T158734

ศิลมน ชูศักดิ์แสงทอง : การตรวจวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อบิดในไก่ด้วยวิธี PCR-RFLP (THE SPECIES DIFFERENTIATION OF *EIMERIA* IN CHICKEN BY PCR-RFLP) อ. ที่ปรึกษา: อ.สพ.ญ.ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. สพ.ญ.ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย, นางสุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์, 89 หน้า. ISBN : 974-17-5911-8

โรคบิดในไก่ เป็นโรคโปรโตซัวมีสาเหตุมาจากเชื้อบิดในสกุล *Eimeria* โดยทั่วไปพื้นฐานของการตรวจแยกชนิดเชื้อบิดในไก่เป็นการแยกจากลักษณะรูปร่างของเชื้อบิดและบริเวณตำแหน่งในลำไส้ของไก่ที่ติดเชื้อบิด ซึ่งจากหลักการนี้พบว่าการตรวจแยกความแตกต่างชนิดของเชื้อบิดในบางครั้งให้ผลไม่น่าเชื่อถือ จึงได้มีการพัฒนานำวิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) มาใช้เพื่อแยกชนิดเชื้อบิด โดยเพิ่มปริมาณ DNA ตรงบริเวณ 18S ribosomal RNA gene (18S rRNA gene) ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 422 bp และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาแยกชนิดเชื้อบิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Alu* I, *Hha* I, *Hpa* II และ *Hae* III โดยความไวของวิธี PCR นั้นอยู่ที่ 0.12 โอโอซีสต์ และความไวของวิธี PCR-RFLP อยู่ที่ 8 โอโอซีสต์ และวิธีนี้ยังมีความจำเพาะต่อเชื้อบิด *Eimeria* มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ DNA ที่สกัดจากปรสิตในระบบทางเดินอาหารของไก่และแพะ ได้แก่ *Raillietina cesticillus,R. chinobothrida, R.Tetragona, Ascaridia galli, Gongylonema* spp., *Heterakis gallinae, Tetrameres* spp. และ*Trichostronglylus* spp.

จากการศึกษาแยกชนิดเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ประกอบด้วยเชื้อบิด 3 ชนิด คือ *E. tenella* มีปริมาณสัมพันธ์มากที่สุดคือ 64%, *E. necatrix* 32% และ *E. maxima* 4% และเชื้อบิดที่ประกอบอยู่ในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I) มีอย่างน้อย 4 ชนิด คือ *E. acervulina* มีปริมาณสัมพันธ์มากที่สุดคือ 26%, *E. maxima* 19%, *E. necatrix* 3% และ *E. tenella* 3% โดยการแยกชนิดของเชื้อบิด *E. tenella* CB38 ที่กระจายอยู่ตามลำไส้ส่วนต่างๆ ได้แก่ ลำไส้ส่วนต้น พบเชื้อบิด 2 ชนิดคือ *E. acervulina* ปริมาณสัมพันธ์ 84% และ *E. tenella* 6% ลำไส้ส่วนกลางที่ 1 พบเชื้อบิด 4ชนิด ได้แก่ *E. necatrix* ปริมาณสัมพันธ์ 26%, *E. acervulina* 21%, *E. tenella* 14% และ *E. maxima* 6% ลำไส้ส่วนกลางที่2 พบเชื้อบิด 3 ชนิดคือ *E. maxima* ปริมาณสัมพันธ์ 69%, *E. necatrix* 7% และ *E. tenella* 6% ลำไส้ส่วนท้าย พบเชื้อบิดได้ 3 ชนิดคือ *E. maxima* ปริมาณสัมพันธ์ 73%, *E. necatrix* 16% และ *E. tenella* 7% และไส้ตันพบเชื้อบิดได้ 3 ชนิด คือ *E. tenella* ปริมาณสัมพันธ์ 52%, *E. necatrix* 43% และ *E. maxima* 4% ส่วนไก่ที่ติดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I) สามารถแยกชนิดเชื้อบิดที่บริเวณลำไส้ส่วนต้นได้ 2 ชนิด คือ *E. acervulina* ปริมาณสัมพันธ์ 73% และ *E. maxima* 3% ลำไส้ส่วนกลางที่1 พบเชื้อบิด 2 ชนิด คือ *E.maxima* ปริมาณสัมพันธ์ 90% และ *E. tenella* 6% ลำไส้ส่วนกลางที่2 พบเชื้อบิด 2 ชนิด คือ *E. maxima* ปริมาณสัมพันธ์ 94% และ *E. tenella* 6% ลำไส้ส่วนท้าย พบเชื้อบิด 2 ชนิดคือ *E. maxima* ปริมาณสัมพันธ์ 87% และ *E. tenella* 8% และไส้ตัน พบเชื้อบิด 3 ชนิด คือ *E. necatrix* ปริมาณสัมพันธ์ 45%, *E. tenella* 40% และ *E. maxima* 13%

ดังนั้นวิธี PCR-RFLP สามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อบิดในไก่ได้ โดยมีความไวและความจำเพาะที่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ตรวจวินิจฉัยและยังสามารถยืนยันได้ว่าพบเชื้อบิด *E. tenella* หรือ *E. maxima* ได้ทุกบริเวณของลำไส้ไก่อีกด้วย

TE 158734

4475571931 : MAJOR Pathobiology

KEYWORDS : *Eimeria spp.*/ *E. tenella* CB 38/ Immucox®(I) vaccine/ 18S rRNA gene/ PCR-RFLP

SILAMON CHOOSAKSAENGTHONG ; THE SPECIES DIFFERENTIATION OF *EIMERIA* IN CHICKEN BY PCR-RFLP. THESIS ADVISOR : NAREERAT VISESHAKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR. SUWANNEE NITHIUTHAI, Ph.D., SUDCHIT CHUNGPIVAT, M.Sc. 89 pp. ISBN: 974-17-5911-8

Avian coccidiosis is a protozoan disease caused by the genus *Eimeria*. Basically, species of *Eimeria* in chicken is distinguished by the distinct morphology and parasitic deposited sites in intestine of the infected animals. The criteria of *Eimeria* species differentiation when the disease occured is sometime unreliable. Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was developed to differentiate species of *Eimeria*. The conserved region of 18S ribosomal RNA gene (18S rRNA gene) was amplified by PCR to yield the product of 422 bp. The RFLP patterns were analyzed by *Alu* I, *Hha* I, *Hpa* II and *Hae* III. The sensitivity of the PCR technique was to detect at least 0.12 oocysts and PCR-RFLP was able to give the RFLP patterns by using at least 8 oocysts. The specificity of PCR-RFLP was compared to DNA extracted from *Raillietina cesticillus*, *R. Echinobothrida*, *R. Tetragona*, *Ascaridia galli* ,*Gongylonema* spp., *Heterakis gallinae*, *Tetrameres* spp. และ *Trichostronglylus* spp.

By using the technique of PCR-RFLP, *E. tenella* CB38 is a mixture of at least 3 *Eimeria* spp.; *E. tenella* 64%, *E. necatrix* 32% and *E. maxima* 4% while Immucox®(I) comprises at least 4 species; *E. acervulina* 26%, *E. maxima* 19%, *E. necatrix* 3% and *E. tenella* 3%. To identify *Eimeria* spp. of *E. tenella* CB38 isolated from the upper part of the intestine revealed the combination of species *E. acervulina* 84% and *E. tenella* 6%. The proximal part of the intestine was infected with *E. necatrix* 26%, *E. acervulina* 21%, *E. tenella* 14% and *E. maxima* 6%. The distal part of the intestine was infected with *E. maxima* 69%, *E. necatrix* 7% and *E. tenella* 6%. The lower part of the intestine was infected with *E. maxima* 73%, *E. necatrix* 16% and *E. tenella* 7%. Lastly, caecum was infected with *E. tenella* 52%, *E. necatrix* 43% and *E. maxima* 4%. While the dentification of *Eimeria* spp. containing in the live-vaccine, Immucox®(I), the upper part of the infected intestine revealed the combination of species; *E. acervulina* 73% and *E. maxima* 3%. The proximal part of the intestine was infected with *E. maxima* 90% and *E. tenella* 6%. The distal part of the intestine was infected with *E. maxima* 94% and *E. tenella* 6%. The lower part of the intestine was infected with *E. maxima* 87% and *E. tenella* 8%. Lastly, the caecum, it was infected with *E. necatrix* 45%, *E. tenella* 40% and *E. maxima* 13%.

Therefore the technique of PCR-RFLP on 18S rRNA gene was able to perform a differential diagnosis of avian coccidiosis caused by *Eimeria* spp. Nonetheless, by using this method, *E. tenella* and *E. maxima* could be found in all part of the infected intestine.