การคัดแยกและศึกษาศักยภาพการก่อโรคในหนูศัตรูพืชของโปรโตซัวสกุล *Isospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) จากหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* และ *Mus* ที่พบในประเทศไทย

Isolation and Pathology in Rats of the Genus *Isospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from Rodent Pest Genus *Rattus* and *Mus* in Thailand.

วิชาญ วรรธนะไกวัล ปราสาททอง พรหมเกิด
สมเกียรติ กล้าแข็ง ทรงทัพ แก้วตา
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ผลการคัดแยกและศึกษาศักยภาพการก่อโรคในหนูศัตรูพืชของโปรโตซัวสกุล *Isospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) จากหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* และ *Mus* ที่พบในประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 - กันยายน 2560 ดักหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* และ *Mus* ทั้งหมดได้ 105 ตัว เป็นหนูท้องขาว 57 ตัว (54% ของหนูที่ดักได้) และเป็นหนูหริ่ง 48 ตัว (46% ของหนูที่ดักได้) ในพื้นที่ทำการเกษตร 8 จังหวัด ในภาคกลางและภาคเหนือของประเทศไทย สามารถคัดแยกเชื้อค็อคซิเดียได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลท (33% ของหนูที่ดักได้) นำมาทดลองศักยภาพในการก่อโรคกับหนูทดลอง 22 ไอโซเลท พบว่าเชื้อค็อคซิเดียที่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ มีจำนวน 5 ไอโซเลท (23% ของเชื้อที่นำมาทดลอง) ได้แก่ Rr K11 01 (จ. ปทุมธานี), R. an Cm04 (อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่) และ *Mus* NKW04, *Mus* NKW05, *Mus* NKW07 (จ.นครสวรรค์) ซึ่งเชื้อค็อคซิเดียที่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ทั้ง 5 ไอโซเลท นั้น เป็นเชื้อโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ทั้งหมด

ซึ่งการทดลองของงานวิจัยนี้ยังไม่สิ้นสุด ยังต้องทำการเก็บตัวอย่างหนูเพิ่ม นำมาคัดแยกเชื้อและทดลองศักยภาพในการก่อโรคกับหนูทดลอง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป

รหัสการทดลอง 03-05-59-01-01-00-08-60

คำนำ

ไฟลัม (Phylum) Apicomplexa เป็นกลุ่มปรสิตโปรโตซัว ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Alveolata (alveolates) ซึ่งกลุ่ม Alveolates นั้น ประกอบไปด้วยโปรโตซัวหลายชนิด ได้แก่ โปรโตซัวในไฟลัม Dinoflagellata (dinoflagellates) โดยมากดำรงชีพเป็นอิสระในทะเล ไฟลัม Ciliophora (ciliates) ตัวอย่างเช่น พารามีเซียม (paramecium) และ ไฟลัม Apicomplexa (apicomplexans) โปรโตซัวกลุ่มนี้ เป็นกลุ่มที่มีจำนวนสมาชิกมากและมักพบเป็นปรสิตโปรโตซัวในสัตว์ชนิดต่างๆ

ค็อคซิเดียโปรโตซัว (coccidian protozoa) อยู่ในไฟลัม Apicomplexa เป็นโปรโตซัวที่มีเซลล์เดียว อาจมีวงจรชีวิตอยู่ภายในสัตว์อาศัยเพียงชนิดเดียว (homoxenous coccidia) หรือมีวงจรชีวิตอยู่ภายในสัตว์อาศัยมากกว่าหนึ่งชนิด (heteroxenous coccidia) ในกรณีที่มีสัตว์อาศัยสองชนิด วงจรชีวิตของโปรโตซัวมักเริ่มจากระยะติดเชื้อ โดยสปอร์โรซีสต์หรือโอโอซีสต์ของเชื้อจะถูกขับออกมาพร้อมกับมูลของสัตว์อาศัยสุดท้ายซึ่งมักเป็นกลุ่มสัตว์นักล่าหรือสัตว์กินเนื้อ (carnivore) และเชื้อเข้าสู่สัตว์อาศัยตัวกลางโดยปนเปื้อนกับน้ำและอาหารที่กินเข้าไป หลังจากที่สปอร์โรซีสต์ (sporocysts) ที่ปนเปื้อนในน้ำและอาหารเข้าสู่สัตว์อาศัยตัวกลางซึ่งมักเป็นกลุ่มสัตว์ที่เป็นเหยื่อหรือสัตว์กินพืชตามธรรมชาติ (herbivore) จะพัฒนาไปเป็นระยะ merozoites และเข้าสู่ระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศหรือ gamonts ซึ่งในระยะนี้พัฒนาต่อไปและสร้าง gametes เมื่อเกิดการปฏิสนธิระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย จะทำการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส เพื่อพัฒนาเป็นสปอร์โรซีสต์หรือโอโอซีสต์เซลล์ใหม่ต่อไป (ยุวลักษณ์ และคณะ, 2544) ส่วนในกรณีที่มีสัตว์อาศัยชนิดเดียว วงจรชีวิตทั้งหมดจะเกิดขึ้นในสัตว์อาศัยเพียงชนิดเดียวเท่านั้น

สารชีวินทรีย์กำจัดหนู (bio-rodenticide) ที่ทางกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ผลิตขึ้นจากปรสิตโปรโตซัว *Sarcocystis singsporensis* Zaman & Colley (1976) ที่มีความจำเพาะต่อสัตว์อาศัยหนูและงูเหลือมนั้นวงจรชีวิตของโปรโตซัวชนิดนี้ มีการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศในสัตว์อาศัยสุดท้าย ซึ่งเกิดขึ้นภายในเซลล์บุผิวลำไส้ของงูเหลือมและสปอร์โรซีสต์ ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการเจริญเติบโตจะปะปนออกมาพร้อมมูลงูสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก และเข้าสู่สัตว์อาศัยตัวกลางได้แก่ หนูในสกุลหนูท้องขาว (*Rattus*) และสกุลหนูพุก (*Bandicota*) โดยปนเปื้อนในน้ำและอาหารที่กินเข้าไป หลังจากที่โปรโตซัว ชนิดนี้เข้าสู่ในร่างกายของหนูแล้ว จะขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศในเซลล์บุผิวหลอดเลือดในอวัยวะสำคัญเช่น ปอด หัวใจ เป็นต้น และสุดท้ายเจริญพัฒนาเป็นแบรดิซอยต์ (bradyzoites) ซึ่งปรากฏฝังตามกล้ามเนื้อลำตัวหนู (sarcocysts)

ด้วยความจำเพาะต่อสัตว์อาศัยสองชนิดซึ่งก็คือ งูเหลือมและหนูท้องขาวและหนูพุกเพียง 2 สกุลเท่านั้น ซึ่งยังเหลือสกุลหนูหริ่ง (*Mus*) อีก 1 สกุล ที่ยังไม่มีสารชีวภัณฑ์กำจัดหนูที่จำเพาะต่อหนูชนิดนี้ ซึ่งหนูหริ่งนั้นเป็นศัตรูสำคัญของธัญพืชที่สำคัญในประเทศไทย เช่น ในแปลงปลูกถั่วเหลือง ถั่วเขียว นาข้าวและโรงเก็บธัญพืชต่างๆ เป็นต้น อีกทั้งการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูจากปรสิต

โปรโตซัว *S. singaporensis* ในปัจจุบันนั้น ต้องมีการเลี้ยงงูเหลือมและหนูเพื่อใช้ในการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู ซึ่งการเลี้ยงงูเหลือมจัดเป็นงานที่มีภาระต้องรับผิดชอบสูงมากทั้งในเรื่องค่าใช้จ่ายบุคลากร รวมไปถึงสถานที่เลี้ยง

โปรโตซัวสกุล *Isospora* Schneider, 1881 เป็นค็อคซิเดียโปรโตซัว อยู่ในวงศ์ (family) Eimeriidae ในไฟลัม Apicomplexa ปัจจุบันพบ 248 ชนิด ถูกพบครั้งแรกเมื่อปี 1986 (Lindsay and Blagburn, 1994; Berto *et al*., 2009) เป็นโปรโตซัวที่ต้องการสัตว์อาศัยเพียงชนิดเดียว (monoxenous host หรือ homoxenous coccidian parasites) โดยอาศัยในระบบทางเดินอาหารของสัตว์อาศัย มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศบริเวณลำไส้ ในระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโตมีการสร้างโอโอซีสต์ (oocyst) ซึ่งเป็นระยะติดเชื้อมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ โดยจะถูกขับออกมาพร้อมกับมูลของสัตว์อาศัยสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก พร้อมที่จะเข้าสู่ร่างกายของสัตว์อาศัยตัวใหม่โดยการปนเปื้อนในน้ำและอาหารของสัตว์อาศัยตามธรรมชาติ เพื่อเริ่มวงจรชีวิตใหม่ต่อไป (Wasae, 2004) สัตว์อาศัยของโปรโตซัวสกุลนี้โดยมากพบในกลุ่มสัตว์ปีก เช่น กลุ่มนกเกาะคอน (passerine birds) พบประมาณ 90% ของค็อคซิเดียโปรโตซัวทั้งหมด รวมถึงสามารถพบได้ในสัตว์เลื้อยคลาน เช่น กบ กิ้งก่าและเต่า ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 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) ซึ่งสัตว์อาศัยที่มีการติดเชื้อโปรโตซัวสกุลนี้พบว่ามักมีอาการท้องเสียและเป็นโรคในระบบลำไส้ อาทิเช่น สัตว์อาศัยในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน (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 *Rattus* spp. และ *Mus* spp. จากภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย เพื่อเป็นทางเลือกในการนำมาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนู ซึ่งหากพบว่าโปรโตซัวชนิดนี้ มีประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองได้ จะต้องมีการทดลองเพิ่มเติมถึงจำความเพาะเจาะจงกับชนิดของหนูและความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมของเชื้อต่อไป เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและกำจัดหนูศัตรูพืชควบคู่กับการใช้เหยื่อโปรโตซัว *S. singaporensis* และการป้องกันกำจัดหนูศัตรูพืชโดยชีววิธีด้วยวิธีอื่นๆ อันจะนำไปสู่การขยายผลการป้องกันและกำจัดหนูแบบบูรณาการต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- สารเคมี; ethyl alcohol, ether, ชุด kit สกัดดีเอ็นเอ, hot start taq DNA polymerase, ชุด kit purification gel electrophoresis, TAE buffer, agarose gel, สีย้อม nucleic acid (gel star)

- สัตว์ทดลอง; หนูศัตรูพืชจากธรรมชาติ

- วัสดุและอุปกรณ์; slides + coverglass, เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge), หลอดปั่นขนาด 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร, ตู้เย็น, กรรไกรและชุดเครื่องมือผ่าตัด, petri dish, เครื่องชั่งสาร, beaker, pipette, sterile tips, eppendorf tube (1.5 ml) อุปกรณ์ run gel electrophoresis และกล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

วิธีการ

การเก็บตัวอย่าง (Sampling)

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

การคัดแยกเชื้อและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Isolation and morphological characteristic)

ผ่าหนู เก็บตัวอย่างบริเวณลำไส้และมูลหนู ตรวจหาโปรโตซัวสกุล *Isospora* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ โดยเก็บในสารละลาย potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ความเข้มข้น 2-2.5% (Duszynski, 1997 and Dolnik *et al*., 2009) เพิ่มความเข้มข้นของเชื้อและลดจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยวิธี saturate NaCl solution (Bhat and Jithendran, 1995) ตรวจดูลักษณะโอโอซีสต์ที่พบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บสารแขวนลอยโอโอซีสต์ ลงในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 4-10 $^{\circ}$C เพื่อรอการทดลองทางชีวโมเลกุลต่อไป

การทดสอบศักยภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองของเชื้อ (Pathology)

นำเชื้อโปรโตซัวสกุล *Isospora* ที่คัดแยกได้จากหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* และ *Mus* จากธรรมชาติ มาทำการทดสอบศักยภาพของเชื้อโดยทดสอบกับหนูทดลอง 2 ชนิด ได้แก่ หนูท้องขาวบ้าน (*R. rattus*) หรือหนูหริ่ง (*Mus* spp.)

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

กรรมวิธีที่ 1	ให้โอโอซีสต์โดยตรงทางปากกับหนูจำนวน	500	โอโอซีสต์
กรรมวิธีที่ 2	ให้โอโอซีสต์โดยตรงทางปากกับหนูจำนวน	5,000	โอโอซีสต์
กรรมวิธีที่ 3	ให้โอโอซีสต์โดยตรงทางปากกับหนูจำนวน	50,000	โอโอซีสต์

กรรมวิธีที่ 4 ให้น้ำกลั่นโดยตรงทางปากกับหนูเป็นตัวเปรียบเทียบ (control)

ทำการทดลองโดยวัดขนาดและชั่งน้ำหนักหนูก่อนทำการทดสอบ แยกหนูที่ใช้ทดสอบใส่กรงทดลอง หลังจากนั้นทดสอบศักยภาพในการก่อโรคกับหนูท้องขาวบ้านหรือหนูหริ่งตามกรรมวิธี บันทึกระยะเวลาการตายของหนูและพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น หาเปอร์เซ็นต์การตายของหนูทดลองและนำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

สกัดดีเอ็นเอของ โอโอซีสต์จากสารแขวนลอยโอโอซีสต์ที่คัดแยกได้จากลำไส้และมูลของหนูจากธรรมชาติที่ดักได้ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร (ul) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR)

ไพรเมอร์ (primers) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ทั้งหมด 2 คู่ บริเวณยีนไซโตโครมบี (cytochrome *b* gene) ใช้ไพรเมอร์จำนวน 1 คู่ IE cytb F1; 5'- ATG TCT CAA GTG AGA TCT CAT CTA CA-3' กับ IE cytb R1; 5'-ARY ACA AAG AAT CTT TTT AAT GTA GG-3' บริเวณไซโตโครม ซี ออกซิเดส (cytochrome c oxidase) ใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ IE cox1 for; 5'- GTW ACT AAT GGT GCA AAA CCA TGG TG - 3' กับ IE cox1 rev; 5'- ATA AAA CTT ARA GCA TAC CAA RTA TC - 3' เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวม 20 ul ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อโปรโตซัว 2 ul ผสมกับ 10x PCR buffer, 10mM dNTPs, เอนไซม์ hot start taq DNA polymerase 1 ยูนิต และไพรเมอร์ชนิดละ 10 mM แล้วเติมน้ำกลั่น จนครบปริมาตร 20 ul ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) ภายใต้อุณหภูมิ pre denature 98 $^{\circ}$C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ denature 98 $^{\circ}$C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing 60 $^{\circ}$C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension 72 $^{\circ}$C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน final extension 72 $^{\circ}$C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วย 1.5 % อะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟริซีส (agarose gel electrophoresis)

การหาลำดับเบส (DNA sequencing)

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1.5% อะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟริซีส และตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ที่มีขนาดของแถบดีเอ็นเอขนาดตรงกับที่คำนวณไว้ หลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel elution kit (GeneMark, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต และส่งดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ First BASE laboratories ประเทศมาเลเซีย

การวิเคราะห์ผล (Data analysis)

ตรวจสอบความถูกต้อง และตัดลำดับเบสที่ไม่ชัดเจนหรือมีสัญญาณรบกวนออก จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) จัดเรียง วิเคราะห์ และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดยใช้

โปรแกรม BioEdit version 7.0 (Hall, 1999) รวบรวมแต่ละ contig เป็นสายเดียว หลังจากนั้นวิเคราะห์ความหลากหลายและสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 3 วิธี ได้แก่ neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP) และ maximum likelihood (ML) โดยใช้ *Toxoplasma gondii* เป็นโปรโตซัวนอกกลุ่ม (outgroup) การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี neighbor-joining (NJ; Saitou and Nei, 1987) นั้นถูกสร้างจากการวิเคราะห์ข้อมูลคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างลำดับเบสของหนูแต่ละคู่ ด้วยแบบจำลอง kimura 2-parameter distance models (Kimura, 1980) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 software (Tamura *et al*., 2013) ส่วนวิธี Maximum parsimony (MP; Fitch, 1971) ดำเนินการโดยใช้โปรแกรม PAUP v. 4.0b8 (Swofford, 2001) สร้าง provisional MP tree ด้วยวิธี stepwise addition algorithm ลำดับการใช้ข้อมูลเป็นไปโดยสุ่ม การทำbrance swapping โดยใช้ subtree-pruning-regrafting (SPR) method (Hein *et al*, 1996) ในขณะที่วิธี Maximum likelihood (ML; Felsenstein, 1981) วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 software (Tamura *et al*., 2013) การทำ branch swapping ใช้ nearest neighbor interchanges (NNI) branch swapping methods (Felsenstein, 2004) ผลการคำนวณใช้แบบจำลอง general time reversible model (GTR) ซึ่งทั้ง 3 แผนภูมิดังกล่าวนั้น ทำการวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 รอบ โดยค่าทางสถิตที่ได้จะถูกนำมาแสดงเพื่อเพิ่มระดับความเชื่อมั่นของแผนภูมิ

เวลาและสถานที่

ทดลองและเก็บรวบรวมข้อมูลระหว่างเดือนตุลาคม 2559 - กันยายน 2560 ภายในกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร และนาข้าว ที่จังหวัดปราจีนบุรี ชัยนาท นครนายก สวนมะพร้าว ที่จังหวัดปทุมธานี แปลงมะคาเดเมีย ที่จังหวัดเชียงใหม่ แปลงถั่วเหลือง ที่จังหวัด นครสวรรค์ และแปลงถั่วลิสง ที่จังหวัดเพชรบุรี

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการคัดแยกและศึกษาศักยภาพการก่อโรคในหนูศัตรูพืชของโปรโตซัวสกุล *Isospora* จากหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* และ *Mus* ที่พบในประเทศไทย ดักหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* และ *Mus* ในพื้นที่ทำการเกษตร 8 จังหวัด ของประเทศไทย ได้แก่ นาข้าว อ.บ้านสร้าง จ. ปราจีนบุรี ได้หนู 7 ตัว (หนูนาใหญ่ 5 ตัว และหนูหริ่ง 2 ตัว) คัดแยกเชื้อค็อคซิเดียได้ 2 ไอโซเลท นาข้าว อ. เมือง จ.ชัยนาท ได้หนู 11 ตัว (หนูนาใหญ่ 11 ตัว) คัดแยกเชื้อค็อคซิเดียได้ 3 ไอโซเลท สวนมะพร้าว คลอง 11 จ. ปทุมธานี ได้หนู 8 ตัว (หนูท้องขาวบ้าน 8 ตัว) คัดแยกเชื้อค็อคซิเดียได้ 3 ไอโซเลท แปลงมะคาเดเมีย อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ ได้หนู 6 ตัว (หนูป่าอินโดจีน 6 ตัว) คัดแยกเชื้อค็อคซิเดียได้ 4 ไอโซเลท แปลงมะคาเดเมีย อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ ได้หนู 16 ตัว (หนูป่าอินโดจีน 16 ตัว) คัดแยกเชื้อค็อคซิเดียได้ 4 ไอโซเลท แปลงถั่วเหลือง อ.บรรพตพิสัย จ.นครสวรรค์ ได้หนู 26 ตัว (หนูหริ่ง 26 ตัว) คัดแยกเชื้อ

ค็อคซิเดียได้ 7 ไอโซเลท แปลงถั่วลิสง อ.บ้านลาด จ.เพชรบุรี ได้หนู 16 ตัว (หนูท้องขาวบ้าน 6 ตัว และหนูหริ่งนาหางสั้น 10 ตัว) คัดแยกเชื้อค็อคซิเดียได้ 5 ไอโซเลท และนาข้าว อ.เมือง จ. นครนายก ได้หนู 15 ตัว (หนูนาใหญ่ 5 ตัว และหนูหริ่งนาหางยาว 10 ตัว) คัดแยกเชื้อค็อคซิเดียได้ 7 ไอโซเลท รวมจำนวนหนูทั้งหมดที่ดักได้ 105 ตัว เป็นหนูท้องขาว 57 ตัว (54% ของหนูที่ดักได้) และเป็นหนูหริ่ง 48 ตัว (46% ของหนูที่ดักได้) สามารถคัดแยกเชื้อค็อคซิเดียได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลท (33% ของหนูที่ดักได้) นำมาทดลองศักยภาพในการก่อโรคกับหนูทดลอง 22 ไอโซเลท (เชื้อค็อคซิเดียจาก จ.เพชรบุรี และ จ.นครนายก กำลังอยู่ในระหว่างดำเนินการทดลอง) เชื้อค็อคซิเดียที่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ มีจำนวน 5 ไอโซเลท (23% ของเชื้อที่นำมาทดลอง) ได้แก่ Rr K11 01 (จ. ปทุมธานี), R. an Cm04 (อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่) และ *Mus* NKW04, *Mus* NKW05, *Mus* NKW07 (จ.นครสวรรค์) ซึ่งเชื้อค็อคซิเดียที่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ทั้ง 5 ไอโซเลท นั้น เป็นเชื้อโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ทั้งหมด

ซึ่งการทดลองของงานวิจัยนี้ยังไม่สิ้นสุด ยังต้องทำการเก็บตัวอย่างหนูเพิ่ม นำมาคัดแยกเชื้อและทดลองศักยภาพในการก่อโรคกับหนูทดลอง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

-

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ช่วยกันปฏิบัติงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค กรแก้ว เสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ ปิยาณี หนูกาฬ และพวงทอง บุญทรง. 2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 136หน้า.

Ball, S. J. and P. Daszak. 1997. *Isospora tiaris* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the sooty grassquit (*Tiaris fuliginousa*) 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 (Passeriformes: Emberizidae) in South America. Systematic Parasitology. 73: 65-69.

Bhat, T.K. and K.P. Jithendran. 1995. *Eimeria magna*: the effect of varying inoculums size on the course of infection in Angora rabbit. World Rabbit Science. 163-165.

Dolnik, O. V., V. Palinauskas and S. Bensch. 2009. Individual oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) parasites from avian feces: from photo to sequence. Journal of Parasitology. 95: 169-174.

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.

Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences. A maximum likelihood approach. Journal of Molecular Evolution. 17: 368-376.

Felsenstein, J. 2004. Inferring phylogenies sinauer associates, Sunderland, Mass. 663 p.

Fitch, W.M. 1971. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Systematic Zoology. 20: 406-416.

Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids Symposium Series. 41: 95-98.

Hein, J., T. Jiang, L. Wang and K. Zhang. 1996. On the complexity of comparing evolutionary trees. Discrete Applied Mathematics. 71: 153-169.

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.

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.

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: 537-541.

Modry, D., B. Koudela, R. M. Al-Oran, Z. S. Amr and D. Dolezel. 1998. *Isospora 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.

Mundt, H-C., A. Joachim, A. Daugschies and M. Zimmermann. 2003. Population biology studies on *Isospora suis* in piglest. Parasitology Research. 90: 158-159.

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.

Swofford, D.L. 2001. PAUP*. Phylogenetic analysis using pasimony (and other method). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 6. Molecular Biology and Evolution. 24: 1596-1599.

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 A 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.

Table 1 Result of isolation and pathology of coccidian protozoa from rodent feces in this study.

No.	Voucher name	Sampling location	Type of oocyst	Size of oocysts (width x length)	Hosts	Mortality rates (%)			
						500 oocysts (treatment 1)	5,000 oocysts (treatment 2)	50,000 oocysts (treatment 3)	Water (treatment 4)
1	Ra Pra01	Bansang, PrachinBuri	unsporulate oocysts	5.94 x 5.94 µm	Rice field rat (*R. argentiventer*)	0	0	0	0
2	Ra Pra02	Bansang, PrachinBuri	unsporulate oocysts	6.93 x 8.91 µm	Rice field rat (*R. argentiventer*)	0	0	0	0
3	Ra Chai01	Muang, ChaiNat	unsporulate oocysts	4.95 x 6.93 µm	Rice field rat (*R. argentiventer*)	0	N/A	N/A	0
4	Ra Chai02	Muang, ChaiNat	*Isospora* sp.	1.98 x 2.97 µm	Rice field rat (*R. argentiventer*)	0	N/A	N/A	0
5	Ra Chai03	Muang, ChaiNat	unsporulate oocysts	7.92 x 9.90 µm	Rice field rat (*R. argentiventer*)	0	N/A	N/A	0
6	Rr K11 01	Khlong Luang, Pathum Thani	*Eimeria* sp.	6.93 x 9.90 µm	Roof rat (*R. rattus*)	0	20	N/A	0
7	Rr K11 02	Khlong Luang, Pathum Thani	unsporulate oocysts	3.96 x 6.93 µm	Roof rat (*R. rattus*)	0	N/A	N/A	0
8	Rr K11 03	Khlong Luang, Pathum Thani	unsporulate oocysts	2.97 x 2.97 µm	Roof rat (*R. rattus*)	0	N/A	N/A	0
9	R.an. Cm02	Mae Rim, Chiang Mai	unsporulate oocysts	6.93 x 8.91 µm	Indochinese forest rat (*R. andamanensis*)	0	N/A	N/A	0
10	R.an. Cm04	Mae Rim, Chiang Mai	unsporulate oocysts	7.92 x 8.91 µm	Indochinese forest rat (*R. andamanensis*)	0	0	20	0
11	R.an. Cm07	Mae Rim, Chiang Mai	unsporulate oocysts	6.93 x 8.91 µm	Indochinese forest rat (*R. andamanensis*)	0	N/A	N/A	0
12	R.an. Khunw01	Mae Wang, Chiang Mai	unsporulate oocysts	5.94 x 9.90 µm	Indochinese forest rat (*R. andamanensis*)	0	0	N/A	0
13	R.an. Khunw02	Mae Wang, Chiang Mai	unsporulate oocysts	7.92 x 7.92 µm	Indochinese forest rat (*R. andamanensis*)	0	N/A	N/A	0
14	R.an. Khunw03	Mae Wang, Chiang Mai	*Eimeria* sp.	19.80 x 18.81 µm	Indochinese forest rat (*R. andamanensis*)	0	N/A	N/A	0
15	R.an. Khunw06	Mae Wang, Chiang Mai	unsporulate oocysts	13.86 x 11.88 µm	Indochinese forest rat (*R. andamanensis*)	0	N/A	N/A	0

Table 1 Result of isolation and pathology of coccidian protozoa from rodent feces in this study (continue).

No.	Voucher name	Sampling location	Type of oocyst	Size of oocysts (width x length)	Hosts	Mortality rates (%)			
						500 oocysts (treatment 1)	5,000 oocysts (treatment 2)	50,000 oocysts (treatment 3)	Water (treatment 4)
16	Mus NKW01	BanphotPhisai, NakhonSawan	*Eimeria* sp.	17.82 x 14.85 µm	Ryukyu mouse (*M. caroli*)	0	0	0	0
17	Mus NKW03	BanphotPhisai, NakhonSawan	*Eimeria* sp.	16.83x 14.85 µm	Ryukyu mouse (*M. caroli*)	0	N/A	N/A	0
18	Mus NKW04	BanphotPhisai, NakhonSawan	*Eimeria* sp.	16.83x19.80 µm	Fawn colored mouse (*M. cervicolor*)	20	N/A	N/A	0
19	Mus NKW05	BanphotPhisai, NakhonSawan	*Eimeria* sp.	17.82 x 15.84 µm	Fawn colored mouse (*M. cervicolor*)	20	N/A	N/A	0
20	Mus NKW07	BanphotPhisai, NakhonSawan	*Eimeria* sp.	16.83x 14.85 µm	Fawn colored mouse (*M. cervicolor*)	0	20	N/A	0
21	Mus NKW13	BanphotPhisai, NakhonSawan	*Eimeria* sp.	17.82 x 17.82 µm	Ryukyu mouse (*M. caroli*)	0	0	N/A	0
22	Mus NKW23	BanphotPhisai, NakhonSawan	*Eimeria* sp.	17.82 x 17.82 µm	Ryukyu mouse (*M. caroli*)	0	0	N/A	0

N/A = not available

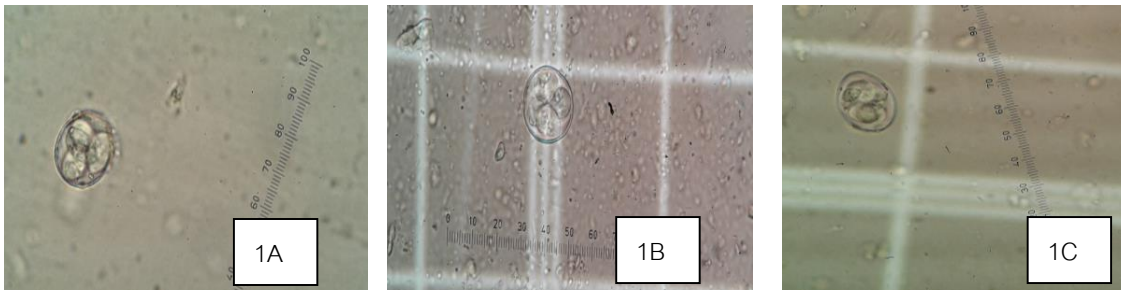

Figure 1 Sporulated oocyst of *Eimeria* spp. at magnification 100x; Isolated *Mus* NKW04 (1A), Isolated *Mus* NKW05 (1B) and Isolated Rr K11 01 (1C).