากโอโอซิสต์ที่คัด แยกได้ทั้งหมดจากการศึกษาในครั้งนี้ ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะนำมาศึกษาวิจัยเพื่อทดสอบศักยภาพใน การก่อโรคกับหนูทดลอง อีกหนึ่งปัญหาสำคัญที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้ ก็คือปริมาณของ โปรโตซัว *Eimeria* และ *Isoospora* ที่คัดแยกได้จากมูลหนูในธรรมชาติ นั้น มีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอ ต่อการทดสอบศักยภาพในการก่อโรคกับหนูทดลอง ซึ่งโอโอซิสต์ทั้งหมด 58 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้นั้น สามารถนำไปทดสอบศักยภาพในการก่อโรคกับหนูทดลอง ได้ครบทุกกรรมวิธีเพียง 20 ไอโซเลท

ขณะที่อีก 34 ไอโซเลท ที่เหลือนั้นสามารถทดสอบศักยภาพในการก่อโรคร่วมกับหนูทดลองได้ 3 กรรมวิธี (treatment 1,2,4) และมี 4 ไอโซเลท ได้แก่ M.ca NKW03, M.cePet09, R.an MJ02 และ M.pa MJ01 สามารถทดสอบศักยภาพในการก่อโรคร่วมกับหนูทดลองได้เพียง 2 กรรมวิธี (treatment 1,4) (table 2) ค่าเฉลี่ยของโอโอซิสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหนูแต่ละตัวนั้นเท่ากับ ร้อยละ 28 oocysts/ul (min-max; 1-670 oocysts/ul)

การทดสอบศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคร่วมกับหนูทดลอง

จากตัวอย่างโอโอซิสต์ที่คัดแยกได้จากมูลหนูท้องขาวและหนูหริ่งศัตรูพืชจากธรรมชาติและนำไปทดสอบศักยภาพในการก่อโรคร่วมกับหนูทดลอง จำนวน 58 ไอโซเลทนั้น พบว่า มีเพียง 7 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพสามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ ร้อยละ 20-40 และทั้ง 7 ไอโซเลทดังกล่าวนี้เป็น โอโอซิสต์ของโปรโตซัว *Eimeria* ทั้งหมด ได้แก่ R.r K11, M.ce NKW04, M.ce NKW05, R.n Bkk02, R.an MJ04, M.pa MJ01 และ R.an KW03 โดยเป็นโปรโตซัวที่คัดแยกได้จากมูลหนูท้องขาว จำนวน 4 ไอโซเลท (R.r K11, R.n Bkk02, R.an MJ04 และ R.an KW03) และคัดแยกได้จากมูลหนูหริ่ง จำนวน 3 ไอโซเลท (M.ce NKW04, M.ce NKW05 และ M.pa MJ01) ในขณะที่ระยะเวลาการก่อโรคที่ทำให้หนูทดลองมีอาการป่วยและตาย อยู่ที่ 2-10 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ (2nd-10th day p.i.) ที่ระดับความเข้มข้นของโอโอซิสต์ 500 – 5,000 โอโอซิสต์ (table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคในหนูทดลอง จากงานวิจัยที่เคยมีรายงานไว้ โดยที่ระยะเวลาการตายของหนูหลังจากที่ได้รับเชื้อโปรโตซัวเข้าไปนั้น แตกต่างกันตามชนิดและปริมาณของเชื้อโปรโตซัวที่ได้รับ ตัวอย่างเช่น ในหนู motley mice (*Lemniscomys striatus*) ที่ได้รับโอโอซิสต์ของโปรโตซัว *E. telekii* n. sp. จำนวน 5,000 oocysts หลังจากได้รับเชื้อแล้ว หนูทดลองมีอาการป่วยจากโรค coccidiosis และตายภายใน 6 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ (Slapeta *et al.*, 2001) และการทดสอบศักยภาพในการก่อโรคในหนูหริ่งบ้าน (*M. musculus*) ภายหลังจากได้รับโอโอซิสต์ของโปรโตซัว *E. krijgsmani* 10⁵ โอโอซิสต์ จะแสดงอาการป่วยของโรค coccidiosis และตายภายใน 9-10 วัน หลังจากได้รับเชื้อ และเมื่อเพิ่มปริมาณโอโอซิสต์เป็น 10⁶ โอโอซิสต์ หนูทดลองมีอาการป่วยและตายเร็วขึ้น ภายใน 3 วันหลังจากได้รับเชื้อ (Matsui *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับการระบาดของโรค coccidiosis จากเชื้อโปรโตซัว *E. nieschulzi* ในหนูทดลอง albino outbred rats ที่ประเทศอินเดีย พบว่ามีหนูทดลองที่ติดเชื้อมีอาการป่วยและตายจำนวน 30 ตัว จากหนูทดลองที่ติดเชื้อทั้งหมด 50 ตัว ซึ่งโดยปกติเชื้อโปรโตซัว *E. nieschulzi* เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในหนูตามธรรมชาติ แต่จะไม่พบในหนูทดลองที่ปลอดเชื้อ และพบว่าหนูทดลองทั้งหมดตายภายใน 3 วัน ภายหลังจากที่แสดงอาการป่วยของโรค coccidiosis (Patra *et al.*, 2011)

ลักษณะพยาธิสภาพ

หนูทดลองที่ป่วยและตายจากเชื้อโปรโตซัว *Eimeria* ทั้ง 7 ไอโซเลท จากการทดลองในครั้งนี้ มีอาการตาแฉะ ซึม ไม่กินน้ำและอาหาร น้ำหนักลด ลักษณะพยาธิสภาพที่พบ มีลักษณะลำไส้อักเสบ กระเพาะอาหารพองลม (figure 3 and 4) ส่วนผลการตรวจทางพยาธิวิทยา (histopathology) บริเวณลำไส้ใหญ่ พบลักษณะเซลล์หลุดลอกออกและพบเซลล์ merozoites เป็นจำนวนมาก (figure 5) เมื่อเชื้อโปรโตซัวกลุ่ม *Eimeria* เมื่อเข้าสู่ร่างกายของหนูที่เป็นสัตว์อาศัยแล้ว จะเข้าสู่เซลล์อ่อนที่กำลังพัฒนาในระบบทางเดินอาหาร หรือเยื่อบุผิวบริเวณลำไส้ เข้าทำลายบริเวณเยื่อเมือกและเซลล์บุผิวลำไส้ ทำให้เกิดอาการของโรค coccidiosis (Slapeta *et al.*, 2001) ลักษณะอาการของโรค coccidiosis ทำให้หนูที่ติดเชื้อมีอาการท้องเสีย ถ่ายเป็นเลือด น้ำหนักลด ร่างกายอ่อนแอ การเคลื่อนไหวผิดปกติ (ataxia) ขนร่วง (Slapeta *et al.*, 2001; Matsui *et al.*, 2005) เมื่อดูลักษณะพยาธิสภาพของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ที่ติดเชื้อเกิดการหลุดลอกและมีการสร้างเซลล์ใหม่มาแทนที่ (crypt hyperplasia) villus มีอาการฝ่อ (villus atrophy) เซลล์ลำไส้มีอาการอักเสบ ตกเลือด เลือดคั่ง บวมน้ำ และพบเชื้อที่กำลังพัฒนาในระยะ endogenous stages (merozoites หรือ schizont) เป็นจำนวนมาก (Matsui *et al.*, 2005; Patra *et al.*, 2011)

การจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา

การแบ่งกลุ่มโปรโตซัว *Eimeria* นั้นใช้การมีหรือไม่มีของ oocyst residuum (OR) เป็นเกณฑ์ ในการจำแนกชนิดร่วมกับความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของสัตว์อาศัย (Reduker *et al.*, 1987; Hnida and Duszynski, 1999; Zhao and Duszynski, 2001a) โดยที่ OR นั้นเป็น lipid granule ที่มีอยู่ในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ของไซโกตซึ่งเป็นโครงสร้างที่ถูกสร้างขึ้นมาระหว่างการพัฒนาเป็น sporogony ในระยะ sporulation (Kheysin, 1967) ซึ่งการจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์นั้น การวัดขนาดและรูปร่างของโอโอซิสต์เพียงอย่างเดียวนั้นไม่เพียงพอ (Duszynski, 1971; Long and Joyner, 1984; Parker and Duszynski, 1986) ต้องใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโอโอซิสต์และการมีหรือไม่มีโครงสร้างต่างๆของโอโอซิสต์ ร่วมกับข้อมูลทางชีวโมเลกุลในการจำแนกชนิดของโปรโตซัวในกลุ่มนี้ (Slapeta *et al.*, 2001; Kvicerova *et al.*, 2011; Al-Habsi *et al.*, 2017)

ตัวอย่างโอโอซิสต์ที่คัดแยกได้จากมูลหนูท้องขาวและหนูหริ่งศัตรูพืชจากธรรมชาติ ที่มีศักยภาพ ทำให้หนูทดลองที่ป่วยและตายได้ในครั้งนี้ จำนวน 7 ไอโซเลท ใช้วิธีและหลักเกณฑ์การจำแนกชนิดของโปรโตซัวในวงศ์ Eimeriidae ตามวิธีของ Duszynski and Wilber 1997 พบว่าตัวอย่างเชื้อโปรโตซัวไอโซเลท R.an KW03, R.an MJ04 ที่คัดแยกจากมูลหนูป่าอินโดจีน (*R. andamansis*) โอโอซิสต์มีรูปร่างแบบ ovoid มีค่า shape index (SI) 1.3 มีผนังโอโอซิสต์ 2 ชั้น ไม่มี oocyst

residuum (OR) micropyle (MP) และ polar granule (PG) และไอโซเลท R.n Bkk02 ที่คัดแยกจากมูลหนูนอร์เว (*R. norvegicus*) โอโอซิสต์มีรูปร่างแบบ ovoid มีค่า shape index (SI) 1.3 มีผนังโอโอซิสต์ 2 ชั้น มี polar granule และ sporocyst residuum (SR) แต่ไม่มี oocyst residuum และ micropyle ตัวอย่างเชื้อโปรโตซัวไอโซเลท M.pa MJ01 ที่คัดแยกจากมูลหนูหริ่งป่าขี้เหล็ก (*M. pahari*) โอโอซิสต์มีรูปร่างแบบ subspherical-ovoid มีค่า shape index 1.2 มีผนังโอโอซิสต์ 2 ชั้น มี sporocyst residuum ไม่มี oocyst residuum, micropyle และ polar granule ขณะเดียวกันไอโซเลท R.r K11 01 ที่คัดแยกจากมูลหนูท้องขาวบ้าน (*R. rattus*) โอโอซิสต์มีรูปร่างแบบ subspherical มีค่า shape index 1.1 มีผนังโอโอซิสต์ 2 ชั้น มี polar granule, sporocyst residuum และ stieda body แต่ไม่มี oocyst residuum และ micropyle ในขณะที่ตัวอย่างเชื้อโปรโตซัวอีก 2 ไอโซเลท ได้แก่ M.ce NKW05 และ M.ce NKW04 ที่คัดแยกจากมูลหนูหริ่งนาทางสั้น (*M. cervicolor*) โอโอซิสต์มีรูปร่างแบบ ovoid มีค่า shape index 1.4 และ 1.3 ตามลำดับ มีผนังโอโอซิสต์ 2 ชั้น มี polar granule, micropyle และ micropolar cap (MC) แต่ไม่มี oocyst residuum (table 3 and figure 2) ซึ่งลักษณะของโอโอซิสต์ดังกล่าวนี้ยังไม่สามารถระบุชนิดให้ชัดเจนได้ ดังนั้นจึงจำแนกชนิดทั้ง 4 ไอโซเลท (M. pa MJ01, R.r K11 01, M.ce NKW05 และ M.ce NKW04) ดังกล่าวเป็น *Eimeria* sp. เพื่อยืนยันผลทางชีวโมเลกุลต่อไป

การศึกษาทางชีวโมเลกุล

ลำดับเบสในบริเวณที่นิยมใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของคือคซิดีโปรโตซัว ได้แก่ ไซโตโครม ซี ออกซิเดส (Kvicerova and Hypsa, 2013) และบริเวณอื่นในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Hikosaka *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011) ไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ (18S rDNA) (Tenter and Johnson, 1997; Morrison *et al.*, 2004) และ plastid open reading frame (ORF470) (Zhao and Duszynski, 2001b; Matsubayashi *et al.*, 2005; Kvicerova and Hypsa, 2013) ในขณะที่บริเวณยีนเครื่องหมายในตำแหน่งอื่นๆ ได้แก่ internal transcribed spacer region (ITS), ribotyping, isoenzymes และ microsatellites ไม่สามารถจำแนกชนิด และ ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของคือคซิดีโปรโตซัวได้ (Ogedengbe *et al.*, 2011)

การศึกษาทางชีวโมเลกุลของเชื้อโปรโตซัว *Eimeria* 7 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ในการศึกษานี้ ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ในบริเวณ ไซโตโครม ซี ออกซิเดส (cox1) ในไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ IE cox1 for/IE cox1 rev ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส และนำไปหาลำดับเบสหลังจากนั้น ตัดส่วนลำดับเบสที่ไม่

ชัดเจน บริเวณปลาย 5' และ 3' แล้วได้ลำดับเบสความยาว 450 คู่เบส โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับ ลำดับเบสของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* และ *Isospora* ที่มีในฐานข้อมูล GenBank ได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรม/ระยะห่างทาง พันธุกรรม และการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของลำดับเบส

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณไซโตโครม ซี ออกซิเดส จากลำดับเบสของ โปรโตซัว *Eimeria* จำนวน 7 ตัวอย่าง ที่มีศักยภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ในการศึกษารั้งนี้ เปรียบเทียบกับลำดับเบสของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* และ *Isospora* ที่มีในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 31 ตัวอย่าง รวมลำดับเบสที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 38 ตัวอย่าง โดยการสร้างแผนภูมิ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 3 วิธี ได้แก่ NJ/ML และ BI (figure 7) พบว่าทั้ง 3 วิธีให้แผนภูมิผลการ วิเคราะห์ในรูปแบบเดียวกัน สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ ตามชนิดของสัตว์อาศัยที่โปรโตซัวสกุล *Eimeria* และ *Isospora* อาศัยอยู่นั้น ได้แก่ clade I (rodent host) เป็นกลุ่มที่มีสัตว์ฟันแทะเป็นสัตว์ อาศัย clade II (lagomorpha host) เป็นกลุ่มที่มีกระต่ายเป็นสัตว์อาศัย clade III (avian host) เป็นกลุ่มที่มีสัตว์ปีกเป็นสัตว์อาศัย clade IV (carnivora host) เป็นกลุ่มที่มีสัตว์ฟันเขี้ยวเป็นสัตว์ อาศัย และ clade V (cattle host) เป็นกลุ่มที่มีสัตว์เท้ากีบเป็นสัตว์อาศัย จากผลการวิเคราะห์พบว่า โปรโตซัวภายใน clade I มีค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรม (nucleotide identity) และค่า ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เท่ากับร้อยละ 87.7-99.7 และ 0.045-0.131 ตามลำดับ (table 4) และเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างโปรโตซัวใน clade I กับ clade II – clade V พบว่า มีค่า ร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรม และค่าระยะห่างทางพันธุกรรม อยู่ที่ร้อยละ 84.8-91.8 และ 0.082-0.164 ตามลำดับ (table 4) จากผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถ จัดกลุ่มโปรโตซัวสกุล *Eimeria* และ *Isospora* ได้ตามชนิดของสัตว์อาศัย ซึ่งโปรโตซัวใน กลุ่ม นี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของสัตว์อาศัยเป็นอย่างมาก (Joyner, 1982; Levine, 1982; Long and Joyner, 1984; Zhao and Duszynski, 2001b) ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่ม จำแนก ความแตกต่างของโปรโตซัวในสกุล *Eimeria* และ *Isospora* ได้ (Joyner, 1982)

Clade I ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีสัตว์ฟันแทะเป็นสัตว์อาศัย (rodent *Eimeria*) นั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ OR- rodent cluster และ OR+ rodent cluster ซึ่งโอโอซิสต์ของโปรโตซัว *Eimeria* ทั้ง 7 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้และมีศักยภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตาย ในการศึกษารั้งนี้ (R.an KW03, R.an MJ04, R.n. Bkk02, M.pa MJ01, R.r K11 01, M.ce NKW05 และ M.ce NKW04) จัดอยู่ในกลุ่ม OR- rodent cluster โดยมี 3 ไอโซเลท ได้แก่ R.an KW03, R.an

MJ04 และ R.n. Bkk02 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยของ *E. falcifformis* (figure 7) ซึ่งไอโซเลท R.an KW03 และ R.an MJ04 มีค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรม และค่าระยะห่างทางพันธุกรรม เมื่อเปรียบเทียบกับ *E. falcifformis* (KX495129) อยู่ที่ร้อยละ 99.7 และ 0.003 ตามลำดับ ขณะที่ไอโซเลท R.n. Bkk02 เมื่อเปรียบเทียบกับ *E. falcifformis* (KX495129) มีค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรม และค่าระยะห่างทางพันธุกรรม อยู่ที่ร้อยละ 99.4 และ 0.006 ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานวิทยาของโอโอซิสต์และชนิดของสัตว์อาศัยของ *E. falcifformis* พบว่ามีรูปร่างของโอโอซิสต์และชนิดของสัตว์อาศัยที่ต่างกัน โดยที่โอโอซิสต์ของ *E. falcifformis* นั้นมีรูปร่าง ellipsoidal และมีหนูหริ่งบ้าน (*M. musculus*) เป็นสัตว์อาศัย (Mesfin and Bellamy, 1978) ในขณะที่โปรโตซัว *Eimeria* ทั้ง 3 ไอโซเลทจากการศึกษาครั้งนี้ มีหนูในสกุลหนูท้องขาว (*Rattus*) ได้แก่ หนูป่าอินโดจีน (*R. andamanensis*) และหนูนอร์เว (*R. norvegicus*) เป็นสัตว์อาศัย อีกทั้งผลการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (amino acid translation) จากลำดับเบสบริเวณ ไซโตโครม ซี ออกซิเดส จำนวน 145 รหัส ของโปรโตซัว *Eimeria* ทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ มีการแปลรหัสต่างกับ *E. falcifformis* ในตำแหน่งที่ 352 ซึ่ง *E. falcifformis* มีการแปลรหัสเป็น I (Isoleucine) ขณะที่ทั้ง 3 ไอโซเลท แปลรหัสเป็น T (threonine) (table 5) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าโปรโตซัว *Eimeria* ทั้ง 3 ไอโซเลท (R.an KW03, R.an MJ04 และ R.n. Bkk02) นั้นไม่ใช่ *E. falcifformis*

ขณะเดียวกันโปรโตซัว *Eimeria* ไอโซเลท M.pa MJ01 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยของ *E. burdai* (figure 7) และเมื่อเปรียบเทียบกับค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรม และค่าระยะห่างทางพันธุกรรม กับ *E. burdai* (JQ993709) มีค่าอยู่ที่ร้อยละ 99.7 และ 0.003 ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาจากลักษณะของโอโอซิสต์และชนิดของสัตว์อาศัย ระหว่างไอโซเลท M.pa MJ01 กับ *E. burdai* พบว่ามีลักษณะโครงสร้างของโอโอซิสต์และชนิดของสัตว์อาศัยที่แตกต่างกัน โดยที่ *E. burdai* นั้นมีรูปร่างเป็น subspherical มี polar granule และมีหนู subterranean African silvery mole-rat (*Heliophobious argenteocinereus*) เป็นสัตว์อาศัย (Koudela et al., 2000; Kvicerova and Hypsa, 2013) ขณะที่ไอโซเลท M.pa MJ01 นั้นมีรูปร่างเป็น subspherical- ovoid ไม่มี polar granule (table 3 and figure 2) และมีหนูหริ่งป่าเล็กขนสั้น (*M. pahari*) เป็นสัตว์อาศัย อีกทั้งผลการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจากลำดับเบสบริเวณ ไซโตโครม ซี ออกซิเดส พบว่ากรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 319 และ 352 นั้น ไอโซเลท M.pa MJ01 มีการแปลรหัสเป็น T (threonine) ทั้ง 2 ตำแหน่ง ขณะที่ *E. burdai* (JQ993709) แปลรหัสเป็น S (serine) และ I (Isoleucine) จึงสามารถสรุปได้ว่า เชื้อโปรโตซัว *Eimeria* ไอโซเลท M.pa MJ01 นั้นไม่ใช่ *E. burdai*

ในขณะที่โปรโตซัว *Eimeria* ไอโซเลท RrK11 01, MceNKW05 และ MceNKW04 นั้นถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยของ *E. papillata* (figure 7) เมื่อเปรียบเทียบกับทั้ง 3 ไอโซเลทกับ *E. papillata* (KT184377) มีค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรม และค่าระยะห่างทางพันธุกรรม อยู่ที่ร้อยละ

99.7 และ 0.003 ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาจากลักษณะของโอโอซิสต์และชนิดของสัตว์อาศัย พบว่า ทั้ง 3 โอโอซิสต์ นั้นโอโอซิสต์มีผนัง 2 ชั้น (bi layered) และมีโครงสร้างลักษณะโอโอซิสต์ที่แตกต่างกับ *E. papillata* ในบางโครงสร้าง อีกทั้งมีหนูท้องขาวบ้าน (*R.rattus*) และหนูหริ่งนาทางสั้น (*M. cervicolor*) เป็นสัตว์อาศัย (table 3 and figure 2) ในขณะที่ *E. papillata* นั้นมีผนังโอโอซิสต์ ชั้นเดียว (single layered) และมีหนูหริ่งบ้าน (*M. musculus*) เป็นสัตว์อาศัย (Ernst et al., 1971; Pellerdy, 1974) และผลการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจากลำดับเบสบริเวณไซโตโครม ซี ออกซิเดส พบว่ากรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 352 โปรโตซัว *Eimeria* ทั้ง 3 โอโอซิสต์ นั้นมีการแปลรหัสเป็น T (threonine) ขณะที่ *E. papillata* (KT184377) แปลรหัสเป็น I (Isoleucine) จึงสามารถสรุปได้ว่า เชื้อโปรโตซัว *Eimeria* ทั้ง 3 โอโอซิสต์ นั้นไม่ใช่ *E. papillata* แต่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้หลักเกณฑ์วิธีของ Kvicerova and Hypsa, 2013 ในการตั้งชื่อโปรโตซัวกลุ่ม rodent *Eimeria* ที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้อย่างชัดเจน ทั้ง 7 โอโอซิสต์ ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ โดยให้ชื่อเป็น *Eimeria* sp. ex. *Rattus andamanensis* isolates R.an KW03, *Eimeria* sp. ex. *Rattus andamanensis* isolates R.an MJ04, *Eimeria* sp. ex. *Rattus norvegicus* isolates R.n. Bkk02, *Eimeria* sp. ex. *Rattus rattus* isolate R.r K11 no 01, *Eimeria* sp. ex. *Mus cervicolor* isolate M.ce NKW05 และ *Eimeria* sp. ex. *Mus cervicolor* isolate M.ce NKW04 ตามลำดับ

ปัญหาที่สำคัญในการจัดจำแนกชนิดและการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของคือคหิเตีย โปรโตซัว ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสบริเวณดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ได้แก่บริเวณ 18S rDNA และ ไซโตโครม ซี ออกซิเดส (mitochondrial DNA) นั้น ในปัจจุบันข้อมูล ลำดับเบสดังกล่าวของโปรโตซัวกลุ่มนี้ ในฐานะข้อมูลยังมีจำนวนน้อยต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมอีกมาก เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) ในการจัดกลุ่ม จำแนกชนิดและการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของคหิเตียโปรโตซัวต่อไป (Chapman et al., 2013; Berto et al., 2014) จึงทำให้การจำแนกชนิดทางชีวโมเลกุลของโอโอซิสต์ของโปรโตซัวในกลุ่ม rodent *Eimeria* ที่มีศักยภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ จากการศึกษาค้นคว้า ทั้ง 7 โอโอซิสต์นั้น ยังไม่สามารถระบุ สปีชีส์ที่ชัดเจนได้ แต่เมื่อพิจารณาผลการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยาจากลักษณะ ต่างๆของโอโอซิสต์ ร่วมกับการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล อย่างน้อยทำให้ทราบว่าโปรโตซัว *Eimeria* ทั้ง 7 โอโอซิสต์ นั้นเป็น *Eimeria* sp. และไม่ตรงกับสปีชีส์ใดๆของโปรโตซัว *Eimeria* จากฐานข้อมูลที่มี ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงควรเพิ่มความยาวของลำดับเบสบริเวณไซโตโครม ซี ออกซิเดส ให้มีความยาว ที่มากขึ้นและควรเพิ่มบริเวณที่ใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม ได้แก่ 18S rDNA และ ORF470 ในการจำแนกชนิดและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโปรโตซัวในกลุ่มนี้ เพื่อให้ผลการจำแนกสปีชีส์มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ดีในการศึกษาค้นคว้า นี้ ยังไม่ได้ทำการทดลองเพิ่มปริมาณโอโอซิสต์ของโปรโตซัว *Eimeria* ที่มีศักยภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูทดลอง เพื่อให้มี

ปริมาณโอโอซิสต์เพียงพอ ต่อการทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคในหนูทดลองได้ครบทุกกรรมวิธี และสามารถคงศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคไว้ได้ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ภายหลังจากที่หนู motley mice (*L. striatus*) ที่ได้รับโอโอซิสต์ของเชื้อ *E. telekii* n. sp. จำนวน 1,000 โอโอซิสต์ หลังจากได้รับเชื้อแล้ว 4-5 วัน หนูทดลองจะขับโอโอซิสต์ออกมาพร้อมมูล ประมาณร้อยละ 40-50 และพบปริมาณโอโอซิสต์ถูกขับออกมามากที่สุด ที่ระยะเวลา 6 วันหลังจากได้รับเชื้อ หลังจากนั้นปริมาณโอโอซิสต์ที่ถูกขับออกมา จะค่อยๆลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จนกระทั่งไม่พบโอโอซิสต์ในมูลหนูทดลอง หลังจากได้รับเชื้อแล้ว 12 วัน (Slapeta *et al.*, 2001) ในขณะที่หนูหริ่งบ้าน (*M. musculus*) ภายหลังจากได้รับโอโอซิสต์ของเชื้อ *E. kriegsmanni* 10^1 - 10^5 โอโอซิสต์ ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ถึงวันที่ 7 เชื้อจะมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในลำไส้ใหญ่ (cecum, colon และ rectum) ของหนู และจะเริ่มขับโอโอซิสต์ออกมาพร้อมกับมูล ในวันที่ 7 หลังจากได้รับเชื้อ และพบมีการขับโอโอซิสต์ออกมาปริมาณสูงสุด 10^6 โอโอซิสต์ ในวันที่ 8 หลังจากได้รับเชื้อ หลังจากนั้นปริมาณโอโอซิสต์ที่ถูกขับออกมา จะค่อยๆลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จนกระทั่งไม่พบโอโอซิสต์ในมูลหนูทดลอง หลังจากได้รับเชื้อแล้ว 12-14 วัน (Matsui *et al.*, 2005) ด้วยเหตุนี้เองจึงควรควรมีการศึกษาต่อยอด ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ ในเรื่องของความจำเพาะเจาะจงของเชื้อกับชนิดของสัตว์อาศัย ความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม วิธีการเพิ่มปริมาณเชื้อให้สามารถคงศักยภาพความรุนแรง การก่อโรคในหนูทดลอง ทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ รวมถึงการทดลองในด้านต่างๆ เพื่อที่จะนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์กำจัดหนูศัตรูพืชต่อไป

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ : การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2561 ได้ดำเนินการ ดักหนูท้องขาว และหนูหริ่งศัตรูพืช จำนวน 237 ตัว สามารถคัดแยกโอโอซิสต์จากมูลหนูที่ดักได้ จำนวน 58 ไอโซเลท จากตัวอย่างหนูท้องขาว 133 ตัว พบโอโอซิสต์ 27 ไอโซเลท และจากตัวอย่างหนูหริ่ง 104 ตัว พบโอโอซิสต์ 31 ไอโซเลท จากพื้นที่เกษตร จำนวน 17 แหล่ง (15 จังหวัด) ใน 5 ภูมิภาคของประเทศไทย โอโอซิสต์ทั้ง 58 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้เป็นโปรโตซัว *Eimeria* 55 ไอโซเลท และ *Isospora* 3 ไอโซเลท และพบโอโอซิสต์ของเชื้อ *Eimeria* จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ระดับความเข้มข้น 500 – 50,000 โอโอซิสต์ มีศักยภาพสามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ ร้อยละ 20-40 ภายใน 2-10 วัน หลังจากได้รับเชื้อ ผลการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยาของโอโอซิสต์ร่วมกับการศึกษาทางชีวโมเลกุล พบว่าเป็น *Eimeria* sp. ทั้ง 7 ไอโซเลท ได้แก่ *Eimeria* sp. ex. *Rattus andamanensis* isolates R.an KW03, *Eimeria* sp. ex. *Rattus andamanensis* isolates R.an MJ04, *Eimeria* sp. ex. *Rattus norvegicus* isolates R.n. Bkk02, *Eimeria* sp. ex. *Mus pahari* isolate M.pa MJ01, *Eimeria* sp. ex. *Rattus rattus* isolate R.r K11 no 01, *Eimeria* sp. ex. *Mus cervicolor* isolate M.ce NKW05 และ *Eimeria* sp. ex. *Mus cervicolor* isolate M.ce NKW04 ตามลำดับ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบโปรโตซัวสกุล *Eimeria* และ *Isospora* ในหนูท้องขาวและหนูหริ่งศัตรูพืช ในประเทศไทย ซึ่งโปรโตซัวสกุล *Isospora* นั้น มีโอกาสพบได้น้อยในธรรมชาติ ดังนั้น

จึงไม่เหมาะที่จะนำมาศึกษาเพื่อที่จะพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนู ในขณะที่โปรโตซัว *Eimeria* นั้น มีโอกาสพบได้มากกว่า อีกทั้งจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่ามี 7 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพสามารถทำให้หนู ทดลองป่วยและตายได้ แต่จำนวนโอโอซิสต์ของเชื้อที่คัดแยกได้จากหนูศัตรูพืชในธรรมชาติ นั้นมี จำนวนน้อยทำให้ไม่สามารถทดสอบความรุนแรงในการก่อโรครักกับหนูทดลอง ได้ครบทุกกรรมวิธี ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาและทำการวิจัยต่อยอดผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อให้สามารถพัฒนาเป็น สารชีวภัณฑ์กำจัดหนูศัตรูพืช ที่มีประสิทธิภาพสูงและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : นำไปเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาวิจัยและพัฒนา ต่อยอด เพื่อประยุกต์ใช้ผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนูต่อไปในอนาคต

11. คำขอบคุณ : ขอขอบคุณ คุณสิทธิศักดิ์ แสไพศาล คุณกาญจนา วาระวิชนี และคุณแสนชัย คำหล้า กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้ เครื่อง thermal cyler ในการทดลองทางชีวโมเลกุล

ขอขอบคุณ คุณทศวรรณ พุ่มกาหลง ที่ให้ความช่วยเหลือในการผ่าซากชันสูตร เพื่อดูพยาธิสภาพหลังการตาย

ขอขอบคุณ คุณณัฐกานต์ ธาแก้ว ที่ให้ความช่วยเหลือในการสกัดดีเอ็นเอ และเตรียม ตัวอย่างในการศึกษาทางชีวโมเลกุล

ขอขอบคุณ คุณศุภกร วงศ์เรืองพิบูลย์ ที่ช่วยแนะนำการใช้โปรแกรม PAUP ในการ วิเคราะห์ผลข้อมูลทางชีวโมเลกุล

ขอขอบคุณ คุณบรรจง บุญครอบ คุณวิชา สีแจ่ม คุณธนาภรณ์ ภัคดีสุข คุณเจริญศักดิ์ กันต่าย และคุณกุลธิดา เจนสิริโสภณ ที่ให้ความช่วยเหลือในการดักหนูและเลี้ยงหนู ทดลอง

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตรที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่มีส่วนร่วม ให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง :

ยูลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด. 2539a.

ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูพุกใหญ่. รายงานผลการวิจัย ปี 2539.

กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 255-256.

ยูลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด. 2539b.

ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนอร์เวย์. รายงานผลการวิจัย ปี 2539.

กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 257.

ยวาลักษณ์ ขอประเสริฐ ปราสาททอง พรหมเกิด กรแก้ว เสือสะอาด เสริมศักดิ์ หงส์นาค และ
ทรงทัพ แก้วตา. 2540. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนาใหญ่.
รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกัญและสัตววิทยา
กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 10-16.

ยวาลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค กรแก้ว เสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์
ปิยานี หนูภาพ และพวงทอง บุญทรง. 2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยา
การเกษตร กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตร
แห่งประเทศไทย. 136หน้า.

Al-Habsi, K., R. Yang, U. Ryan, D.W. Miller, C. Jacobson. 2017. Morphological and
molecular characterization of three *Eimeria* species from captured rangeland
goats in Western Australia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and
Reports*. 9: 75-83.

Ball, S. J. and P. Daszak. 1997. *Isospora tiaris* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from
the sooty grassquit (*Tiaris fuliginosa*) a passeriform bird of South America.
Journal of Parasitology. 83: 465-466.

Barnard, W.P., J.V. Ernst and R.O. Stevens. 1971. *Eimeria palustris* sp. n. and *Isospora
hammondi* sp. n. (Coccidia: Eimeriidae) from the marsh rice rat, *Oryzomys
palustris* (Harlan) (subscription required). *The Journal of Parasitology*. 57:
1293-1296.

Berto, B. P., L. M. C. Balthazar, W. Flausina and C. W. G. Lopes. 2009. Three new
species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the
buffy-fronted seedeater *Sporophila Frontalis* (Verreaux, 1869) (Passeriformes:
Emberizidae) in South America. *Systematic Parasitology*. 73: 65-69.

Berto, B. P., D. McIntosh and C.W.G. Lopes. 2014. Studies on coccidian oocysts
(Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*.
23: 1-15.

- Beaver, P.C. and J.R. Maleckar. 1981. *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley (1975) 1976. *Sarcocystis villivillosi* N, and *Sarcocystis zamani* N.: Development, morphology and persistence in the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. Journal of Parasitology. 67: 241-526.
- Chapman, H.D., J.R. Barta, D. Blake, A. Gruber, M. Jenkins and N.C. Smith. 2013. A selective review of advances in coccidiosis research. Advances in Parasitology. 83: 93-171.
- Duszynski, D.W. 1971. Increase in size of *Eimeria separate* oocysts during patency. Journal of Parasitology. 57: 948-952.
- Duszynski, D.W. and P.G. Wilber. 1997. A Guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. Journal of Parasitology. 83: 333-336.
- Ernst, J.V., B. Chobotar and D.M. Hammond. The oocysts of *Eimeria vermiformis* sp. n. and *E. papillata* sp. n. (protozoa: Eimeriidae) from the mouse *Mus musculus*. Eukaryotic Microbiology. 18: 221-223.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences. A maximum likelihood approach. Journal of Molecular Evolution. 17: 368-376.
- Hikosaka, K., Y. Nakai, Y. Watanabe, S.I. Tachibana, N. Arisue, N.M.Q. Palacpac, T. Toyama, H. Honma, T. Horii, K. Kita and K. Tanabe. 2010. Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. Mitochondrion. 11: 273-278.
- Hnida, J.A. and D.W. Duszynski. 1999. Taxonomy and phylogeny of some *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) species of rodents as determined by polymerase chain reaction/restriction fragment-length polymorphism analysis of 18S rDNA. Parasitology Research. 85: 887-894.
- Jaekel, T., H. Burgstaller and W. Frank. 1996. *Sarcocystis singaporensis*: Studies on host specificity, pathogenicity, and potential use as a biocontrol agent of wild rats. Journal of Parasitology. 82: 280-287.
- Joyner, L.P. 1982. Host and site specificity. The biology of the coccidia. University Park Press, pp. 35-62.

- Kheysin, E.M. 1967. Life cycles of coccidia of domestic animal. University Park Press. Baltimore. pp. 35-62.
- Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111–120.
- Koudela, B., R. Sumbera and F. Sedlacek. 2000. *Eimeria burdai* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new parasite species from subterranean African silvery mole-rat, *Heliophobius argenteocinereus*. *Folia Parasitologica*. 47: 97-99.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- Kvicerova, J., V. Mikes and V. Hypsa. 2011. Third lineage of rodent eimerians: morphology phylogeny and re-description of *Eimeria myoxi* (Apicomplexa: Eimeriidae) from *Eliomys quercinus* (Rodentia: Gliridae). *Parasitology*. 138: 1217-1223.
- Kvicerova, J. and V. Hypsa. 2013. Host-parasite incongruences in rodent *Eimeria* suggest significant role of adaptation rather than cophylogeny in maintenance of host specificity. *PLoS ONE*. 8: e63601.
- Levine, N.D. 1982. *Isospora passeris* n. sp. from the house sparrow *Passer domesticus*, *I. lacazei* and related apicomplexan Protozoa. *Transactions of the American Microscopical Society*. 101: 66-74.
- Lin R.Q., L.L. Qiu, G.H. Liu, X.Y. Wu, Y.B. Weng, W.Q. Xie, J. Hou, H. Pan, Z.G. Yuan, F.C. Zou, M. Hu and X.Q. Zhu. 2011. Characterization of the complete mitochondrial genomes of five *Eimeria* species from domestic chickens. *Gene*. 480: 28-33.
- Lindsay, D. S. and B. L. Blagurn. 1994. Biology of mammalian *Isospora*. *Parasitology Today*. 10: 214-220.
- Long, P. L. and L. P. Joyner. 1984. Problems in the identification of species of *Eimeria*. *The Journal of Protozoology*. 31: 535-541.

- Matsubayashi, M., K. Takami, N. Abe, I. Kimata, H. Tani, K. Sasai and E. Baba. 2005. Molecular characterization of crane coccidian, *Eimeria gruis* and *E. reichenowi*, found in feces of migratory cranes. *Parasitology Research*. 97: 80-83.
- Matsui, T., T. Fujino, F. Kobayashi, T. Morita and S. Imai. 2005. Life cycle of *Eimeria krijgsmani*-like coccidium in the mouse (*Mus musculus*). *The Journal of Veterinary Medical Science*. 68: 331-336.
- Mesfin, G.M. and J.E. Bellamy. 1978. The life cycle of *Eimeria falciformis* var. *pragensis* (sporozoa: coccidian) in the mouse, *Mus musculus*. *Journal of Parasitology*. 64: 696 – 705.
- Modry, D., B. Koudela, R. M. Al-Oran, Z. S. Amr and D. Dolezel. 1998. *Isoospora ptyodactyli* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) a new coccidian parasite of the fanfooted gecko *Ptyodactylus puisauxi* Boutan, 1893 (Reptilia: Gekkonidae) from Jordan. *Systematic Parasitology*. 39: 45-48.
- Morrison, D.A., S. Bornstein, P. Thebo, U. Wernery, J. Kinne and J.G. Mattsson. 2004. The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidian (Sporozoa). *International Journal for Parasitology*. 34: 501-514.
- Mundt, H-C., A. Joachim, A. Dauschies and M. Zimmermann. 2003. Population biology studies on *Isoospora suis* in piglets. *Parasitology Research*. 90: 158-159.
- Ogedengbe, J.D., R.H. Hanner and J.R. Barta. 2011. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal for Parasitology*. 8: 843-850.
- Page, R.D.M., 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computers Applications in the Biosciences*. 12: 357-358.
- Parker, B.P., D.W. Duszynski. 1986. Polymorphism of Eimerian oocysts: A dilemma posed by working with some naturally infected hosts. *Journal of Parasitology*. 72: 602-604.

- Patra, G., M. A. Ali, Kh. V. Chanu, J. Lalsiamthara, J.L. Kataria, S. Hazarika, D. Malswmkima, R. Ravindran and L. I. Devi. 2011. Molecular diagnosis of naturally infection with *Eimeria nieschulzi* in laboratory rats. 6: 43-52.
- Pellerdy, L.P. 1974. Coccidia and coccidiosis. 2nd ed., Akademiai Kiado, Budapest, 600.
- Reduker, D.W., D.W. Duszynski and T.L. Yates. 1987. Evolutionary relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa) infecting cricetid rodents. Canadian Journal of Zoology. 65: 722-735.
- Ronquist, F and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572-1574.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4: 406-425.
- Sayd, S. M. O. and U. Kawazoe. 1998. Experimental infection of swine by *Isospora suis* Biester., 1934 for species confirmation. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 93: 851-854.
- Slapeta, J.R., D. Modry, J. Votypka, M.J. Jirku, M. Obornik, J. Lukes and B. Koudela. 2001. *Eimeria telekii* n.sp. (Apicomplexa: Coccidia) from *Lemniscomys striatus* (Rodentia: Muridae): morphology, pathology and phylogeny. Parasitology. 122: 133-143.
- Swofford, D.L. 2001. PAUP*. Phylogenetic analysis using pasimony (and other method) version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. Molecular Biology and Evolution. 9: 678-687.
- Tenter, A.M. and A.M. Johnson. 1997. Phylogeny of the tissue cystforming coccidia. Advances in Parasitology. 39: 69-139.
- Upton, S.J., D.S. Lindsay, W.L. Current and J.V. Ernst. 1985. *Isospora masoni* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the cotton rat, *Sigmodon hispidus*. The Helminthological Society of Washington. 52: 60-63.

- Upton, S.J., S. C. Wilson, T. M. Norton and E. C. Greiner. 2001. A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae), from the Bali (Rothschild's) mynah *Leucopsar rothschildi* (Passeriformes: Sturnidae), and comments concerning the genera *Toxoplasma* Garnham, 1950 and *Isospora*. *Systematic Parasitology*. 48: 47-53.
- Wasae, B.M.A. 2004. *Isospora taizii* (Apicomplexa: Eimeriidae), a new coccidian parasite from the Yemen chameleon (*Chamaleon calyptratus*) (Sauria: Chamaeleonidae) in Taiz city, Yemen republic. *The Assiut University Bulletin for Environmental Researches*. 7: 29-35.
- Zhao, X., D.W. Duszynski. 2001a. Molecular phylogenies suggest the oocyst residuum can be used to distinguish two independent lineages of *Eimeria* spp. in rodents. *Parasitology research*. 87: 638-643.
- Zhao, X. and D.W. Duszynski. 2001b. Phylogenetic relationships among rodent *Eimeria* species determined by plastid ORF470 and nuclear 18S rDNA sequences. *International Journal for Parasitology*. 31: 715-719.

13. ภาคผนวก :

Table 1 Oocysts of coccidia species list indicating the location, host and type of oocysts in this study.

No	Country	Sampling location	Source	Locallity coordinating	Hosts (N)	Oocysts (N)	Host species (n)	Type of oocysts (n)
1	Eastern Thailand	BanSang, PrachinBuri	rice field	14.011897, 101.215630	7	2	Ricefield rat; <i>Rattus argentiventer</i> (5)	<i>Eimeria</i> sp. (2)
							Ryukyu mouse; <i>Mus caroli</i> (2)	N.A.
2	Central Thailand	Mueng, ChaiNat	rice field	15.19322, 100.123391	11	3	Ricefield rat; <i>Rattus argentiventer</i> (11)	<i>Eimeria</i> sp. (2)
								<i>Isospora</i> sp. (1)
		KlongLuang, Pathumthani	coconut farm	14.176516, 100.771015	8	3	Roof rat; <i>Rattus rattus</i> (8)	<i>Eimeria</i> sp. (3)
		Mueng, NakhonNayok	rice field	14.159897, 101.134773	15	6	Ricefield rat; <i>Rattus argentiventer</i> (5)	N.A.
							Ryukyu mouse; <i>Mus caroli</i> (10)	<i>Eimeria</i> sp. (6)
		Mueng, Kanchanaburi	lemongrass farm	14.111819, 99.4964177	16	6	Fawn-colored mouse; <i>Mus cervicolor</i> (16)	<i>Eimeria</i> sp. (5)
							<i>Isospora</i> sp. (1)	
		BanphotPhisai, NakhonSawan	soybean farm	15.967748, 99.897299	26	7	Ryukyu mouse; <i>Mus caroli</i> (12)	<i>Eimeria</i> sp. (3)
							Fawn-colored mouse; <i>Mus cervicolor</i> (14)	<i>Eimeria</i> sp. (4)
BanLat, Phetchaburi	peanut farm	13.072184, 99.887626	15	3	Roof rat; <i>Rattus rattus</i> (6)	N.A.		
					Fawn-colored mouse; <i>Mus cervicolor</i> (9)	<i>Eimeria</i> sp. (3)		
NongYang, UthaiTani	rice field	15.3228345, 99.6391726	10	1	Roof rat; <i>Rattus rattus</i> (5)	<i>Eimeria</i> sp. (1)		
					Fawn-colored mouse; <i>Mus cervicolor</i> (3)	N.A.		
					Polynesian rat; <i>Rattus exulans</i> (2)	N.A.		
Phranakhon, Bangkok	SanamLuang	13.755344, 100.493134	3	1	Norway rat; <i>Rattus norvegicus</i> (3)	<i>Eimeria</i> sp. (1)		

Table 1 Oocysts of coccidia species list indicating the location, host and type of oocysts in this study (continue).

No	Country	Sampling location	Source	Locallity coordinating	Hosts (N)	Oocysts (N)	Host (n)	Type of oocysts (n)
----	---------	-------------------	--------	------------------------	-----------	-------------	----------	---------------------

3	Northern Thailand	MaeRim, ChiangMai	Macadamia plantation	18.647326, 98.476465	21	5	Indochinese forest rat; <i>Rattus andamanensis</i> (16)	<i>Eimeria</i> sp. (4)	
		MaeWang, ChiangMai	Macadamia plantation	18.639482, 98.512224	6	4	Indochinese forest rat; <i>Rattus andamanensis</i> (6)	<i>Eimeria</i> sp. (4)	
		BoKluea, Nan	rice field	19.139900, 101.155085	7	1	Asian rat; <i>Rattus tanezumi</i> (7)	<i>Eimeria</i> sp. (1)	
		Phan, ChiangRai	rice field	19.528509, 99.744685	12	2	Asian rat; <i>Rattus tanezumi</i> (9) Ryukyu mouse; <i>Mus caroli</i> (3)	<i>Eimeria</i> sp. (2) N.A.	
			NamNao, Phetchabun	Macadamia plantation	16.945576, 101.612696	12	3	Indochinese forest rat; <i>Rattus andamanensis</i> (12)	<i>Eimeria</i> sp. (3)
			LomKao, Phetchabun	rice field	16.850098, 101.200224	16	3	Fawn-colored mouse; <i>Mus cervicolor</i> (13) Ryukyu mouse; <i>Mus caroli</i> (3)	<i>Eimeria</i> sp. (3) N.A.
4	NorthEast Thailand	Sikhio, NakhonRatchasima	corn field	14.872284, 101.650930	31	6	Fawn-colored mouse; <i>Mus cervicolor</i> (5)	<i>Eimeria</i> sp. (3)	
							Ryukyu mouse; <i>Mus caroli</i> (9)	<i>Iso spora</i> sp. (1), <i>Eimeria</i> sp. (1)	
							Ricefield rat; <i>Rattus argentiventer</i> (8)	N.A.	
							Roof rat; <i>Rattus rattus</i> (9)	<i>Eimeria</i> sp. (1)	
5	Southern Thailand	HatYai, SongKla	rice field	6.968445, 100.380445	9	2	Roof rat; <i>Rattus rattus</i> (9)	<i>Eimeria</i> sp. (2)	
		Sawi, Chumphon	oil palm plantation	10.188052, 99.109264	12	N.A.	Malayan wood rat, <i>Rattus tiomanicus</i> (12)	N.A.	

Table 2 Percent mortality of rodents at different concentration of oocysts suspension in 4 treatments after direct feeding.

— N.A., Not available

No.	number	Sampling location	Hosts	Type of oocysts	oocysts/ul	% Mortality after treatment				Range of mortality (days)
						T1 (500 oocysts)	T2 (5,000 oocysts)	T3 (50,000 oocysts)	T4 (control)	
1	R.a Pra 01	BanSang, PrachinBuri	<i>R. argentiventer</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	0	0	-
2	R.a Pra 02	BanSang, PrachinBuri	<i>R. argentiventer</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	0	0	-

*3	R.a Chai 01	Mueng, ChaiNat	<i>R. argentiventer</i>	<i>Eimeria</i> sp.	3	0	0	N.A.	0	-
*4	R.a Chai 02	Mueng, ChaiNat	<i>R. argentiventer</i>	<i>Isospora</i> sp.	1	0	0	N.A.	0	-
*5	R.a Chai 03	Mueng, ChaiNat	<i>R. argentiventer</i>	<i>Eimeria</i> sp.	1	0	0	N.A.	0	-
6	R.r K11 01	KlongLuang, Pathumthani	<i>R. rattus</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	30	0	3,4 and 10
*7	R.r K11 02	KlongLuang, Pathumthani	<i>R. rattus</i>	<i>Eimeria</i> sp.	1	0	0	N.A.	0	-
*8	R.r K11 03	KlongLuang, Pathumthani	<i>R. rattus</i>	<i>Eimeria</i> sp.	3	0	0	N.A.	0	-
*9	M.ca NKY 01	Mueng, NakhonNayok	<i>M. caroli</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	N.A.	0	-
*10	M.ca NKY 04	Mueng, NakhonNayok	<i>M. caroli</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	N.A.	0	-
*11	M.ca NKY 05	Mueng, NakhonNayok	<i>M. caroli</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	N.A.	0	-
*12	M.ca NKY 08	Mueng, NakhonNayok	<i>M. caroli</i>	<i>Eimeria</i> sp.	10	0	0	N.A.	0	-
*13	M.ca NKY 09	Mueng, NakhonNayok	<i>M. caroli</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	N.A.	0	-
14	M.ca NKY 10	Mueng, NakhonNayok	<i>M. caroli</i>	<i>Eimeria</i> sp.	250	0	0	0	0	-
*15	M.ce Khan 05	Mueng, Kanchanaburi	<i>M. cervicolor</i>	<i>Isospora</i> sp.	25	0	0	N.A.	0	-
16	M.ce Khan 12	Mueng, Kanchanaburi	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	425	0	0	0	0	-
*17	M.ce Khan 13	Mueng, Kanchanaburi	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	22	0	0	N.A.	0	-
*18	M.ce Khan 20	Mueng, Kanchanaburi	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	50	0	0	N.A.	0	-
*19	M.ce Khan 22	Mueng, Kanchanaburi	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	50	0	0	N.A.	0	-
*20	M.ce Khan 24	Mueng, Kanchanaburi	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	20	0	0	N.A.	0	-
21	M.ca NKW 01	BanphotPhisai, NakhonSawan	<i>M. caroli</i>	<i>Eimeria</i> sp.	150	0	0	0	0	-
*22	M.ca NKW 03	BanphotPhisai, NakhonSawan	<i>M. caroli</i>	<i>Eimeria</i> sp.	5	0	N.A.	N.A.	0	-

Table 2 Percent mortality of rodents at different concentration of oocysts suspension in 4 treatments after direct feeding (continue).

No.	Voucher number	Sampling location	Hosts	Type of oocysts	oocysts/ul	% Mortality after treatment				Range of mortality (days)
						T1 (500 oocysts)	T2 (5,000 oocysts)	T3 (50,000 oocysts)	T4 (control)	
*23	M.ca NKW 13	BanphotPhisai, NakhonSawan	<i>M. caroli</i>	<i>Eimeria</i> sp.	50	0	0	N.A.	0	-
24	M.ca NKW 23	BanphotPhisai, NakhonSawan	<i>M. caroli</i>	<i>Eimeria</i> sp.	670	0	0	0	0	-
*25	M.ce NKW04	BanphotPhisai, NakhonSawan	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	15	0	20	N.A.	0	3 and 7
*26	M.ce NKW05	BanphotPhisai, NakhonSawan	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	16	0	20	N.A.	0	7
*27	M.ce NKW07	BanphotPhisai, NakhonSawan	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	75	0	0	N.A.	0	-
*28	M.ce Pet 04	BanLat, Phetchaburi	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	N.A.	0	-

*29	M.ce Pet 08	BanLat, Phetchaburi	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	75	0	0	N.A.	0	-
*30	M.ce Pet 09	BanLat, Phetchaburi	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	3	0	N.A.	N.A.	0	-
31	R.r Uth 05	NongYang, UthaiTani	<i>R. rattus</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	0	0	-
*32	R.n Bkk 02	Phranakhon, Bangkok	<i>R. norvegicus</i>	<i>Eimeria</i> sp.	11	0	20	N.A.	0	3
*33	R.an MJ02	MaeRim, ChiangMai	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	1	0	N.A.	N.A.	0	-
34	R.an MJ04	MaeRim, ChiangMai	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	40	0	2,4,7 and 8
35	R.an MJ07	MaeRim, ChiangMai	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	75	0	0	0	0	-
36	R.an MJ15	MaeRim, ChiangMai	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	0	0	-
*37	M.pa MJ01	MaeRim, ChiangMai	<i>M. pahari</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	20	N.A.	N.A.	0	2 and 3
38	R.an KW01	MaeWang, ChiangMai	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	23	0	0	0	0	-
39	R.an KW03	MaeWang, ChiangMai	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	13	0	20	N.A.	0	6 and 7
40	R.an KW04	MaeWang, ChiangMai	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	0	0	-
*41	R.an KW06	MaeWang, ChiangMai	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	1	0	0	N.A.	0	-
42	R.ta Nan02	BoKluea, Nan	<i>R. tanezumi</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	0	0	-
43	R.ta CR07	Phan, ChiangRai	<i>R. tanezumi</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	0	0	-
44	R.ta CR08	Phan, ChiangRai	<i>R. tanezumi</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	0	0	-

Table 2 Percent mortality of rodents at different concentration of oocysts suspension in 4 treatments after direct feeding (continue).

No.	Voucher number	Sampling location	Hosts	Type of oocysts	oocysts/ul	% Mortality after treatment				Range of mortality (days)
						T1 (500 oocysts)	T2 (5,000 oocysts)	T3 (50,000 oocysts)	T4 (control)	
45	R.a NNPB01	NamNao, Phetchabun	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	22	0	0	0	0	-
*46	R.a NNPB04	NamNao, Phetchabun	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	3	0	0	N.A.	0	-
47	R.a NNPB05	NamNao, Phetchabun	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	0	0	-
*48	M.ce LKPB04	LomKao, Phetchabun	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	11	0	0	N.A.	0	-
*49	M.ce LKPB05	LomKao, Phetchabun	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	25	0	0	N.A.	0	-
*50	M.ce LKPB06	LomKao, Phetchabun	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	11	0	0	N.A.	0	-
*51	M.ce NKR01	Sikhio, NakhonRatchasima	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	11	0	0	N.A.	1	-
*52	M.ce NKR02	Sikhio, NakhonRatchasima	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	75	0	0	N.A.	0	-

*53	M.ce NKR03	Sikhio, NakhonRatchasima	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	22	0	0	N.A.	1	-
*54	M.ca NKR04	Sikhio, NakhonRatchasima	<i>M. caroli</i>	<i>Isospora</i> sp.	22	0	0	N.A.	2	-
*55	M.ca NKR06	Sikhio, NakhonRatchasima	<i>M. caroli</i>	<i>Eimeria</i> sp.	11	0	0	N.A.	3	-
56	R.r NKR04	Sikhio, NakhonRatchasima	<i>R. rattus</i>	<i>Eimeria</i> sp.	22	0	0	0	0	-
57	R.r SK05	HatYai, SongKla	<i>R. rattus</i>	<i>Eimeria</i> sp.	100	0	0	0	0	-
*58	R.r SK10	HatYai, SongKla	<i>R. rattus</i>	<i>Eimeria</i> sp.	2	0	0	N.A.	0	-

* The isolate of oocysts have insufficient concentration to all treatments.

N.A., Not available

Table 3 Comparison of morphological features measured in micrometers (M ± SD, measurement of oocyst has 5 replicates per sample) from 7 isolates of oocysts, can cause rodents to died in this study and 5 rodents *Eimeria* from the previous study.

No.	Voucher number / Acession number	Sampling location/ Origin	Hosts	Type of oocysts	Oocysts									Reference	
					OS	Length (min - max)	Width (min - max)	SI	OW (bl,sl)	OR	MP	PG	remark		
1	KX495129	Australia	<i>M. musculus</i>	<i>E. falciformis</i>	ellipsoidal		21.1 (16-25)	18.3 (15-22)	1.1	bl	-	-	+	-	A
2	Ran KW03	MaeWang, ChiangMai	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	ovoid		29.11 ± 1.80 (26.73-31.68)	21.58 ± 2.47 (19.80-25.74)	1.3	bl	-	-	+	-	This study
3	Ran MJ04	MaeRim, ChiangMai	<i>R. andamanensis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	ovoid		11.48 ± 2.48 (7.92-13.86)	8.51 ± 1.66 (5.94-9.90)	1.3	bl	-	-	+	-	This study
4	RnBkk 02	Phranakhon, Bangkok	<i>R. norvegicus</i>	<i>Eimeria</i> sp.	ovoid		21.98 ± 3.53 (16.83-25.84)	16.43 ± 2.05 (14.85-19.80)	1.3	bl	-	-	+	SR+	This study
5	JQ993709	Czech Republic	<i>Heliophobious argenteocinereus</i>	<i>E. burdi</i>	subspherical		17.8 (16-19)	14.1 (12-15)	1.2	bl	-	-	+	SR+	B, C
6	Mpa MJ01	MaeRim, ChiangMai	<i>M. pahari</i>	<i>Eimeria</i> sp.	subspherical - ovoid		20.99 ± 2.83 (18.81-25.74)	17.05 ± 1.90 (12.87-17.82)	1.2	bl	-	-	-	SR+	This study
7	KT184377	USA	<i>M. musculus</i>	<i>E. papillata</i>	subspherical		22.4 (18-26)	19.2 (16-24)	1.2	sl	-	-	+	-	D, E

8	RrK11 01	KlongLuang, Pathumthani	<i>R. rattus</i>	<i>Eimeria</i> sp.	subspherical	19.99 ± 2.66 (15.84-21.78)	17.98 ± 3.59 (13.68-21.78)	1.1	bl	-	-	+	SR+, Sb+	This study
9	MceNkW05	BanphotPhisai, NakhonSawan	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	ovoid	20.39 ± 1.92 (17.82-21.78)	14.45 ± 1.33 (12.87-15.84)	1.4	bl	-	-	+	MC+	This study
10	MceNkW04	BanphotPhisai, NakhonSawan	<i>M. cervicolor</i>	<i>Eimeria</i> sp.	ovoid	23.76 ± 0.99 (22.77-24.75)	19.01 ± 0.44 (18.81-19.08)	1.3	bl	-	-	+	MC+	This study

A* Mesfin and Bellamy, 1978; B* Kvicerova and Hypsa, 2013; C* Koudela *et al.*, 2000; D* Ernst *et al.*, 1971; E* Pellerdy, 1974.

OS - oocysts shape; SI - shape index; OW - oocysts wall; OR - oocysts residuum; MP – micropyle; PG – polar granule; SR – sporocyst residuum; Sb – stieda body; MC – micropo;ar cap;

sl – single layered; bl – bi layered

Table 4 Pairwise comparison of nucleotide sequences divergence with Kimura's two-parameter distance using the MEGA 7 program (lower half) and percentage values of sequence identity using the BioEdit program (upper half) among the *cox1* sequences (450 bp) from the *Eimeria* and *Isospora* species sequences in GenBank database.

No	Seq->	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	KX495129 <i>Eimeria falciformis</i>	D	0.997	0.997	0.994	0.976	0.976	0.962	0.959	0.93	0.918	0.918	0.915	0.921	0.918	0.918	0.918	0.892	0.877	0.909	0.88	0.892	0.892	0.854
2	* <i>Eimeria</i> sp. ex. <i>Rattus andamanensis</i> isolate R.an KW03	0.003	D	1	0.997	0.973	0.973	0.959	0.956	0.927	0.915	0.915	0.912	0.918	0.915	0.915	0.915	0.889	0.874	0.906	0.877	0.889	0.895	0.851
3	* <i>Eimeria</i> sp. ex. <i>Rattus andamanensis</i> isolate R.an MU04	0.003	0	D	0.997	0.973	0.973	0.959	0.956	0.927	0.915	0.915	0.912	0.918	0.915	0.915	0.915	0.889	0.874	0.906	0.877	0.889	0.895	0.851
4	* <i>Eimeria</i> sp. ex. <i>Rattus norvegicus</i> isolate R.n Bkk02	0.006	0.003	0.003	D	0.97	0.97	0.962	0.959	0.924	0.918	0.918	0.915	0.921	0.918	0.918	0.918	0.886	0.877	0.909	0.88	0.892	0.897	0.848
5	JQ993701 <i>Eimeria alorani</i>	0.024	0.027	0.027	0.03	D	0.97	0.956	0.953	0.927	0.912	0.909	0.906	0.912	0.909	0.909	0.909	0.892	0.88	0.912	0.883	0.883	0.889	0.854
6	JQ993700 <i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus agrarius</i>	0.024	0.027	0.027	0.03	0.03	D	0.965	0.962	0.932	0.921	0.921	0.918	0.924	0.921	0.921	0.921	0.892	0.877	0.909	0.892	0.889	0.9	0.857
7	JQ993709 <i>Eimeria burdai</i>	0.039	0.042	0.042	0.039	0.045	0.036	D	0.997	0.93	0.93	0.924	0.921	0.927	0.924	0.924	0.924	0.889	0.886	0.918	0.906	0.909	0.9	0.862
8	* <i>Eimeria</i> sp. ex. <i>Mus pahari</i> isolate M.pa MJ01	0.042	0.045	0.048	0.042	0.048	0.039	0.003	D	0.927	0.927	0.921	0.918	0.924	0.921	0.921	0.921	0.886	0.883	0.915	0.903	0.906	0.897	0.86
9	KT184375 <i>Eimeria tamiasciuri</i>	0.073	0.076	0.076	0.079	0.076	0.069	0.073	0.076	D	0.932	0.941	0.932	0.938	0.935	0.935	0.935	0.927	0.897	0.924	0.912	0.915	0.909	0.871
10	JQ993696 <i>Eimeria myxii</i>	0.085	0.088	0.088	0.085	0.092	0.082	0.073	0.076	0.069	D	0.97	0.973	0.967	0.97	0.97	0.97	0.909	0.892	0.921	0.912	0.918	0.912	0.868
11	JQ993706 <i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus sylvaticus</i>	0.085	0.088	0.088	0.085	0.095	0.082	0.079	0.082	0.06	0.03	D	0.991	0.991	0.988	0.988	0.988	0.921	0.909	0.932	0.906	0.918	0.912	0.877
12	JQ993705 <i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus flavicollis</i>	0.088	0.092	0.092	0.083	0.098	0.085	0.082	0.085	0.069	0.027	0.009	D	0.988	0.991	0.991	0.991	0.918	0.906	0.941	0.903	0.921	0.906	0.874
13	KT184377 <i>Eimeria papillata</i>	0.082	0.085	0.085	0.082	0.092	0.079	0.076	0.079	0.063	0.033	0.009	0.012	D	0.997	0.997	0.997	0.924	0.906	0.93	0.906	0.921	0.906	0.874
14	* <i>Eimeria</i> sp. ex. <i>Rattus rattus</i> isolate R.r K11 no 01	0.085	0.088	0.088	0.085	0.095	0.082	0.079	0.082	0.066	0.03	0.012	0.009	0.003	D	1	1	0.921	0.903	0.932	0.903	0.918	0.903	0.871
15	* <i>Eimeria</i> sp. ex. <i>Mus cervicolor</i> isolate M.ce NKW05	0.085	0.088	0.088	0.085	0.095	0.082	0.079	0.082	0.066	0.03	0.012	0.009	0.003	0	D	1	0.921	0.903	0.932	0.903	0.918	0.903	0.871
16	* <i>Eimeria</i> sp. ex. <i>Mus cervicolor</i> isolate M.ce NKW04	0.085	0.088	0.088	0.085	0.095	0.082	0.079	0.082	0.066	0.03	0.012	0.009	0.003	0	0	D	0.921	0.903	0.932	0.903	0.918	0.903	0.871
17	JQ993713 <i>Isospora</i> sp. ex <i>Talpa europaea</i>	0.114	0.117	0.117	0.121	0.114	0.114	0.117	0.121	0.076	0.095	0.082	0.085	0.079	0.082	0.082	0.082	D	0.9	0.915	0.918	0.895	0.897	0.877
18	JQ993688 <i>Eimeria callospermophili</i>	0.131	0.134	0.134	0.131	0.127	0.131	0.121	0.124	0.108	0.114	0.095	0.098	0.098	0.101	0.101	0.101	0.104	D	0.956	0.883	0.883	0.886	0.862
19	JQ993687 <i>Eimeria cahirinensis</i>	0.095	0.098	0.098	0.095	0.092	0.095	0.085	0.088	0.079	0.082	0.069	0.06	0.073	0.069	0.069	0.069	0.088	0.045	D	0.9	0.909	0.906	0.886
20	KP025691 <i>Eimeria media</i> (<u>lacomorphs hosts</u>)	0.127	0.131	0.131	0.127	0.124	0.114	0.098	0.101	0.092	0.092	0.098	0.101	0.098	0.101	0.101	0.101	0.085	0.124	0.104	D	0.9	0.895	0.854
21	FJ236458 <i>Eimeria tenella</i> (<u>avian hosts</u>)	0.114	0.117	0.117	0.114	0.124	0.117	0.095	0.098	0.088	0.085	0.085	0.082	0.082	0.085	0.085	0.085	0.111	0.124	0.095	0.1	D	0.903	0.88
22	KT203398 <i>Eimeria mephitidis</i> (<u>carnivara hosts</u>)	0.114	0.111	0.111	0.108	0.117	0.104	0.104	0.108	0.095	0.092	0.092	0.098	0.098	0.101	0.101	0.101	0.108	0.121	0.098	0.11	0.101	D	0.871
23	KT184372 <i>Eimeria bovis</i> (<u>bovine hosts</u>)	0.158	0.161	0.161	0.164	0.158	0.154	0.147	0.151	0.137	0.141	0.131	0.134	0.134	0.137	0.137	0.137	0.131	0.147	0.121	0.15	0.127	0.137	D

Table 5 Variable amino acid positions within the cox1 (145 amino acids) from difference sequences of *Eimeria* and *Isospora* species in this study and GenBank database. The amino acid for these sequences based on KX495129 *Eimeria falciformis*, cox1 sequence.

No	Seq->	Amino acid position																					
		21	23	25	26	26	26	27	27	27	27	27	28	28	29	30	31	31	32	33	33	34	35
.		9	7	9	0	1	8	1	5	7	8	9	4	5	7	6	7	9	1	7	8	0	2

1	KX495129 <i>Eimeria falciiformis</i>	G	S	I	L	I	I	A	S	G	K	S	P	T	A	M	F	S	I	L	S	F	I
	* <i>Eimeria</i> sp ex. <i>Rattus andamanensis</i> isolate R.an																						
2	KW03	T
3	* <i>Eimeria</i> sp ex. <i>Rattus andamanensis</i> isolate R.an MJ04	T
4	* <i>Eimeria</i> sp ex. <i>Rattus norvegicus</i> isolate R.n Bkk02	T
5	JQ993701 <i>Eimeria alorani</i>	.	.	.	I	V	A	T
6	JQ993700 <i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus agrarius</i>	T
7	JQ993709 <i>Eimeria burdai</i>	.	.	.	I	.	.	T
8	* <i>Eimeria</i> sp ex. <i>Mus pahari</i> isolate M.pa MJ01	.	.	.	I	.	.	T	T	T
9	KT184375 <i>Eimeria tamiasciuri</i>	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	L	.	S	S	.	Y
10	JQ993696 <i>Eimeria myoxi</i>	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	L	.	S	S	.	Y
11	JQ993706 <i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus sylvaticus</i>	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	L	.	S	S	.	Y
12	JQ993705 <i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus flavicollis</i>	.	.	.	I	.	V	T	.	.	.	L	.	S	S	.	Y
13	KT184377 <i>Eimeria papillata</i>	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	L	.	S	S	.	Y	Y	.
14	* <i>Eimeria</i> sp. ex <i>Rattus rattus</i> isolate R.r K11 no 01	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	L	.	S	S	.	Y	Y	T
15	* <i>Eimeria</i> sp. ex <i>Mus cervicolor</i> isolate M.ce NKW05	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	L	.	S	S	.	Y	Y	T
16	* <i>Eimeria</i> sp. ex <i>Mus cervicolor</i> isolate M.ce NKW04	.	.	.	I	.	.	T	.	.	.	L	.	S	S	.	Y	Y	T
17	JQ993713 <i>Isospora</i> sp. ex <i>Talpa europaea</i>	.	.	.	I	.	.	V	.	.	.	L	.	S	S	.	Y	.	V	.	.	Y	.
18	JQ993688 <i>Eimeria callospermophili</i>	.	A	.	V	I	.	V	N	.	.	F	V	A	S	V	Y	.	.	.	T	.	L
19	JQ993687 <i>Eimeria cahirinensis</i>	.	A	.	I	.	V	V	N	.	.	F	.	A	S	.	Y	.	.	.	T	.	L
20	KP025691 <i>Eimeria media</i> (<u>lagomorphs hosts</u>)	.	.	.	I	.	.	T	.	.	R	V	.	S	S	.	Y	.	.	.	G	.	.
21	FJ236458 <i>Eimeria tenella</i> (<u>avian hosts</u>)	.	A	.	I	.	V	T	.	.	.	L	.	S	S	.	Y	Y	.
22	KT203398 <i>Eimeria mephitidis</i> (<u>carnivara hosts</u>)	.	A	.	V	I	.	.	T	.	.	L	.	S	S	.	Y	.	V	.	.	.	T
23	KT184372 <i>Eimeria bovis</i> (<u>bovine hosts</u>)	A	A	.	I	.	.	V	T	A	R	M	.	S	S	.	Y	.	V	I	.	.	L

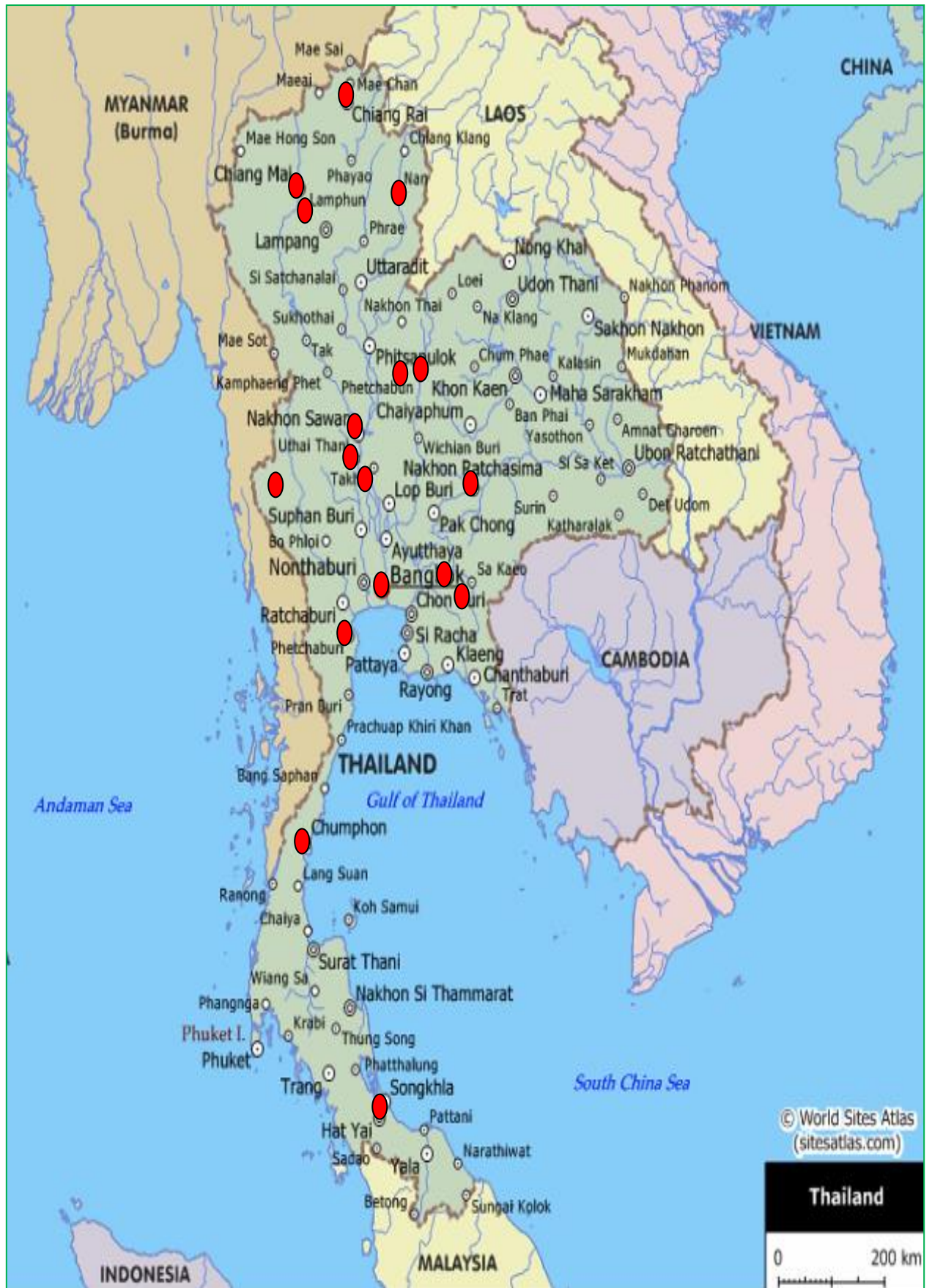


Figure 1 Map of the sampled localities in this study.

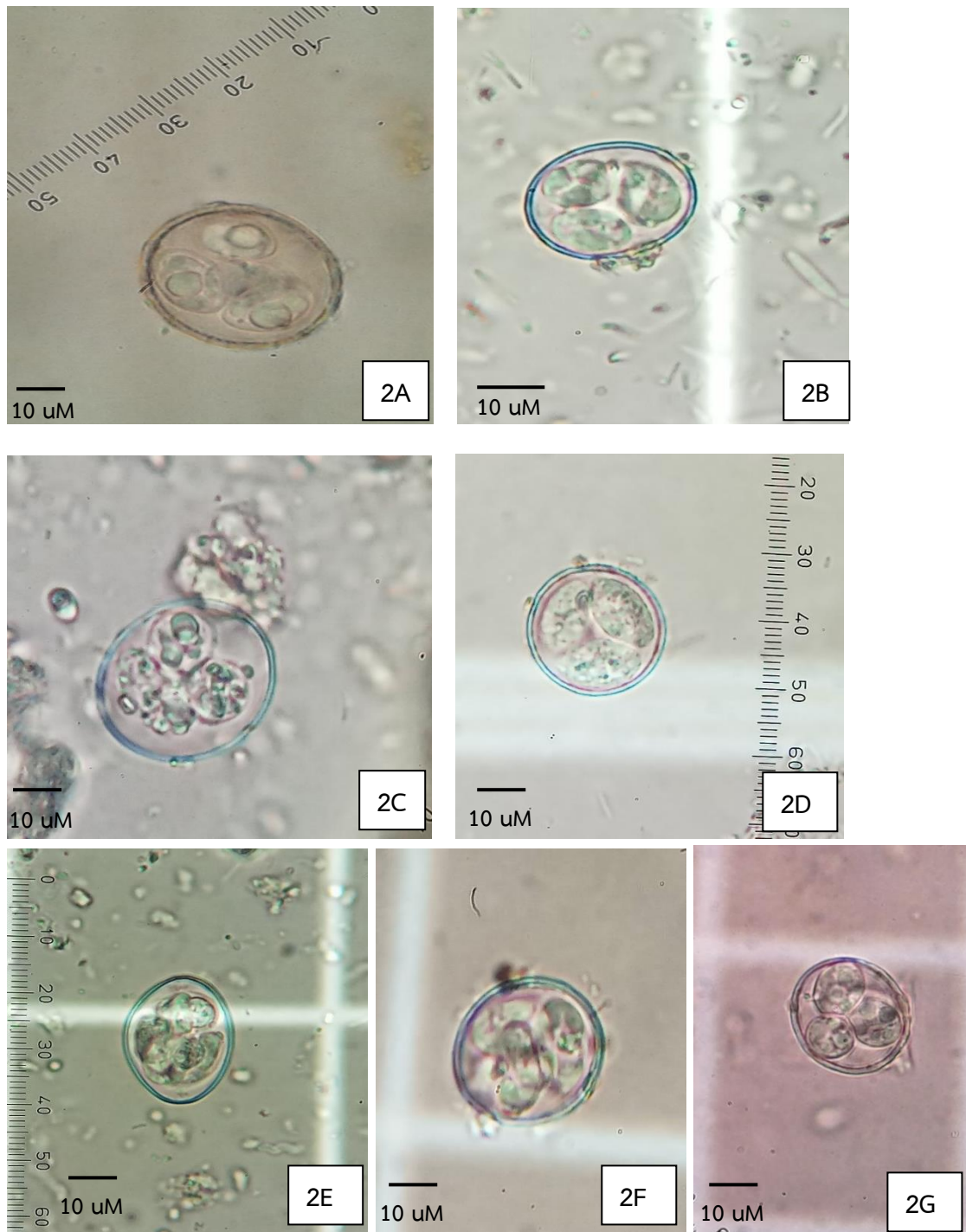


Figure 2 Sporulated oocysts of *Eimeria* sp. can cause rodents to die in this study (100x), **2A)** the isolate R.an KW03, **2B)** the isolate R.an MJ04, **2C)** the isolate R.n Bkk02, **2D)** the isolate M.pa MJ01, **2E)** the isolate RrK11 01, **2F)** the isolate M.ce NKW05 and **2G)** the isolate M.ce NKW04

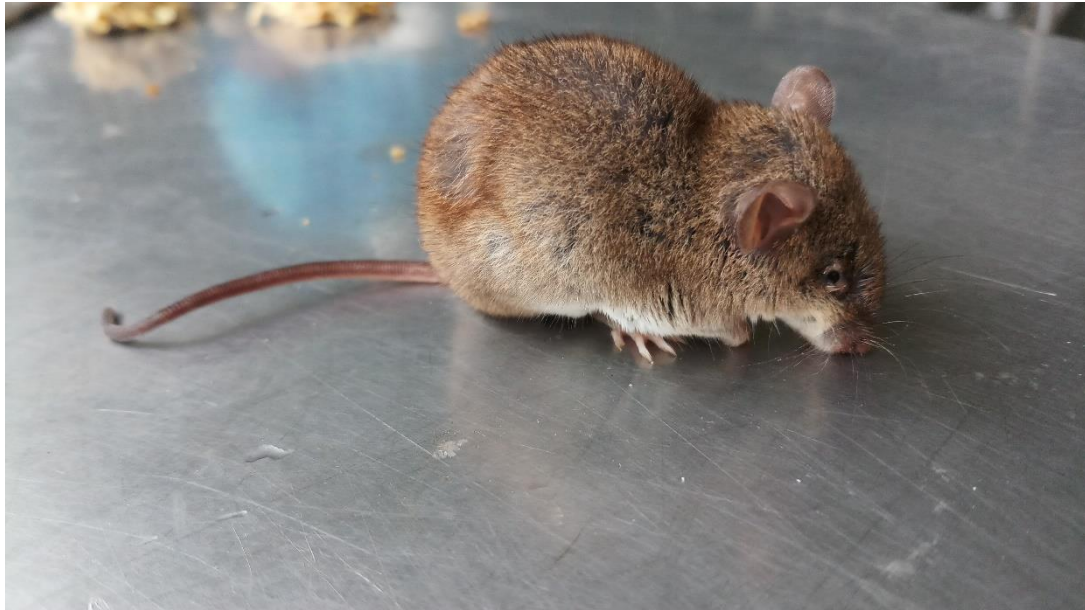


Figure 3 *Mus cervicolor* experimentally infected with 5,000 oocysts of *Eimeria* sp. (voucher M.ce NKW05) showing weakness, depression, ruffling and off food at the 7th day p.i.

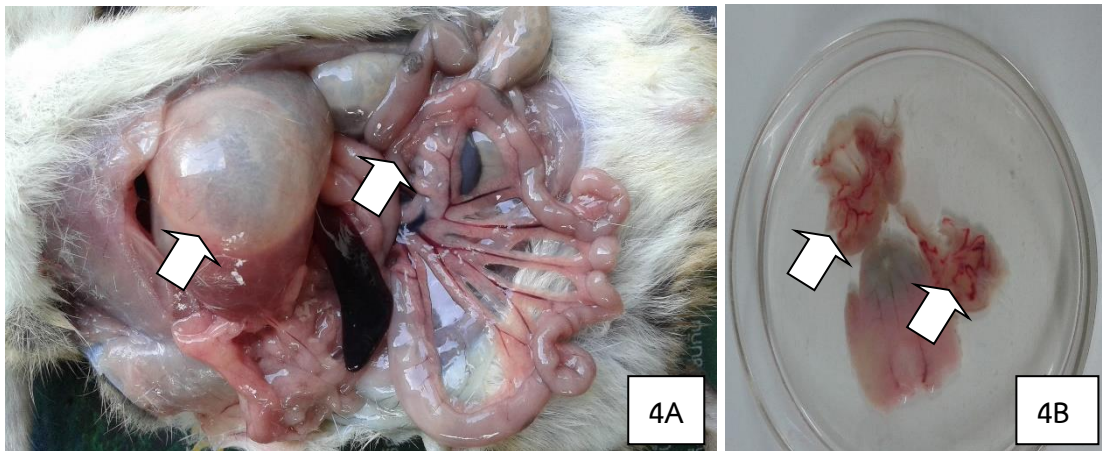


Figure 4 Stomach showing inflatable and hemorrhagic enteritis of *Rattus rattus* experimentally infected with 50,000 oocysts of *Eimeria* sp. (voucher R.r K11 01) died at the 3th day p.i. (4A). Gross inflammation of the large intestine of *Mus cervicolor* experimentally infected with 5,000 oocysts of *Eimeria* sp. (voucher M.ce NKW05) died at the 7th day p.i. (4B).

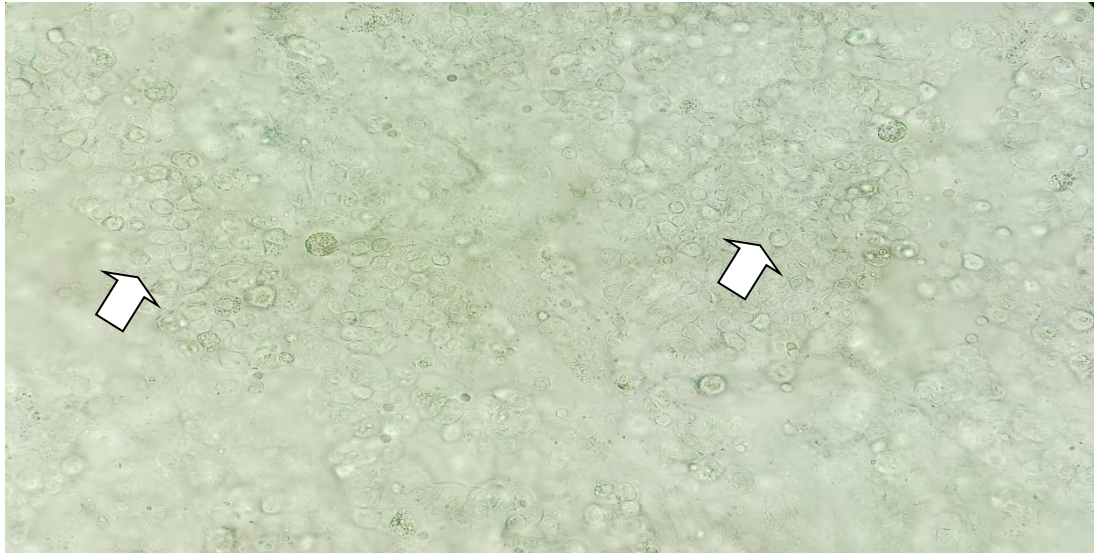


Figure 5 Colonic section of *Mus cervicolor* experimentally infected with 5,000 oocysts of *Eimeria* sp. (voucher M.ce NKW05) and died at the 7th day p.i. showing large number of merozoites and peeling cells (x 400).



Figure 6 PCR product from oocyst of *Eimeria* spp. of *cox1* region with use of the primer IE *cox1* for/IE *cox1* rev in this study detect by 1.5% agarose gel electrophoresis. M: molecular weight marker (100 bp), N: negative control.

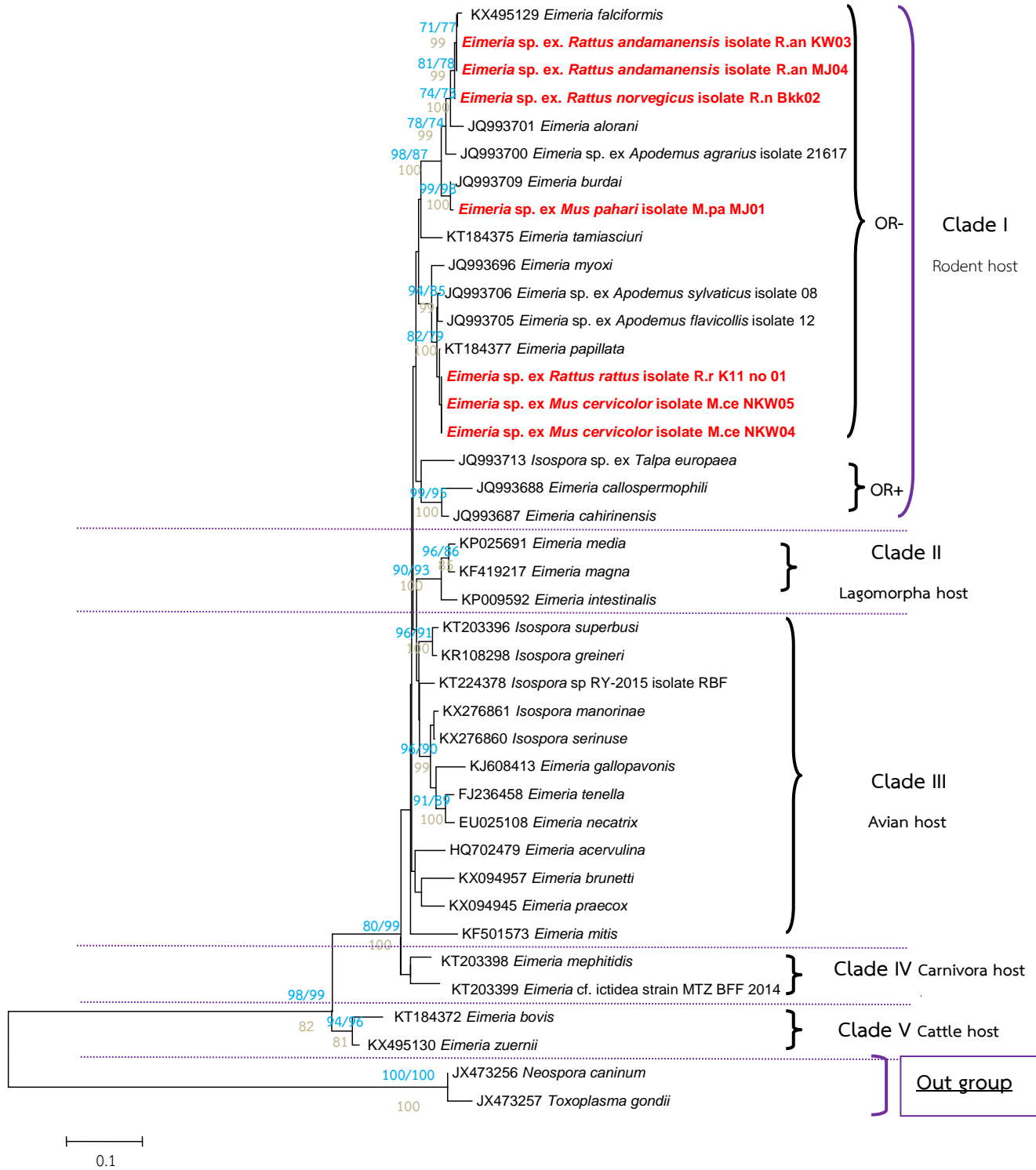


Figure 7 Phylogenetic tree based on *cox1* sequence alignment of *Eimeria* and *Isospora* species. Tree was constructed using the neighbor-joining (NJ), maximum likelihood (ML) and bayesian inference (BI) respectively and rooted on *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. The bootstrap values (1,000 replicates) based on NJ/ML are given above the branches and the bayesian posterior probability values are indicated below the branches. The new sequences are in the red bold letters and the species names of the parasites are given after GenBank accession numbers. Scale bar indicates nucleotides substitutions per site.