

ความชุก และลักษณะทางอนุชีววิทยาของ
เชื้อพลาสโมเดียมและลิวโคไซโตซูนในไก่พื้นเมือง
ในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

โดย : น.สพ.กิตติชัย อุ่นจิต



Agenda

01

บทนำ

ที่มาของการศึกษา

02

อุปกรณ์ และ วิธีการ

ตัวอย่าง การตรวจ และวิธีการวิเคราะห์

03

ผล และ วิจัยารณ์

ความชุก ผลการวิเคราะห์ความสอดคล้อง

04

สรุปผล และ ข้อเสนอแนะ

ความชุก ผลการวิเคราะห์ความสอดคล้อง



บทนำ

ที่มาของการศึกษา

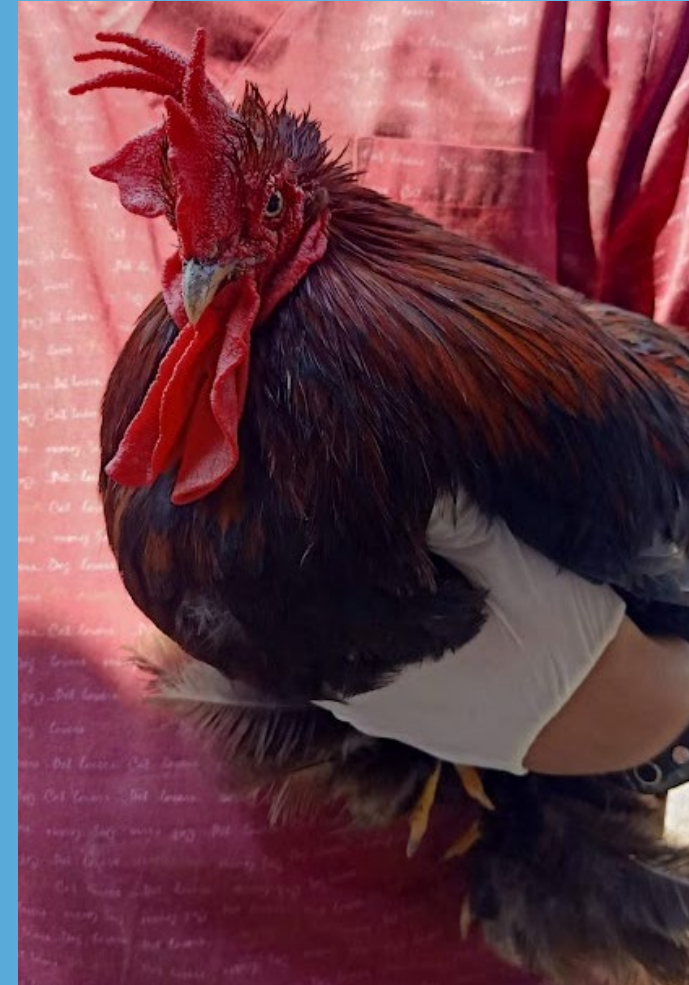
บทนำ

ที่มาของการศึกษา

เชื้อพลาสมาเดียมและลิวโคไซโตซูน เป็นปรสิตที่พบในเลือดสัตว์ปีก เช่น ไก่ มีแมลงเป็นพาหะนำโรค ไก่ที่ติดเชื้อมักก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงเป็นอย่างมาก

ไก่อาจไม่แสดงอาการ หรือแสดงอาการ เช่น น้ำหนักลด ผอม มีไข้ ไม่มีแรง อูจจาระร่วง ถ้าติดเชือรุนแรงไก่จะมีอาการชัก หงอนซีด และตายได้

ไก่ที่ไม่แสดงอาการอาจเป็น**ตัวอมโรค**ไปสู่ไก่ตัวอื่นผ่านแมลงพาหะ



บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

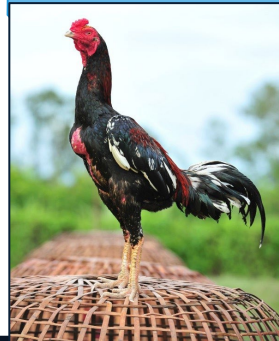
โรคติดเชื่อพลาสโมเดียม

- ❖ โรคติดเชื่อพลาสโมเดียม (*Plasmodium* spp.)
- ❖ ยุงเป็นพาหะนำโรค ได้แก่ ยุงในสกุล *Aedes* spp. *Culex* spp. และ *Anopheles* spp.



<https://www.istockphoto.com/th>

เชื้อลิวโคไซโตซูน



เชื้อพลาสโมเดียม



โรคติดเชื่อลิวโคไซโตซูน

- ❖ เชื้อลิวโคไซโตซูน (*Leucocytozoon* spp.)
- ❖ รื่น (*Culicoides* spp.) เป็นพาหะในการนำโรค

ไก่พื้นเมืองมีการเลี้ยงแพร่หลายทั่วประเทศ แต่**ปัญหาที่พบ**ในการเลี้ยงไก่พื้นเมือง คือ**การเลี้ยงและการจัดการฟาร์มที่ยังไม่ดีพอ** โดยเกษตรกรส่วนใหญ่มีการเลี้ยงแบบปล่อยให้หากินเองตามบริเวณที่อยู่อาศัย หรือบริเวณฟาร์ม อาจส่งผลให้ไก่พื้นเมืองมีโอกาสติดเชื่อไวรัส แบคทีเรีย และปรสิตจากสิ่งแวดล้อมสูงขึ้น.

บทนำ

วัตถุประสงค์

1. สำรวจความชุกของการติดเชื้อพลาสมาเดียมและลิวโคไซโตซูนในไก่พื้นเมืองที่เลี้ยงในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน
2. ศึกษาลักษณะทางอนุชีววิทยาของเชื้อที่ตรวจพบ ทำให้ทราบสถานะโรคในพื้นที่ และนำข้อมูลมาช่วยในการวางแผน ควบคุม และป้องกันโรค
3. เปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการตรวจหาเชื้อโดยวิธี stained thin smear และ multiplex PCR ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเลือกใช้วิธีทดสอบที่มีความจำเพาะต่อการตรวจหาเชื้อมาปรับใช้ในการตรวจวินิจฉัย

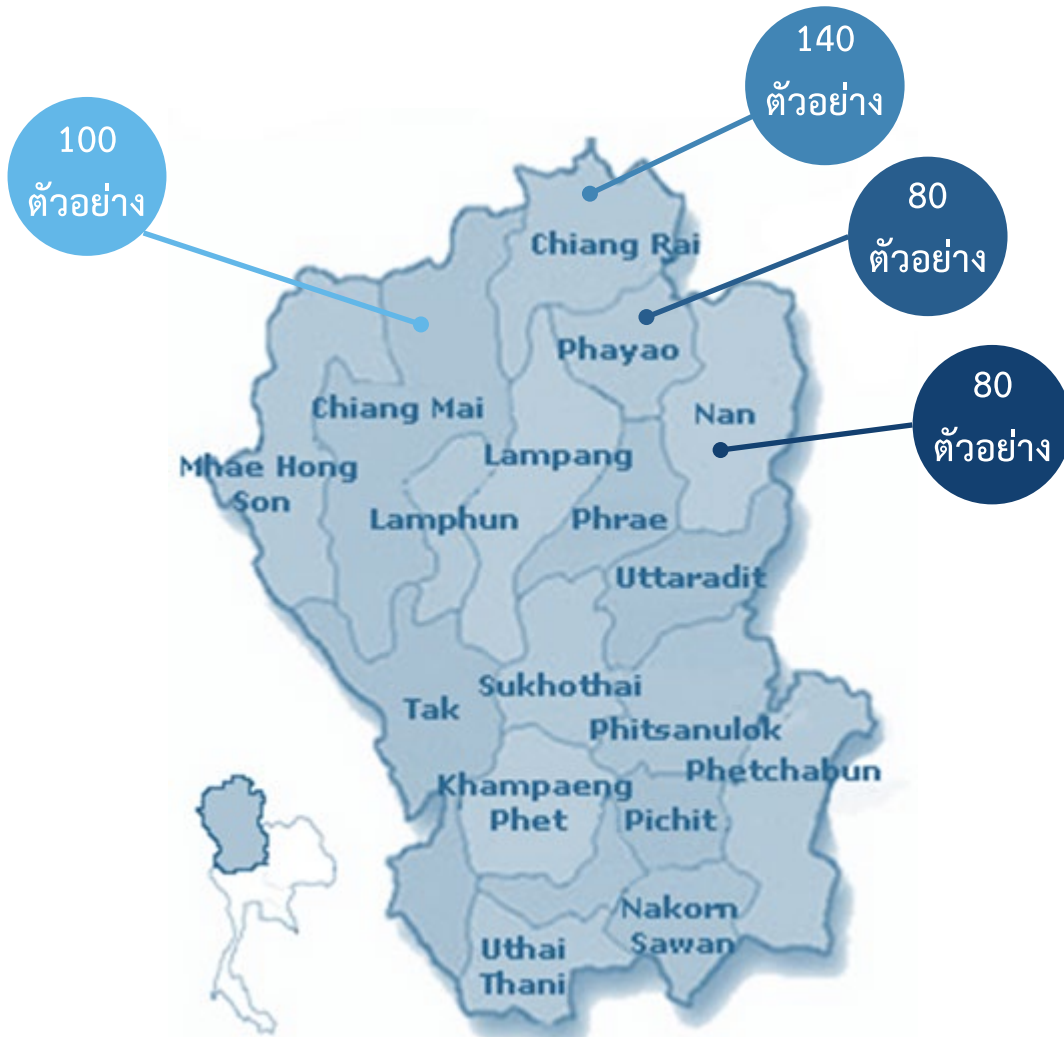


อุปกรณ์ และ วิธีการ

ตัวอย่าง การตรวจ และวิธีการวิเคราะห์

อุปกรณ์ และวิธีการ

ตัวอย่าง พื้นที่ศึกษา และการเก็บตัวอย่าง



- เก็บตัวอย่างเลือดไก่พื้นเมือง จำนวน 400 ตัวอย่าง
- เก็บเลือดจากเส้นเลือดบริเวณใต้ปีก (wing vein)
- ปริมาตร 0.5-1 มิลลิลิตร
- ใส่หลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA
- เก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส จนกว่าทำการทดสอบ

■ เชียงใหม่ 100 ตัวอย่าง จาก 10 ฟาร์ม

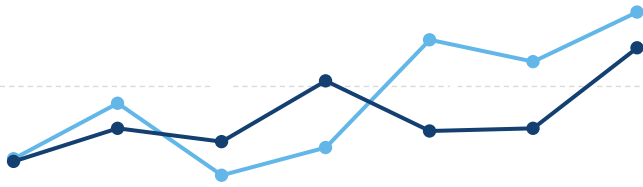
■ จังหวัดเชียงราย 140 ตัวอย่าง จาก 14 ฟาร์ม

■ พะเยา 80 ตัวอย่าง จาก 8 ฟาร์ม .

■ น่าน 80 ตัวอย่าง จาก 8 ฟาร์ม

การเก็บตัวอย่าง





อุปกรณ์ และวิธีการ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูล

- วิเคราะห์ความชุกแบบภาคตัดขวาง (Cross-sectional study)
- วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา แจกแจงความชุกเป็นรายตัวตามพื้นที่ที่ทำการสำรวจ ตามชนิดของเชื้อที่พบ
- เปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการตรวจหาเชื้อโดยวิธี stained thin smear และ multiplex PCR โดยใช้ Kappa (McHugh, 2012) โดยใช้โปรแกรม R

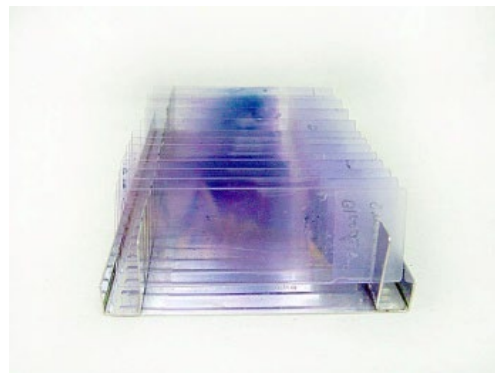
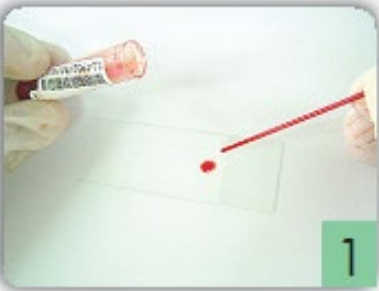
โดยใช้เกณฑ์วัดตาม Weighted Kappa Index (Landis & Koch, 1977) มีค่าตัดสินดังนี้
<0.00 = แย่ (poor),
0.00-0.20 = น้อย (slight),
0.21-0.40 = พอใช้ (fair),
0.41-0.60 = ปานกลาง (moderate),
0.61-0.80 = ดี (substantial),
0.80-1.00 = ค่อนข้างสมบูรณ์ (almost perfect)

อุปกรณ์ และวิธีการ

การตรวจด้วยวิธี stained thin smear

การตรวจด้วยวิธี stained thin smear

- การป้ายเลือดแบบบางลงบนสไลด์ (thin smear)
- คงสภาพด้วย absolute ethanol นาน 5 นาที
- ย้อมเลือดป้ายสไลด์ด้วย 5% Giemsa นาน 40 นาที
- ตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ที่กำลังขยาย 100 เท่า (100x) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ



อุปกรณ์ และวิธีการ

การตรวจด้วยวิธี multiplex PCR

1

- สกัดสารพันธุกรรมชนิด DNA

2

- ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี multiplex PCR

3

- เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine)

4

- นำ PCR product ไปวิเคราะห์ขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis

5

- ย้อม gel ด้วย Novel juice

6

- วิเคราะห์ขนาดของ PCR product ภายใต้แสง UV

การตรวจด้วยวิธี multiplex PCR

- สกัดสารพันธุกรรมชนิด DNA ด้วยชุดสกัด
- เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR (96-Well Thermal Cycler)

ประกอบด้วย ขั้นตอน

- Initial denaturation ที่ 95°C นาน 15 นาที
- 35x [
 - denaturation ที่ 95 °C นาน 30 วินาที
 - annealing ที่ 59°C นาน 90 วินาที
 - extension ที่ 72°C นาน 90 วินาที
- final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที

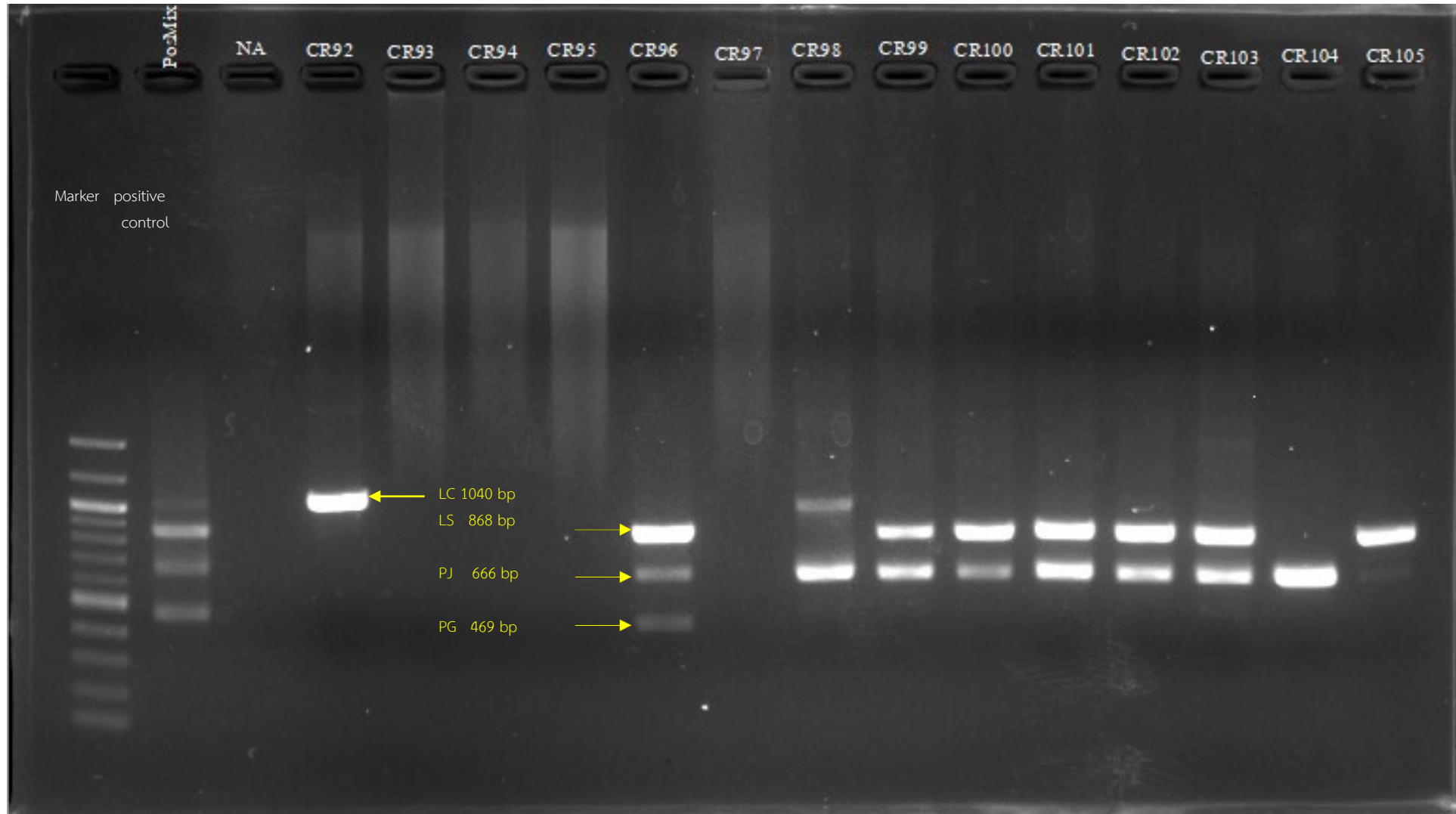
อุปกรณ์ และวิธีการ

การตรวจด้วยวิธี multiplex PCR (Xuan et al. 2021)

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

Primer name	Sequence (5' to 3')	Concentration (10x, μ M)	PCR product size (bp)
<i>P. gallinaceum</i>			
PGCox3F	TGTAACAAATAATAAAGCTTCTGAAATTATTAATGAT	0.2	469
PGCox3R	CCTGGAGTTCTTCATCTAAATTGAA	0.2	
<i>P. juxtannucleare</i>			
PJCox3F	CTAAATGTAAATATTCAGTAGCTTGTAATGATC	0.2	666
PJCox3R	CAACAATACACGCTATGTTTTATTATGTA	0.2	
<i>L. caulleryi</i>			
LCCox3F	GCTTTGAACACGAATATATTTCTGCTAATA	0.15	1,040
LCCox3R	GCCTGGAGTTCTTAATCTTGATAGAT	0.15	
<i>L. sabraezesi</i>			
LSCox3F	CATATGAGAAACCAATAACAGATGGTATA	0.2	868
LSCox3R	ACGCCTGGAGTTCATGTTA	0.2	

Multiplex PCR

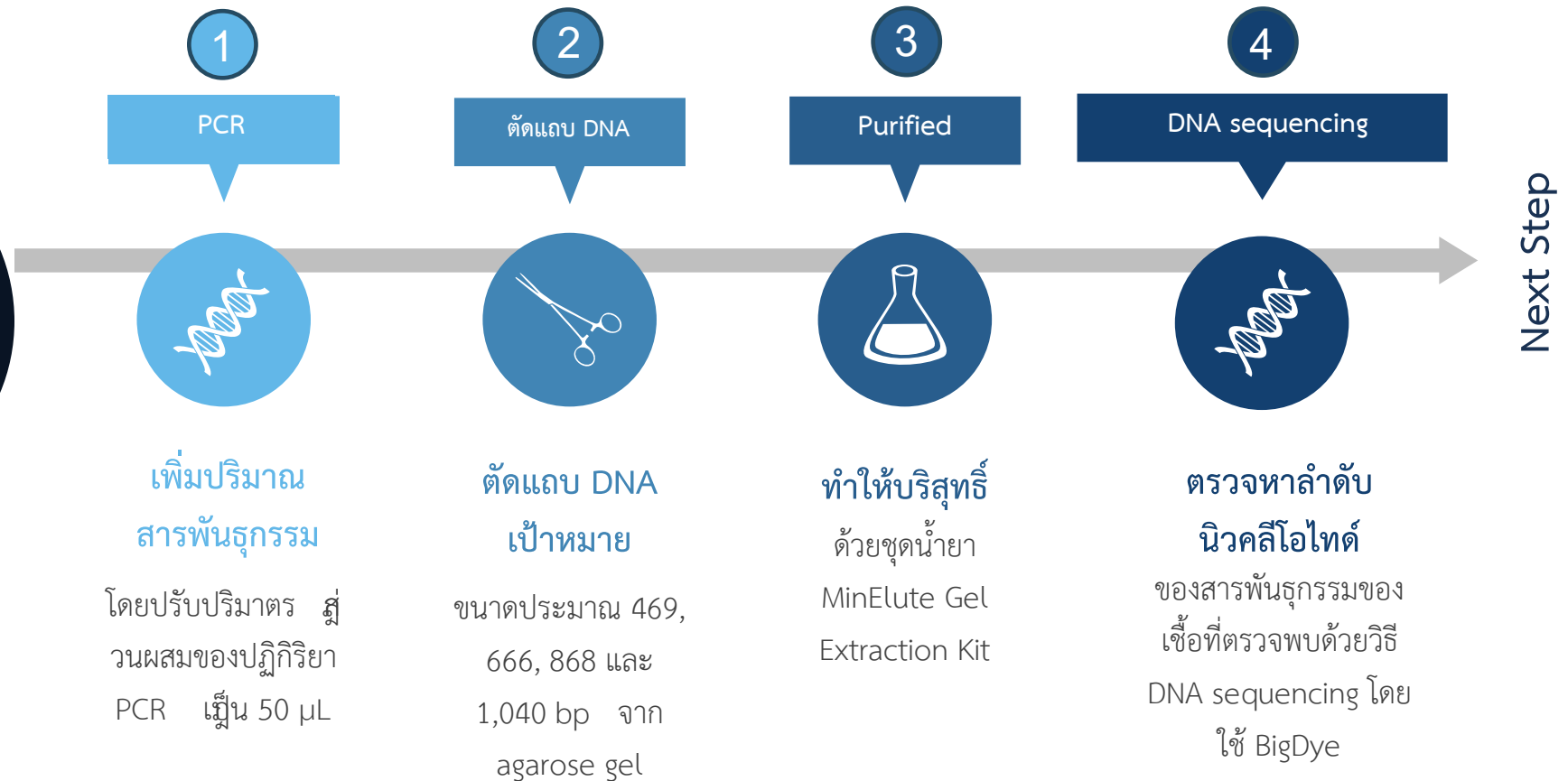




อุปกรณ์ และวิธีการ

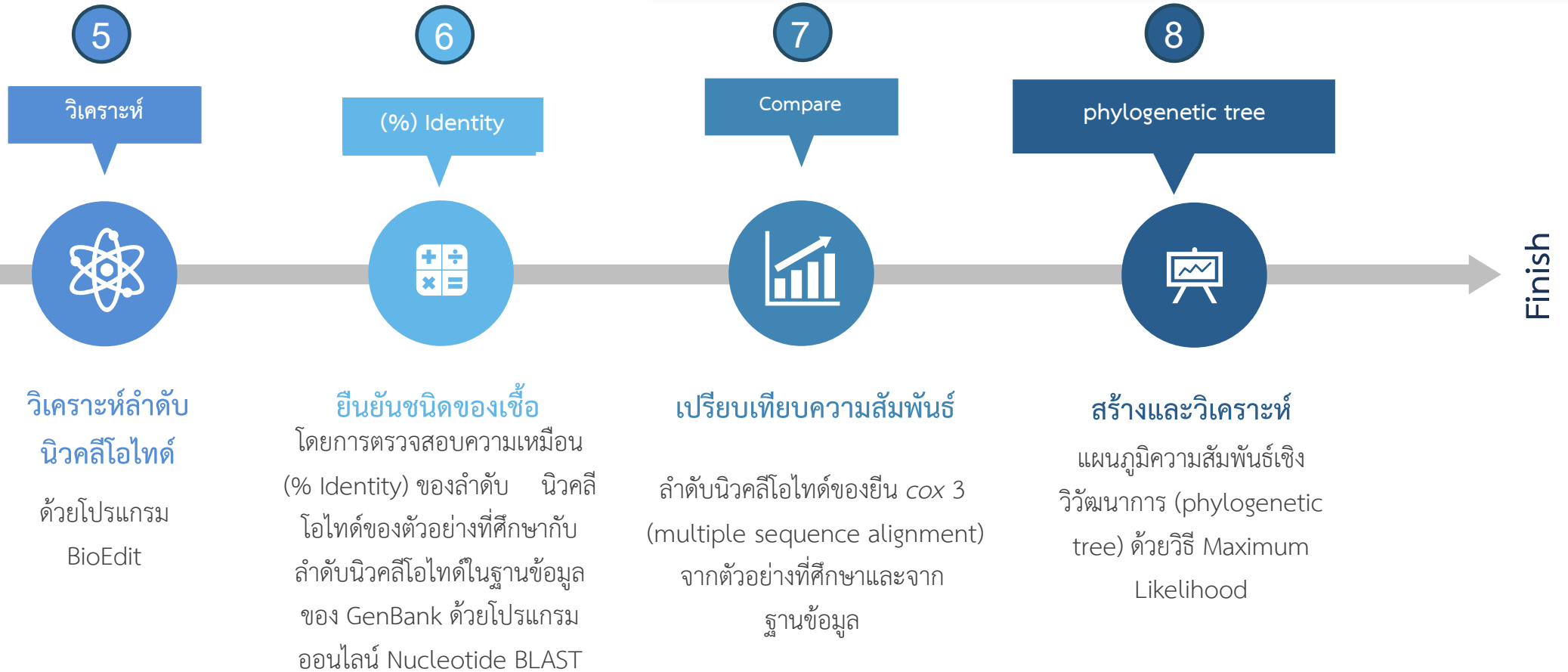
การตรวจและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (1)

ตัวอย่างที่
ให้ผลบวกด้วย
วิธี multiple-
PCR



อุปกรณ์ และวิธีการ

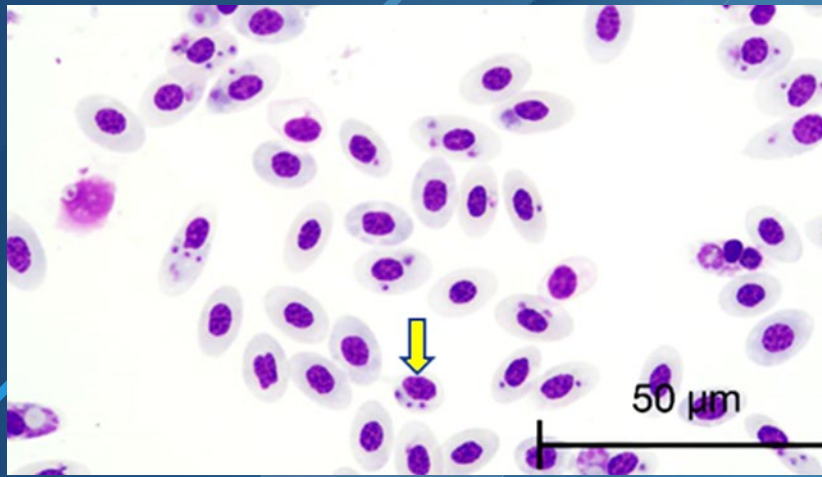
การตรวจและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (2)





ผล และ วิจัยรณั้

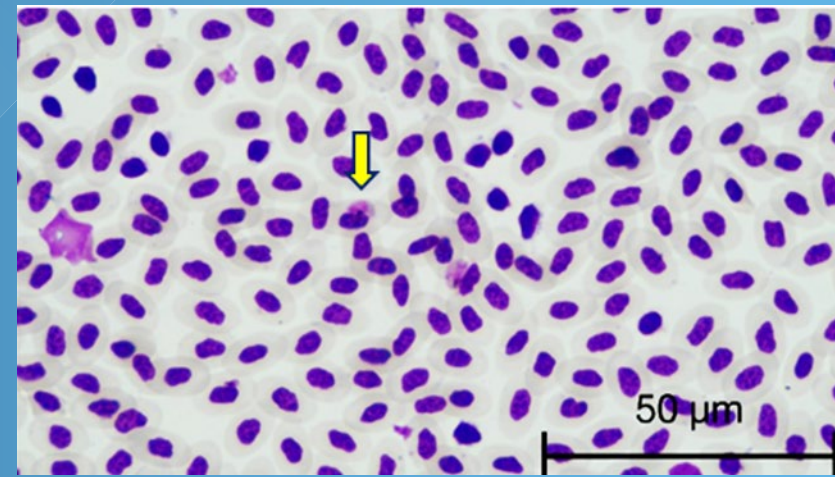
ความชุก ผลการวิเคราะห์ความสอดคล้อง



รูปที่ 1

P. gallinaceum

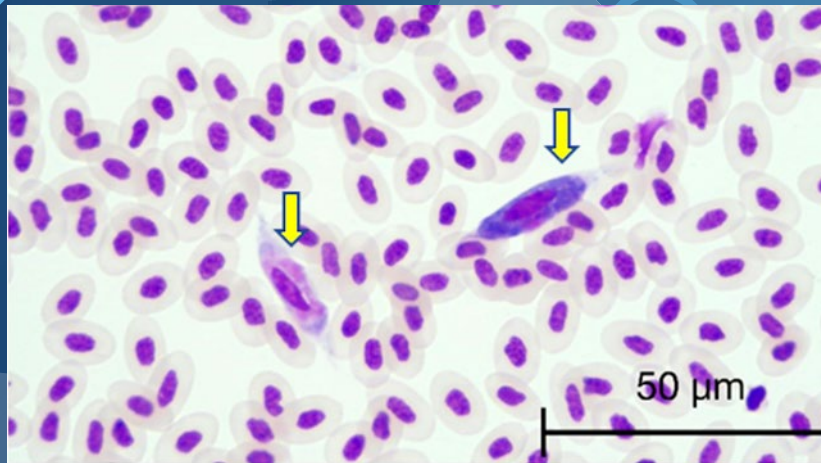
ระยะ trophozoite (ลูกศร) (10x)



รูปที่ 2

P. juxtannucleare

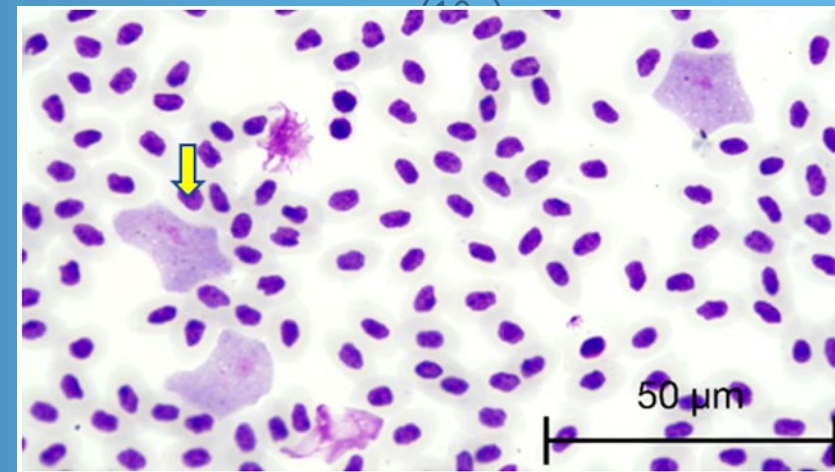
ระยะ gametocyte (ลูกศร)



รูปที่ 3

L. sabraezesi

elongate form (ลูกศร) (10x)

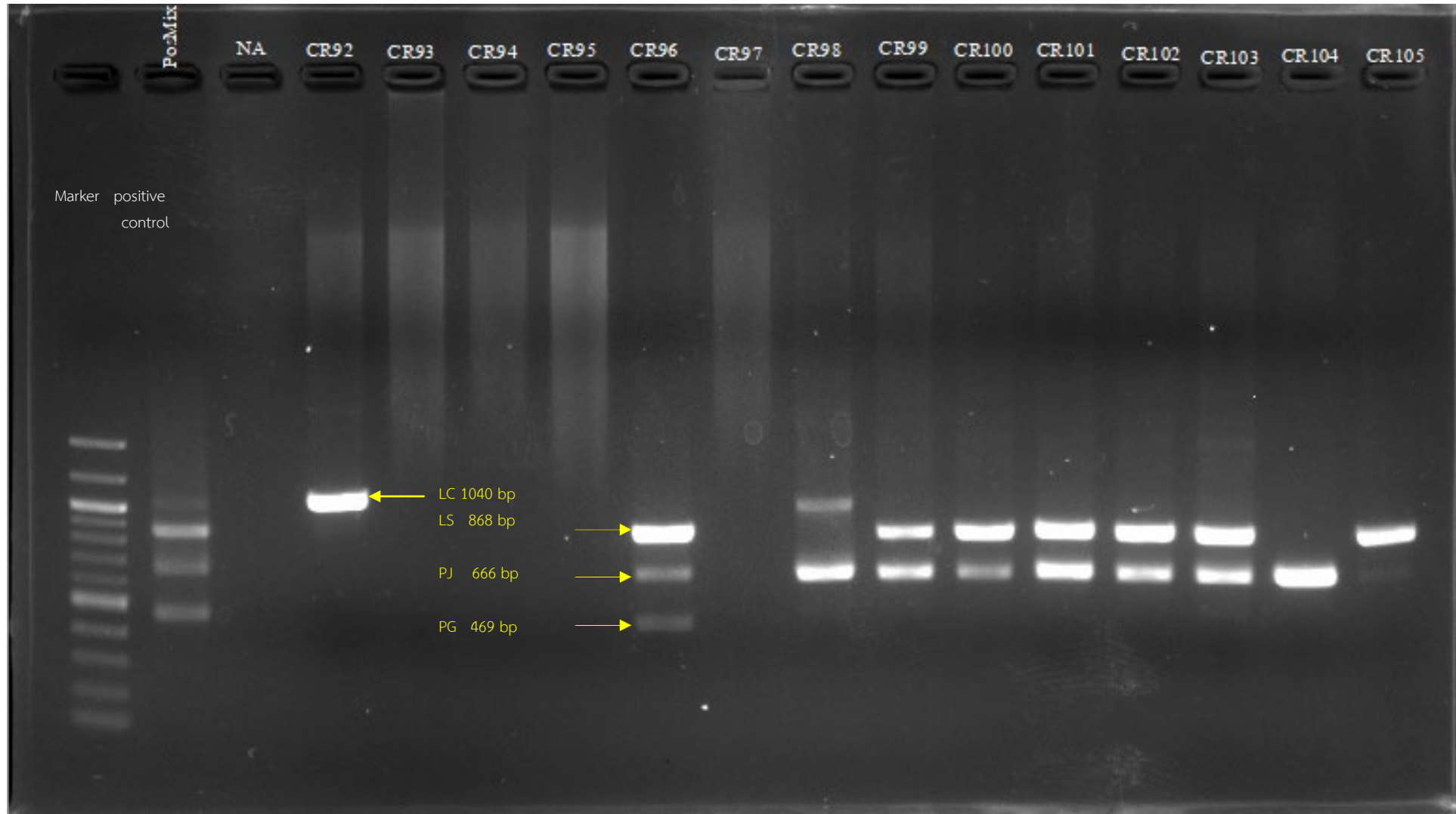


รูปที่ 4

L. caulleryi

ระยะ microgametocyte (ลูกศร) (10x)

Multiplex PCR



ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจโดยวิธี multiplex PCR และ stained thin smear

Table 2 Prevalence of *P. gallinaceum*, *P. juxtannucleare*, *L. sabraezesi* and *L. caulleryi* infection in native chickens in upper Northern Thailand during March to April 2023 by stained thin smear and multiplex PCR (n=400)

Parasites	Number of positive (% prevalence)	
	stained thin smear	multiplex PCR
<i>P. gallinaceum</i>	8 (2.0%)	24 (6.0%)
<i>P. juxtannucleare</i>	197 (49.3%)	292 (73.0%)
<i>L. sabraezesi</i>	266 (66.5%)	316 (79.0%)
<i>L. caulleryi</i>	2 (0.5%)	8 (2.0%)
Overall	319 (79.8%)	355 (88.8%)

ผลและวิจารณ์

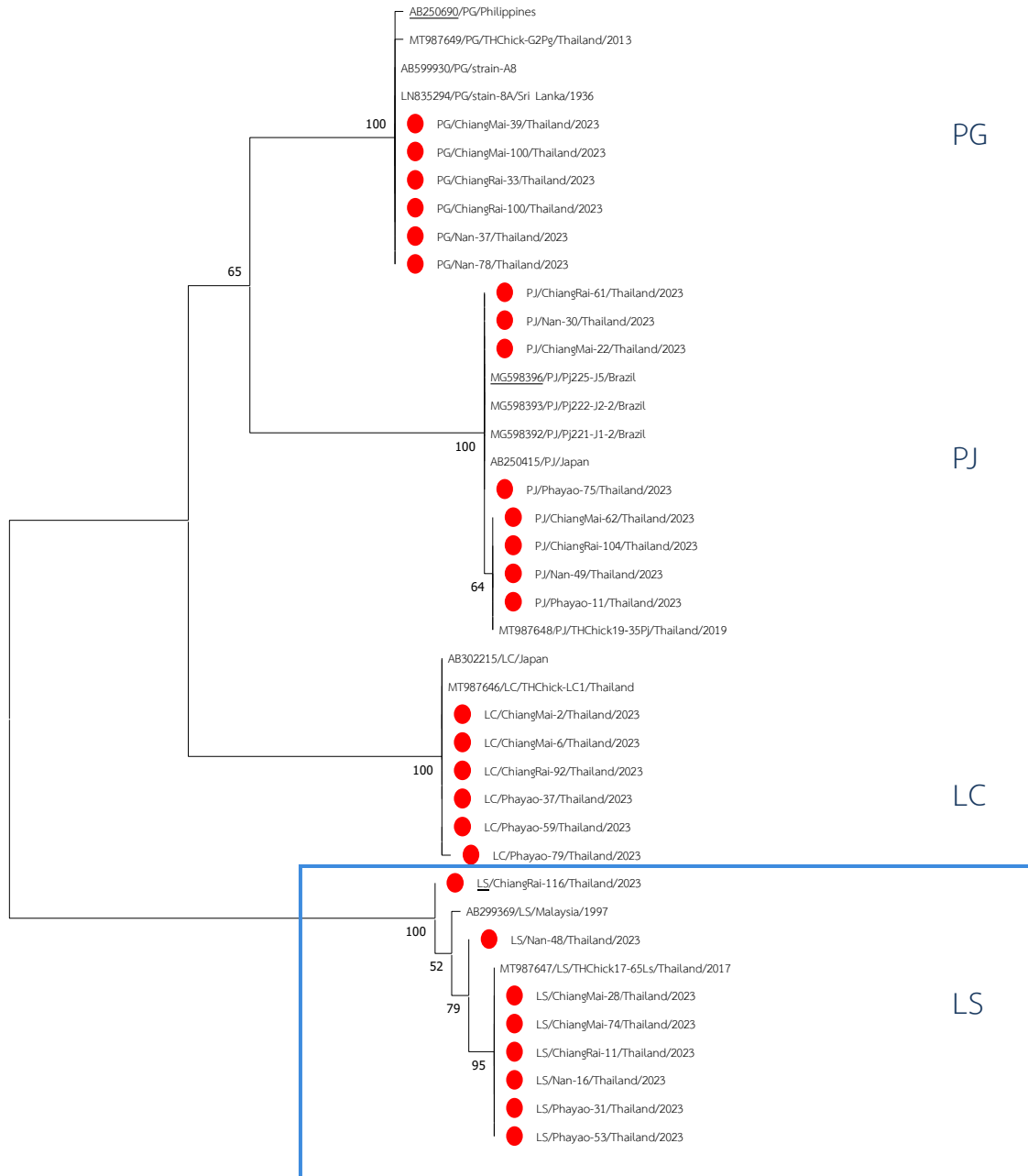
ผลการตรวจโดยวิธี multiplex PCR

Table 3 Prevalence of Plasmodium spp. and Leucocytozoon spp. infection in native chickens in upper Northern Thailand during March to April 2023 based on multiplex PCR

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

ความสอดคล้องของการทดสอบ

Blood Parasite			multiplex PCR			Kappa*	95% CI
			Negative	Positive	Total	(Agreement)	
<i>P. gallinaceum</i>	Microscopic examination	Negative	376	16	392	0.484 (Moderate)	0.237-0.73
		Positive	0	8	8		
		Total	376	24	400		
<i>P. juxtannucleare</i>		Negative	108	95	203	0.528 (Moderate)	0.445-0.61
		Positive	0	197	197		
		Total	108	292	400		
<i>L. sabrazesi</i>		Negative	84	50	134	0.691 (Substantial)	0.610-0.77
		Positive	0	266	266		
		Total	84	316	400		
<i>L. caulleryi</i>	Negative	392	6	398	0.395 (Fair)	-0.085-0.87	
	Positive	0	2	2			
	Total	392	8	400			
Overall	Negative	45	36	81	0.666 (Substantial)	0.562-0.77	
	Positive	0	319	319			
	Total	45	355	400			



ผลและวิจารณ์

แผนภูมิวิวัฒนาการ เปรียบเทียบความสัมพันธ์

แผนภูมิวิวัฒนาการ

แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ

Plasmodium และ *Leucocytozoon*



สรุป และ ข้อเสนอแนะ

ความซุก ผลการวิเคราะห์ความสอดคล้อง

สรุปผล และ ข้อเสนอแนะ

สรุป ความชุก ความสอดคล้อง ลักษณะทางอนุชีววิทยา

ความชุก

- ความชุกของการติดเชื้อพลาสมาเดียมและลิโวโคไซซอนในไก่พื้นเมืองในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน

- มีความชุกในระดับสูง

ความสอดคล้อง

- ความสอดคล้องจากการตรวจหาเชื้อโดยวิธี stained thin smear และ multiplex PCR

- อยู่ในระดับดี (substantial)

ลักษณะทางอนุชีววิทยา

- ลักษณะทางอนุชีววิทยาของเชื้อ

- *L. sabraezesi* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าเชื้อชนิดอื่นๆ

สรุปผล และ ข้อเสนอแนะ

การศึกษาแมลงพาหะ การจัดการฟาร์มที่ดี

ผลการศึกษาพบความชุก

ของการติดเชื้อพลาสมาเดียมและลิวโค
ไซโตซูนในไก่พื้นเมืองในพื้นที่ภาคเหนือ
ตอนบนของประเทศไทยอยู่ในระดับสูง

การจัดการฟาร์มที่ดี

การเลี้ยงสัตว์ให้ถูกสุขลักษณะ รวมทั้งมี
มาตรการความปลอดภัยทางชีวภาพจะ
ช่วยลดโอกาสการแพร่เชื้อได้

ข้อเสนอแนะ

มีแมลงพาหะในการนำโรค

ควรมีการควบคุมแมลงพาหะในบริเวณ
ฟาร์มอย่างมีประสิทธิภาพ

การศึกษาชนิดและจำนวนของ แมลงพาหะ

การศึกษาชนิดและจำนวนของแมลง
พาหะในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ปีก เพื่อใช้เป็น
ข้อมูลพื้นฐานในการประเมินความเสี่ยง
ของการติดเชื้อปรสิตในเลือดสัตว์ปีกใน
แต่ละพื้นที่

รายงานผลการดำเนินงาน และให้ความรู้เกษตรกร



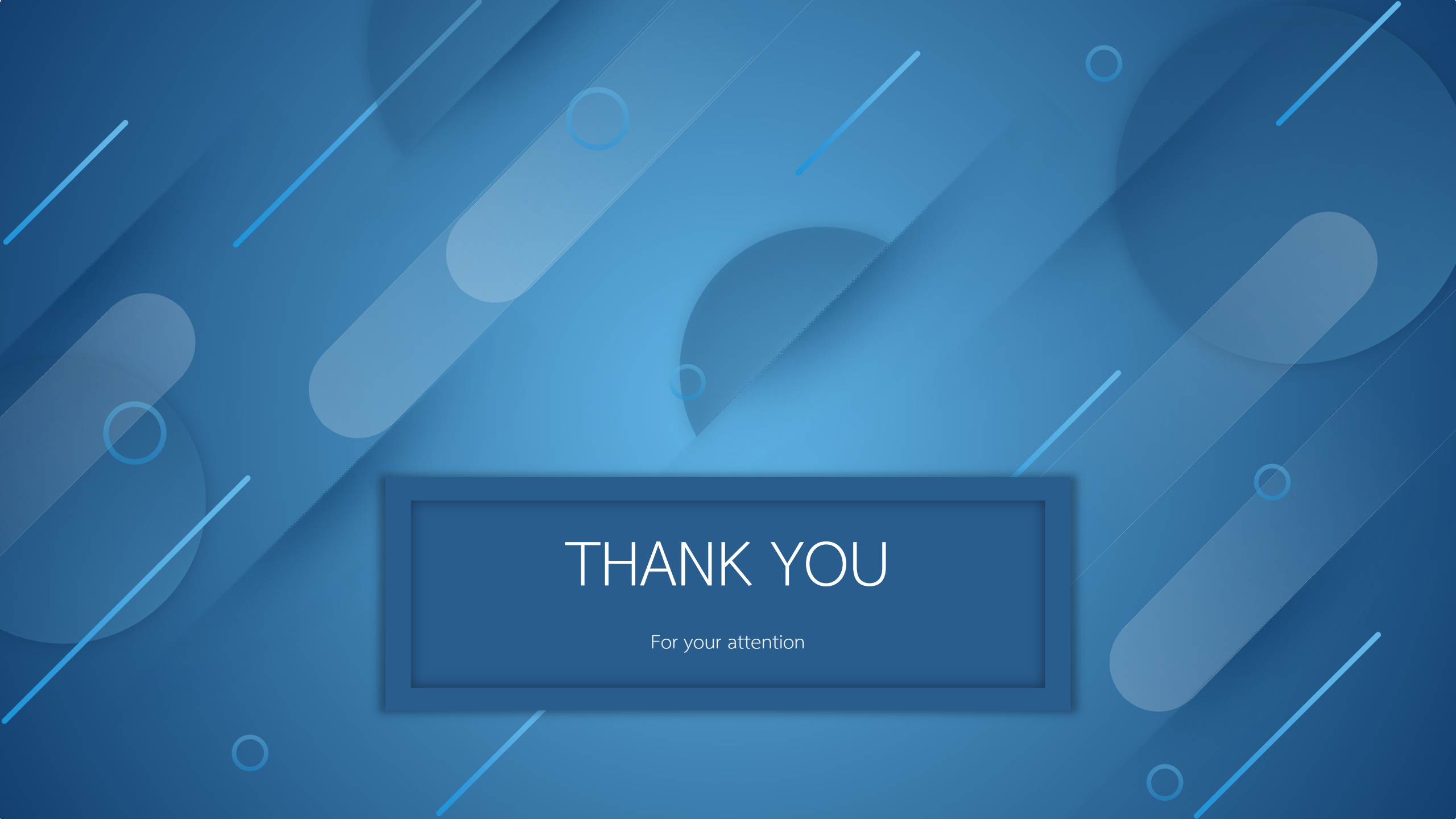
กิตติกรรมประกาศ

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



ภาพรวมกิจกรรม



The background is a solid dark blue color. It is decorated with various light blue geometric elements: several thin diagonal lines, some circles of different sizes, and larger, semi-transparent rounded rectangular shapes. These elements are scattered across the frame, creating a modern, abstract aesthetic.

THANK YOU

For your attention