1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์

2. โครงการวิจัย : สำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การคัดแยกชนิดและทดสอบศักยภาพการก่อโรคในหนูศัตรูพืชของโปรโตซัวสกุล *Emieria* (Apicomplexa: Coccidia) จากหนูนาใหญ่ (ricefield rat : Rattus argentiventer (Robinson and Kloss, 1916) เพื่อนำมาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนู

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Isolation and pathology in rats of *Eimeria* species (Apicomplexa: Coccidia) from ricefield rat: *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916) for production of bio-rodenticide.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : วิชาญ วรรธนะไกวัล กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ปราสาททอง พรหมเกิด สมเกียรติ กล้าแข็ง และ ทรงทัพ แก้วตา กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ : การทดลองเรื่อง การคัดแยกชนิดและทดสอบประสิทธิภาพการก่อโรคในหนูของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* (Apicomplexa: Coccidia) จากหนูนาใหญ่ (ricefield rat*: Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916)) เพื่อนำมาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนูในครั้งนี้ ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2563 ดำเนินการดักหนูนาใหญ่ (*R. argentiventer*) ในพื้นที่ปลูกข้าวและพื้นที่เกษตรตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 8 จังหวัด (4 ภูมิภาค) ได้แก่ จังหวัดปราจีนบุรี จังหวัดชัยนาท จังหวัดนครนายก จังหวัดอุทัยธานี จังหวัดอุตรดิตถ์ จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดบุรีรัมย์ จังหวัดสงขลา ได้ตัวอย่างหนูในการทดลองครั้งนี้จำนวน 74 ตัว สามารถคัดแยกโอโอซีสต์ได้ 19 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 25.68 จากตัวอย่างหนูที่ดักได้ทั้งหมด พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลท (ไอโซเลท UTN 02 จากจังหวัดอุทัยธานี) ที่มีศักยภาพสามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ร้อยละ 60 ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 โอโอซีสต์ ภายในระยะเวลา 2-5 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อโดยตรงทางปาก (dpi) คิดเป็นร้อยละ 5.26 จากตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมด ผลการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยาจากลักษณะของโอโอซีสต์สอดคล้องกับผลการจำแนกชนิดทางชีวโมเลกุล บริเวณไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ (18S rDNA) ได้ผลเป็น *E. ferrisi* isolate UTN 02 และผลการเพิ่มปริมาณโอโอซีสต์ของโปรโตซัว *E. ferrisi* isolate UTN 02 โดยการให้เชื้อที่ระดับความเข้มข้น 2,500 โอโอซีสต์ (sublethal dose) โดยตรงทางปากกับหนูท้องขาวบ้าน (*R. rattus*) จำนวน 10 ตัว พบโอโอซีสต์ถูกขับออกมาพร้อมกับมูลหนู สูงสุดที่ระยะเวลา 6 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ เท่ากับ 19.44±11.55 (oocysts/µl ± S.D.)

กรมวิชาการเกษตร

Abstract : This study was conducted during October 2017 – September 2020. Total isolation of oocyst 19 isolates (25.68%), from 74 ricefield rat (Rattus argentiventer) were captured from rice fields and agricultural of 8 provinces in 4 regions of Thailand such as Prachin Buri, Chai Nat, Nakhon Nayok, Uthai Thani, Uttaradit, Nakhon Ratchasima, Buri Ram and Songkhla provinces, was revealed the Eimeria oocysts isolate UTN 02 caused severe clinical illness and mortality, 60%, occurred in rats an infectious dose of 5,000 oocysts at the 2-5 days postinfection (dpi). The morphological of sporulate oocysts were identified according to molecular analysis of partial 18S ribosomal DNA (18S rDNA), the oocysts were identified as E. ferrisi isolate UTN 02. In the study of oocysts propagation, we infected R. rattus (n = 10) with 2,500 oocysts (sublethal dose) of E. ferrisi isolate UTN 02. On day 6 after oral infection, Rats were shedding the highest number of oocysts as 19.44±11.55 (oocysts/µl ± S.D.).

6. คำนำ: หนูเป็นสัตว์ศัตรูพืชที่สร้างความเสียหายให้แก่พืชหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย ถั่วเหลือง และปาล์มน้ำมัน เป็นต้น ซึ่งนอกจากการทำลายผลิตผลทางการเกษตรแล้ว หนูยังเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญที่ถ่ายทอดสู่มนุษย์ และสัตว์เลี้ยงอีกด้วย เช่น กาฬโรค และโรคฉี่หนู เป็นต้น (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544)

หนูนาใหญ่ (ricefield rat, *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916)) เป็นศัตรูสำคัญในแหล่งปลูกข้าวและธัญพืชอื่นๆ ทางภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย รวมถึงแหล่งปลูกข้าวในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Lekagul and Jeffrey, 1977) ในปี พ.ศ 2557 - 2558 เกิดการระบาดของหนูนาใหญ่ ในนาข้าวของเกษตรกรบริเวณแถบที่ลุ่มภาคกลางของประเทศไทยหลายจังหวัด ได้แก่ จังหวัดชัยนาท จังหวัดอยุธยา จังหวัดลพบุรี และจังหวัดปราจีนบุรี เป็นต้น ทำให้ข้าวที่ปลูกไว้ไม่ได้เก็บเกี่ยว ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ซึ่งปัญหาการระบาดของหนูนาใหญ่เป็นพื้นที่กว้างนั้น ทำให้ผลผลิตของเกษตรกรได้รับความเสียหาย ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศในภาพรวม

การป้องกันกำจัดหนูสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่การใช้สารเคมีและไม่ใช้สารเคมี ซึ่งการใช้สารกำจัดหนู (rodenticide) แม้ว่าจะสามารถลดจำนวนประชากรหนูลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ถ้าหากใช้สารเคมีที่ใช้กำจัดหนูเหล่านี้เหล่านี้ในปริมาณที่สูงเกินความจำเป็น และไม่เหมาะสม จะทำให้มีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ ส่งผลให้เสียระบบสมดุลของสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติในที่สุด

ในปัจจุบันนี้กรมวิชาการเกษตร โดยกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช มีการผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดหนูจากสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* Zamen & Colley (1976) ในรูปเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูซึ่งโปรโตซัวชนิดนี้มีความจำเพาะต่อสัตว์อาศัย 2 ชนิด ได้แก่ หนูในสกุลหนูพุก (*Bandicota*) กับสกุลหนูท้องขาว (*Rattus*) และงูเหลือม

กรมวิชาการเกษตร

(*Python reticulatus*) ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยต่อคน สัตว์และสิ่งแวดล้อม (Jaekel *et al*., 1996) แต่เนื่องจากขั้นตอนการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูนั้น จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเชื้อในหนูทดลองและงูเหลือม ซึ่งรวมใช้ระยะเวลาประมาณ 3-4 เดือน อีกทั้งการดูแลงูเหลือมจำเป็นต้องใช้บุคคลที่มีความชำนาญในการเลี้ยงและต้องเสียค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงดูงูเหลือมค่อนข้างสูง ดังนั้นการสำรวจหาเชื้อกลุ่มใหม่ที่สามารถลดข้อจำกัดเหล่านี้ลงได้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ควรทำการศึกษา

โปรโตซัวสกุล *Eimeria* Schneider, 1875 เป็นค็อคซิเดียโปรโตซัว อยู่ในวงศ์ (family) Eimeriidae ในไฟลัม (phylum) Apicomplexa เป็นโปรโตซัวที่ต้องการสัตว์อาศัยเพียงชนิดเดียว (monoxenous host) ปัจจุบันพบมากกว่า 1,300 สปีชีส์ (Duszynski *et al*. 2001) และมีมากกว่า 400 สปีชีส์ ที่มีหนูเป็นสัตว์อาศัย (Duszynski and Upton, 2000) ตลอดวงจรชีวิตมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ดำรงชีวิตอยู่ในบริเวณทางเดินอาหาร (intestinal parasite) ของสัตว์อาศัยเพียงชนิดเดียว (Macova, 2013) และถูกขับออกมาสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกพร้อมมูลของสัตว์อาศัย (Berto *et al*., 2009) พร้อมที่จะเข้าสู่สัตว์อาศัยตัวใหม่ต่อไป โดยที่โอโอซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* นั้น สามารถทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมของสิ่งแวดล้อมได้ อีกทั้งโปรโตซัวสกุลนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อสัตว์อาศัย (highly host-specific organism) (Joyner, 1982; Zhao and Duszynski, 2001) ดังนั้นการที่มีสัตว์อาศัยเพียงชนิดเดียว จึงอาจย่นระยะเวลา ขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู ทำให้สามารถผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูได้ในระยะเวลาที่สั้นลง และมีค่าใช้จ่ายที่ลดลงจากเดิมด้วยเช่นกัน สำหรับ การทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่า โอโอซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ *E. nieschulzi* isolate K11 01, *E. ferrisi* isolate MJ01, *E. ferrisi* isolate MJ04, *E. nafuko* isolate NKW05, *Eimeria* sp. ex *Rattus norvegicus* isolate Bkk02 และ *Eimeria* sp. ex *Rattus andamanensis* isolate KW03 ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ5,000 โอโอซีสต์มีศักยภาพสามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ ร้อยละ 20-40 ภายใน 2-10 วัน หลังจากได้รับเชื้อ (days p.i.) (วิชาญ และคณะ, 2562ก.) อีกทั้งพบว่า โอโอซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ไอโซเลทที่มีศักยภาพสามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้นั้น สามารถเพิ่มปริมาณในหนูท้องขาวบ้าน (*R. rattus*) ได้ โดยการให้โอโอซีสต์ของ *E. nieschulzi* isolate K11 01 จำนวน 2,500 โอโอซีสต์ กับหนูท้องขาวบ้าน จำนวน 10 ตัว พบโอโอซีสต์ถูกขับออกมาพร้อมกับมูลหนูสูงสุด (28±12 oocysts/µl) ที่ระยะเวลา 7 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ (วิชาญ และคณะ, 2562ข.)

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำโอโอซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* มาศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้มาเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนูชนิดใหม่ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนูศัตรูพืช และมีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อมต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างหนูนาใหญ่จากธรรมชาติ
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. สารเคมีได้แก่ Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$), QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN, Germany), Thermo scientific phusion hot start II high-fedelity 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
10. กรงดักหนูขนาด 14x28x14 เซนติเมตร
11. จานแก้วเพาะเชื้อ (petridish)
12. ที่ให้อาหารโดยตรงจากปากสู่กระเพาะ (feeding tube)
13. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยายสูง (light microscope)
14. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermal cycler)
15. เครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis)
16. เครื่อง U.V. Electronic U.V. Transilluminator (Alphadigidoc™, EEC)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

ดักหนูนาใหญ่ บริเวณแปลงนาหรือพื้นที่ทำการเกษตรที่พบหนูนาใหญ่ของเกษตรกร ในพื้นที่ 8 จังหวัด (4 ภูมิภาค) ได้แก่ ภาคตะวันออก 1 จังหวัด (จังหวัดปราจีนบุรี) ภาคกลาง 4 จังหวัด(จังหวัดชัยนาท จังหวัดนครนายก จังหวัดอุทัยธานี และจังหวัดอุตรดิตถ์) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 จังหวัด (จังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดบุรีรัมย์) และ ภาคใต้ 1 จังหวัด (จังหวัดสงขลา)

2. การคัดแยกและจำแนกชนิดโปรโตซัวสกุล *Eimeria* โดยวิธีทางสัณฐานวิทยา

2.1 เก็บมูลหนูนาใหญ่ที่ดักมาได้จากธรรมชาติ โดยเก็บรักษาในสารละลาย potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ความเข้มข้น 2-2.5% (Duszynski and Wilber, 1997)

2.2 คัดแยกโอโอซีสต์ด้วยวิธี Saturate NaCl solution (Bhat and Jithendran, 1995) ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

2.2.1 ชั่งมูลหนูนาใหญ่ 5 กรัม ละลายในน้ำ 30 มิลลิลิตร

2.2.2 กรองผ่านตะแกรงกรองละเอียด

2.2.3 ปั่นสารแขวนลอยที่ผ่านการกรองแล้วที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน2 นาที

2.2.4 เทส่วนใสทิ้ง ทำเช่นเดียวกับข้อ 1-3 จนกว่าสารส่วนใสด้านบนตะกอนจะใส

2.2.5 นำสารแขวนลอยโอโอซีสต์ที่ผ่านการปั่นล้างแล้วผสมกับสารละลาย saturate NaCl solution (ชั่ง NaCl 311 กรัมละลายในน้ำ 1 ลิตร)

2.2.6 ปั่นสารแขวนลอยที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 2 นาที

2.2.7 เก็บส่วนใสด้านบนของสารแขวนลอยโอโอซีสต์

2.2.8 ปั่นล้างสารแขวนลอยที่ได้ด้วยน้ำกลั่น ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 2 นาที

2.2.9 เก็บส่วนใสด้านบนของสารแขวนลอยโอโอซีสต์ จำแนกชนิดโดยการตรวจดูลักษณะโอโอซีสต์ที่พบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) และบันทึกลักษณะโอโอซีสต์ที่พบ

2.2.10 เก็บสารแขวนลอยโอโอซีสต์ ลงในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 4-10 °C เพื่อรอการทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลอง และการทดสอบทางชีวโมเลกุลต่อไป

บันทึกข้อมูล

1. ลักษณะสัณฐานวิทยาของโอโอซีสต์ที่พบ
2. ปริมาณความเข้มข้นของสารแขวนลอยโอโอซีสต์ที่คัดแยกได้
3. สถานที่และสภาพแวดล้อมที่พบโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่คัดแยกได้จากหนูนาใหญ่ตามธรรมชาติ พร้อมพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS)

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองของเชื้อ

นำสารแขวนลอยโอโอซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่คัดแยกได้จากข้อ 2 มาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ โดยทดสอบกับหนูท้องขาวบ้าน (*R. rattus*)

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 10 ซ้ำ ซ้ำละ 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)

<u>วิธีปฏิบัติการทดลอง</u>

3.1 วัดขนาดและชั่งน้ำหนักหนูก่อนทำการทดสอบ แยกหนูที่ใช้ทดสอบใส่กรงทดลอง งดอาหารเป็นเวลา 1 คืน ก่อนการทดสอบ

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูท้องขาวบ้านตามกรรมวิธี

กรมวิชาการเกษตร

3.3 หลังจากทำการทดสอบกับเชื้อทดลองแล้วให้อาหารและน้ำตามปกติ

3.4 บันทึกระยะเวลาการตายของหนูและพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น ในกรณีหนูทดลองตาย ทำการตรวจหาเชื้อจากซากหนูและมูลหนู

3.5 เมื่อครบ 14 วัน ทำการผ่าหนูทดลองที่เหลือ ตรวจหาเชื้อและบันทึกพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นโดยละเอียด

3.6 หาร้อยละการตายของหนูทดลองและนำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม

บันทึกข้อมูล

1. ระยะเวลาที่ทำให้หนูทดลองป่วยและตาย
2. ลักษณะพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น
3. ร้อยละการตายของหนูทดลอง

4. การจำแนกชนิดโปรโตซัวสกุล *Eimeria* โดยวิธีชีวโมเลกุล

นำโอโอซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่มีประสิทธิภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตาย จากข้อ 3 มาจำแนกชนิดด้วยวิธีชีวโมเลกุล

4.1 **ออกแบบไพรเมอร์**

4.1.1 สืบค้นข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA ของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (Data base ของ NCBI) และกลุ่มอื่นที่ใกล้เคียงกันเพื่อใช้เปรียบเทียบอ้างอิง

4.1.2 ออกแบบไพรเมอร์บริเวณ 18S rDNA ของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* โดยดัดแปลงจาก Jinneman *et al*., 1999 ได้แก่ 1 FE edit: 5´-GCAAATTACCCAATGAAAACAGYTTC-3´ และ 4RB edit: 5´- GTGCAGGAGAAGCCAAGGTAGG-3´

4.2 สกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากโอโอซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่มีประสิทธิภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตาย จากข้อ 3 โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

4.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

4.3.1 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR รวมถึงการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่ใช้

4.3.2 เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ul ในหลอดขนาด 0.2 ml โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่คัดแยกได้ 2 ul ผสมกับ 5x 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) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้

ศรีนครินทรวิโรฒ

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturing)	98	30 วินาที
แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (denaturing)	98	30 วินาที
ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	60	30 วินาที
สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension)	72	60 วินาที
สังเคราะห์ดีเอ็นเอ รอบสุดท้าย (final extension)	72	10 นาที

หมายเหตุ : อุณหภูมิของปฏิกริยาไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ปรับอุณหภูมิเพิ่มและลดตามค่า Tm ของไพรเมอร์ที่ใช้

ทำปฏิกิริยาซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 35 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 °C

4.4 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (agarose gel electrophoresis)

จำแนกชนิดของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่คัดแยกได้โดย ตรวจสอบจากขนาดของ PCR product ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีสเปรียบเทียบกับ DNA marker ดังนี้

4.4.1 นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 5 ul มาผสมกับ สีย้อม (loading dye) ปริมาณ 1 ul ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส โดยใช้ 1.5% อะกาโรสใน 0.5xTAE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักดิ์ 135 โวลต์ เวลาประมาณ 25-30 นาที

4.4.2 ย้อมดีเอ็นเอด้วยสีย้อม syber green dye ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (UV) และบันทึกผลการทดลองที่ได้

4.5 การหาลำดับเบส (DNA sequencing)

4.5.1 ตัดแถบ ดีเอ็นเอ ที่มีขนาดตรงกับที่คำนวณไว้และทำให้ผลิตผลดีเอ็นเอ ที่ได้มีความบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัด gel elution kit (GeneMark, Taiwan) เพื่อส่งไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ First BASE laboratories ประเทศมาเลเซีย

4.5.2 ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสที่ได้

4.6 การจำแนกชนิด การวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree)

4.6.1 เมื่อได้ลำดับเบสและตรวจสอบความถูกต้องแล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

4.6.2 รวบรวมแต่ละ contig เป็นสายเดียว

กรมวิชาการเกษตร

4.6.3 จัดเรียงและเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสใช้โปรแกรม BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) ในการเปรียบเทียบลำดับเบสเพื่อจัดกลุ่ม (haplotype) ของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหนูนาใหญ่ในประเทศไทย ในการศึกษาครั้งนี้กับลำดับเบสที่มีในฐานข้อมูล GenBank

4.6.4 วิเคราะห์ความหลากหลายและสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) 3 วิธี ได้แก่ Neighbor-Joining (NJ), Maximum Likelihood (ML) และ Bayesian analysis (BI) โดยใช้ *Toxoplasma gondii* และ *Neospora caninum* เป็นโปรโตซัวนอกกลุ่ม (outgroup) การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี neighbor-joining (NJ; Saitou and Nei, 1987) คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างหนูตัวอย่างแต่ละคู่ ด้วยแบบจำลอง Tamura-Nei models (Tamura and Nei. 1993.) โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 software (Kumar *et al*., 2016) วิธี maximum likelihood (ML; Felsenstein, 1981) คำนวณหา best fit model และวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 software คำนวณด้วยแบบจำลอง Kimura 2- parameter model; K2+G (Kimura, 1980) และ ML heuristic method โดยใช้ nearest neighbor interchanges; NNI (Felsenstein, 2004) ซึ่งทั้ง 2 แผนภูมิดังกล่าวนั้น ทำการวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 รอบ โดยที่ค่าทางสถิตที่ได้จะถูกนำมาแสดงเพื่อเพิ่มระดับความเชื่อมั่นของแผนภูมิ ขณะที่วิธี Bayesian analysis (BI; Huelsenbeck and Ronquist, 2001) ดำเนินการโดยใช้โปรแกรม Mr.Bayes version 3.2 (Ronquist and Huelsenbeck., 2003) ด้วยวิธี Markov Chain Monte Carlo (mcmc) numerical method 1,000,000 generations โดยตัดค่า burn-in 20% (Kvicerova and Hypsa, 2013) วิเคราะห์ด้วยแบบจำลอง GTR+I+G (general time reversible gamma proportion of invariant sites) method (Sumner *et al*., 2012) สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสุดท้าย (final tree) โดยใช้โปรแกรม TreeView version 1.6.6 (Page, 1996)

4.7. วิเคราะห์ผลจากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) เปรียบเทียบผลร่วมกับผลทางสัณฐานวิทยาของโอโอซีสต์แต่ละชนิดที่พบ แล้วนำมาสรุปผลการทดลอง

บันทึกข้อมูล

1.ชนิดของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่สามารถก่อโรคในหนูทดลอง

5. การเพิ่มปริมาณโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่มีศักยภาพในการทำให้หนูทดลองป่วยและตายในหนูทดลอง

ให้สารแขวนลอยโอโอซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่มีศักยภาพในการทำให้หนูทดลองป่วยและตายโดยตรงทางปากกับหนูทดลอง ที่ความเข้มข้น sublethal dose เก็บมูลหนูทดลองภายหลังจากได้รับเชื้อโดยตรงทางปากในระยะเวลา 14 วัน หลังจากได้รับเชื้อ ทำการคัดแยกเชื้อพร้อมกับตรวจดูลักษณะสัณฐานวิทยาและนับจำนวนของโอโอซีสต์ที่พบ

กรมวิชาการเกษตร

บันทึกข้อมูล

1. ลักษณะสัณฐานวิทยาและปริมาณโอโอซีสต์ที่คัดแยกได้ ที่ระยะเวลา 1-15 วัน หลังจากได้รับเชื้อ
2. ระยะเวลาที่ทำให้เชื้อโปรโตซัวมีปริมาณเพิ่มขึ้น
3. ลักษณะพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น

เวลา และสถานที่

ทดลองและเก็บรวบรวมข้อมูลระหว่างเดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2563 ภายในกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร และพื้นที่ปลูกข้าวและพื้นที่การเกษตร ของเกษตรกรในพื้นที่ 8 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดปราจีนบุรี จังหวัดชัยนาท จังหวัดนครนายก จังหวัดอุทัยธานี จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดอุตรดิตถ์ จังหวัดบุรีรัมย์ และจังหวัดสงขลา

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อ (sampling and isolation)

การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2562 เก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่ โดยการใช้กรงดักชนิดจับเป็นบริเวณแปลงนาหรือพื้นที่ทำการเกษตร ในพื้นที่ 8 จังหวัด (4 ภูมิภาค) ได้แก่ ภาคตะวันออก 1 จังหวัด (จังหวัดปราจีนบุรี) ภาคกลาง 4 จังหวัด(จังหวัดชัยนาท จังหวัดนครนายก จังหวัดอุทัยธานี และจังหวัดอุตรดิตถ์) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 จังหวัด (จังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดบุรีรัมย์) และ ภาคใต้ 1 จังหวัด (จังหวัดสงขลา) รวมได้ตัวอย่างหนูในการทดลองครั้งนี้ จำนวน 74 ตัว สามารถคัดแยกโอโอซีสต์ได้ 19 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 25.68) จากตัวอย่างหนูที่ดักได้ทั้งหมด (table 1)

เมื่อพิจารณาความชุกของเชื้อโปรโตซัวทั้งสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม rodent *Eimeria* และ *S. singaporensis* ในหนูศัตรูพืชที่พบตามธรรมชาติในประเทศไทยจากงานวิจัยที่เคยมีรายงานไว้ พบว่าโปรโตซัวกลุ่ม rodent *Eimeria* สามารถคัดแยกเชื้อได้ 57 ไอโซเลท จากมูลหนู 9 สปีชีส์ ที่พบในพื้นที่ทำการเกษตร ได้แก่ *R. rattus, R. tanezumi, R. norvegicus, R. andamanensis, R. tiomanicus, Mus caroli, M. cervicolor* และ *M. pahari* จำนวน 236 ตัว คิดเป็นร้อยละ 24.2 จากตัวอย่างหนูทั้งหมด (วิชาญ และคณะ, 2562ก,ข) และเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่ทางกรมวิชาการเกษตรนำมาใช้ผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนูศัตรูพืช พบเป็นปรสิตในหนูศัตรูพืชตามธรรมชาติร้อยละ 29.52 (ยุวลักษณ์ และ Jackle, 2539) แสดงให้เห็นว่าโปรโตซัวทั้งสองกลุ่มมีร้อยละความชุกพบในหนูศัตรูพืชตามธรรมชาติที่ใกล้เคียงกันในประเทศไทย

8.2 การทดสอบศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคกับหนูทดลองในห้องปฏิบัติการ (pathogenicity)

นำตัวอย่างโอโอซีสต์ของโปรโตซัว *Eimeria* ที่คัดแยกได้จากมูลหนูนาใหญ่ที่ดักได้จากธรรมชาติในการวิจัยครั้งนี้ จำนวน 19 ไอโซเลท ไปทดสอบศักยภาพในการก่อโรคกับหนูทดลอง พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลท (ไอโซเลท UTN 02 จากจังหวัดอุทัยธานี) มีศักยภาพสามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ ร้อยละ 60 ที่ความระดับเข้มข้น 5,000 โอโอซีสต์ (กรรมวิธีที่ 2) ภายในระยะเวลา 2-5 วัน (2^{nd}- 5^{th} dpi) ภายหลังจากได้รับเชื้อ

กรมวิชาการเกษตร

โดยตรงทางปาก (table 2) คิดเป็นร้อยละ 5.26 จากตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยมีรายงานไว้ (Slapeta *et al*., 2001; Matsui *et al*., 2005; Patra *et al*., 2011; วิชาญ และคณะ, 2562ก,ข)

เมื่อพิจารณาศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคกับหนูทดลองของเชื้อโปรโตซัวทั้งสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม rodent *Eimeria* และ *S. singaporensis* ในหนูศัตรูพืชที่พบตามธรรมชาติในประเทศไทยจากงานวิจัยที่เคยมีรายงานไว้เปรียบเทียบกับโปรโตซัวกลุ่ม rodent *Eimeria* ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่าโปรโตซัวกลุ่ม rodent *Eimeria* จำนวน 6 ไอโซเลท จากมูลหนู 5 สปีชีส์ ได้แก่ *R. rattus, R. norvegicus, R. andamanensis, M. cervicolor* และ *M. pahari* มีศักยภาพสามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ ร้อยละ 20-40 ภายใน 3-10 วัน หลังจากได้รับเชื้อโดยตรงทางปาก ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 5,000 โอโอซีสต์ คิดเป็นร้อยละ 10.53 จากตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมด 57 ไอโซเลท ในขณะที่เชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* นั้นสามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ร้อยละ 100 ภายใน 10-15 วัน หลังจากได้รับเชื้อโดยตรงทางปาก ที่ระดับความเข้มข้น 100,000 ถึง 200,000 สปอร์โรซีสต์ (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* นั้นมีศักยภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้มากกว่ากลุ่ม rodent *Eimeria* แม้ว่าจะใช้ระยะเวลาในการก่อโรคที่มากกว่า เนื่องจากโปรโตซัวทั้ง 2 กลุ่ม นั้นมีวงจรชีวิตและลักษณะการเจริญเติบโตในหนูที่เป็นสัตว์อาศัยต่างกัน

8.3 ลักษณะพยาธิสภาพ (clinical pathology)

ผลการวิจัยในครั้งนี้ พบว่าหนูทดลองที่ป่วยและตายจากเชื้อโปรโตซัว *Eimeria* ไอโซเลท UTN 02 มีอาการตาแฉะ ซึม ไม่กินน้ำและอาหาร น้ำหนักลด ลักษณะพยาธิสภาพที่พบ มีลักษณะลำไส้อักเสบ (intestinal inflammation) ส่วนผลการตรวจทางพยาธิวิทยา (histopathology) บริเวณลำไส้ พบเซลล์ merozoites เป็นจำนวนมาก (figure 2) เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ วิชาญ และคณะ, 2562ก,ข ซึ่งเป็นผลจากการที่เชื้อโปรโตซัวกลุ่ม *Eimeria* เมื่อเข้าสู่ร่างกายของหนูที่เป็นสัตว์อาศัยแล้วจะเข้าสู่เซลล์อ่อนที่กำลังพัฒนาในระบบทางเดินอาหาร หรือเยื่อบุผิวบริเวณลำไส้ และเข้าทำลายบริเวณเยื่อเมือกและเซลล์บุผิวลำไส้ ทำให้เกิดอาการของโรค coccidiosis (Slapeta *et al*., 2001; Matsui *et al*., 2005; Patra *et al*., 2011)

8.4 การจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา (morphological identification)

ในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีและหลักเกณฑ์การจำแนกชนิดของโปรโตซัวในวงศ์ Eimeriidae ตามวิธีของ Duszynski and Wilber 1997 พบว่าไอโซเลท UTN 02 (table 3, figure 1) นั้นมีลักษณะ โอโอซีสต์ที่ชี้บ่งว่าเป็น *E. ferrisi* (Jarquin-Diaz *et al*., 2019)

8.5 การจำแนกชนิดทางชีวโมเลกุล (molecular identification)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของโปรโตซัว *Eimeria* ไอโซเลท UTN 02 ที่มีศักยภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ในบริเวณ 18S rDNA ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบส และนำไปหาลำดับเบส หลังจากนั้นรวมแต่ละ contig เป็นสายเดียว ตัดส่วนลำดับเบสที่ไม่ชัดเจน บริเวณปลาย 5’ และ 3’ ได้ลำดับเบสความยาว 440 คู่เบส โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับลำดับเบสของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่มีในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 30 ตัวอย่าง รวมลำดับเบสที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 31 ตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 3 วิธี ได้แก่ NJ/ML และ BI (figure 3) พบว่าทั้ง 3 วิธีให้แผนภูมิผลการวิเคราะห์ในรูปแบบเดียวกัน สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่ม ตามชนิดของสัตว์อาศัยที่โปรโตซัวสกุล *Eimeria* นั้นอาศัยอยู่ ได้แก่ clade I (rodent host) เป็นกลุ่มที่มีสัตว์ฟันแทะเป็นสัตว์อาศัย (rodent *Eimeria*) ในขณะที่โปรโตซัวใน clade II (avian host) เป็นกลุ่มที่มีนกเป็นสัตว์อาศัย clade III (bovine host) เป็นกลุ่มที่มีสัตว์เท้ากีบเป็นสัตว์อาศัย และ clade IV (lagomorph host) เป็นกลุ่มที่มีกระต่ายเป็นสัตว์อาศัย จากผลการวิเคราะห์พบว่าโปรโตซัว *Eimeria* ไอโซเลท UTN 02 ที่มีศักยภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ จากการวิจัยครั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ *E. ferrisi* (MH752036) ในฐานข้อมูล GenBank มีค่า nucleotide identity (NI) และ pairwise distances (PD) เท่ากับร้อยละ 99.5 และ 0.000 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับโปรโตซัว *Eimeria* สปีชีส์อื่นๆภายใน clade I พบว่ามีค่า NI และ PD เท่ากับร้อยละ 99.0-94.8 และ 0.003-0.036 ตามลำดับ ซึ่งจากผลการจำแนกชนิดทางชีวโมเลกุลนั้นสอดคล้องกับผลการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยาจากลักษณะของโอโอซีสต์ (table 3) ที่บ่งชี้ว่าโปรโตซัว *Eimeria* ไอโซเลท UTN 02 นั้นเป็น *E. ferrisi* isolate UTN 02 ตามหลักเกณฑ์วิธีการตั้งชื่อโปรโตซัวในกลุ่ม rodent *Eimeria* ของ Kvicerova and Hypsa, 2013 ขณะเดียวกันยังมีข้อแตกต่างกันในเรื่องชนิดของสัตว์อาศัยที่พบ ซึ่งโปรโตซัว *E. ferrisi* isolate UTN 02 ในการศึกษาครั้งนี้พบในหนูนาใหญ่ (*R. argentiventer*) ในขณะที่ *E. ferrisi* accession number MH752036 และ KT361028 (Jarquin – Diaz, *et al*., 2019) จากฐานข้อมูล GenBank นั้น พบในหนูหริ่งบ้าน (*M. musculus*) ทั้งสองตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยมีรายงานไว้ว่า โปรโตซัวในสกุล *Eimeria* บางสปีชีส์ สามารถพบในสัตว์อาศัยได้มากกว่า 1 ชนิด (Hill and Duszynski, 1986; Upton *et al*., 1992)

การจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์นั้นการวัดขนาด และรูปร่าง ของโอโอซีสต์เพียงอย่างเดียวนั้นไม่เพียงพอ (Long and Joyner, 1984) ต้องใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโอโอซีสต์และการมีหรือไม่มีโครงสร้างต่างๆของโอโอซีสต์ ร่วมกับข้อมูลทางชีวโมเลกุลในการจำแนกชนิดของโปรโตซัวในกลุ่มนี้ (Slapeta *et al*., 2001) ซึ่งลำดับเบสในบริเวณที่นิยมใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของค็อคซิเดียโปรโตซัว ได้แก่ บริเวณไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ และ plastid open reading frame (ORF470) (Zhao and Duszynski, 2001; Kvicerova and Hypsa, 2013) โดยเฉพาะบริเวณ 18S rDNA นั้นเป็นบริเวณที่เหมาะสมในการใช้เป็นเครื่องหมายในการจำแนกชนิดและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโปรโตซัวในสกุล *Eimeria* (Zhao and Duzynski, 2001)

8.6 การเพิ่มปริมาณในหนูทดลอง (oocysts propogation)

การเพิ่มปริมาณโอโอซีสต์ของโปรโตซัว *E. ferrisi* isolate UTN 02 ที่มีศักยภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ ในการวิจัยครั้งนี้ โดยการให้เชื้อความเข้มข้น 2,500 โอโอซีสต์ (sublethal dose) โดยตรงทางปากกับหนูท้องขาวบ้าน (*R. rattus*) จำนวน 10 ตัว พบว่าโอโอซีสต์ถูกขับออกมาพร้อมกับ มูลหนูที่ระยะเวลา 6- 10 วัน โดยพบโอโอซีสต์ถูกขับออกมาสูงสุด ที่ระยะเวลา 6 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ มีค่าเฉลี่ยของโอโอซีสต์ เท่ากับ 19.44±11.55 (oocysts/µl ± S.D.) และมีค่าเฉลี่ยของโอโอซีสต์ที่ระยะเวลา 4, 6, 8 และ 10 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ เท่ากับ 5.22±11.07, 19.44±11.55, 6.67±14.91 และ 5.44±10.97 (oocysts/µl ± S.D.) ตามลำดับ (figure 4) ในขณะที่

ระยะเวลา 12 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อเป็นต้นไปนั้น ตรวจไม่พบโอโอซีสต์ที่ถูกขับออกมาพร้อมกับมูลหนู ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของวิชาญ และคณะ, 2562ข รายงานว่า หลังจากการให้โอโอซีสต์ของ *E. nieschulzi* isolate K11 01 จำนวน 2,500 โอโอซีสต์ โดยตรงทางปากกับหนูท้องขาวบ้าน จำนวน 10 ตัว พบโอโอซีสต์ถูกขับออกมาพร้อมกับมูลหนูสูงสุด 28 ± 12 (oocysts/µl ± S.D.) ที่ระยะเวลา 7 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ และมีค่าเฉลี่ยของโอโอซีสต์ที่ระยะเวลา 6 - 8 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ เท่ากับ 2.2±4.64, 28±12 และ 6.3±10.4 (oocysts/µl ± S.D.) ตามลำดับ เพียงแต่ระยะเวลาที่โอโอซีสต์ถูกขับออกมาพร้อมมูลสูงสุดแตกต่างกัน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Matsui *et al*., 2005 และ Slapeta *et al*., 2001 รายงานว่า ภายหลังจากที่หนูทดลองได้รับเชื้อที่ระยะเวลา 6-8 วัน หนูทดลองจะขับโอโอซีสต์ออกมาพร้อมมูลมากที่สุด หลังจากนั้นปริมาณโอโอซีสต์ที่ถูกขับออกมาจะค่อยๆลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จนกระทั่งไม่พบโอโอซีสต์ในมูลหนูทดลอง หลังจากได้รับเชื้อแล้ว 12-14 วัน จึงแสดงให้เห็นว่าโอโอซีสต์ของโปรโตซัวกลุ่ม rodent *Eimeria* ที่มีศักยภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้นั้น สามารถเพิ่มปริมาณโอโอซีสต์ในหนูทดลองได้

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

งานวิจัยในครั้งนี้ ดำเนินการตั้งแต่เดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2563 โดยการดักหนูนาใหญ่ (*R. argentiventer*) ในพื้นที่ปลูกข้าวและพื้นที่เกษตรตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 8 จังหวัด (4 ภูมิภาค) ได้แก่ จังหวัดปราจีนบุรี จังหวัดชัยนาท จังหวัดนครนายก จังหวัดอุทัยธานี จังหวัดอุตรดิตถ์ จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดบุรีรัมย์ จังหวัดสงขลา ได้ตัวอย่างหนูทั้งหมด 74 ตัว สามารถคัดแยกโอโอซีสต์ได้ 19 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 25.68 จากตัวอย่างหนูที่ดักได้ทั้งหมด พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท UTN 02 จากจังหวัดอุทัยธานี ที่มีศักยภาพสามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ ร้อยละ 60 ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 โอโอซีสต์ ภายในระยะเวลา 2-5 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อโดยตรงทางปาก คิดเป็นร้อยละ 5.26 จากตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมด ผลการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยาจากลักษณะของโอโอซีสต์สอดคล้องกับผลการจำแนกชนิดทางชีวโมเลกุล บริเวณ 18S rDNA ได้ผลเป็น *E. ferrisi* isolate UTN 02 และผลการเพิ่มปริมาณโอโอซีสต์ของโปรโตซัว *E. ferrisi* isolate UTN 02 โดยการให้เชื้อที่ระดับความเข้มข้น 2,500 โอโอซีสต์ (sublethal dose) โดยตรงทางปากกับหนูท้องขาวบ้าน (*R. rattus*) จำนวน 10 ตัว พบโอโอซีสต์ถูกขับออกมาพร้อมกับมูลหนู สูงสุดที่ระยะเวลา 6 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ เท่ากับ 19.44±11.55 (oocysts/µl ± S.D.) และมีค่าเฉลี่ยของโอโอซีสต์ที่ระยะเวลา 4, 6, 8 และ 10 วัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ เท่ากับ 5.22±11.07, 19.44±11.55, 6.67±14.91 และ 5.44±10.97 (oocysts/µl ± S.D.) ตามลำดับ ผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าหนูนาใหญ่ตามสภาพธรรมชาติในประเทศไทยนั้น มีโอโอซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* ที่มีศักยภาพทำให้หนูป่วยและตายได้อยู่แต่สามารถพบได้น้อย อย่างไรก็ดีการที่จะนำโอโอซีสต์ของโปรโตซัวกลุ่ม rodent *Eimeria* ที่มีศักยภาพทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ ไปใช้ผลิตขยายเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนูศัตรูพืชชนิดใหม่ ยังคงต้องศึกษาวิจัยเพิ่มเติม โดยอาศัยผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ไปศึกษาและพัฒนาต่อ ทั้งในเรื่องการเพิ่มปริมาณโอโอซีสต์ที่มีประสิทธิภาพทำให้

กรมวิชาการเกษตร

หนูทดลองป่วยและตายได้ ให้มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นและสามารถคงความรุนแรงในการก่อโรคในหนูไว้ได้ รวมถึงความจำเพาะเจาะจงของเชื้อ ความปลอดภัยต่อสัตว์ชนิดอื่นและสิ่งแวดล้อม เพื่อนำไปพัฒนาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนูชนิดใหม่ ในการป้องกันและกำจัดหนูศัตรูพืช เพื่อลดการใช้สารเคมีและรักษาสมดุลธรรมชาติต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน สำหรับการศึกษาและพัฒนาต่อยอด เพื่อที่จะนำไปผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนูชนิดใหม่ต่อไป

11. คำขอบคุณ : ขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่เป็นแหล่งทุนวิจัยในการศึกษาครั้งนี้ขอขอบคุณ คุณสิทธิศักดิ์ แสไพศาล คุณกาญจนา วาระวิชนี และคุณแสนชัย คำหล้า กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่อง thermal cycler ในการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล ขอขอบคุณ คุณทัศวรรณ พุ่มกาหลง คุณบรรจง บุญครอบ คุณวิชา สีแจ่ม คุณธนากรณ์ ภักดีสุข คุณกุลธิดา เจนสิริโสภณ และเจ้าหน้าที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร. 2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 136 หน้า

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และ T. Jackle. 2539. การแพร่ระบาดของ *Sarcocystis* ในหนูศัตรูพืชในประเทศไทย. หน้า 207 – 214. *ใน*: รายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช 2539 ภาคแผ่นภาพ ครั้งที่ 10 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

วิชาญ วรรธนะไกวัล ปราสาททอง พรหมเกิด สมเกียรติ กล้าแข็ง และทรงทัพ แก้วตา. 2562ก. การคัดแยกและศึกษาศักยภาพการก่อโรคในหนูศัตรูพืชของค็อคซิเดียโปรโตซัวในลำไส้ (Apicomplexa: Eimeriidae) จากหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* **และ** *Mus* ที่พบในประเทศไทย. หน้า 60 – 80. *ใน*: การประชุมวิชาการประจำปีสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 10-12 มิถุนายน 2562 ณ โรงแรมรอยัล ฮิลล์ กอล์ฟ รีสอร์ท แอนด์ สปา จังหวัดนครนายก.

วิชาญ วรรธนะไกวัล ปราสาททอง พรหมเกิด สมเกียรติ กล้าแข็ง และทรงทัพ แก้วตา. 2562ข. การศึกษาศักยภาพการก่อโรคในหนูศัตรูพืชและการเพิ่มปริมาณของค็อคซิเดียโปรโตซัวในลำไส้ (Apicomplexa: Eimeriidae) จากหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* **และ** *Mus* ที่พบในประเทศไทย. หน้า 22 – 23. *ใน*: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 14. 12-14 พฤศจิกายน 2562 ณ โรงแรมดุสิตธานี หัวหิน อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี.

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.

กรมวิชาการเกษตร

Berto, B.P., H.R. Luz, W. Flausino, I. Ferreira and C.W. Lopes. 2009. New species of Eimeria Schneider, 1875 and Isospora Schneider, 1881 (Apicomplex: Eimeriidae) from the shortcrested flycatcher Myiarchus ferox (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. Systematic of parasitology. 74: 75-80.

Duszynski, D.W. 2001. Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. The Journal of Parasitology. 57: 948 – 952.

Duszynski, D.W., L.couch and S.J. Upton. 2000. Coccidia of the world. Available source: http://biology.umn.edu/biology/coccidia/home.html.

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.

Duszynski, D.W. and S.J. Upton. 2000. *Cyclospora*, *Eimeria*, *Isospora*, and *Cryptosporidium* spp. Parasitic Diseases of wild mammals, 2nd edition. Iowa state press, pp. 416-433.

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. 663p.

Hill, T.P. and D.W. Duszynski. 1986. Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) from sciurid rodents (*Eutamias, Sciurus, Tamiasciuris* spp.) from the western United States and northern Mexico with description of two new species. Journal of Protozoology. 33: 282-288.

Huelsenbeck, J.P. and F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics. 17: 754-755.

Hurkova, L., M.A. Baker, M. Jirku and D. Modry. 2005. Two new species of *Eimeria* Schneider 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the broad-toothed field mouse, *Apodemus mystacinus* Danford and Alston 1877 (Rodentia: Muridae) from Jordan. Parasitology research. 97: 33-40.

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.

Jarquin – Diaz, V.H., A. Balard, J. Jost, J. Kraft, M.N. Dikmen, J. Kvicerova and E. Heitlinger. 2019. Detection and quantification of house mouse *Eimeria* at the species level-challenges and solutions for the assessment of coccidia in wildlife. Parasites and Wildlife. 10: 29-40.

กรมวิทยาศาสตร์

Jinneman, K.C., J.H. Wetherington, W.E. Hill. C.J. Omiescinski, A.M. Adams, J.M. Johnson, B.J. Tenge, N.L. Dang and M.M. Wekell. 1999. An oligonucleotide-ligation assay for the differentiation between Cyclospora and Eimeria spp. polymerase chain reaction amplification products. Journal of Food Protection. 62: 682-685.

Joyner, L.P. 1982. Host and site specificity. The biology of the coccidia. University park press, Baltimore, pp. 35-62.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111–120.

Kowalik, S. and H. Zahner. 1999. Eimeria separata: method for the excystation of sporozoites. 85: 496-499.

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. 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.

Lekagul, B. and A.M.Jeffery. 1977. Mammal of Thailand. Printed at Kurusapha Ladprao Press by Nai kamthon Sathirakul, Bangkok. 758 p.

Long, P. L. and L. P. Joyner. 1984. Problems in the identification of species of *Eimeria*. The Journal of Protozoology. 31: 535-541.

Macova, A. 2013. Systemstics of Apicomplexa parasites and coevolution with definitive and intermediate hosts. Master thesis faculty of science. University of South Bohemia.

Matsui, T., T. Fujino, F. Kobayashi, T. Morita and S. Imai. 2005. Life cycle of *Eimeria krijgsmanni*-like coccidium in the mouse (*Mus musculus*). The Journal of Veterinary Medical Science. 68: 331-336.

Nowell, F. and S. Higgs. 1988. *Eimeria* species infecting wood mice (genus *Apodemus*) and the transfer of two species to *Mus musculus*. Parasitology. 98: 329-336.

Page, R.D.M., 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computers Applications in the Biosciences. 12: 357-358.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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. Research Journal of Parasitology. 6: 43-52.

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.

Slapeta, J.R., D. Modry, J. Votypka, M. 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.

Sumner J. G., P.D. Jarvis, J. Fernandez-Sanchez, B.T. Kaine, M.D. Woodhams and B.R. Holland. 2012. Is the general time-reversible model bad for molecular phylogenetics? Systematic Biology. 61: 1069–1074.

Tamura K and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution. **10**: 512–26.

Upton, S.J., C.T. McAllister, D.B. Brillhart, D.W. Duszynski and C.W. wash. 1992. Cross-transmission studies with *Eimeria arizonensis*-like oocysts (Apicomplexa) in new world rodents of the genera *Baiomys, Neotoma, Onychomys, Peromyscus* and *Reithrodontomys* (Muridae). Journal of Parasitology. 78: 406-413.

Zhao, X. and D.W. Duszynski. 2001. Phylogenetic relationships among rodent *Eimeria* species determined by plastid ORF470 and nuclear 18S rDNA sequences. International Journal for Parasitology. 31: 715-719.

ลิขสิทธิ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. **ภาคผนวก** :

Table 1 Summary of nucleotide sequences of *S. singaporensis* included in this study.

No	Country	Sampling location	Locallity coordinating	Source	Hosts (N)	Oocysts (N)
1	Eastern Thailand	BanSang, PrachinBuri (PCBR)	14.011897, 101.215630	rice field	5	2
2	Central Thailand	Mueng, ChaiNat (CN)	15.19322, 100.123391	rice field	21	8
		Mueng, NakhonNayok (NKY)	14.159897, 101.134773	rice field	5	N.A.
		NongYang, UthaiTani (UTN)	15.3228345, 99.6391726	rice field	7	3
		Phichai, Uttaradit (UTD)	17.263430, 100.099866	rice field	12	4
3	NorthEast Thailand	Sikhio, NakhonRatchasima (NKM)	14.872284, 101.650930	corn field	8	N.A.
		Napho, Buriram (BRR)	15.625610,102.947091	rice field	7	N.A.
4	Southern Thailand	HatYai, SongKla (SK)	6.968445, 100.380445	rice field	9	2
			(prevalence 25.68%)	**Total**	**74**	**19**

N.A.; Not available

กรมวิชาการเกษตร

Table 2 Comparative descriptive measurement of sporocyst measured in micrometers (M ± SD) and molecular diversity of 18S rDNA sequences (600 bp) from *S. singaporensis*, 22 samples were collected in this study.

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)	
1	PCBR 01	BanSang, PrachinBuri	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	25	0	0	0	0	-
2	PCBR 02	BanSang, PrachinBuri	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	25	0	0	0	0	-
*3	CN 01	Mueng, ChaiNat	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	3	0	0	N.A.	0	-
*4	CN 02	Mueng, ChaiNat	*R. argentiventer*	*Isospora* sp.	1	0	0	N.A.	0	-
*5	CN 03	Mueng, ChaiNat	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	1	0	0	N.A.	0	-
*6	UTN 02	NongYang, UthaiTani	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	25	0	60	N.A.	0	2-5
7	UTN 06	NongYang, UthaiTani	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	25	0	0	0	0	-
8	UTN 07	NongYang, UthaiTani	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	25	0	0	0	0	-
*9	UTD 02	Phichai, Uttaradit	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	11	0	0	N.A.	0	-
*10	UTD 03	Phichai, Uttaradit	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	11	0	0	N.A.	0	-
11	UTD 04	Phichai, Uttaradit	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	25	0	0	0	0	-
12	UTD 08	Phichai, Uttaradit	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	25	0	0	0	0	-
13	SK 05	HatYai, SongKla	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	100	0	0	0	0	-
*14	SK 10	HatYai, SongKla	*R. argentiventer*	*Eimeria* sp.	2	0	0	N.A.	0	-

* ; the isolate of oocysts have insufficient concentration to all treatments.

N.A.; Not available

กรมวิชาการเกษตร

Table 3 Comparison of morphological characteristics measured in micrometers (M ± SD) from *Eimeria ferrisi* isolate UTN02, can cause rodents to died in this study and 4 rodents *Eimeria* from the previous study.

No.	Voucher number / Acession number	Type of oocysts	Hosts (countries)	Oocysts											Reference
				OS	Length (min - max)	Width (min - max)	SI	OW layer	OW texture	OR	MP	PG	SB	SR	
1	UTN 02	*E. ferrisi*	*Rattus argentiventer* (Thailand)	Spherical	12.48 ± 0.54 (11.88 - 12.87)	11.68 ± 0.44 (10.89-11.88)	1.07	2	smooth	-	-	+	+	+	This study
2	KT360995	*E. ferrisi*	*Mus musculus* (Germany)	Spherical /Ellipsoidal	17.32 (13.59 - 21.47)	14 (10.97 - 17.44)	1.23	2	smooth	-	-	+	+	+	Jarquin-Diaz *et al*., 2019
3	AF311643	*E. separata*	*Rattus noregicus* (Lewis rat; Germany)	Spherical	14.5 (9.9 - 17.6)	12.5 (8.8 - 16.5)	1.16	2	smooth	-	-	-	+	+	Duszynski, 1971; Kowalik and Zahner., 1999; Zhao and Duszynski, 2001
4	-	*E. apionodes*	*Apoodemus sylvaticus* (United Kingdom)	Ovoid	12.73 ± 0.69	7.61 ± 0.33	1.67	2	rough	-	-	+	+	+	Nowell and Higgs, 1988
5	-	*E. alorani*	*Apodemus mystacinus* (Jordan)	Ellipsoidal	26.9 (23.0 - 29.0)	19.3 (18.0 - 22.0)	1.39	2	smooth	-	-	+	+	+	Hurkova *et al*., 2005

OS - oocysts shape; SI - shape index; OW - oocysts wall; OR - oocysts residuum; MP – micropyle; PG – polar granule; SB – stieda body; SR – sporocyst residuum.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1 Sporulated oocysts of *Eimeria ferrisi* isolate UTN 02 can cause rodents to died in this study (100x)

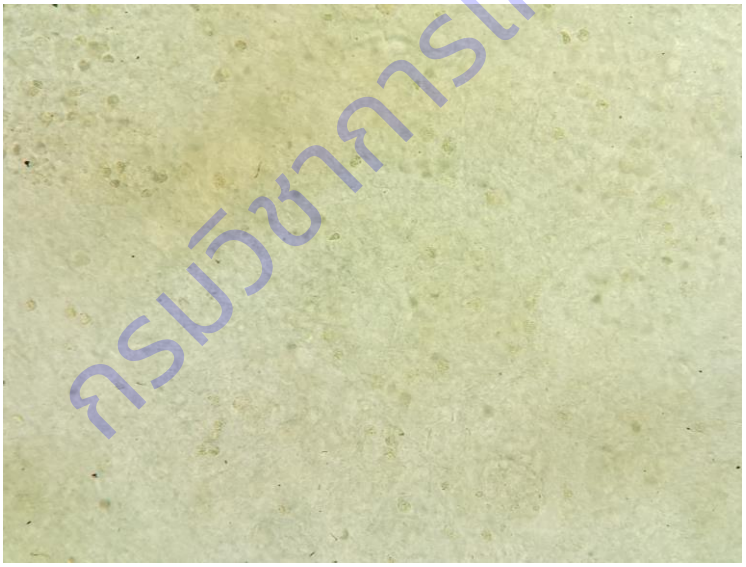

Figure 2 Jejunum of *Rattus rattus* experimentally infected with 2,500 oocysts of *Eimeria ferrisi* isolate UTN 02 and died at the 5th dpi. showing large number of merozoites (x 400).

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3 Phylogenetic tree based on partial 18S rDNA sequences (440 bp) were used to infer the molecular identification of *Eimeria ferrisi* isolate UTN02 in this study. Tree was constructed using the Neighbor-Joining (NJ), Maximum Likelihood (ML) and Baysian inference (BI) respectively and rooted on *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. The bootstrap values (1,000 replicates) based on NJ/ML and the Bayesian posterior probability values are given above the branchs respectively. Scale bar indicates nucleotides substitutions per site.

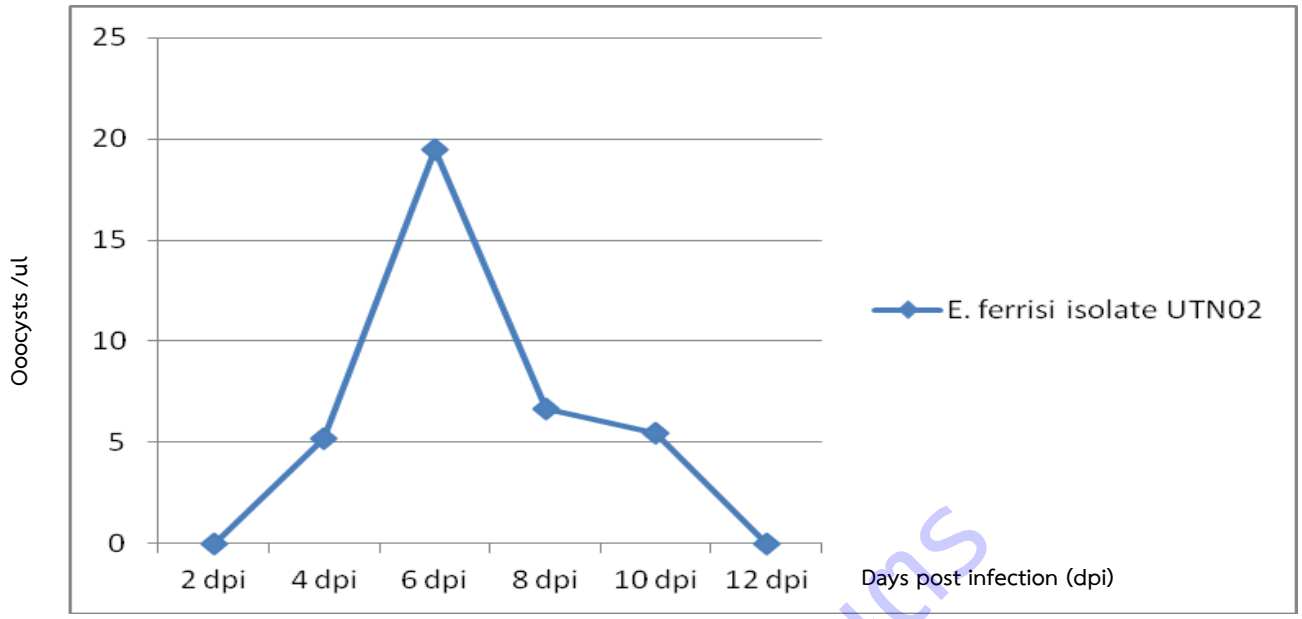

Figure 4 *E. ferrisi* isolate UTN02 shedding by *R. rattus* receive with 2,500 oocysts over period of 12 days post infection (dpi).

กรมวิชาการเกษตร