การพัฒนาวิธี simplex PCR และ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ควบคู่กับ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีก

THE DEVELOPMENTS OF SIMPLEX PCR AND LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) COUPLED WITH LATERAL FLOW DIPSTICK (LFD) FOR DETECTION OF CESTODE BELONGING TO GENUS *RAILLIETINA* IN POULTRY

วศิน พานิช

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

การพัฒนาวิธี simplex PCR และ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ควบคู่กับ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีก

วศิน พานิช

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

THE DEVELOPMENTS OF SIMPLEX PCR AND LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) COUPLED WITH LATERAL FLOW DIPSTICK (LFD) FOR DETECTION OF CESTODE BELONGING TO GENUS *RAILLIETINA* IN POULTRY

WASIN PANICH

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF SCIENCE

(Biotechnology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธี simplex PCR และ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ควบคู่กับ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีก

ของ

วศิน พานิช

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

....

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

....

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

.... ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐาปนา ชลธนานารถ)

.... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล)

.... ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนวรรณ เตชางกูร)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

ชื่อเรื่อง การพัฒนาวิธี simplex PCR และ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ควบคู่กับ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีก

ผู้วิจัย วศิน พานิช

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2563

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฐาปนา ชลธนานารถ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนวรรณ เตชางกูร

งานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* 3 ชนิด ได้แก่ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* ด้วยวิธี simplex PCR และ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ควบคู่กับ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับเป็นเครื่องมือการตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีก ผลการศึกษาวิธี simplex PCR ได้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* แต่ละชนิด ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป้าหมายที่มีความจำเพาะขนาด 473, 352 และ 397 bp ตามลำดับ ความไวในการเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์จำเพาะต่อ *R. echinobothrida* และ *R. cesticillus* เท่ากับ 0.05 ng/µl ในขณะที่ *R. tetragona* มีความไวเท่ากับ 0.5 ng/µl สำหรับการตรวจหาด้วยวิธี LAMP-LFD ไพรเมอร์ LAMP และ DNA probe ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด และมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 0.5 ng/µl สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 66 °C ระยะเวลา 60 นาที เมื่อนำผลิตภัณฑ์ LAMP มาวิเคราะห์ควบคู่กับเทคนิค LFD พบว่าการเข้าจับของ DNA probe ที่ความเข้มข้น 2 pmol ที่อุณหภูมิ 66 °C ระยะเวลา 5 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ผล เมื่อนำวิธี simplex PCR, LAMP และ LAMP-LFD ไปตรวจหากับพยาธิตัวตืดจากไก่และเป็ด พบว่าทั้ง 3 วิธีให้ผลที่มีความถูกต้องและแม่นยำเหมือนกันทั้งหมด นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานแรกที่พัฒนาไพรเมอร์จำเพาะสำหรับใช้ในการตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

คำสำคัญ : Raillietina echinobothrida, Raillietina tetragona, Raillietina cesticillus, Simplex PCR, Loop-mediated isothermal amplification, Lateral flow dipstick

Title	THE DEVELOPMENTS OF SIMPLEX PCR AND LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) COUPLED WITH LATERAL FLOW DIPSTICK (LFD) FOR DETECTION OF CESTODE BELONGING TO GENUS *RAILLIETINA* IN POULTRY
Author	WASIN PANICH
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Assistant Professor Thapana Chontananarth , Ph.D.
Co Advisor	Assistant Professor Thanawan Tejangrura , Ph.D.

In this study, the specific primers of simplex PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) coupled with lateral flow dipstick (LFD) were developed for the detection of *Raillietina echinobothrida*, *R. tetragona*, and *R. cesticillus* in poultry. The results showed that each primer was capable of specifically amplifying species without cross-amplification. The size of target products were approximately 473, 352, and 397 bp for *R. echinobothrida*, *R. tetragona*, and *R. cesticillus*, respectively. The sensitivity test demonstrated that the minimum DNA concentration can be detected using specific primers for *R. echinobothrida* and *R. cesticillus* was 0.05 ng/µl while *R. tetragona* primer has lower sensitivity and can detect DNA at concentration of 0.5 ng/µl. For LAMP-LFD, LAMP primers and DNA probe were specifically designed for *Raillietina* species. The optimal LAMP reaction was 66 °C for 60 minutes. LAMP products were hybridized with 2 pmol of the DNA probe at 66 °C for 5 minutes for examination. Finally, the specific simplex PCR, LAMP, and LAMP-LFD were used to test adult worms from chicken and duck. Three methods were successfully amplified the target DNA with high accuracy and sensitivity. In addition, this study was the first report on specific primers for verification of *Raillietina* species.

Keyword : Raillietina echinobothrida, Raillietina tetragona, Raillietina cesticillus, Simplex PCR, Loop-mediated isothermal amplification, Lateral flow dipstick

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และมูลนิธิพระบรมราชานุสรณ์พระบาทสมเด็จพระปกเกล้าเจ้าอยู่หัว และสมเด็จพระนางเจ้ารำไพพรรณีที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จไปได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบคุณ รศ.ดร. วัชริยา ภูรีวิโรจกุล และ รศ.ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. ฐาปนา ชลธนานารถ และ ผศ.ดร. ธนวรรณ เตชางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาผู้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและช่วยแก้ไขข้อบกพร่อง ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้อง ผู้เป็นที่รักและกำลังใจ ตลอดจนช่วยอำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือในขั้นตอนต่าง ๆ

ขอขอบคุณนายสิรภัทร นาคอ่อน และนางสาวกชามาส สิทธิวงค์เป็ง รวมทั้งพี่น้องในห้องปฏิบัติการทุกคน ที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำเกี่ยวกับการปฏิบัติงาน รวมทั้งเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์

วศิน พานิช

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ
กิตติกรรมประกาศ .... ฉ
สารบัญ .... ช
สารบัญตาราง .... ญ
สารบัญภาพ .... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
ที่มาและความสำคัญ 1
ความมุ่งหมายงานวิจัย 3
ความสำคัญของงานวิจัย 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
ขอบเขตการศึกษา 4
สมมติฐานการวิจัย 4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
พยาธิตัวตืด (cestode) 5
พยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* 5
รูปวิธานสำหรับจัดจำแนกสกุลย่อยของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* 9
วงจรชีวิตของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* 9
รายงานการระบาดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในประเทศไทย 11
รายงานการระบาดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในต่างประเทศ 15
การรักษาการติดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* 16

การระบุชนิดเชิงโมเลกุลของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* 18

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 20

งานวิจัยการตรวจหาปรสิตด้วยวิธี LAMP 24

Biosensor 26

Lateral flow dipstick (LFD) 27

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 28

อุปกรณ์และสารเคมี 28

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 28

2. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร 28

3. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทำวิจัยทางอณูชีววิทยา 29

วิธีดำเนินการทดลอง 29

1. จริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง 29

2. การเตรียมตัวอย่างหนอนพยาธิ 29

3. การระบุชนิดหนอนพยาธิก่อนนำมาใช้ในการทดลอง 31

3.1 การระบุชนิดด้วยวิธีสัณฐานวิทยา 31

3.2 การระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยา 31

4. การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* สำหรับวิธี simplex PCR 32

5. การออกแบบไพรเมอร์ LAMP และ DNA probe ที่จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* 34

6. การพัฒนาวิธี LAMP-LFD ที่จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* 36

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาด้วยวิธีสัณฐานวิทยา, simplex PCR, LAMP และ LAMP-LFD 37

แผนผังแสดงวิธีการดำเนินการทดลองโดยภาพรวม 38

บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย 39
การระบุชนิดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* 39
1. การระบุชนิดด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา 39
2. การระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยา 44
การตรวจสอบความเที่ยงตรงของไพรเมอร์สำหรับวิธี simplex PCR 44
1. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 44
2. การทดสอบความไวของไพรเมอร์ 47
การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP 48
1. การทดสอบอุณหภูมิ ระยะเวลา และความเข้มข้นสารที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP 48
2. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 48
3. การทดสอบความไวของไพรเมอร์ 50
การพัฒนาวิธี LAMP-LFD ที่จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* 51
1. การทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA probe ที่ติดฉลากสารเรืองแสง FITC และระยะเวลาในการบ่มสำหรับใช้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP 51
2. การทดสอบกับสารพันธุกรรมแบบผสมด้วยวิธี LAMP-LFD 52
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาด้วยวิธีสัณฐานวิทยา, simplex PCR, LAMP และ LAMP-LFD 53
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย 56
ข้อเสนอแนะ 60
บรรณานุกรม 61
ประวัติผู้เขียน 72

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 สถานการณ์ระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในโฮสต์เฉพาะชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย 11

ตาราง 2 การระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในโฮสต์เฉพาะชนิดต่าง ๆ ทั่วโลก 15

ตาราง 3 การศึกษาชนิดและปริมาณยาที่แตกต่างกันในการรักษาการติดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* 17

ตาราง 4 รายงานการประยุกต์วิธีทางอณูชีววิทยาสำหรับระบุชนิดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* .. 19

ตาราง 5 รายงานการตรวจหาหนอนพยาธิในระยะต่าง ๆ ด้วยวิธี LAMP 24

ตาราง 6 ตัวอย่างหนอนพยาธิที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 30

ตาราง 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์และความยาวของไพรเมอร์ LAMP และ DNA probe ที่จำเพาะต่อ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* 36

ตาราง 8 เปรียบเทียบสัณฐานวิทยาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ที่พบในการศึกษา 43

ตาราง 9 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* แต่ละชนิด 46

ตาราง 10 ความเข้มข้นสารเคมีที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา LAMP 48

ตาราง 11 สรุปผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาพยาธิตัวตืดในสัตว์ปีกด้วยวิธีสัณฐานวิทยา, simplex PCR, LAMP และ LAMP-LFD 55

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 สัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของพยาธิตัวตืด 5

ภาพประกอบ 2 สัณฐานวิทยาของ *R.* (*P.*) *kashiwarensis* 6

ภาพประกอบ 3 สัณฐานวิทยาของ *R.* (*S.*) *doggaddaensisi* 7

ภาพประกอบ 4 สัณฐานวิทยาของ *R.* (*R.*) *dromaius* 8

ภาพประกอบ 5 สัณฐานวิทยาของ *R.* (*F*) *jurubatensis* 9

ภาพประกอบ 6 วงจรชีวิตพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* 10

ภาพประกอบ 7 สัณฐานวิทยาของ *R. tetragona* 12

ภาพประกอบ 8 สัณฐานวิทยาของ *R. echinobothrida* 13

ภาพประกอบ 9 สัณฐานวิทยาของ *R. cesticillus* 14

ภาพประกอบ 10 ตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์ทั้ง 4 สายใน DNA เป้าหมาย 20

ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการทำงานของ LAMP ในขั้นตอน starting structure producing 22

ภาพประกอบ 12 กลไกการทำงานของ LAMP ในขั้นตอน cycle amplification 23

ภาพประกอบ 13 ส่วนประกอบ biosensor 26

ภาพประกอบ 14 กลไกการทำงานของ lateral flow dipstick 27

ภาพประกอบ 15 ตำแหน่งและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* แต่ละชนิดที่บริเวณ ITS2 33

ภาพประกอบ 16 ตำแหน่งเป้าหมายของไพรเมอร์ LAMP และ DNA probe ที่จำเพาะต่อยีน *28S rDNA* ของ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* 35

ภาพประกอบ 17 ส่วนประกอบ lateral flow dipstick 37

ภาพประกอบ 18 แผนผังแสดงวิธีการดำเนินการทดลอง 38

ภาพประกอบ 19 สัณฐานวิทยาของ *R. echinobothrida* 40

ภาพประกอบ 20 สัณฐานวิทยาของ *R. tetragona* 41

ภาพประกอบ 21 สัณฐานวิทยาของ *R. cesticillus* 42

ภาพประกอบ 22 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 45

ภาพประกอบ 23 การทดสอบความไวในการเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ 47

ภาพประกอบ 24 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ LAMP ที่จำเพาะต่อ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* 49

ภาพประกอบ 25 การทดสอบความไวในการเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ LAMP 50

ภาพประกอบ 26 การทดสอบหาความเข้มข้น DNA probe ที่เหมาะสม สำหรับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP 51

ภาพประกอบ 27 การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม DNA probe ร่วมกับผลิตภัณฑ์ LAMP 52

ภาพประกอบ 28 การตรวจหาสารพันธุกรรมแบบผสมของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ด้วยวิธี LAMP และ LAMP-LFD 53

ภาพประกอบ 29 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาระหว่างวิธี simplex PCR, LAMP และ LAMP-LFD 54

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

ประเทศไทยประกอบด้วยพื้นที่เกษตรกรรมที่อุดมไปด้วยทรัพยากรที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกและเลี้ยงสัตว์ ส่งผลให้มีผู้ประกอบอาชีพเกษตรกรและปศุสัตว์กระจายตัวอยู่ทุกภูมิภาคของประเทศ สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศอย่างสูง สำนักงานพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์ได้รายงานปริมาณการส่งออกผลิตภัณฑ์จากสัตว์เศรษฐกิจระหว่างปี พ.ศ. 2557-2561 เฉลี่ยสูงถึง 7.70 แสนตันต่อปี และมีแนวโน้มขยายตัวขึ้นทุกปี โดยหนึ่งในสัตว์เศรษฐกิจที่มีแนวโน้มในการขยายตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องคือ สัตว์ปีก ได้แก่ ไก่ และเป็ด เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการ และให้ปริมาณโปรตีนต่อน้ำหนักมากกว่าสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่น ระหว่างปี พ.ศ. 2557-2561 อัตราการส่งออกเนื้อไก่และเนื้อเป็ดคิดเป็นร้อยละ 95 ของผลิตภัณฑ์จากสัตว์เศรษฐกิจที่ส่งออกทั้งหมด ซึ่งทำรายได้ให้กับประเทศมากกว่า 70,000 ล้านบาทต่อปี (สำนักงานพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์, 2562) ดังนั้นการขยายกำลังการผลิตจึงเป็นสิ่งสำคัญในการเพิ่มรายได้ให้กับประเทศ อย่างไรก็ตามการขยายกำลังการผลิตอย่างเดียวยังไม่เพียงพอสำหรับการแข่งขันกับความต้องการของตลาดโลก แต่ยังต้องมีการพัฒนามาตรฐานด้านสุขอนามัยในขั้นตอนการผลิต รวมถึงการตรวจสอบ และควบคุมโรคระบาดเพื่อให้ได้เนื้อสัตว์ที่มีคุณภาพและได้รับความเชื่อมั่นจากตลาดโลก

โรคระบาดในไก่และเป็ดเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น เชื้อไวรัส ได้แก่ โรคไข้หวัดนก (avian influenza), โรคฝีดาษ (fowl pox), โรคมาเร็กซ์ (Marek's disease) เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ โรคหวัดหน้าบวม (fowl coryza), โรคอหิวาต์สัตว์ปีก (fowl cholera), โรคขี้ขาว (pullorum) รวมไปถึงโรคที่มีสาเหตุจากการติดหนอนพยาธิโดยสามารถแบ่งได้ 3 กลุ่มคือ 1) พยาธิตัวกลม เช่น *Ascaridia galli, Heterakis gallinarum, Capillaria annulata, Strongyloides* spp. 2) พยาธิใบไม้ เช่น *Hypoderaeum conoideum, Echinostoma revolutum, Echinoparyphium recurvatum, Prosthogonimus macrochis, P. cuneatus, P. pellucidus* และ 3) พยาธิตัวตืด เช่น *Diorchis* spp., *Cotugnia* spp., *Raillietina* spp. (Butboonchoo, & Wongsawad, 2017; Nithiuthai, Chungpivat, & Sukumavasi, 2003; Saijuntha, Duenngai, & Tantrawatpan, 2013; Saijuntha, Tantrawatpan, Sithithaworn, Andrews, & Petney, 2011) ซึ่งหนอนพยาธิที่กล่าวมาก่อให้เกิดอาการท้องร่วง เบื่ออาหาร น้ำหนักลด ขาดสารอาหาร ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตช้าลง และอาจทำให้ถึงตายได้ในที่สุด (ประภากร, 2560)

ประเทศไทยมีรายงานการระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีกเศรษฐกิจทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ *Raillietina echinobothrida, R. tetragona* และ *R. cesticillus* โดยมีค่าความชุก (prevalence) อยู่ระหว่างร้อยละ 8.40-66.8 (Butboonchoo & Wongsawad, 2017; Sangvaranond, 1994) ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูง อัตราแลกเนื้อเพิ่มขึ้นและคุณภาพเนื้อที่ไม่ได้มาตรฐาน ดังนั้นความรวดเร็วและความแม่นยำในการตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietin* ในสัตว์ปีกจึงมีความสำคัญสำหรับใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์แนวทางการรักษาสัตว์ที่ติดพยาธิได้อย่างทันท่วงที รวมถึงใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวัง ป้องกัน และควบคุมพื้นที่ ๆ มีการระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ไม่ให้กระจายเป็นวงกว้างต่อไป

โดยทั่วไปการตรวจหาการติดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ต้องใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการทำสไลด์ถาวรเพื่อตรวจลักษณะสำคัญที่ใช้ในการระบุชนิด ดังนี้ (1) rostellum ประกอบด้วย hook ที่มีลักษณะเป็นรูปค้อน เรียงตัวเป็นวงกลมอย่างน้อย 1 วง (2) หนึ่งปล้องมีระบบสืบพันธุ์ 1 ชุด ประกอบด้วยรังไข่ 1 อันอยู่บริเวณกึ่งกลางปล้องกับอัณฑะจำนวนมากที่กระจายตัวอยู่รอบ ๆ (3) genital pore เปิดแบบ unilateral และ (4) จำนวนไข่ต่อหนึ่งแคปซูลมีตั้งแต่หนึ่งจนถึงหลายฟอง (Butboonchoo, Wongsawad, Rojanapaibul, & Chai, 2016; Sawada, 1964; Sawada, 1965; Yamaguti, 1959) จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการตรวจหาโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำได้ยาก ใช้ระยะเวลานาน และต้องอาศัยความชำนาญทางด้านปรสิตวิทยาในการจัดจำแนกสูง เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนพยาธิกลุ่มนี้ และโฮสต์เฉพาะ (definitive host) มีความใกล้เคียงกัน ทำให้เกิดความผิดพลาดในการตรวจหาได้ง่าย ส่งผลต่อการใช้ยารักษาผิดชนิดหรือให้ยาในปริมาณที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงมีการนำวิธีทางอณูชีววิทยามาประยุกต์สำหรับระบุชนิดเนื่องจากมีความรวดเร็ว และความแม่นยำสูง รวมถึงสามารถตรวจหาการติดหนอนพยาธิได้ตั้งแต่ระยะเริ่มต้น โดยไม่จำเป็นต้องรอให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเหมือนโดยวิธีการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานการใช้วิธีทางอณูชีววิทยาหลายวิธีในการศึกษาและระบุชนิดการติดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* เช่น reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Chen & Li, 2014), random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) (Ghobashy & Taeleb, 2015), phylogenetic analysis (Butboonchoo et al., 2016), high annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) (Butboonchoo & Wongsawad, 2017) เป็นต้น แต่วิธีทางอณูชีววิทยาที่กล่าวมาจำเป็นต้องใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและต้องตรวจสอบผลด้วยการทำ gel electrophoresis ซึ่งต้องดำเนินการในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ทำให้มีข้อจำกัด

ทางด้านเครื่องมือและสถานที่ ปัจจุบันวิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ได้รับความนิยมในการนำมาตรวจหาเชื้อก่อโรคในมนุษย์ และสัตว์เศรษฐกิจหลายชนิด เนื่องจากเป็นวิธีที่เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยไม่ต้องใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler machine) สามารถทำได้ง่าย มีความจำเพาะ (specificity) และความไวสูง (sensitivity) นอกจากนี้เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค lateral flow dipstick (LFD) จะทำให้สามารถตรวจสอบผลได้ง่าย รวดเร็วและเหมาะกับการปฏิบัติงานภาคสนาม เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจที่ให้ผู้ประกอบการสามารถตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ได้ด้วยตนเอง

การศึกษาครั้งนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อออกแบบเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ตรวจหาการติดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีกเศรษฐกิจ เพื่อยกระดับมาตรฐานคุณภาพเนื้อไก่และเป็ดของประเทศให้สามารถแข่งขันกับตลาดโลกได้

ความมุ่งหมายงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธี simplex PCR สำหรับระบุชนิดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* แต่ละชนิดที่พบในการศึกษาครั้งนี้

2. เพื่อพัฒนาวิธี LAMP ควบคู่กับ LFD ที่จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทุกชนิดที่พบในการศึกษา สำหรับเป็นเครื่องมือในการตรวจหาในสัตว์ปีก

ความสำคัญของงานวิจัย

พัฒนาวิธี simplex PCR และ วิธี LAMP-LFD สำหรับระบุชนิดและตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีก ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาการระบาดเชิงพื้นที่ และวินิจฉัยการติดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เครื่องมือ และ/หรือกระบวนการในการระบุชนิดและตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีก

2. สามารถนำเครื่องมือที่ได้ไปประยุกต์ใช้ติดตาม และเฝ้าระวังการระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

ขอบเขตการศึกษา

ตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในไก่ และเป็ดที่พบในพื้นที่ที่มีรายงานการระบาดในประเทศไทย เพื่อนำตัวอย่าง DNA จากพยาธิตัวตืดสกุลดังกล่าวมาพัฒนาวิธี simplex PCR ที่จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* แต่ละชนิดที่พบจากยีนที่มีประสิทธิภาพ สำหรับการระบุชนิด และพัฒนาวิธี LAMP-LFD สำหรับเป็นเครื่องมือตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

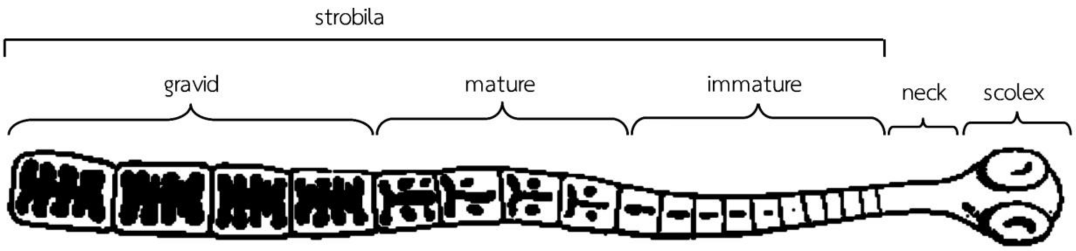
สมมติฐานการวิจัย

เนื่องจากการระบุชนิดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาทำได้ยาก ผู้วิจัยจึงออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ที่พบในประเทศไทยในการศึกษาครั้งนี้ สำหรับใช้ในระบุชนิด และพัฒนาวิธี LAMP-LFD สำหรับการตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีกที่มีประสิทธิภาพ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พยาธิตัวตืด (cestode)

พยาธิตัวตืดเป็นหนอนตัวแบนซึ่งถูกจัดอยู่ในไฟลัม (phylum) Platyhelminthes ชั้น (class) Cestoda มีลักษณะของลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ (1) ส่วน scolex เป็นส่วนที่อยู่ปลายด้านหน้าสุดของลำตัวมีหน้าที่ในการยึดเกาะกับทางเดินอาหารของโฮสต์และเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการระบุชนิดของพยาธิตัวตืด (2) ส่วน neck เป็นส่วนคอดอยู่ต่อจาก scolex มีหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างปล้อง และ (3) ส่วน strobila อยู่ถัดจาก neck เป็นส่วนหลักของลำตัวทั้งหมด ประกอบด้วยปล้อง (proglottid) 3 ชนิดเรียงจากส่วนหน้าไปยังท้ายลำตัวคือ ปล้องอ่อน (immature proglottid) เป็นปล้องที่มีอวัยวะสืบพันธุ์พัฒนาแต่ยังไม่สมบูรณ์, ปล้องแก่ (mature proglottid) เป็นปล้องที่ระบบสืบพันธุ์มีการพัฒนาจนสมบูรณ์ ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถช่วยในการระบุชนิดได้ และปล้องสุก (gravid proglottid) อยู่ส่วนท้ายลำตัวเป็นปล้องที่เต็มไปด้วยแคปซูลไข่ซึ่งภายในมีไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ (fertilized egg) (ภาพประกอบ 1) (Cheng, 2012)



ภาพประกอบ 1 สัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของพยาธิตัวตืด

ที่มา: ดัดแปลงจาก Roberts & Janovy. (2009)

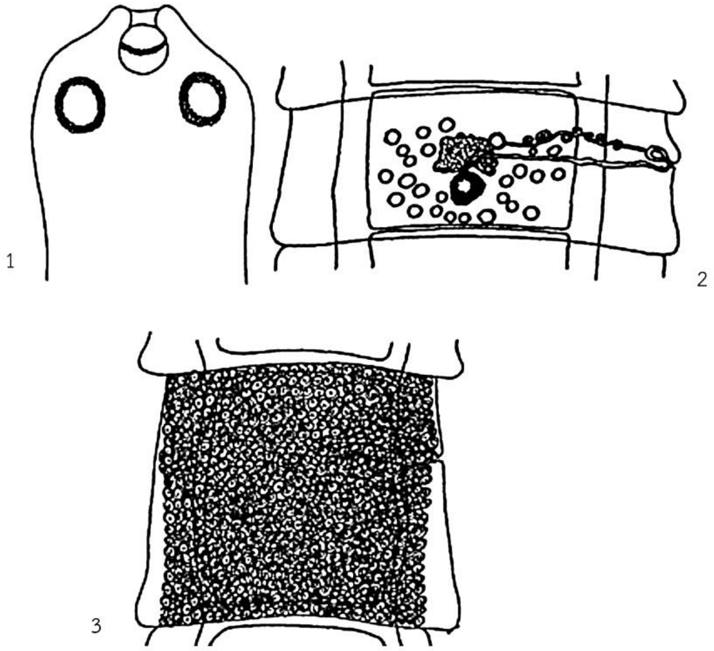
พยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

พยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ประกอบด้วยสมาชิกมากกว่า 200 ชนิด สามารถแบ่งได้ 4 สกุลย่อย ได้แก่ *Paroniella*, *Skrjabinia*, *Raillietina* และ *Fuhrmanneta* ซึ่งมีรายงานการพบในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด ลักษณะทั่วไปของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ที่สำคัญคือ (1) มี rostellar hook ลักษณะเป็นรูปค้อน (2) มีจำนวนอัณฑะต่อปล้องมาก (3) ส่วนใหญ่ sucker ประกอบด้วยหนามขนาดเล็กจำนวนหลายวง (4) genital pore เปิดแบบ unilateral

(5) รังไข่มีลักษณะเป็น lobe ส่วนใหญ่อยู่ตำแหน่งกึ่งกลางของปล้อง และ (6) จำนวนไข่ต่อแคปซูลไข่ ตั้งแต่หนึ่งฟองจนถึงหลายฟอง สำหรับการระบุชนิดของพยาธิตัวตืดสกุลดังกล่าวจำเป็นต้องทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยละเอียด เช่น ขนาดและลักษณะของ scolex, ปล้องแก่, รังไข่, ลักษณะและจำนวนแถวของ rostellar hook, ลักษณะและจำนวนหนามที่ sucker จำนวนของอัณฑะต่อปล้อง และตำแหน่งการเปิดของ genital pore ในแต่ละปล้อง (Butboonchoo et al., 2016; Sawada, 1964; Sawada, 1965; Yamaguti, 1959)

สกุลย่อย *Raillietina* (*Paroniella*)

ประกอบด้วยสมาชิก 47 ชนิด โดยมี 2 ลักษณะสำคัญที่ถูกใช้ในการจัดจำแนกพยาธิตัวตืดเป็นสมาชิกสกุลย่อยนี้ คือ รูปแบบการเปิดของ genital pore เป็นแบบ unilateral และมีไข่เพียงหนึ่งฟองต่อหนึ่งแคปซูลไข่ เท่านั้น (ภาพประกอบ 2) โดยมีรายงานพยาธิตัวตืดในสกุลย่อยนี้ในไก่ (*Gallus* sp.) และเป็ด (*Anas* sp.) เช่น *R.* (*P*) *acanthovagina*, *R.* (*P*) *anatine*, *R.* (*P*) *fecunda*, *R.* (*P*) *kashiwarensis*, *R.* (*P*) *macassarensis*, *R.* (*P*) *parbata*, *R.* (*P*) *rangoonica*, *R.* (*P*) *southwelli*, *R.* (*P*) *tenuniformis* และ *R.* (*P*) *tinguiana* (Sawada, 1964)



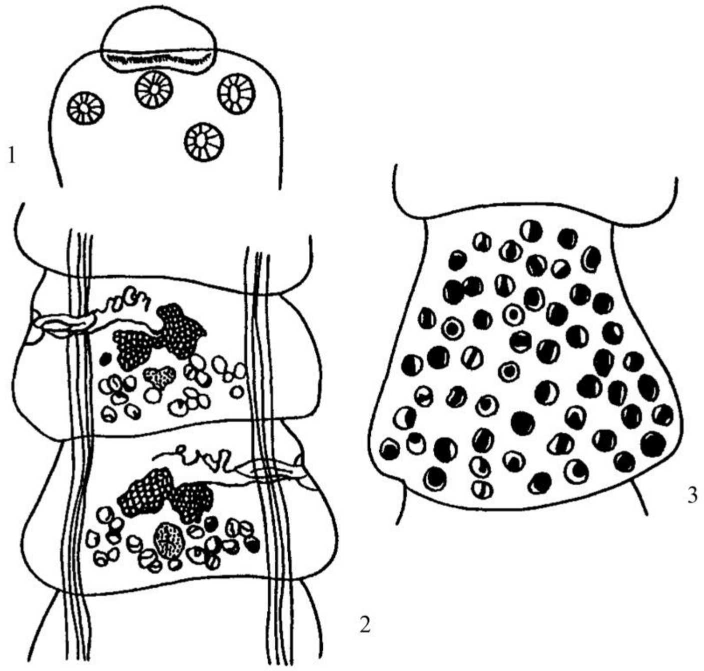
ภาพประกอบ 2 สัณฐานวิทยาของ *R.* (*P.*) *kashiwarensis*

(1: ส่วน scolex; 2: ปล้องแก่; 3: ปล้องสุก)

ที่มา: Sawada. (1953)

สกุลย่อย *Raillietina* (*Skrjabinia*)

ประกอบด้วยสมาชิก 33 ชนิด มีลักษณะสำคัญที่ใช้จัดจำแนกพยาธิตัวตืดเป็นสกุลย่อยนี้ คือ รูปแบบการเปิดของ genital pore เป็นแบบ alternating irregular unilateral และมีไข่เพียงหนึ่งฟองต่อหนึ่งแคปซูลไข่ (ภาพประกอบ 3) พบในไก่ และเป็ด เช่น *R.* (*S*) *bohmi*, *R.* (*S*) *cesticillus* และ *R.* (*S*) *sudanica* (Sawada, 1964)



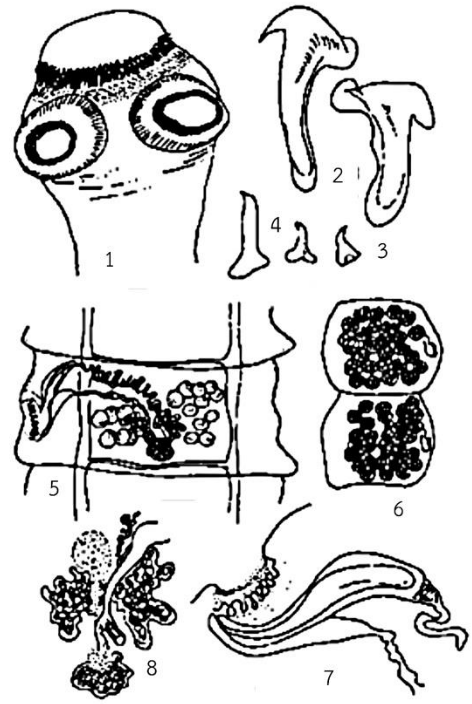
ภาพประกอบ 3 สัณฐานวิทยาของ *R.* (*S.*) *doggaddaensisi*

(1: ส่วน scolex; 2: ปล้องแก่; 3: ปล้องสุก)

ที่มา: Malhotra & Capoor. (1984)

สกุลย่อย *Raillietina* (*Raillietina*)

ประกอบด้วยจำนวนชนิดมากที่สุดในสกุลย่อยทั้งหมดโดยมีจำนวนถึง 129 ชนิด ซึ่งมีลักษณะที่ต่างจากสกุลย่อยอื่น คือ รูปแบบการเปิดของ genital pore เป็นแบบ unilateral และมีไข่มากกว่าหนึ่งฟองต่อหนึ่งแคปซูลไข่ (ภาพประกอบ 4) ชนิดที่มีรายงานติดในไก่ และเป็ด เช่น *R.* (*R*) *cyrtus*, *R.* (*R*) *dattai*, *R.* (*R*) *echinobothrida*, *R.* (*R*) *osakensis*, *R.* (*R*) *parviuncinata*, *R.* (*R*) *peradenica*, *R.* (*R*) *pseudocyrtus*, *R.* (*R*) *thantugensis* และ *R.* (*R*) *tetragona* (Sawada, 1965)



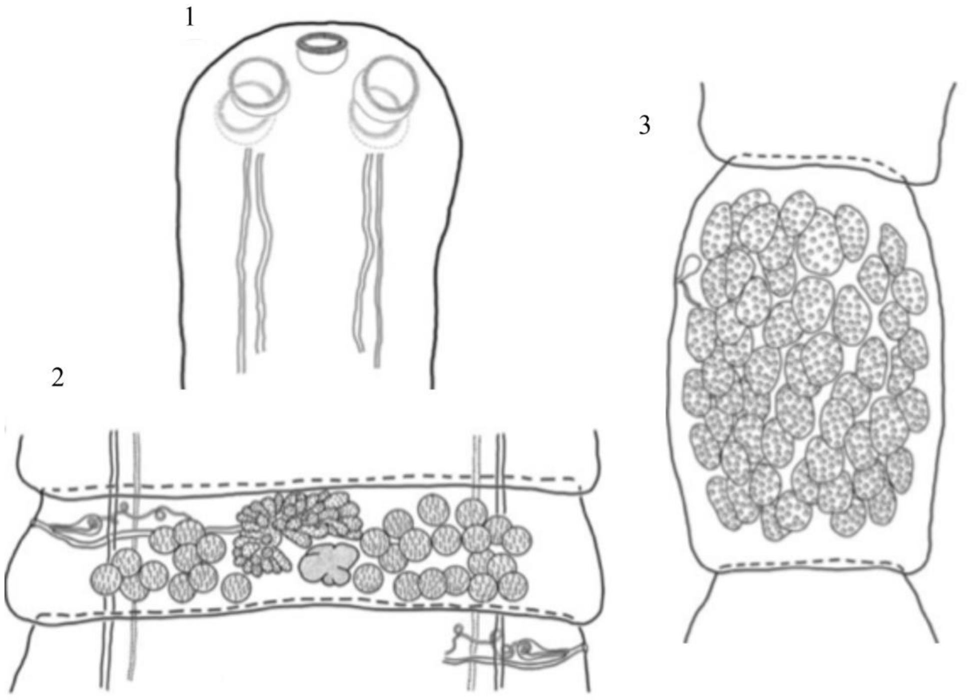
ภาพประกอบ 4 สัณฐานวิทยาของ *R.* (*R.*) *dromaius*

(1: ส่วน scolex; 2: rostellar hooks; 3: accessory rostellum spine; 4: sucker hooks;
5: ปล้องแก่; 6: ปล้องสุก; 7: cirrus และ distal vagina; 8: female genitalia)

ที่มา: O'Callaghan. (2004)

สกุลย่อย ***Raillietina*** **(*****Fuhrmanneta*****)**

ประกอบด้วยสมาชิก 17 ชนิด ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากสกุลย่อยอื่น ๆ คือ รูปแบบการเปิดของ genital pore เป็นแบบ alternating irregular unilateral และมีไข่มากกว่าหนึ่งฟองต่อหนึ่งแคปซูลไข่ (ภาพประกอบ 5) โดยมีรายงานชนิดที่ติดในไก่ และเป็ด เช่น *R.* (*F*) *birmanica*, *R.* (*F*) *laticanalis* และ *R.* (*F*) *pseudoechinobothrida* (Sawada, 1965)



ภาพประกอบ 5 สัณฐานวิทยาของ *R.* (*F*) *jurubatensis*

(1: ส่วน scolex; 2: ปล้องแก่; 3: ปล้องสุก)

ที่มา: Oliveira, Oliveira, & Ederli. (2017)

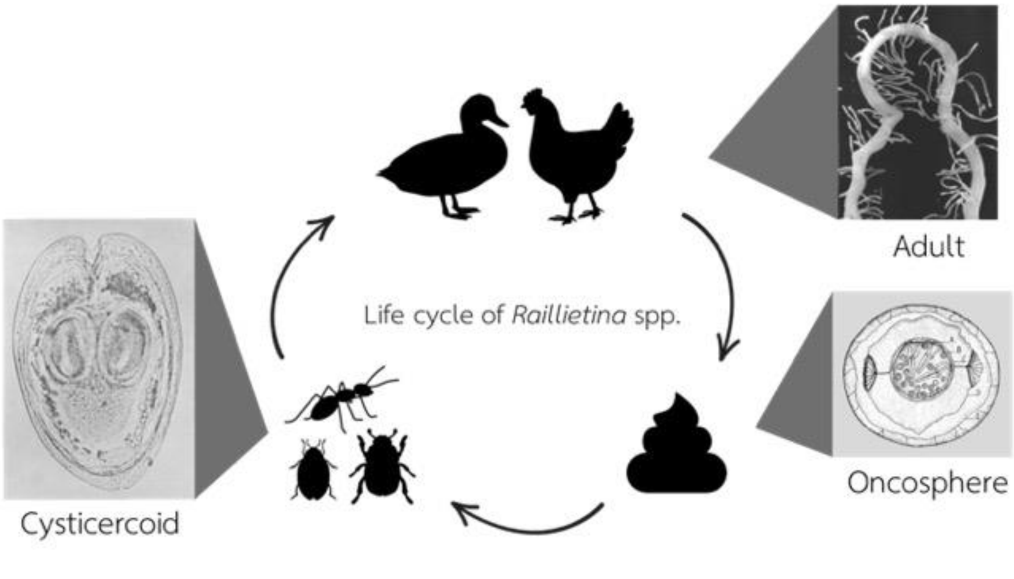
รูปวิธานสำหรับจัดจำแนกสกุลย่อยของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

1. genital pore เปิดแบบ unilateral……………….………..…………..…..……..………(2)
   genital pore เปิดแบบ alternating irregular unilateral…..………………..…..…………..(3)
2. แต่ละ แคปซูลไข่ ประกอบด้วยไข่หนึ่งฟอง……………………....................………*Paroniella*
   แต่ละ แคปซูลไข่ ประกอบด้วยไข่หลายฟอง……...……………………..…..………..*Raillietina*
3. แต่ละ แคปซูลไข่ ประกอบด้วยไข่หนึ่งฟอง……………………………………..……..*Skrjabinia*
   แต่ละ แคปซูลไข่ ประกอบด้วยไข่หลายฟอง……………..………………………..….*Fuhrmanneta*

วงจรชีวิตของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

พยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ระยะตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในโฮสต์เฉพาะที่เป็นสัตว์ปีก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิดเช่น ไก่ เป็ด และ หนู (Chandler & Pradatsundarasar, 1957; Chaisiri et al., 2010; Chenchittikul, Daengpium, Hasegawa, Itoh, & Phanthumachinda, 1983) จากนั้นปล้องสุกและไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิซึ่งมีตัวอ่อนที่เรียกว่า oncosphere อยู่ภายในจะ

หลุดออกมาพร้อมกับอุจาระของโฮสต์เฉพาะแล้วถูกกินโดยโฮสต์กึ่งกลาง (intermediate host) เป็นสัตว์พวกแมลง เช่น มด, ด้วง, แมลงวัน และ แตน เป็นต้น (Bartel, 1965; Horsfall, 1938; Reid, Ackert, & Case, 1938) จากนั้น oncosphere จะไชผ่าน alimentary canal ของโฮสต์กึ่งกลางแล้วพัฒนาเป็นระยะติดต่อที่เรียกว่า cysticercoid อยู่ที่ abdominal cavity เมื่อโฮสต์เฉพาะมากินโฮสต์กึ่งกลาง cysticercoid จะใช้ rostellar hook และ sucker ยึดเกาะกับผนังลำไส้ของโฮสต์เฉพาะ แล้วพัฒนาเป็นระยะตัวเต็มวัย และปล่อยปล้องสุกออกมากับอุจจาระใหม่ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ภาพประกอบ 6) (Ackert, 1936; Reid et al., 1938) การระบาดของพยาธิตัวตืดสามารถกระจายได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากปล้องสุกหนึ่งปล้องที่หลุดออกมากับอุจจาระประกอบด้วยแคปซูลไข่ ตั้งแต่ 10 ถึง 600 แคปซูลไข่ แต่ละอันจะบรรจุไข่ที่มีตัวอ่อนอยู่ภายในตั้งแต่ 1 ไปจนถึงมากกว่า 10 ฟอง ซึ่งหนอนพยาธิกลุ่มนี้สามารถปล่อยปล้องสุกออกมาได้มากถึง 9 ปล้องต่อวัน โดยจะแตกต่างกันตามชนิดของพยาธิ ดังนั้นหากเกิดการติดพยาธิตัวตืดเพียงหนึ่งตัวอาจจะส่งผลทำให้ค่าความชุก และความหนาแน่นของพยาธิสูงขึ้นได้อย่างรวดเร็ว (Baer & Sandars, 1956; Bartel & Hansen, 1964; Deardorff, Schmidt, & Kuntz, 1976; Reid, 1942; Reid & Nugara, 1961; Stunkard, 1953)



ภาพประกอบ 6 วงจรชีวิตพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bartel. (1965); Reid et al. (1938)

รายงานการระบาดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในประเทศไทย

จากรายงานการสำรวจตั้งแต่ปี 1983 ถึง 2017 พบว่าประเทศไทยมีการระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* อยู่ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *R. siriraji*, *R. tetragona*, *R. echinobothrida* และ *R. cesticillus* ซึ่งเป็นการสำรวจในโฮสต์เฉพาะทั้งสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด โดยมีค่าความชุกตั้งแต่ร้อยละ 1.70-66.80 และกระจายตัวหลายพื้นที่ของประเทศไทยดังตาราง 1

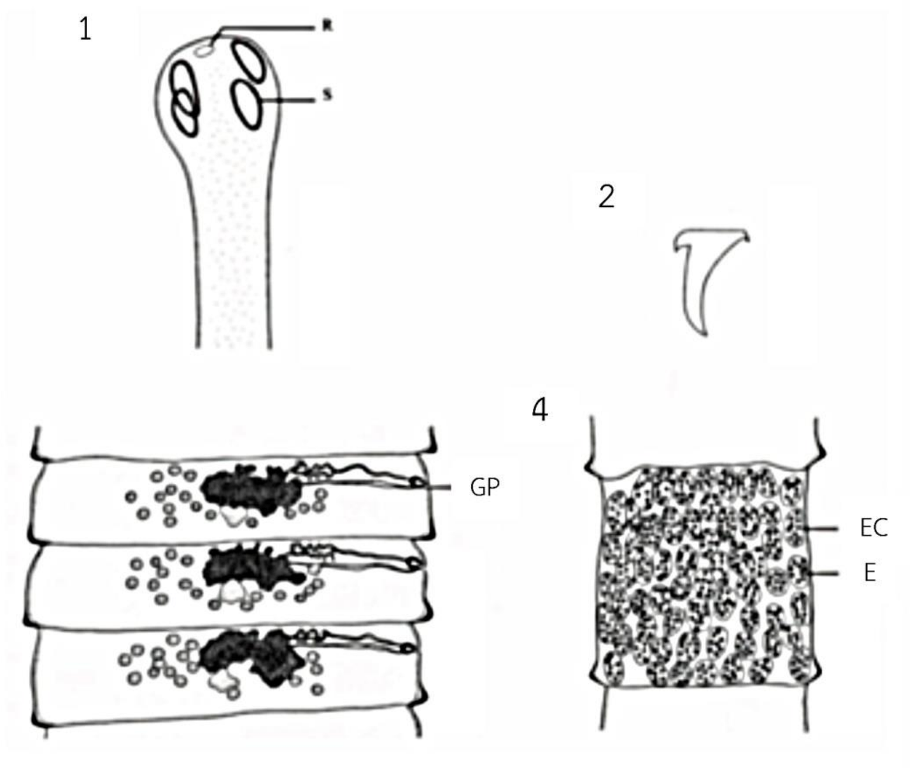
ตาราง 1 สถานการณ์ระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในโฮสต์เฉพาะชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย

พยาธิ	โฮสต์	ค่าความชุก (%)	จังหวัด	อ้างอิง
R. tetragona	*Gallus gallus domesticus*	20.10	ภาคกลาง 8 จังหวัด*	Sangvaranond, 1994
		57.50	พะเยา	Butboonchoo & Wongsawad, 2017
R. echinobothrida	*G. g. domesticus*	66.80	ภาคกลาง 8 จังหวัด*	Sangvaranond, 1994
		48.30	พะเยา	Butboonchoo & Wongsawad, 2017
R. cesticillus	*G. g. domesticus*	8.40	ภาคกลาง 8 จังหวัด*	Sangvaranond, 1994
		12.50	พะเยา	Butboonchoo & Wongsawad, 2017
R. siriraji	*Rattus* spp.	1.70	จันทบุรี	Chenchittikul et al., 1983
	Bandicota spp.	50.00		
	Suncus murinus	2.20		
Raillietina sp.	*Rattus tanezumi*	20.60	น่าน เลย บุรีรัมย์	Chaisiri et al., 2010
	Rattus spp.	34.70	อุดรธานี	Ribas et al., 2016

*ภาคกลาง 8 จังหวัด: พระนครศรีอยุธยา, อ่างทอง, สุพรรณบุรี, สิงห์บุรี, ลพบุรี, ชัยนาท, สระบุรี และนครนายก

Raillietina tetragona **(Molin, 1858)**

R. tetragona จัดเป็นพยาธิตัวตืดขนาดกลางมีความยาวทั้งลำตัวประมาณ 25 เซนติเมตร และความกว้าง 3 มิลลิเมตร scolex ประกอบด้วย rostellar hook ความยาว 6-8 ไมโครเมตร จำนวน 90-100 อันเรียงตัวหนึ่งแถว และ sucker ลักษณะเป็นรูปไข่ประกอบด้วยหนามขนาดเล็ก ความยาว 3-8 ไมโครเมตร เรียงตัว 8-12 แถวอยู่บริเวณขอบ genital pore เปิดแบบ unilateral อยู่ส่วนหน้าของปล้อง cirrus sac ขนาดเล็กมีความยาว 75-100 ไมโครเมตร หนึ่งแคปซูลไข่ประกอบด้วยไข่ 6-12 ฟอง (ภาพประกอบ 7) ระยะติดต่ออาศัยอยู่ในมด การติดพยาธิจะก่อให้เกิดอาการน้ำหนักลด ระดับไกลโคเจนในตับ และเยื่อบุลำไส้ลดลง ส่งผลให้อัตราการผลิตไข่ของสัตว์ปีกลดลงเมื่อเกิดติดพยาธิตั้งแต่ 12 ตัวขึ้นไป (Butboonchoo et al., 2016; McDougald, 2020; Sawada, 1964)



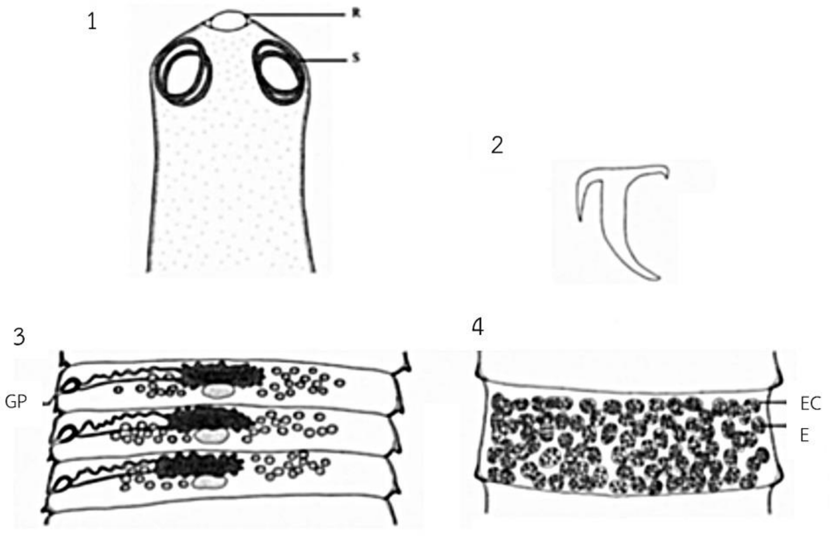
ภาพประกอบ 7 สัณฐานวิทยาของ *R. tetragona*

(1: ส่วน scolex ประกอบด้วย rostellum (R) และ sucker (S); 2: rostellar hook; 3: ปล้องแก่ที่มี genital pore; 4: ปล้องสุกที่บรรจุแคปซูลไข่ (EC) และ egg (E))

ที่มา: Butboonchoo et al. (2016)

Raillietina echinobothrida **(Megnin, 1881)**

R. echinobothrida เป็นชนิดที่มีความคล้ายกับ *R. tetragona* แต่มีลักษณะแตกต่างกันที่ขนาดใหญ่กว่า โดยมีขนาดลำตัวยาว 34 เซนติเมตร ความกว้าง 4 มิลลิเมตร scolex ประกอบด้วย rostellar hook ความยาว 10-13 ไมโครเมตร จำนวน 200-250 อัน เรียงตัวสองแถว และ sucker ลักษณะกลม และมีหนามขนาดเล็กบริเวณขอบความยาว 5-15 ไมโครเมตร เรียงตัว 8-15 แถว genital pore เปิดแบบ unilateral อยู่ส่วนหลังของปล้อง cirrus sac ขนาดใหญ่ความยาว 130-180 ไมโครเมตร ในหนึ่งแคปซูลไข่ ประกอบด้วยไข่ 8-12 ฟอง บริเวณตรงกลางระหว่างปล้องสุกแยกออกจากกันลักษณะคล้ายหน้าต่าง (ภาพประกอบ 8) ซึ่งไม่พบใน *R. tetragona* ระยะติดต่ออาศัยอยู่ในมด *R. echinobothrida* ถูกระบุว่าเป็นหนึ่งในพยาธิตัวตืดที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงที่สุด เนื่องจากการติดเชื้อจะทำให้เพิ่มการหลั่ง mucus ที่ villi มีอาการตกเลือด ลำไส้อักเสบ และเกิด granuloma ในบริเวณที่ติดพยาธิ (Butboonchoo et al., 2016; Sawada, 1964; McDougald, 2020; Nadakal, Mohandas, John, & Muraleedharan, 1973; Samad, Alam, & Bari, 1986)



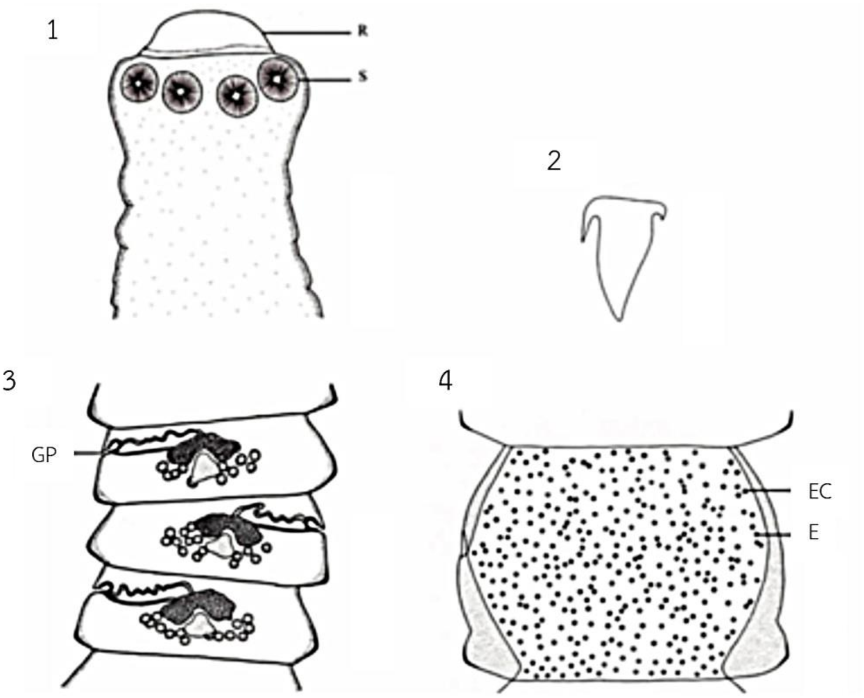
ภาพประกอบ 8 สัณฐานวิทยาของ *R. echinobothrida*

(1: ส่วน scolex ประกอบด้วย rostellum (R) และ sucker (S); 2: rostellar hook; 3: ปล้องแก่ที่มี genital pore; 4: ปล้องสุกที่บรรจุแคปซูลไข่ (EC) และ egg (E))

ที่มา: Butboonchoo et al. (2016)

Raillietina cesticillus (Molin, 1858)

R. cesticillus เป็นพยาธิตัวตืดที่มี scolex ขนาดใหญ่ ความยาวลำตัวมากกว่า 15 เซนติเมตร rostellum มีลักษณะใหญ่และแบนทำหน้าที่เหมือนลูกสูบช่วยในการยึดเกาะกับเยื่อบุลำไส้ได้ดีขึ้น บริเวณฐานประกอบด้วย rostellaum hook จำนวน 300-500 อัน เรียงตัวสองแถว sucker รูปร่างกลมไม่มีหนาม genital pore เปิดแบบ alternating irregular unilateral แต่ละแคปซูลไข่ ประกอบด้วยไข่เพียง 1 ฟอง เท่านั้น (ภาพประกอบ 9) ระยะติดต่ออาศัยอยู่ในแมลงปีกแข็งมากกว่า 100 ชนิด เมื่อติดพยาธิจะทำให้โฮสต์เฉพาะเกิดอาการผอมซูบ น้ำหนักลดและขนาดตัวเล็กกว่าปกติ นอกจากนี้ยังทำให้บริเวณที่ติดเชื้อเกิดการฝ่อของ villi และการอักเสบ (Butboonchoo et al., 2016; McDougald, 2020; Reid, 1942; Sawada, 1964; T Salam, S Mir, & R Khan, 2010)



ภาพประกอบ 9 สัณฐานวิทยาของ *R. cesticillus*

(1: ส่วน scolex ประกอบด้วย rostellum (R) และ sucker (S); 2: rostellar hook; 3: ปล้องแก่ที่มี genital pore; 4: ปล้องสุกที่บรรจุแคปซูลไข่ (EC) และ egg (E))

ที่มา: Butboonchoo et al. (2016)

รายงานการระบาดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในต่างประเทศ

นอกจากการระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในประเทศไทยแล้วยังมีรายงานการระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* อีกหลายประเทศทั่วโลก ซึ่งศึกษาในโฮสต์เฉพาะชนิดอื่นที่ต่างจากประเทศไทย เช่น Owolabi และคณะ (2009) ศึกษาหนอนพยาธิในนกพิราบท้องถิ่น (*Columba livia domesticus*) ที่ประเทศไนจีเรียจำนวน 250 ตัว พบพยาธิตัวตืดในสกุล *Raillietina* ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ *R. tetragona*, *R. echinobothrida* และ *R. cesticillus* โดยมีค่าความชุกร้อยละ 4.60, 7.60 และ 3.00 ตามลำดับ และ Begum และคณะ (2019) ศึกษาการติดหนอนพยาธิในเป็ด (*Anas platyrhynchos domesticus*) จำนวน 60 ตัวในประเทศบังกลาเทศ พบการติดพยาธิตัวตืดในสกุล *Raillietina* ทั้งหมด 3 ชนิด คือ *R. echinobothrida*, *R. cesticillus* และ *R. bonini* โดยมีค่าความชุกร้อยละ 50.00, 56.67 และ 63.33 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีอีกหลายการศึกษาสำรวจหนอนพยาธิในโฮสต์เฉพาะชนิดเดียวกันกับที่มีการระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในประเทศไทยดังตาราง 2

ตาราง 2 การระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในโฮสต์เฉพาะชนิดต่าง ๆ ทั่วโลก

พยาธิ	โฮสต์	ค่าความชุก (%)	ประเทศ	อ้างอิง
R. tetragona	*Gallus* spp.	21.30	แทนซาเนีย	Permin et al., 1997
		84.40	ซิมบับเว	Mukaratirwa & Hove, 2009
		45.69	เอธิโอเปีย	Eshetu, Mulualem, Ibrahim, Berhanu, & Aberra, 2001
		9.30	โมร็อกโก	Hassouni & Belghyti, 2006
	G. g. domesticus	15.00	โซมาเรีย	Catelli, Poglayen, & Gadale, 1999
	C. l. domesticus	4.90	ไนจีเรีย	Owolabi, Jato, & Yusuf, 2009
	Columba livia	2.00	ลิเบีย	Alkharigy, El Naas, & Maghrbi, 2018
R. echinobothrida	*Gallus* spp.	46.30	แทนซาเนีย	Permin et al., 1997
		32.20	ซิมบับเว	Mukaratirwa & Hove, 2009
		25.84	เอธิโอเปีย	Eshetu et al., 2001
		5.70	โมร็อกโก	Hassouni & Belghyti, 2006

ตาราง 2 (ต่อ)

พยาธิ	โฮสต์	ค่าความชุก (%)	ประเทศ	อ้างอิง
R. echinobothrida	*G. g. domesticus*	8.50	โซมาเรีย	Catelli et al., 1999
	C. l. domesticus	7.60	ไนจีเรีย	Owolabi et al., 2009
	C. livia	32.00	ลิเบีย	Alkharigy et al., 2018
	A. p. domesticus	50.00	บังกลาเทศ	Begum, Mukutmoni, & Akter, 2019
R. cesticillus	*Gallus* spp.	2.70	แทนซาเนีย	Permin et al., 1997
		27.30	ซิมบับเว	Mukaratirwa & Hove, 2009
		11.60	สหรัฐอเมริกา	Wilson, Yazwinski, Tucker, & Johnson, 1994
		5.62	เอธิโอเปีย	Eshetu et al., 2001
		12.00	โมร็อกโก	Hassouni & Belghyti, 2006
	G. g. domesticus	2.00	โซมาเรีย	Catelli et al., 1999
	C. l. domesticus	3.00	ไนจีเรีย	Owolabi et al., 2009
	C. livia	4.00	ลิเบีย	Alkharigy et al., 2018
	A. p. domesticus	56.67	บังกลาเทศ	Begum et al., 2019
Raillietina spp.	*Gallus* spp.	0.40	ซิมบับเว	Mukaratirwa & Hove, 2009
R. bonini	*A. p. domesticus*	63.33	บังกลาเทศ	Begum et al., 2019

การรักษาการติดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

พยาธิสภาพของการติดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* เกิดจากการยึดเกาะของ rostellar hook และ sucker ที่ผนังลำไส้ เป็นสาเหตุให้เกิดการตกเลือดและลำไส้อักเสบ (Reid et al., 1938) การศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานการทดสอบกำจัดพยาธิด้วยยาชนิดที่แตกต่างกัน รวมถึงหาปริมาณยาที่เหมาะสม และระยะเวลาในการให้ยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการกำจัดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* แสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 การศึกษาชนิดและปริมาณยาที่แตกต่างกันในการรักษาการติดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

พยาธิ	ชนิดยา	ปริมาณยา	ระยะเวลา (วัน)	ประสิทธิภาพ (%)	อ้างอิง
R. tetragona	Praziquantel	25 mg/kg*	1	100	Rajendran & Nadakal, 1988
		10 mg/kg*	1	100	Nurelhuda, Elowni & Hassan, 1989a
	Albendazole	25 mg/kg*	3	100	Saeed, 2007
	Oxfendazole	10 mg/kg*	1	100	Nurelhuda et al., 1989b
R. echinobothrida	Albendazole (*in vitro*)	20 mg/ml**	1	100	Lalchhandama, 2010; Roy, Lalchhandama, & Dutta, 2007;
	Praziquantel (*in vitro*)	0.01 mg/ml**	1	100	Dasgupta, Roy, & Tandon, 2010
R. cesticillus	Fenbendazole	104.3 mg/kg*	6	100	Pote et al., 1992
	Niclosamide	52.65 mg/kg*	12	100	Boisvenue & Hendrix, 1965
	Praziquantel (*in vitro*)	60 mg/ml**	1	95	El-Bahy & Bazh, 2015

* ปริมาณยา (มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนักตัวไก่ (กิโลกรัม), ** ปริมาณยา (มิลลิกรัม) ต่อสารละลาย (มิลลิลิตร)

นอกจากนี้มีการศึกษาโดยใช้สารสกัดจากพืชหลายชนิดเพื่อนำมาทดสอบการกำจัด *R. echinobothrida* เช่น พืชชนิด *Flemingia vestita* (Das, Tandon, & Saha, 2004), *Potentilla fulgens* (Giri, Roy, & Babu, 2013), *Acacia oxyphylla* (Dasgupta et al., 2010) เป็นต้น แต่การที่จะควบคุมการระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ให้มีประสิทธิภาพสูงสุดคือการลดจำนวนประชากรของโฮสต์กึ่งกลาง ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการกระจายตัวของพยาธิ (McDougald, 2020)

การระบุชนิดเชิงโมเลกุลของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

โดยทั่วไปการระบุชนิดหนอนพยาธิด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาต้องอาศัยการทำสไลด์ถาวร และ/หรือ การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ และมีค่าใช้จ่ายสูง รวมถึงต้องมีความชำนาญทางด้านปรสิตวิทยาสำหรับระบุชนิด ปัจจุบันจึงมีการศึกษาทางอณูชีววิทยาในหนอนพยาธิมากขึ้น โดยมีเป้าหมายเพื่อนำไปใช้เพิ่มความแม่นยำ และความรวดเร็วในการระบุชนิด รวมทั้งวิธีทางอณูชีววิทยาต้องการชิ้นส่วนของหนอนพยาธิเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยไม่จำเป็นต้องฆ่าโฮสต์ เช่น เนื้อเยื่อ ปล้องสุก หรือไข่ของหนอนพยาธิที่หลุดออกมากับอุจจาระมาใช้ทำปฏิกิริยา ซึ่งสามารถทราบผลได้ในระยะเวลาเพียงหนึ่งวัน ทำให้วิธีทางอณูชีววิทยาถูกประยุกต์ใช้สำหรับระบุชนิดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* มากขึ้น เช่น Olson และคณะ (2001) ศึกษายีน *18S* และ *28S ribosomal* DNA ของ *R. australis* ร่วมกับพยาธิตัวตืดอื่น ๆ อีก 39 วงศ์ ด้วยวิธี phylogenetic analysis ต่อมา Butboonchoo และ Wongsawad (2017) ได้ระบุชนิด *R. tetragona*, *R. echinobothrida* และ *R. cesticillus* จากวิธี high annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 สาย นอกจากนี้ยังมีอีกหลายรายงานที่ประยุกต์ใช้วิธีทางอณูชีววิทยาสำหรับระบุชนิดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ดังตาราง 4

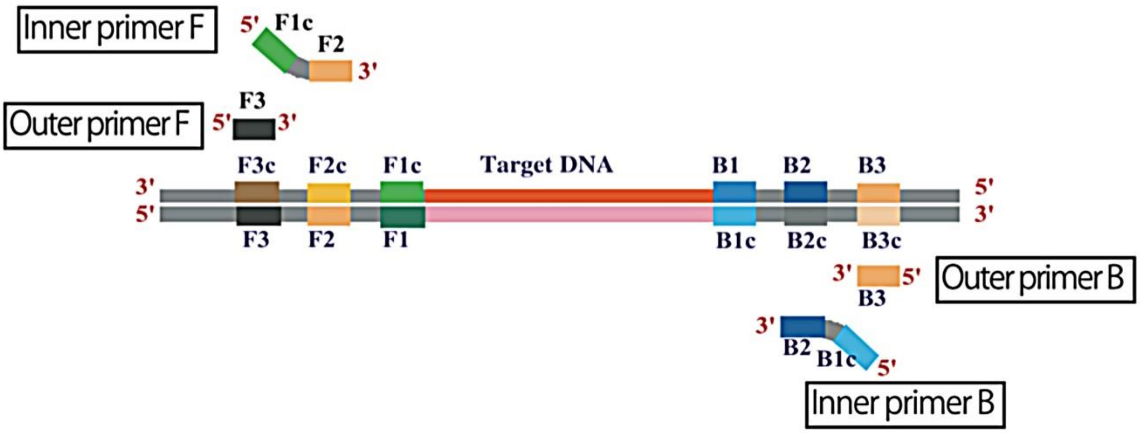
ตาราง 4 รายงานการประยุกต์วิธีทางอณูชีววิทยาสำหรับระบุชนิดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

วิธี	พยาธิ	บริเวณเป้าหมาย	อ้างอิง
PCR และ phylogenetic analysis	*Raillietina* spp.	*Cytochrome oxidase subunit 1* (*COX1*), *TRNT*, *RRNL*, *NADH dehydrogenase subunit 1*(*NAD1*), *trnN*, *18S rDNA*, *28S rDNA* gene	Littlewood, Waeschenbach, & Nikolov, 2008
reverse transcription PCR (RT-PCR)	*R. tetragona*	*RT10* gene	Chen & Li, 2014
PCR และ phylogenetic analysis	*R. echinobothrida*	ITS2 region	Jyrwa, Dutta, Das, & Tandon, 2014
random amplified polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR)	*Raillietina* spp.	*18S rDNA* gene	Ghobashy & Taeleb, 2015
PCR และ phylogenetic analysis	*Raillietina* spp.	ITS2 region, *NAD1* gene	Butboonchoo et al., 2016
PCR	*R. tetragona*	Mitochondrial genome	Liang & Lin, 2016

จากรายงานที่กล่าวมาและรายงานอื่น ๆ ก่อนหน้านี้ไม่พบรายงานการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับใช้ในการตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการระบุชนิดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* แต่ละชนิดที่พบในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อเพิ่มความไว และความจำเพาะในการตรวจหาด้วยวิธี simplex PCR ในระดับห้องปฏิบัติการ

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

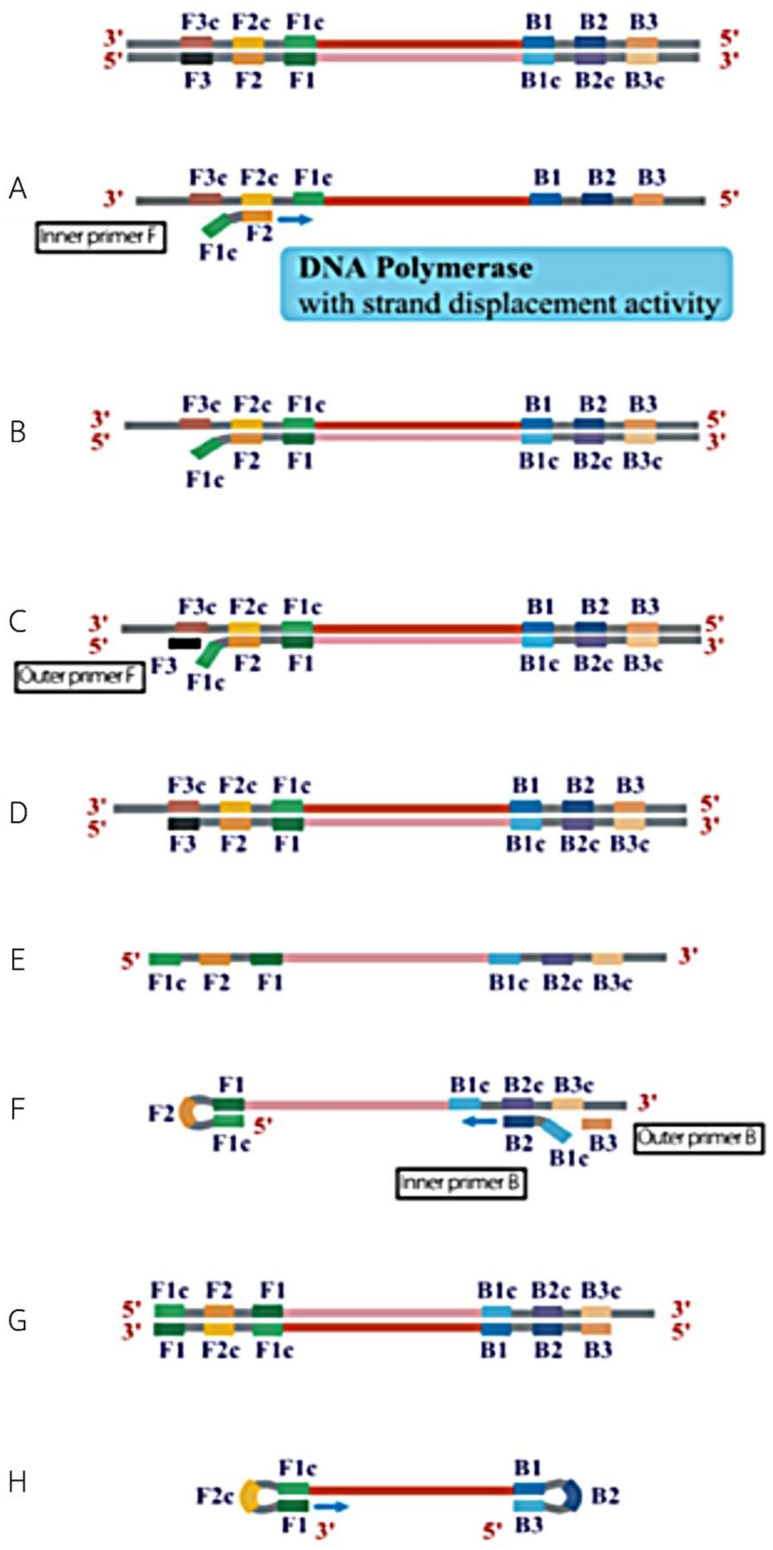
วิธีทางอณูชีววิทยาที่กล่าวก่อนหน้าจำเป็นต้องอาศัยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้ต้องปฏิบัติงานอยู่ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น จึงเป็นข้อจำกัดขณะปฏิบัติงานในภาคสนาม ส่งผลให้ผู้ประกอบการหรือเกษตรกรไม่สามารถตรวจหาได้ด้วยตนเอง ปัจจุบันวิธี LAMP เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายสำหรับใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส รวมไปถึงหนอนพยาธิ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิเดียว ทำให้ง่ายต่อการนำไปตรวจในภาคสนาม วิธี LAMP เป็นวิธีที่สร้างขึ้นโดย Notomi และคณะ (2000) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองได้ถึง 10^9 เท่าภายในระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือน้อยกว่านั้น โดยมีการใช้ไพรเมอร์ 4 สาย ประกอบด้วย ไพรเมอร์คู่นอก (outer primer F และ outer primer B) มีความยาวประมาณ 17-21 base pair (คู่เบส) และ ไพรเมอร์คู่ใน (FIP = forward inner primer, BIP = backward inner primer) ที่จำเพาะต่อตำแหน่งของ DNA เป้าหมาย 6 ตำแหน่ง (ภาพประกอบ 10) และใช้เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียร และทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 60-65 °C ทำหน้าที่แยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวได้ (strand displacement) กลไกการทำงานของ LAMP ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ



ภาพประกอบ 10 ตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์ทั้ง 4 สายใน DNA เป้าหมาย

ที่มา: Hirayama, Kageyama, Moriyasu, Sawai, & Minamihashi. (2013)

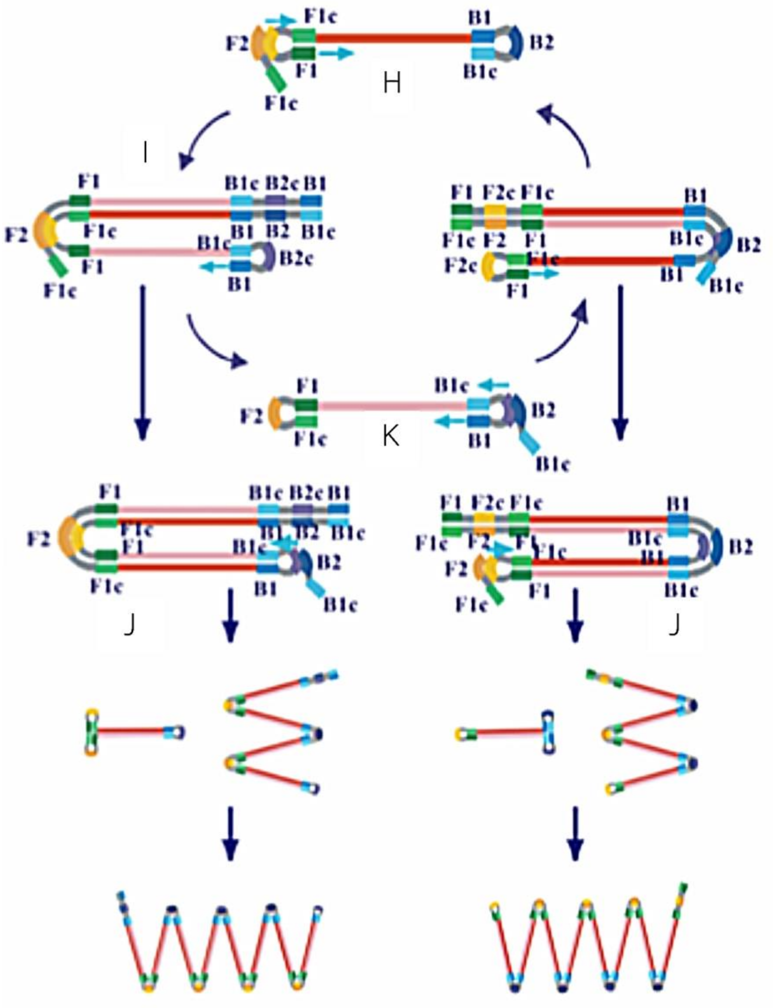
1. ขั้นตอน starting structure producing ที่อุณหภูมิ 65 °C DNA จะอยู่ในรูปแบบสายคู่ (double stranded DNA) และคลายบางส่วนเป็นสายเดี่ยว (single stranded DNA) ส่งผลให้ FIP primer มีโอกาสเข้าไปจับกับ DNA ต้นแบบ (ภาพประกอบ 11 A) จากนั้น *Bst* DNA polymerase จะแยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว และมีการสร้าง DNA สายใหม่ขึ้น (ภาพประกอบ 2-11 B) จากนั้น F3 primer จะเข้าไปจับกับ DNA ต้นแบบ (ภาพประกอบ 11 C) แล้วเริ่มสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยอาศัยคุณสมบัติ DNA polymerase กับ strand displacement ได้ DNA เส้นใหม่ที่มีลักษณะเหมือนต้นแบบ (ภาพประกอบ 11 D) ขณะเดียวกันนั้นจะปล่อยสายที่ 1 ออกมาเป็น single strand (ภาพประกอบ 11 E) โดยทางด้าน 5’ ของสายที่ 1 จะเป็นส่วนของ F1c (ปลายของ FIP) สามารถเข้าจับกับ F1 สร้าง loop ขึ้นทางด้าน forward จากนั้น BIP primer จะเข้าจับ และสังเคราะห์ DNA สายที่ 2 ขึ้นมา (ภาพประกอบ 11 F) เช่นเดียวกันกับ B3 primer เข้าจับ และสังเคราะห์ DNA สายใหม่ (ภาพประกอบ 11 G) แล้วปล่อยสายที่ 2 ออกมาเป็น single strand โดยด้าน forward จะเป็น F1 ซึ่งจะสร้าง loop โดยจับกับ F1c ในขณะเดียวกันด้าน backward จะเป็น B1c ที่สร้าง loop โดยจับกับ B1 ทำให้ได้ stem loop ที่มีลักษณะเป็น dumbbell shape สำหรับใช้ในปฏิกิริยาขั้นต่อไป (ภาพประกอบ 11 H)



ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการทำงานของ LAMP ในขั้นตอน starting structure producing

ที่มา: Hirayama et al. (2013)

2. ขั้นตอน cycle amplification (ภาพประกอบ 12) จะเกิดที่ด้านปลายของ loop forward ก่อน โดยสามารถมี self-primed strand displacement DNA synthesis สร้าง DNA จาก F1 ต่อไปจนถึง B1c ในเวลาเดียวกัน FIP primer ก็สามารถจับกับ F2c ที่ loop forward (ภาพประกอบ 12 I) และสังเคราะห์ DNA สายใหม่ ได้ 3 ชุด (ภาพประกอบ 12 J) และมี stem loop ลักษณะเป็น dumbbell shape (ภาพประกอบ 12 K) ที่สามารถเกิด cycle amplification ด้าน backward ขึ้นได้ ซึ่งจะทำงานต่อเนื่องกันตลอดเวลาทำให้ได้ DNA เป้าหมายที่ยาวขึ้นหลาย ๆ ชุด ทำให้อัตราการสังเคราะห์ DNA ยิ่งมากขึ้นโดยพบว่าสามารถสังเคราะห์ DNA ได้ถึง 10^{9}-10^{10} copy (Notomi et al., 2000; อมรรัตน์, 2554)



ภาพประกอบ 12 กลไกการทำงานของ LAMP ในขั้นตอน cycle amplification

ที่มา: Hirayama et al. (2013)

งานวิจัยการตรวจหาปรสิตด้วยวิธี LAMP

เนื่องจากวิธี LAMP เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ทำให้ได้รับความนิยมนำมาประยุกต์ใช้สำหรับตรวจหาปรสิตในกลุ่มปรสิตโพรโทซัว เช่น Iseki และคณะ (2007) ใช้วิธี multiplex LAMP ที่จำเพาะต่อยีน *Rhoptry-associated protein 1* (*RAP-1*) สำหรับตรวจหาเชื้อ *Babesia bovis* และ *B. bigemina* ในเลือดวัว โดยมีความไวในการตรวจหาเท่ากับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเพียง 50 เซลล์ ซึ่งมีความไวสูงกว่าการตรวจหาด้วยวิธี conventional PCR ถึง 1,000 เท่า ในปีเดียวกัน Han และคณะ (2007) ใช้วิธี LAMP ที่จำเพาะต่อยีน *18S rDNA* สำหรับตรวจหาปรสิตโพรโทซัวสกุล *Plasmodium* 4 ชนิดในเลือดมนุษย์ ได้แก่ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* ต่อมา Adams และคณะ (2010) ตรวจหาปรสิตโพรโทซัวสกุล *Leishmania* ในเลือดโดยใช้วิธี reverse transcriptase LAMP ที่จำเพาะต่อยีน *18S rDNA* โดยสามารถตรวจหาเชื้อปริมาณต่ำสุดที่ 100 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ใช้วิธี LAMP สำหรับตรวจหาหนอนพยาธิทั้ง 3 กลุ่มในระยะต่าง ๆ และใช้บริเวณเป้าหมายที่แตกต่างกันดังตาราง 5

ตาราง 5 รายงานการตรวจหาหนอนพยาธิในระยะต่าง ๆ ด้วยวิธี LAMP

พยาธิ	**ระยะ**	**บริเวณเป้าหมาย**	**ความไว**	**อ้างอิง**
Nematodes				
Trichuris trichiura	adult	*β-tubulin isotype 1* gene	1 pg	Rashwan, Diawara, Scott, & Prichard, 2017
Ascaris lumbricoides	adult	ITS1 region, *β-tubulin isotype 1* gene	1 pg	
Necator americanus	egg	ITS2 region	0.4 fg	Mugambi et al., 2015
Loa loa	microfilaria	*LLMF72* gene *LLMF342* gene	0.2 fg 0.02 pg	Drame, Fink, Kamgno, Herrick, & Nutman, 2014
Toxocara canis	egg	ITS2 region	0.1 pg	Macuhova, Kumagai, Akao, & Ohta, 2010
	adult			Khoshakhlagh et al., 2017

ตาราง 5 (ต่อ)

พยาธิ	**ระยะ**	**บริเวณเป้าหมาย**	**ความไว**	**อ้างอิง**
Trematodes				
Clonorchis sinensis	egg	*COX1* gene	100 fg	Rahman et al., 2017
	adult		10 EPGs	
Fasciola hepatica	egg	ITS2 region	1 pg	Martínez & Rojo, 2016
F. hepatica	adult	Intergenic spacer (IGS)	10 fg	Ai et al., 2010
Opisthorchis viverrini	egg	*NAD1* gene	1 pg-100 fg	Le et al., 2012
	adult			
Cestodes				
Taenia solium	proglottid	*COX1* gene	-	Nkouawa, Sako, Nakao, Nakaya, & Ito, 2009
	cysticercus			
T. saginata	egg	*COX1* gene	5 EPGs	
T. hydatigena	egg	*COX1* gene	10 pg	Feng et al., 2017
	adult		1 egg	
Echinococcus granulosus	egg	*NAD5* gene	1 pg	Ni et al., 2014
E. felidi	egg	*NAD1* gene	1/10, 1/50 egg	Salant, Abbasi, & Hamburger, 2012

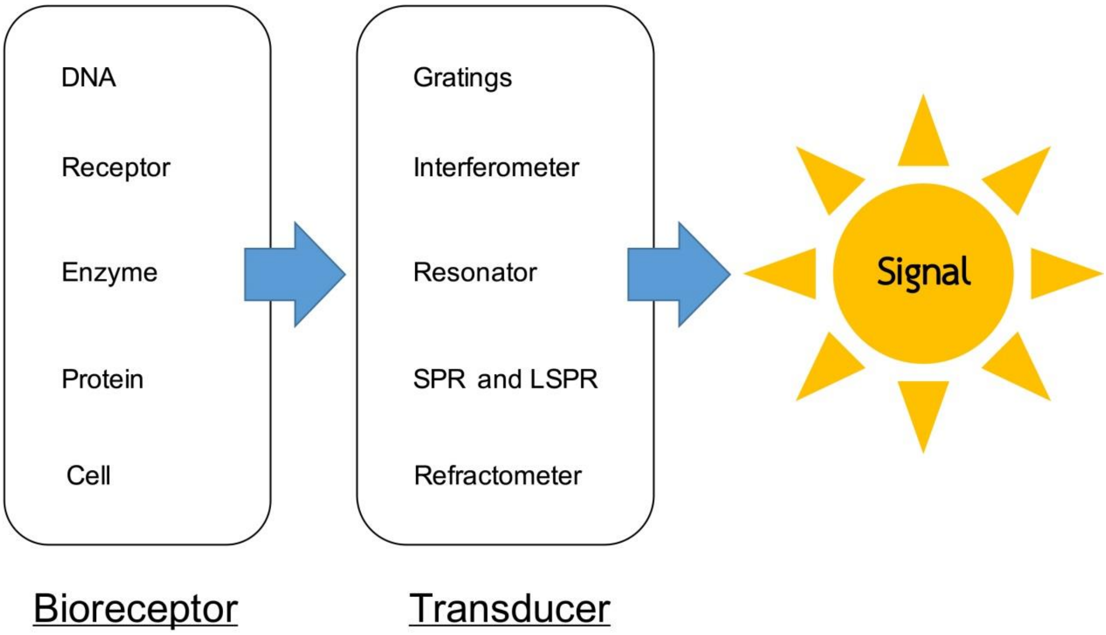
*EPGs: จำนวนไข่ต่อน้ำหนักอุจจาระหนึ่งกรัม

จากรายงานที่กล่าวมาไม่พบการประยุกต์ใช้วิธี LAMP สำหรับการตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี LAMP ควบคู่กับ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับเป็นเครื่องมือตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีก

Biosensor

การตรวจสอบผลการเกิดปฏิกิริยาของวิธี conventional PCR ซึ่งนิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยปรสิตต้องอาศัยการทำ gel electrophoresis และใช้แสง UV ในการตรวจสอบ ซึ่งจำเป็นต้องใช้เครื่องมือจำเพาะที่ขนย้ายลำบาก ทำให้ไม่เหมาะกับการปฏิบัติการในภาคสนาม ดังนั้นเทคโนโลยี biosensor จึงเข้ามามีบทบาทในการแก้ไขข้อจำกัดดังกล่าว

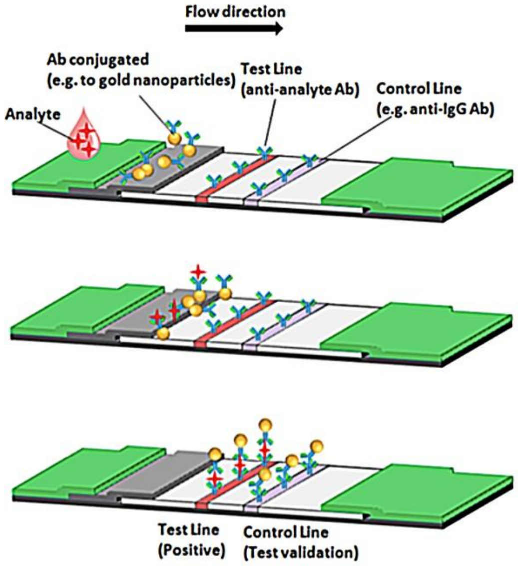
Biosensor เป็นเครื่องมือหนึ่งที่ใช้ตรวจวัดทางชีวภาพที่พัฒนาขึ้นเพื่อติดตามสารที่ต้องการตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว และสามารถทำได้ง่าย โดยอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่าง ไบโอรีเซฟเตอร์ (bioreceptor) ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสามารถในการจับอย่างจำเพาะกับสารที่ต้องการตรวจสอบได้ เช่น เอนไซม์, DNA, โปรตีนรีเซฟเตอร์ (receptor protein) หรือแอนติบอดี (antibody) เป็นต้น และตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ซึ่งมีหน้าที่ในการแปลงสัญญาณจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า เคมี แสง สี สำหรับการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป (ภาพประกอบ 13) (Debnath, Prasad, & Bisen, 2010)



ภาพประกอบ 13 ส่วนประกอบ biosensor

Lateral flow dipstick (LFD)

เทคนิค LFD เป็นหนึ่งในเทคโนโลยี biosensor ที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพด้านความรวดเร็ว และความจำเพาะให้เหมาะสำหรับการตรวจหาในภาคสนาม LFD เป็นเทคนิคทาง immunochromatography โดยมีหลักการคือ นำผลิตภัณฑ์ LAMP ที่มี biotin ติดอยู่ไป hybridize กับ DNA probe ที่ติดฉลากด้วย FITC (fluorescein isothiocyanate) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปหยดใส่ dipstick ในบริเวณ sample pad ผลิตภัณฑ์จะเกิดการแพร่ไปยัง conjugate pad ซึ่งจะมีโมเลกุลของ gold nanoparticle ที่เชื่อมอยู่กับ primary antibody ที่จำเพาะต่อ FITC ทำให้เกิดการเชื่อมติดกันของผลิตภัณฑ์ LAMP กับ primary antibody เมื่อสารเกิดการแพร่ไปถึงเส้น test line ที่จะมีการตรึงด้วย biotin ligand ซึ่งสามารถจับกับ biotin ที่ติดอยู่กับผลิตภัณฑ์ LAMP ได้ จะเกิดแถบสีขึ้นจาก gold nanoparticle จากนั้นเมื่อสารแพร่ต่อไปถึงเส้น control line จะเกิดแถบสีเนื่องจาก secondary antibody ที่ถูกตรึงไว้จะจับแบบจำเพาะกับ primary antibody (ภาพประกอบ 14) ซึ่งเป็นบริเวณที่ประเมินการทำงานของ LFD โดยการดูผลการตรวจจะดูจากจำนวนเส้นที่เกิดแถบสีโดยผลที่เป็น positive จะเกิดแถบสีขึ้นเส้นขึ้น 2 เส้น หากเกิดแถบสีที่เส้น control line เพียงเส้นเดียวแสดงว่าผลเป็น negative แต่ถ้าไม่มีแถบสีเกิดขึ้นเลยแสดงว่าอาจเกิดปัญหากับอุปกรณ์หรือสารเคมีที่ใช้ (Jaroenram, Kiatpathomchai, & Flegel, 2009)



ภาพประกอบ 14 กลไกการทำงานของ lateral flow dipstick

ที่มา: Koczula & Gallotta. (2016)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์ผ่าตัด: กรรไกร, มีด, เข็มเขี่ย, ปากคีบ, ถาดผ่าตัด อุปกรณ์เครื่องแก้ว: จานเพาะเชื้อ (petri-dish), บีกเกอร์ (beaker), ปิเปต (pipette), staining jar, embryo dish ฯลฯ

1.2 กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์ (slide and microscope cover glass)

1.3 หลอดเก็บตัวอย่าง microcentrifuge tube ขนาด 0.2 และ 1.5 ml

1.4 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ถุงมือ, พู่กัน, ถุงพลาสติก, กระดาษเลเบล, กระบอกตวง, ช้อนตักสาร, ด้าย, pipette tip ฯลฯ

1.5 ชุด LFD strip test (Milenia® Genline)

1.6 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope, Nikon SMZ445)

1.7 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพร้อมอุปกรณ์ถ่ายรูป (light microscope, Olympus CH30)

1.8 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

1.9 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

1.10 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

1.11 เครื่องผสมเขย่า (vortex mixer)

1.12 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด 2 ตำแหน่ง

1.13 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (heat box)

1.14 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาตรน้อย (nanodrop lite spectrophotometer, Thermo scientific)

1.15 ตู้ทำความเย็น 4 $^{\circ}$C และ -20 $^{\circ}$C

1.16 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

1.17 ปิเปตอัตโนมัติ (auto pipette)

2. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร

2.1 4% formalin

2.2 ethyl alcohol ความเข้มข้น 10% 20% 30% 50% 70% 80% และ 95%

2.3 butyl alcohol

2.4 xylene

2.5 permount

2.6 สีย้อม (haematoxylin, borax carmine, aceto carmine, fast green)

2.7 1% destain (1% HCl ใน 70% ethyl alcohol)

3. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทำวิจัยทางอณูชีววิทยา

3.1 ชุดสกัด DNA (GF-1 tissue DNA extraction, Vivantis company)

3.2 *Bst* DNA polymerase

3.3 *Taq* DNA polymerase

3.4 LAMP primer

3.5 primer

3.6 DNA probe

3.7 betaine

3.8 deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs)

3.9 SYBR safe

3.10 agarose gel

3.11 magnesium sulfate ($MgSO_4$)

3.12 magnesium chloride ($MgCl_2$)

3.13 absolute ethyl alcohol

3.14 deionized H_2O

วิธีดำเนินการทดลอง

1. จริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง

การขออนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ การปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองต้องมีการขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองเพื่อรับรองว่าผู้วิจัยได้ปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองอย่างถูกต้องตามหลักจริยธรรมภายใต้การอนุญาตการใช้สัตว์ เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ เลขที่ SWU-A-025-2562

2. การเตรียมตัวอย่างหนอนพยาธิ

เพื่อนำตัวอย่างหนอนพยาธิไปศึกษาทางสัณฐานวิทยา และอณูชีววิทยา โดยพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* เก็บจากทางเดินอาหารของซากไก่ (*Gallus gallus domesticus*) และเป็ด (*Anas playtrhynchos domesticus*) รวมถึงหนอนพยาธิชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานการติดร่วมกับพยาธิตัวตืด

สกุล *Raillietina* ในทางเดินอาหารของไก่ และเป็ดจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ กรุงเทพมหานคร มหาสารคาม และสุพรรณบุรี แสดงในตาราง 6

ตาราง 6 ตัวอย่างหนอนพยาธิที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

พยาธิ	**ระยะ**	**โฮสต์**
Raillietina echinobothrida	ตัวเต็มวัย	ไก่ (*G. g. domesticus*)
R. tetragona	ตัวเต็มวัย	ไก่ (*G. g. domesticus*)
R. cesticillus	ตัวเต็มวัย	ไก่ (*G. g. domesticus*)
Cotugnia sp.	ตัวเต็มวัย	ไก่ (*G. g. domesticus*)
Diorchis sp.	ตัวเต็มวัย	เป็ด (*A. p. domesticus*)
Fimbriaria sp.	ตัวเต็มวัย	เป็ด (*A. p. domesticus*)
Echinostoma sp.	เมตาเซอร์คาเรีย	หอยขม (*Filopaludina sumatrensis polygramma*)
E. miyagawai	ตัวเต็มวัย	เป็ด (*A. p. domesticus*)
Hypoderaeum conoideum	ตัวเต็มวัย	เป็ด (*A. p. domesticus*)
Prosthogonimus cuneatus	ตัวเต็มวัย	เป็ด (*A. p. domesticus*)
Ascaridia galli	ตัวเต็มวัย	ไก่ (*G. g. domesticus*)

สำหรับการเตรียมตัวอย่างหนอนพยาธิระยะตัวเต็มวัยในทางเดินอาหาร และอวัยวะภายในของซากโฮสต์เฉพาะ จะทำการผ่าแล้วนำอวัยวะภายในตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยใช้เข็มเขี่ยค่อย ๆ ฉีดเนื้อเยื่อออก จากนั้นเก็บตัวอย่างโดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ (1) การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยทำการคงสภาพ (fixation) หนอนพยาธิโดยปิดด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วพันด้วยด้ายให้ตัวอย่างแบน แล้วคงสภาพใน 4% formalin หรือ 70% ethyl alcohol เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปทำสไลด์ถาวร เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาพร้อมวัดขนาดตัวอย่างหนอนพยาธิ และ (2) การศึกษาทางอณูชีววิทยาโดยเก็บพยาธิใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มี 95% ethyl alcohol แล้วแช่ในตู้เย็น -20 °C จนกระทั่งนำไปสกัด DNA

3. **การระบุชนิดหนอนพยาธิก่อนนำมาใช้ในการทดลอง**

3.1 การระบุชนิดด้วยวิธีสัณฐานวิทยา

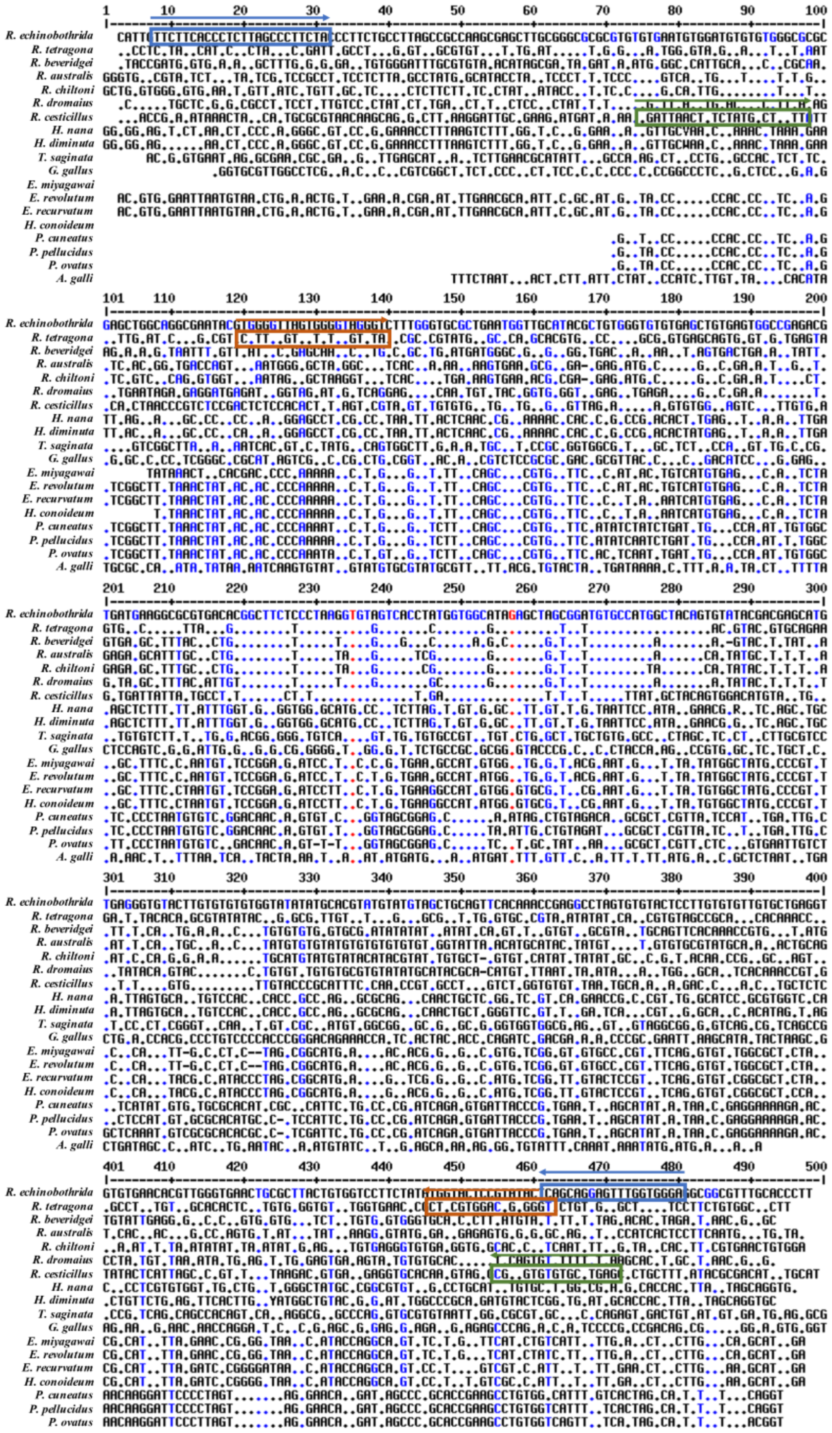
การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาจากสไลด์ถาวร โดยนำตัวอย่างหนอนพยาธิที่ผ่านการคงสภาพด้วย 4% formalin เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ มาแช่น้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัด formalin แล้วทำการย้อมสีโดยแช่ใน haematoxylin เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือย้อมตัวอย่างด้วย borax carmine หรือ aceto carmine หลังจากผ่าน 70% ethyl alcohol แล้วทำการดึงน้ำออกด้วย ethyl alcohol ขั้นตอนละประมาณ 30 นาที ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10% 20% 30% 50% 70% ตามลำดับจากนั้นนำตัวอย่างมาล้างสีส่วนเกินด้วย 1% destain ก่อนดึงน้ำออกด้วย ethyl alcohol อีกครั้งที่ความเข้มข้น 70% และ 80% แล้วย้อมด้วย fast green ต่อด้วย 95%, ethyl alcohol : butyl alcohol 1:1, butyl alcohol และ butyl alcohol : xylene 1:1 เป็นระยะเวลา 15 นาที ตามลำดับ แล้วทำให้ตัวอย่างใส (clearing) ด้วย xylene เป็นระยะเวลา 5 นาที นำพยาธิผนึกสไลด์กับกระจกปิดสไลด์ด้วย permount วางบนเครื่องอุ่นสไลด์เป็นเวลา 3 วัน เพื่อไล่ฟองอากาศ จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเพื่อระบุชนิดตาม Butboonchoo และคณะ (2016), Heneberg, Sitko, & Bizos (2015), Schultz (1940), Sawada (1964), Sawada (1965), Yamaguti (1958) และ Yamaguti (1959)

3.2 การระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยา

การระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยาสำหรับยืนยันผลการระบุชนิดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ถูกแปลรหัส (coding) หรือไม่ถูกแปลรหัส (non-coding) โดยนำตัวอย่างพยาธิที่รักษาสภาพใน 95% ethyl alcohol มาสกัด DNA ด้วยชุดสกัด GF-1 tissue DNA extraction จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้น DNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง nanodrop lite spectrophotometer แล้วปรับความเข้มข้น DNA ตั้งต้นให้เท่ากับ 5 ng/µl ต่อมานำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อหนอนพยาธิ ได้แก่ บริเวณ ITS2 ใช้ forward primer ITS3 (5’-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3’) และ reverse primer ITS4 (5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) (Barber, Mkoji, & Loker, 2000) และยีน *18S ribosomal DNA* ใช้ forward primer Uni_parasite_F2 (5’-AACGGCTACCACTTCCAA-3’) และ reverse primer Uni_parasite_R2 (5’-AGGGCATCACAGACCTGT-3’) จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn สำหรับการระบุชนิด

4. การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* สำหรับวิธี simplex PCR

ไพรเมอร์ถูกออกแบบให้จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* แต่ละชนิดที่พบในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* ด้วยวิธี manual design ซึ่งออกแบบจากบริเวณ ITS2 ร่วมกับพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ชนิดอื่น หนอนพยาธิที่มีรายงานการติดร่วมกับ *Raillietina* จากที่พบในการศึกษาครั้งนี้หรือมีรายงานก่อนหน้านี้ และพยาธิตัวตืดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Raillietina* รวมถึงโฮสต์เฉพาะที่มีรายงานการติด *Raillietina* มาออกแบบร่วมกันได้แก่ *R. echinobothrida* (MN902341, MN902342, MN902343), *R. tetragona* (MH421967.1, MH421970.1, MH421995.1, MN902344, MN902345, MN902346), *R. cesticillus* (KP893422.1, MN902347), *R. beveridgei* (AY382318.1), *R. australis* (AY382317.1), *R. chiltoni* (AY382319.1), *R. dromaius* (AY382320.1), *Hymenolepis nana* (AF461124.1), *H. diminuta* (AF461125.1), *Taenia saginata* (AY825542.1, AY825541.1), *P. cuneatus* (KP192736.1, KP192725.1), *P. pellucidus* (KP192732.1, KP192734.1), *P. ovatus* (KP192733.1, KP192722.1), *E. miyagawai* (MH796365.1), *E. revolutum* (GQ463129.1, AF067850.1), *H. conoideum* (KJ944311.1, KJ944314.1, KJ944315.1), *Echinoparyphium recurvatum* (AY168931.1), *A. galli* (KY789471.1, AJ007452.1), *G. gallus* (DQ018755.1) โดยไพรเมอร์แต่ละคู่ให้ผลิตภัณฑ์เป้าหมายมีความยาวเท่ากับ 473 bp, 352 bp และ 397 สำหรับ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* ตามลำดับ แสดงดังภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 ตำแหน่งและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* แต่ละชนิดที่บริเวณ ITS2

(กรอบสีฟ้า: ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *R. echinobothrida*; กรอบสีส้ม: ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *R. tetragona*; กรอบสีเขียว: ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *R. cesticillus*)

4.1 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์ โดยหาอุณหภูมิ และปริมาณสารเคมีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ $MgCl_2$, dNTPs และ ไพรเมอร์

4.2 ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ โดยนำไพรเมอร์ไปทำปฏิกิริยาร่วมกับหนอนพยาธิชนิดอื่น ๆ ที่แสดงในตาราง 6 และเนื้อเยื่อโฮสต์เฉพาะ ได้แก่ ไก่ และเป็ด โดยตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) คือการไม่เติม DNA เพื่อทดสอบว่าไพรเมอร์ไม่เกิดกับปฏิกิริยาข้าม (cross-amplification) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.1

4.3 ทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์ โดยทำปฏิกิริยาจากความเข้มข้น DNA ตั้งต้นที่ 5 ng/μl จากนั้นเจือจางครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) (ตั้งแต่ 5–5 x 10^{-6} ng/μl) จนไม่สามารถตรวจสอบผลได้ เพื่อหาความเข้มข้นของ DNA ที่น้อยที่สุดที่ไพรเมอร์สามารถเกิดปฏิกิริยาได้

5. การออกแบบไพรเมอร์ LAMP และ DNA probe ที่จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

ไพรเมอร์ LAMP และ DNA probe ถูกออกแบบให้จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* โดยออกแบบจากยีน *28S rDNA* ด้วยวิธี manual design ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ *R. echinobothrida* (MT856353, MT856354, MT856355), *R. tetragona* (MT856359, MT856360, MT856361) และ *R. cesticillus* (MT856356, MT856357, MT856358) ซึ่งมีรายละเอียดไพรเมอร์ LAMP และ DNA probe แสดงในภาพประกอบ 16 และตาราง 7

```
                                          F3 ------------>
R. echinobothrida     GTGGGGCATG GCTGCGACCT CGGTTGTGGC TATTGCTACG CGTGCCGAGT TGTGTGTCGG    60
R. tetragona          GTGGGGCGTA GCTGCGACCT CGGTTGTGGC TATTGCTACG CGTGCCGAGT TGTGTGTCGG
R. cesticillus        GTGGGGCATA GCTGTAGCCT CGGTTGCGGC TTTTGCTACG CGTGCCGGGT GGT-TATCGG

                                           F2 ----------->
R. echinobothrida     AGCGTGCTAC TCGTCTGTGG GGCCGTCTGG TCAGTGCACT TTCTCCGTGG TGAACACCAC    120
R. tetragona          AGCGTGCTAC TCGTCTGTGG GGCCGTCTGG TCAGTGCACT TTCTCTGTGG TGAACACCAC
R. cesticillus        AGCGTGCTAT TCATCTGTTG GGCCGTCTGG TCAGTGCACT TTCTCTGTGG TGAACACCAC

                              F1c
R. echinobothrida     GACCGGTGGT ATTGCCAGTC TACTGTGGTC AAGTCGTGCC TCTCTGGTGG CCTTGT-TGT    180
R. tetragona          GACCGGTGGT ATTGCCAGTC TACTGTGGCC AAGTCGTGTC TCCCTGATGG CCCTGT-TGT
R. cesticillus        GACCGGTGGT ATTGCCAGTC TGCTGTGGTC AAGTCGTGTC TTTCTGATGG TCTTGTCTCT

R. echinobothrida     TCCTTCCTG- ---------- ---------- GGATGATGAT GGCTGTTAGG GGGACGCGAT    240
R. tetragona          -CCTCCCTT- ---------- ---------- GGATGGTAGT GGCTATTTGG AGGACGCGAT
R. cesticillus        CTCTCTCTCT GTGTGTCTTA TCATGGGGAG GGAGGATAAT GACTGTTTGG GAGATGCGAT

                        Probe                                           B1
R. echinobothrida     CGCAGATGGG AGGGATGCAC GGCGTAGCGG TGTTTCGGCG CTGTTGCGTG TTATCGTGCA    300
R. tetragona          CGCAGATGGG AGGGATGTAC GGCGTGGCAG TGTTTCGGCG CTGTTGCGTG CTATCGTGCA
R. cesticillus        CGCGGATGGG AGGGGTGTAC GGCGTAATGG TGTCTCCGCA CTGTTGCGTG TCATCGTGCA

R. echinobothrida     TTCACCGTC- -AACGGGGTG T-CGC-GGTG TTTGGGCTGT GATCGCGCTG ATTGGCACCT    360
R. tetragona          TTCACCGTC- -AACGGGGTG T-TGG-AGTG ----GGCTGT GATTGCACTC CTGGGCACCT
R. cesticillus        TCCACCGTCT CAACGGGGTG TGTGGCGGTG TA-AGGCTGT GACCGCGCTA CAATTTGCCT

                                 <-------------- B2c
R. echinobothrida     CGGCGGGCCA TGGTGGTGAA AGTGACTGTG CAAGGCACCG TGTTCAACCG CCTCAGCTGG    420
R. tetragona          CGGCGGGCCA TGGTGGTGAA AGTGACTGTG CAAGGCACCG TGTTCAACCG CCTCAGCTGA
R. cesticillus        CGGCGGATCA TGGTGGTGAA AGTGACTGTG CAAGGCACCG TGTTTGACCG CCTCA----A

                                                      <------------ B3c
R. echinobothrida     TTGGTGGGCC TTCTGGGTTG ACCGATTGGC TTATGGTATC TGGCACGCAC ATCACAGGTG    480
R. tetragona          TTGGTCGGCC TTCTGGGTTG TCCGATTGGC TCATGGTATC TGGCACGCAC ATCACAGGTG
R. cesticillus        TT------CC T--------- ---------- --ATGGTATC GGGCACGCAC GTCACAGGTG
```

ภาพประกอบ 16 ตำแหน่งเป้าหมายของไพรเมอร์ LAMP และ DNA probe ที่จำเพาะต่อยีน *28S rDNA* ของ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus*

(ตัวอักษรสี: ตำแหน่งที่ไพรเมอร์และ DNA probe เข้าจับ; ตัวอักษรสีแดง: ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ตรงกับไพรเมอร์และ DNA probe)

ตาราง 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์และความยาวของไพรเมอร์ LAMP และ DNA probe ที่จำเพาะต่อ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus*

ไพรเมอร์/DNA probe	**ลำดับนิวคลีโอไทด์** (5'-3')	**ขนาด** (bp)
F3-RAI	TCGGTTGCGGCTTTTGCTAC	20
B3-RAI	GACGTGCGTGCCAGATACCAT	21
FIP-RAIBi (F1c-TTTT-F2)	Biotin-AGACTGGCAATACCACCGGTCGT-TTTT-GGCCGTCTGGTCAGTGCAC	46
BIP-RAI (B1c-TTTT-B2)	CTGTTGCGTGTTATCGTGCATCCACC-TTTT-CCTTGCACAGTCACTTTCACCACC	54
Probe-RAI	FITC-GATCGCAGATGGGAGG	16

5.1 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของวิธี LAMP โดยหาอุณหภูมิ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา และปริมาณสารเคมีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ $MgSO_4$, dNTPs, betaine และไพรเมอร์

5.2 ทดสอบความจำเพาะของวิธี LAMP โดยทำปฏิกิริยาร่วมกับหนอนพยาธิชนิดอื่น ๆ ที่แสดงในตาราง 6 และเนื้อเยื่อของโฮสต์เฉพาะได้แก่ ไก่ และเป็ด โดยตัวควบคุมเชิงลบไม่เติม DNA ด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 เพื่อทดสอบว่าไพรเมอร์ LAMP ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสิ่งมีชีวิตอื่น

5.3 ทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์ ดำเนินการตามข้อที่ 4.3

5.4 ทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับสารพันธุกรรมแบบผสม สำหรับกรณีที่มีการติดเชื้อร่วม (co-infection) ระหว่างพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด

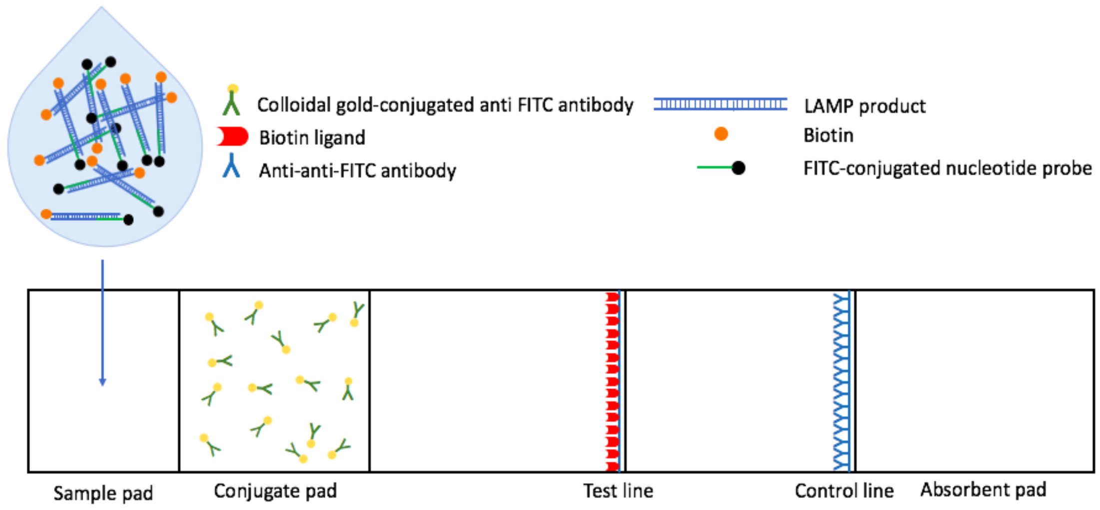
6. **การพัฒนาวิธี LAMP-LFD ที่จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina***

การพัฒนาวิธี LAMP-LFD เริ่มจากทำปฏิกิริยา LAMP จาก DNA ต้นแบบของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาต่ำที่สุดเพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นของ *Raillietina* ได้ทั้ง 3 ชนิด เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำผลิตภัณฑ์ LAMP ไปบ่มร่วมกับ DNA probe จากนั้นนำสารละลายผสมกับ assay buffer จากนั้นนำแผ่น dipstick มาจุ่ม รอดูการตกตะกอนบนเส้น test line และ control line ประมาณ 5 นาที (ภาพประกอบ 17)

6.1 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการบ่ม DNA probe โดยหาความเข้มข้นของ DNA probe (2, 20 และ 200 pmol) และระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสม (5, 10, 15 และ 20 นาที)

6.2 ทดสอบความจำเพาะของ DNA probe เพื่อยืนยันผลิตภัณฑ์ LAMP เป้าหมาย โดยนำผลิตภัณฑ์จากการทำ LAMP ของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด มาบ่มกับ DNA probe ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 6.1

6.3 ทดสอบความสามารถของ DNA probe ในการ hybridize ผลิตภัณฑ์ LAMP ที่เกิดจาก DNA ต้นแบบที่แตกต่างกัน สำหรับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP ในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด

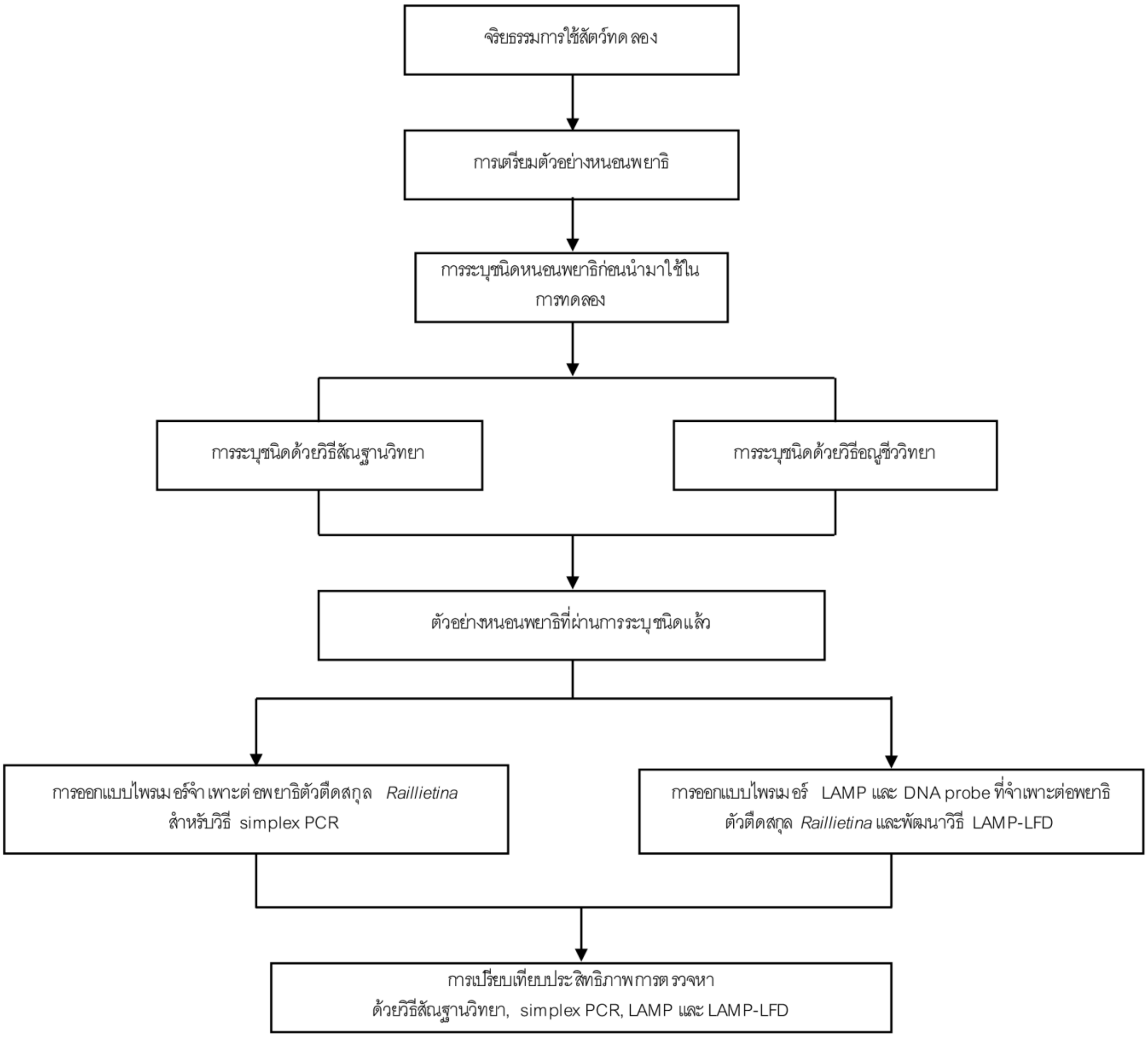


ภาพประกอบ 17 ส่วนประกอบ lateral flow dipstick

7. **การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาด้วยวิธีสัณฐานวิทยา**, simplex PCR, LAMP และ LAMP-LFD

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* โดยสุ่มเก็บตัวอย่างพยาธิตัวตืดระยะตัวเต็มวัย 9 ตัวอย่างจากทางเดินอาหารของไก่ และเป็ด แล้วระบุชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาจากการทำสไลด์ถาวร จากนั้นนำปล้องสุกหนึ่งปล้องของพยาธิแต่ละตัวไปสกัด DNA ด้วยชุดสกัด GF-1 tissue DNA extraction แล้วนำไปตรวจหาด้วยวิธี simplex PCR, LAMP และ LAMP-LFD เพื่อยืนยันความถูกต้องในการตรวจหาของแต่ละวิธี โดยตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) คือ DNA พยาธิตัวตืดที่ผ่านการระบุชนิดมาแล้วก่อนหน้านี้

แผนผังแสดงวิธีการดำเนินการทดลองโดยภาพรวม



ภาพประกอบ 18 แผนผังแสดงวิธีการดำเนินการทดลอง

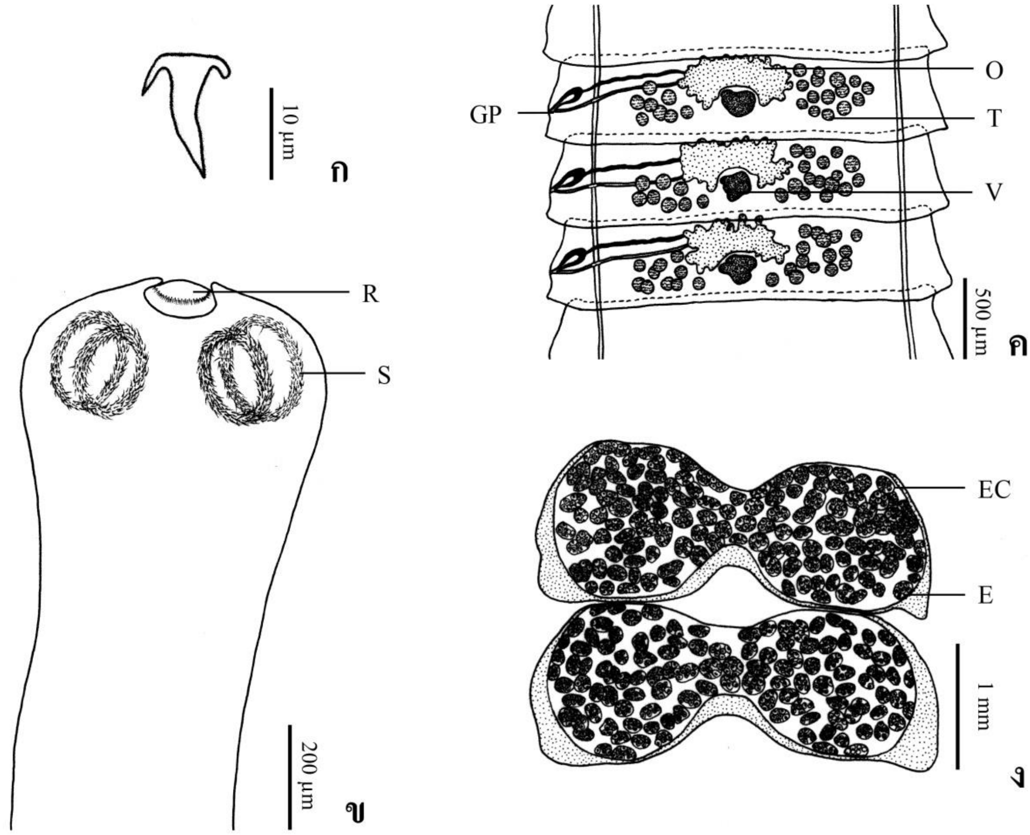
บทที่ 4
ผลการดำเนินงานวิจัย

การระบุชนิดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

1. การระบุชนิดด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถระบุชนิดพยาธิตัวตืดในสกุล *Raillietina* ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาที่สำคัญในการแยก 3 ชนิดนี้ คือ จำนวนชั้นของ rostellar hook, หนามบริเวณ sucker, รูปแบบการเปิดของ genital pore และจำนวนไข่ต่อหนึ่งแคปซูลไข่ นอกจากนี้ยังมีอีกหลายลักษณะที่แตกต่างกันดังตาราง 8

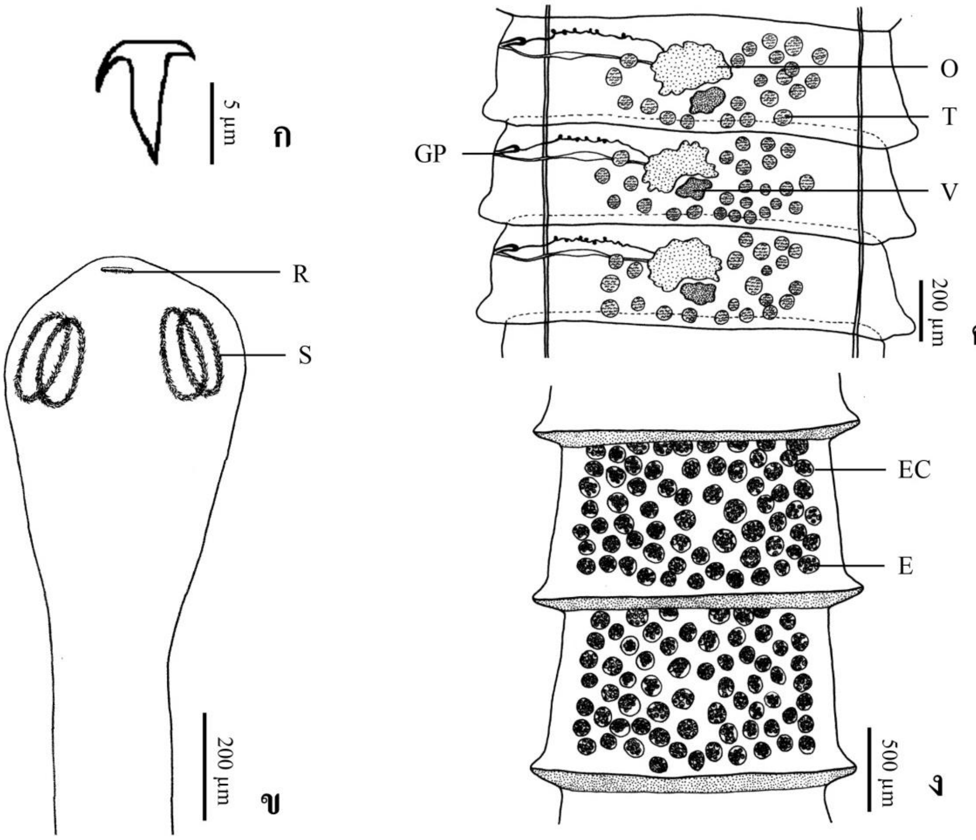
(1) *R. echinobothrida* จัดอยู่ในสกุลย่อย *Raillietina* มี scolex ลักษณะค่อนข้างกลมมีความกว้าง 531-606 (565±32) ไมโครเมตร และความยาว 435-737 (594±128) ไมโครเมตร ส่วนของ rostellum ประกอบด้วย rostellar hook รูปค้อนเรียงตัวสองแถว โดยมีความยาว 10-13 (11±1) ไมโครเมตร sucker ลักษณะกลม และมีหนามขนาดเล็กอยู่จำนวนมาก genital pore เปิดแบบ unilateral โดยตำแหน่งการเปิดอยู่ห่างจากด้านหน้าของปล้อง (anterior) เป็นระยะ 211.11-377.33 (293.06±43.06) ไมโครเมตร รังไข่เป็น lobe วางตัวอยู่กึ่งกลางปล้อง และมีอัณฑะกระจายตัวอยู่รอบ ๆ ปล้องสุกประกอบด้วยแคปซูลไข่จำนวนมาก โดยแต่ละแคปซูลไข่จะบรรจุไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ 5-11 ฟอง นอกจากนี้มีลักษณะเด่นที่พบเฉพาะชนิดนี้คือบริเวณตรงกลางระหว่างปล้องสุกจะเกิดการแยกออกจากกันเป็นรูตรงกลาง (ภาพประกอบ 19)



ภาพประกอบ 19 สัณฐานวิทยาของ *R. echinobothrida*

(ก: rostellar hook ลักษณะรูปค้อน; ข: scolex ที่มี rostellum (R) และ sucker ที่มีหนาม (S); ค: ปล้องแก่ที่มีอัณฑะ (T) กระจายตัวล้อมรอบรังไข่ (O) และ vitellaria (V) บริเวณกลางปล้อง และการเปิดของ genital pore (GP) แบบ unilateral; ง: ปล้องสุกที่ประกอบด้วยแคปซูลไข่ (EC) ซึ่งบรรจุไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิอยู่ภายใน (E))

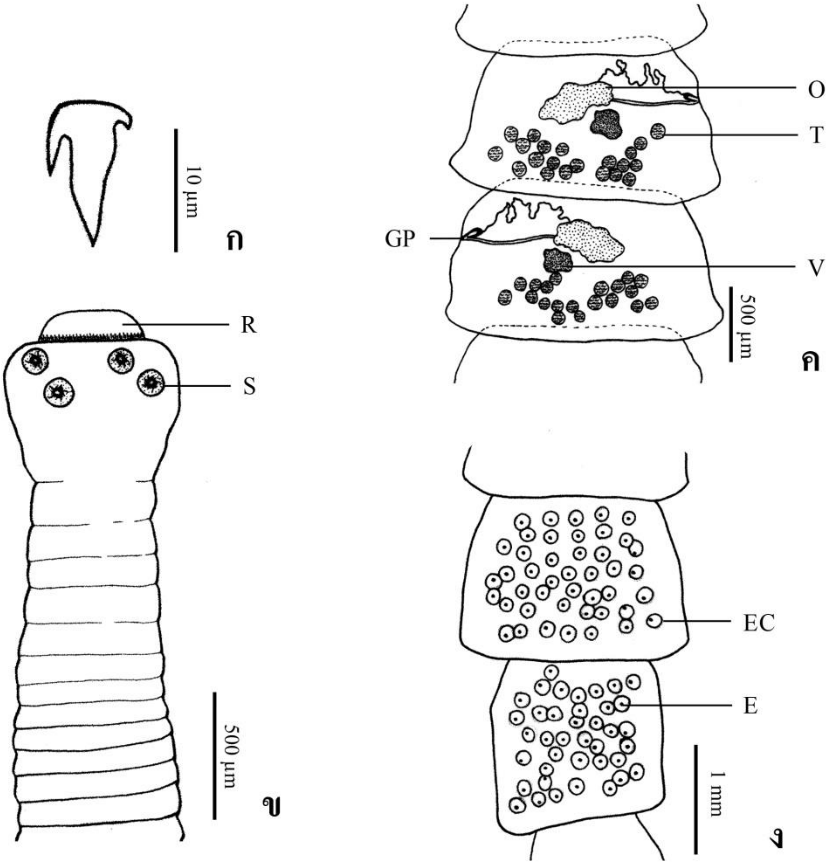
(2) *R. tetragona* จัดอยู่ในสกุลย่อย *Raillietina* มี scolex ลักษณะเป็นรูปไข่หรือวงรีมีความกว้าง 404-455 (429±20) ไมโครเมตร และมีความยาว 541-796 (705±99) ไมโครเมตร ส่วน rostellum ประกอบด้วย rostellar hook รูปค้อนเรียงตัวหนึ่งแถวขนาดเล็กกว่าหนามของ *R. echinobothrida* โดยมีความยาว 4-8 (6±1) ไมโครเมตร sucker ลักษณะเป็นวงรีประกอบด้วยหนามจำนวนมาก ตำแหน่งการวางตัวและลักษณะของรังไข่คล้ายกับ *R. echinobothrida* แต่แตกต่างกันที่ระยะห่างจาก genital pore กับด้านหน้าของปล้อง 81-254 (113±35) ไมโครเมตร แคปซูลไข่แต่ละอันประกอบด้วยไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ 8-9 ฟอง (ภาพประกอบ 20)



ภาพประกอบ 20 สัณฐานวิทยาของ *R. tetragona*

(ก: rostellar hook ลักษณะรูปค้อน; ข: scolex ที่มี rostellum (R) และ sucker ที่มีหนาม (S); ค: ปล้องแก่ที่มีอัณฑะ (T) กระจายตัวล้อมรอบรังไข่ (O) และ vitellaria (V) บริเวณกลางปล้อง และการเปิดของ genital pore (GP) แบบ unilateral; ง: ปล้องสุกที่ประกอบด้วยแคปซูลไข่ (EC) ซึ่งบรรจุไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิอยู่ภายใน (E))

(3) *R. cesticillus* จัดอยู่ในสกุลย่อย *Skrjabinia* มี scolex ประกอบด้วย rostellum ที่มีขนาดใหญ่และกว้าง สามารถยืดหดได้ และมี rostellar hook รูปค้อนเรียงตัวสองแถวอยู่ที่ฐานของ rostellum ไม่สามารถแยก neck ออกจาก scolex ได้ รังไข่อยู่ตำแหน่งกึ่งกลางปล้องและมีอัณฑะกระจายตัวอยู่ด้านหลังของปล้อง (posterior) จำนวน 17-23 อัน genital pore เปิดแบบ alternating irregular unilateral และตำแหน่งการเปิดห่างจากด้านหน้าของปล้อง 193-313 (251±35) ไมโครเมตร แคปซูลไข่แต่ละอันบรรจุไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ 1 ฟองเท่านั้น และสามารถเห็นช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นในได้ชัดเจน (ภาพประกอบ 21)



ภาพประกอบ 21 สัณฐานวิทยาของ *R. cesticillus*

(ก: rostellar hook ลักษณะรูปค้อน; ข: scolex ที่มี rostellum (R) ที่ประกอบด้วยหนามและ sucker ที่ไม่มีหนาม (S); ค: ปล้องแก่ที่มีอัณฑะ (T) กระจายตัวด้าน posterior ของปล้องและรังไข่ (O) กับ vitellaria (V) ที่อยู่บริเวณกลางปล้อง รวมถึงการเปิดของ genital pore (GP) แบบ alternating irregular unilateral; ง: ปล้องสุกที่ประกอบด้วยแคปซูลไข่ (EC) ซึ่งบรรจุไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิอยู่ภายใน (E))

ตาราง 8 เปรียบเทียบสัณฐานวิทยาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ที่พบในการศึกษา

ลักษณะ	ชนิดหนอนพยาธิ		
	R. echinobothrida (n=6)	*R. tetragona* (n=5)	*R. cesticillus* (n=4)
ความกว้าง scolex	530.97-606.16 (564.95±31.66)	404.34-455.14 (428.86±20.55)	555.91-722.43 (623.36±76.73)
ความยาว scolex	435.12-736.99 (594.14±128.05)	541.43-795.73 (705.27±98.96)	458.74-762.74 (597.03±127.54)
ความกว้าง sucker	136.21-277.46 (178.16±45.58)	81.22-101.17 (91.20±5.51)	104.87-135.67 (117.75±9.25)
ความยาว sucker	167.07-381.71 (229.01±70.17)	163.52-198.66 (180.12±8.45)	101.2-119.55 (112.22±5.49)
ความยาว rostellar hook	10.26-12.56 (11.45±0.72)	3.88-7.62 (6.08±1.01)	9.50-11.94 (10.60±0.68)
ความกว้างปล้องอ่อน	966.11-2087.14 (1451.56±341.81)	307.01-656.29 (457.82±97.47)	735.87-1240.25 (985.07±171.05)
ความยาวปล้องอ่อน	194.47-414.18 (292.52±62.52)	111.96-222.61 (156.34±33.28)	204.75-336.43 (274.08±44.02)
ความกว้างปล้องแก่	2121.32-3055.34 (2734.35±201.36)	1137.32-1785.49 (1497.60±172.76)	770.49-1858.27 (1501.43±320.61)
ความยาวปล้องแก่	401.22-577.11(486.60±46.07)	254.52-610.89 (399.48±73.60)	338.44-960.66 (593.85±136.10)
ความกว้างรังไข่	384.56-840.89 (724.21±86.98)	128.84-362.72 (248.49±66.33)	170.71-511.60 (322.04±123.71)
ความยาวรังไข่	231.70-481.27 (355.88±56.58)	135.35-292.56 (191.29±48.80)	141.14-306.12 (208.22±43.64)
ความกว้างปล้องสุก	2804.76-4385.78 (3647.31±511.99)	1601.86-2022.75 (1861.57±135.78)	1276.49-2591.64 (2149.71±380.26)

ตาราง 8 (ต่อ)

ลักษณะ	ชนิดหนอนพยาธิ		
	R. echinobothrida (*n*=6)	*R. tetragona* (*n*=5)	*R. cesticillus* (*n*=4)
ความยาวปล้องสุก	522.27-1317.79 (886.64±224.38)	593.09-1417.14 (856.95±206.06)	859.22-2698.79 (1352.76±509.11)
เส้นผ่านศูนย์กลางแคปซูลไข่	129.06-240.50 (166.94±30.82)	102.97-172.60 (150.37±25.06)	90.09-143.89 (115.59±21.14)
รูปร่าง scolex	วงกลม	วงรี	วงกลม
จำนวนแถว rostellar hook	2	1	2
รูปร่าง sucker	วงกลม (มีหนาม)	วงรี (มีหนาม)	วงกลม (ไม่มีหนาม)
การเปิด genital pore	เปิดด้านใดด้านหนึ่งเหมือนกันทุกปล้อง	เปิดด้านใดด้านหนึ่งเหมือนกันทุกปล้อง	เปิดด้านใดด้านหนึ่งไม่เป็นแบบแผน

* ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน), ** หน่วยไมโครเมตร

2. การระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีววิทยา

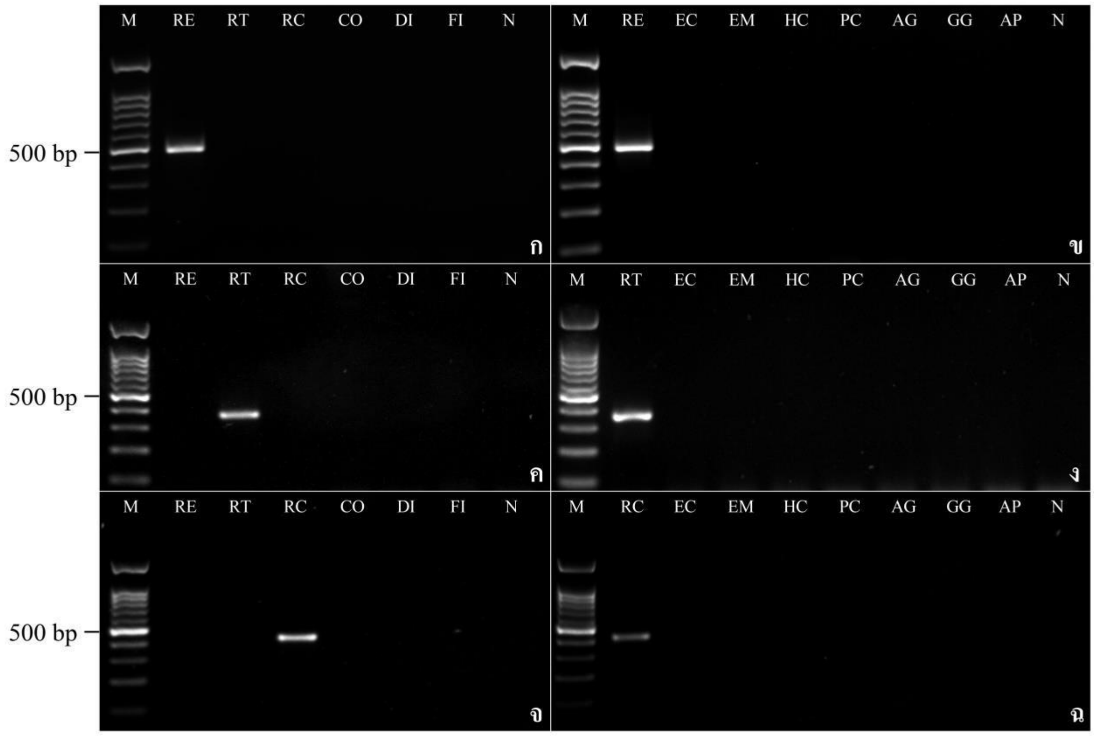
การระบุชนิดเชิงโมเลกุลของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ ITS2 ด้วยไพรเมอร์ ITS3 และ ITS4 แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิดที่พบมีค่าความเหมือนกับพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในฐานข้อมูลถึงร้อยละ 100 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาที่กล่าวมาข้างต้น

การตรวจสอบความเที่ยงตรงของไพรเมอร์สำหรับวิธี simplex PCR

1. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ถูกทดสอบร่วมกับ DNA จากหนอนพยาธิชนิดอื่น ๆ ดังตาราง 6 และโฮสต์เฉพาะ ได้แก่ ไก่ และเป็ด ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* แต่ละชนิด สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้อย่างจำเพาะ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามในสภาวะการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม (ตาราง 9) ซึ่งมีขนาดของผลิตภัณฑ์

เป้าหมายสำหรับไพรเมอร์จำเพาะของ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* ประมาณ 473, 352 และ 397 bp ตามลำดับ (ภาพประกอบ 22) นอกจากนี้เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลิตภัณฑ์เป้าหมาย จึงทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์เป้าหมายทั้งหมด แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ทั้งหมดมีค่าความเหมือนกับพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* เท่ากับร้อยละ 100



ภาพประกอบ 22 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

(ก-ข: *R. echinobothrida*; ค-ง: *R. tetragona*; จ-ฉ: *R. cesticillus*; lane M: DNA marker 100 bp; lane RE: *R. echinobothrida*; lane RT: *R. tetragona*; lane RC: *R. cesticillus*; lane CO: *Cotugnia* sp.; lane DI: *Diorchis* sp.; lane FI: *Fimbriaria* sp.; lane EC: *Echinostoma* sp.; lane EM: *E. miyagawai*; lane HC: *H. conoideum*; lane PC: *P. cuneatus*; lane AG: *A. galli*; lane GG: *G. g. domesticus*; lane AP: *A. p. domesticus*; lane N: negative control)

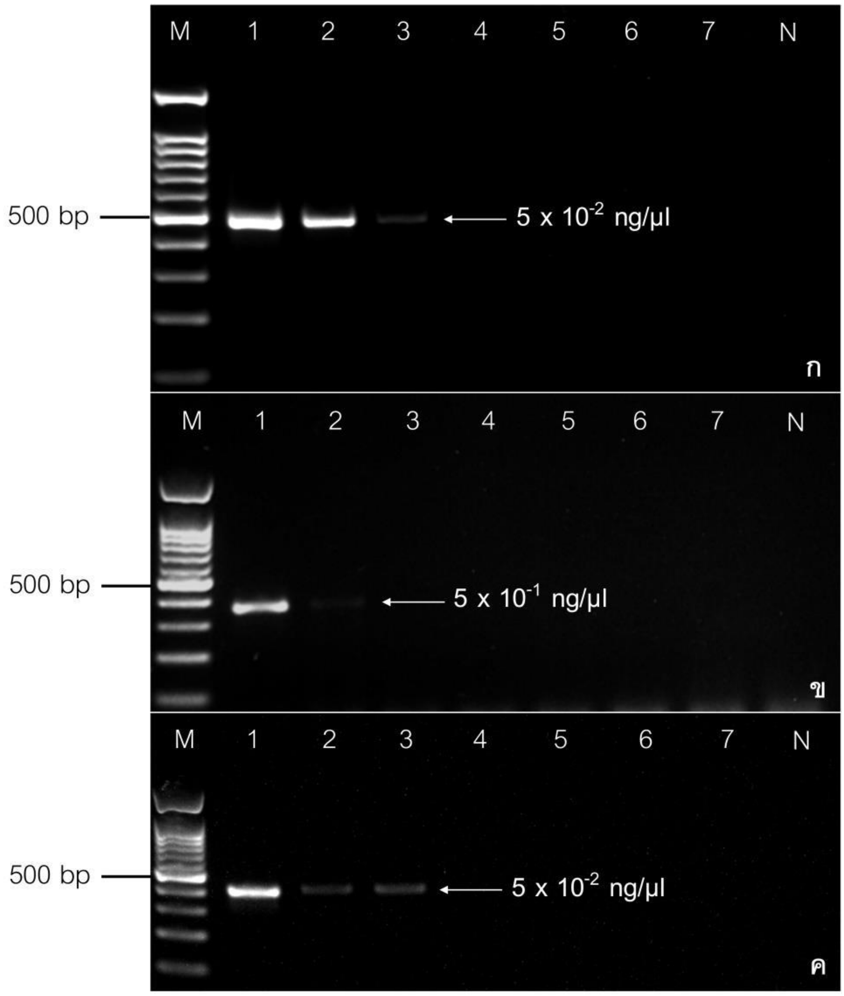
ตาราง 9 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* แต่ละชนิด

ชนิดหนอนพยาธิ	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (5'-3')**		T_a (ºC)	**ความเข้มข้นสุดท้าย**		**ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)**
	Forward primer	Reverse primer		$MgCl_2$ (mM)	Each primer (µM)	
R. echinobothrida	R.echiF: TTCTTCACCCTCTTAGCCCTTCTA	R.echiR: TCCCACCAAACTCCTGCTG	58.0	0.50	0.20	473
R. tetragona	R.tetF: CGTTGTGTGTTG TGTGTGTA	R.tetR: ACCCACAGTACCCACAG	60.0	1.00	0.12	352
R. cesticillus	R.cesF: GGATTAACTGTCTATGGCTGGTT	R.cesR: CTCACGCACACACATCG	60.0	0.50	0.16	397

*ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเคมีอื่น ๆ เท่ากัน ได้แก่ 0.1 mM แต่ละ dNTPs, 1.5 unit ของ *Taq* polymerase, 1X PCR buffer และ 1 ไมโครลิตร ของ DNA

2. การทดสอบความไวของไพรเมอร์

การทดสอบความไวในการเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์โดยเริ่มทดสอบที่ปริมาณ DNA ตั้งต้น 5 ng จากนั้นเจือจางต่อไปครั้งละ 10 เท่า (5–5 x 10^{-6} ng/μl) จนไม่สามารถตรวจสอบผลได้ ผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของ DNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาได้ของไพรเมอร์จำเพาะต่อ *R. echinobothrida* และ *R. cesticillus* เท่ากับ 5 x 10^{-2} ng/μl (50 pg/μl) และไพรเมอร์จำเพาะต่อ *R. tetragona* เท่ากับ 0.5 ng/μl (500 pg/μl) (ภาพประกอบ 23)



ภาพประกอบ 23 การทดสอบความไวในการเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์

(ก: *R. echinobothrida*; ข: *R. tetragona*; ค: *R. cesticillus*; lane M: DNA marker 100 bp; lane 1: 5 ng/μl; lane 2: x 10^{-1} ng/μl; lane 3: 5 x 10^{-2} ng/μl; lane 4: 5 x 10^{-3} ng/μl; lane 5: 5 x 10^{-4} ng/μl; lane 6: 5 x 10^{-5} ng/μl; lane 7: 5 x 10^{-6} ng/μl; lane N: negative control)

การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP

1. การทดสอบอุณหภูมิ ระยะเวลา และความเข้มข้นสารที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP

จากการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ LAMP ที่จำเพาะต่อยีน *28S rDNA* ของพยาธิตัวตืดในสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด พบว่าความเข้มข้นสารเคมีที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ ไพรเมอร์แสดงดังตาราง 10 และผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP คือ 66 °C เนื่องจากที่อุณหภูมิดังกล่าวสามารถเห็นผลิตภัณฑ์รูปแบบ ladder ชัดเจนและทำให้ไพรเมอร์มีความจำเพาะสูงสุด ในส่วนของระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา LAMP พบว่าเริ่มตรวจสอบผลของปฏิกิริยาได้ตั้งแต่ 45 นาทีขึ้นไป แต่ระยะเวลาที่สามารถสังเกตผลิตภัณฑ์ได้ชัดเจนคือ 60 นาที ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงใช้อุณหภูมิ 66 °C เป็นเวลา 60 นาที สำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP

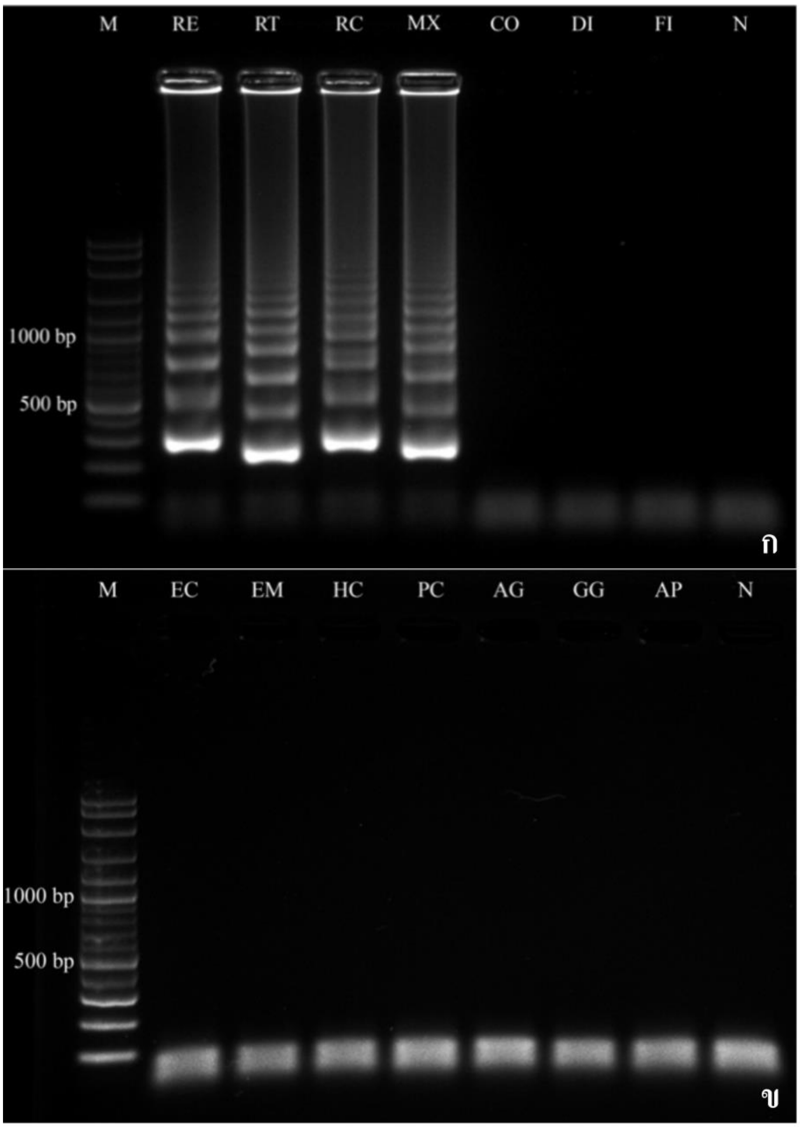
ตาราง 10 ความเข้มข้นสารเคมีที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา LAMP

สารเคมี	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
10X isothermal amplification buffer	1X
$MgSO_4$ (100mM)	2.4 mM
F3 (5mM)	0.2 mM
B3 (5mM)	0.2 mM
FIP (10mM)	1.6 mM
BIP (10mM)	1.6 mM
dNTPs (10mM)	1.4 mM
Betaine (5M)	1 M
Bst 2.0 DNA polymerase (8,000 U/ml)	8 U
Nuclease-free water	เติมจนถึงปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร
DNA template (5 ng/µl)	1 ไมโครลิตร

2. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

ความจำเพาะไพรเมอร์ LAMP ถูกทดสอบร่วมกับหนอนพยาธิชนิดต่าง ๆ และโฮสต์เฉพาะ โดยใช้ความเข้มข้นสารเคมีจากตาราง 10 ที่อุณหภูมิ 66 °C เป็นระยะเวลา 60 นาที ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ LAMP สามารถเกิดปฏิกิริยากับ DNA ต้นแบบของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิดได้เท่านั้น โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับหนอนพยาธิชนิดอื่นและโฮสต์ ดังนั้น

สามารถสรุปได้ว่าไพรเมอร์ LAMP มีความจำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด (ภาพประกอบ 24)

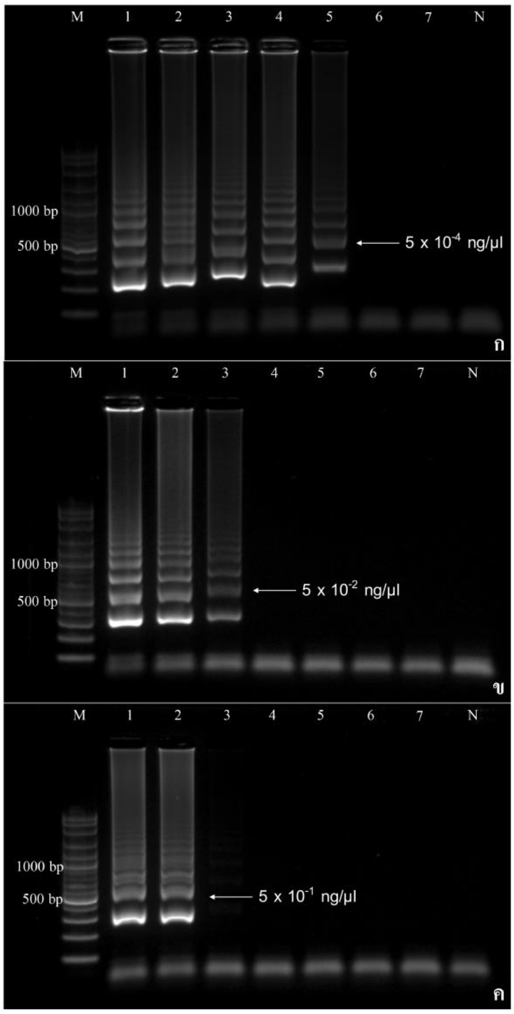


ภาพประกอบ 24 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ LAMP ที่จำเพาะต่อ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus*

(lane M: DNA marker 100 bp; lane RE: *R. echinobothrida*; lane RT: *R. tetragona*; lane RC: *R. cesticillus*; lane MX: *R. echinobothrida* + *R. tetragona* + *R. cesticillus*; CO: *Cotugnia* sp.; lane DI: *Diorchis* sp.; lane FI: *Fimbriaria* sp.; lane EC: *Echinostoma* sp.; lane EM: *E. miyagawai*; lane HC: *H. conoideum*; lane PC: *P. cuneatus*; lane AG: *A. galli*; lane GG: *G. g. domesticus*; lane AP: *A. p. domesticus*; lane N: negative control)

3. การทดสอบความไวของไพรเมอร์

การทดสอบความไวของไพรเมอร์ LAMP โดยใช้ความเข้มข้น DNA ตั้งต้นที่ 5 ng แล้วเจือจางต่อไปครั้งละ 10 เท่า (5–5 x 10^{-6} ng/µl) จนไม่สามารถตรวจสอบผลได้ ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ LAMP มีความไวต่อ *R. tetragona* สูงสุดเท่ากับ 5 x 10^{-4} ng/µl (0.5 pg/µl) และ *R. echinobothrida* กับ *R. cesticillus* รองลงมาที่ 5 x 10^{-2} ng/µl (50 pg/µl) และ 5 x 10^{-1} ng/µl (500 pg/µl) ตามลำดับ (ภาพประกอบ 25) ดังนั้นความไวเฉลี่ยในการตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด เท่ากับ 5 x 10^{-1} ng/µl



ภาพประกอบ 25 การทดสอบความไวในการเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ LAMP

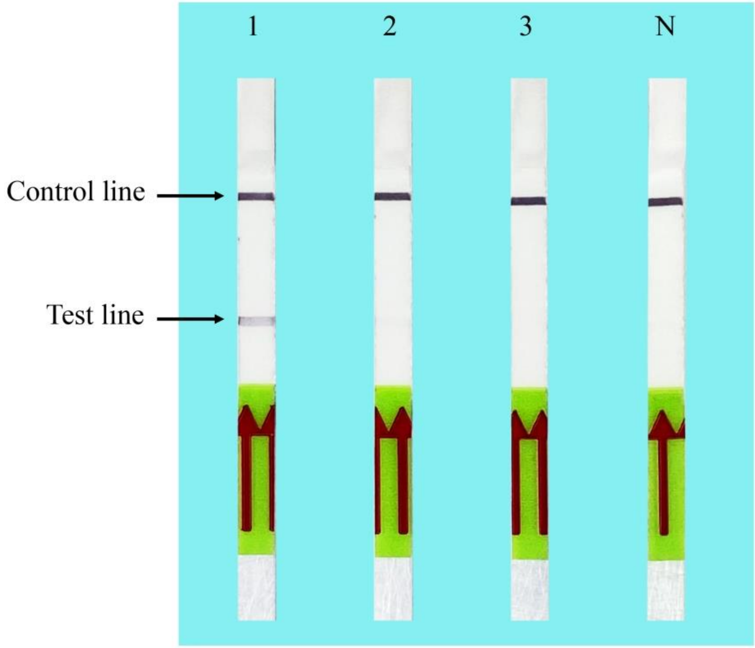
(ก: *R. tetragona*; ข: *R. echinobothrida*; ค: *R. cesticillus*; lane M: DNA marker 100 bp; lane 1: 5 ng/µl; lane 2: x 10^{-1} ng/µl; lane 3: 5 x 10^{-2} ng/µl; lane 4: 5 x 10^{-3} ng/µl; lane 5: 5 x 10^{-4} ng/µl; lane 6: 5 x 10^{-5} ng/µl; lane 7: 5 x 10^{-6} ng/µl lane N: negative control)

การพัฒนาวิธี LAMP-LFD ที่จำเพาะต่อพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina*

การพัฒนาวิธี LAMP-LFD ผู้วิจัยเลือกผลิตภัณฑ์ LAMP ของ *R. cesticillus* ที่ DNA ความเข้มข้น 0.5 ng/μl มาใช้ในขั้นตอนการพัฒนา เนื่องจากเป็นค่าความไวของไพรเมอร์ต่ำที่สุดที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิดได้

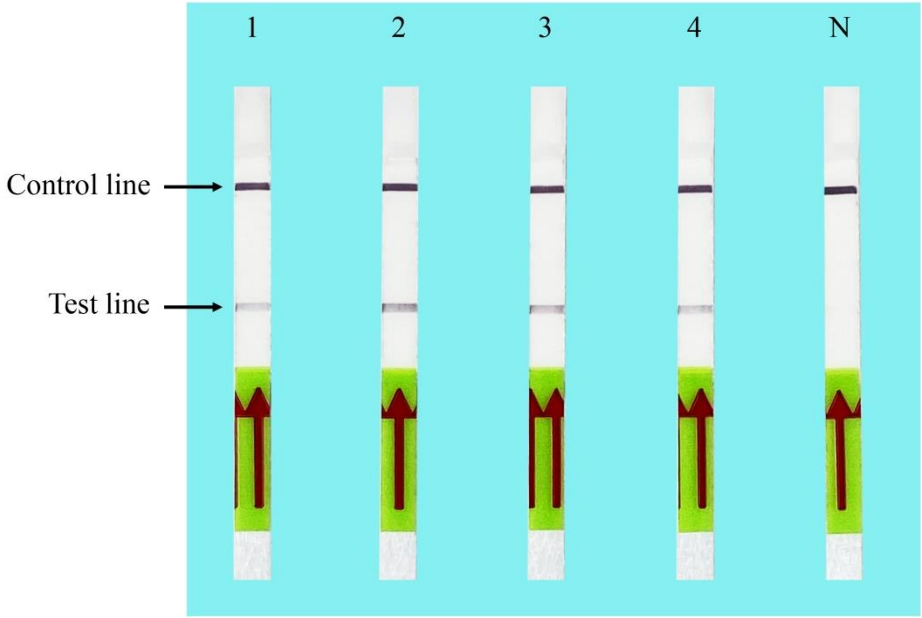
1. การทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA probe ที่ติดฉลากสารเรืองแสง FITC และระยะเวลาในการบ่มสำหรับใช้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP

การทดสอบหาความเข้มข้น DNA probe ที่เหมาะสมดำเนินการโดยนำผลิตภัณฑ์ LAMP มาบ่มร่วมกับ DNA probe ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันได้แก่ 2, 20 และ 200 pmol ที่อุณหภูมิ 66 °C เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายไปใส่ใน microcentrifuge tube ที่มี assay buffer 92 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วจุ่ม dipstick ประมาณ 5 นาที เพื่อสังเกตผล พบว่าความเข้มข้น DNA probe ที่ 2 pmol สามารถสังเกตเห็นแถบสีที่ test line ชัดเจนที่สุด (ภาพประกอบ 26) จากนั้นนำความเข้มข้น DNA probe ที่ 2 pmol ไปทดสอบหาระยะเวลาการบ่มที่ 5, 10, 15 และ 20 นาที พบว่าเวลาต่ำสุดที่เริ่มสังเกตเห็นแถบสีที่ test line เท่ากับ 5 นาที (ภาพประกอบ 27) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้น DNA probe ที่ 2 pmol สำหรับการบ่มที่ 66 °C เป็นระยะเวลา 5 นาที



ภาพประกอบ 26 การทดสอบหาความเข้มข้น DNA probe ที่เหมาะสม
สำหรับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP

(lane 1-3: ความเข้มข้น 2, 20 และ 200 pmol ตามลำดับ; lane N: negative control)

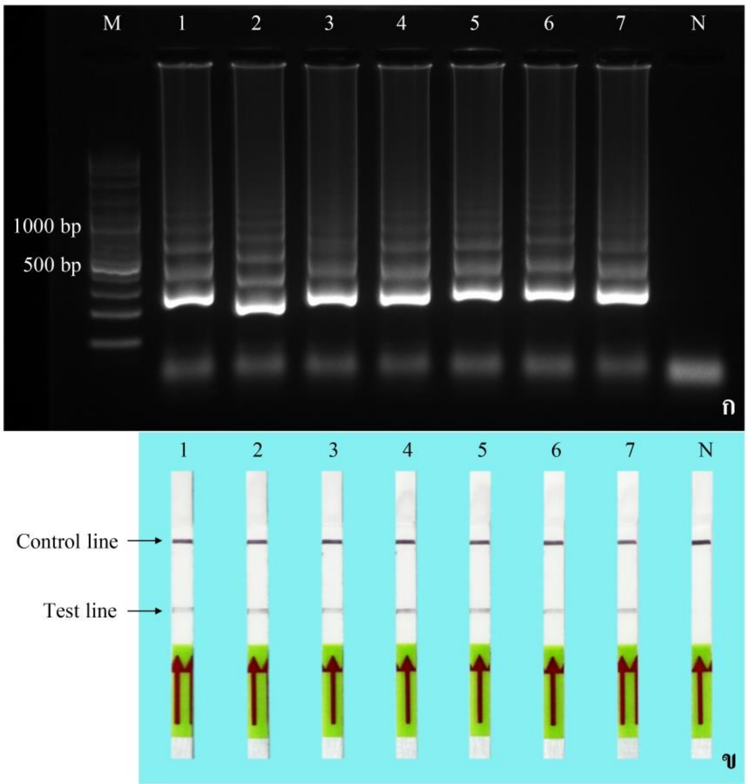


ภาพประกอบ 27 การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม DNA probe ร่วมกับผลิตภัณฑ์ LAMP

(lane 1-4: 5, 10, 15 และ 20 นาที ตามลำดับ; lane N: negative control)

2. การทดสอบกับสารพันธุกรรมแบบผสมด้วยวิธี LAMP-LFD

สำหรับกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด ผู้วิจัยจึงนำ DNA ของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น DNA 0.5 ng มาผสมกันได้ทั้งหมด 4 รูปแบบได้แก่ (1) *R. echinobothrida* + *R. tetragona* (2) *R. echinobothrida* + *R. cesticillus* (3) *R. tetragona* + *R. cesticillus* และ (4) *R. echinobothrida* + *R. tetragona* + *R. cesticillus* จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา LAMP แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิค LFD ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ LAMP สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทั้ง DNA ของพยาธิแต่ละชนิดและ DNA ผสมระหว่างชนิดโดยไม่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาซึ่งกันและกัน แล้วเมื่อนำผลิตภัณฑ์ LAMP ไปบ่มกับ DNA probe พบว่า DNA probe สามารถ hybridize กับผลิตภัณฑ์ LAMP ได้ทั้งหมดโดยไม่เกิดการยับยั้งเช่นกัน (ภาพประกอบ 28)

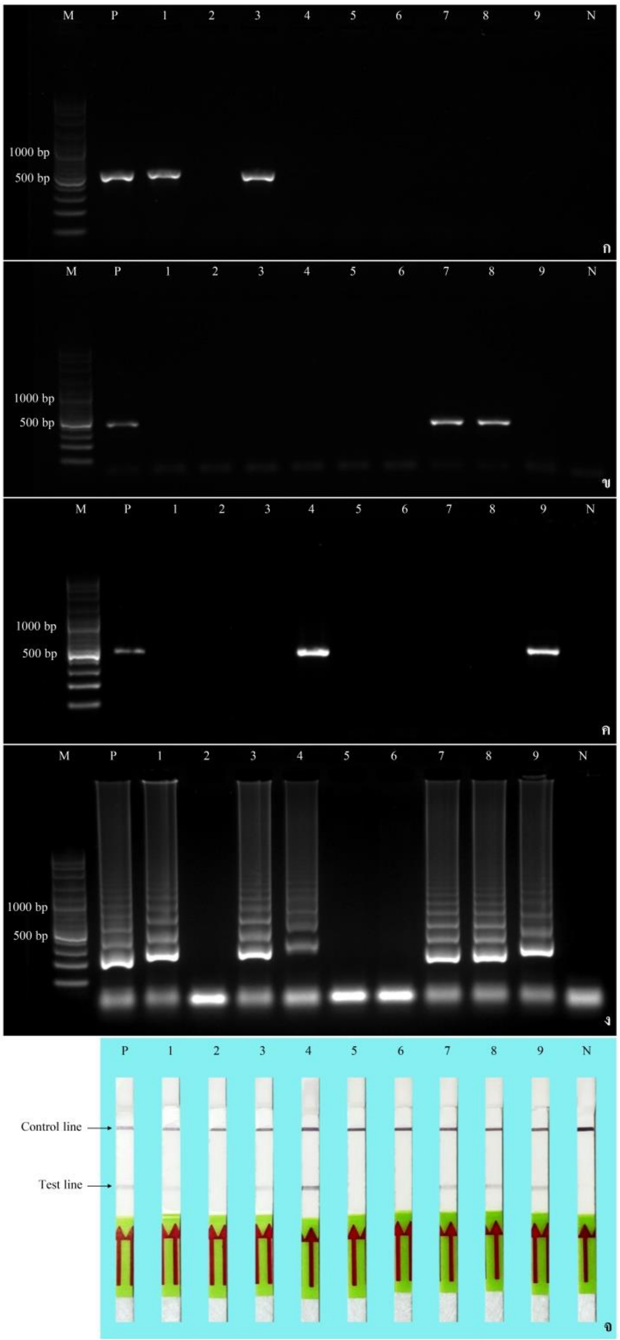


ภาพประกอบ 28 การตรวจหาสารพันธุกรรมแบบผสมของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ด้วยวิธี LAMP และ LAMP-LFD

(ก: วิธี LAMP; ข: วิธี LAMP-LFD; lane M: DNA marker 100 bp; lane 1: *R. echinobothrida*; lane 2: *R. tetragona*; lane 3: *R. cesticillus*; lane 4: *R. echinobothrida* + *R. tetragona*; lane 5: *R. echinobothrida* + *R. cesticillus*; lane 6: *R. tetragona* + *R. cesticillus*; lane 7: *R. echinobothrida* + *R. tetragona* + *R. cesticillus*; lane N: negative control)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาด้วยวิธีสัณฐานวิทยา, simplex PCR, LAMP และ LAMP-LFD

การระบุชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาจากพยาธิตัวตืดระยะตัวเต็มวัยที่พบในลำไส้ไก่และเป็ดรวมกันจำนวน 9 ตัวอย่างพบว่าสามารถระบุเป็นพยาธิตัวตืดในสกุล *Raillietina* ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 3 ชนิดคือ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* อย่างละ 2 ตัวอย่าง เมื่อนำไปตรวจหาด้วยวิธี simplex PCR, LAMP และ LAMP-LFD พบว่าแต่ละวิธีให้ผลการตรวจหาที่สอดคล้องกับผลการระบุชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา (ภาพประกอบ 29 และตาราง 11) ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าการตรวจหาด้วยวิธีอณูชีววิทยาทั้ง 3 วิธีในการศึกษาครั้งนี้มีความถูกต้องและแม่นยำสูงสำหรับการตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีก



ภาพประกอบ 29 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาระหว่างวิธี simplex PCR, LAMP และ LAMP-LFD

(ก: วิธี simplex PCR ที่จำเพาะต่อ *R. echinobothrida*; ข: วิธี simplex PCR ที่จำเพาะต่อ *R. tetragona*; ค: วิธี simplex PCR ที่จำเพาะต่อ *R. cesticillus*; ง: วิธี LAMP; จ: วิธี LAMP-LFD; lane M: DNA marker 100 bp; lane P: positive control; lane 1-9: ตัวอย่างทดสอบ; lane N: negative control)

ตาราง 11 สรุปผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาพยาธิตัวตืดในสัตว์ปีกด้วยวิธีสัณฐานวิทยา, simplex PCR, LAMP และ LAMP-LFD

วิธีการตรวจหา	**ตัวอย่างทดสอบ**								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
วิธีทางสัณฐานวิทยา	*R. echinobothrida*	*Diorchis* sp.	*R. echinobothrida*	*R. cesticillus*	*Cotugnia* sp.	*Fimbriaria* sp.	*R. tetragona*	*R. tetragona*	*R. cesticillus*
วิธี simplex PCR									
ไพรเมอร์จำเพาะ *R. echinobothrida*	+	-	+	-	-	-	-	-	-
ไพรเมอร์จำเพาะ *R. tetragona*	-	-	-	-	-	-	+	+	-
ไพรเมอร์จำเพาะ *R. cesticillus*	-	-	-	+	-	-	-	-	+
วิธี LAMP	+	-	+	+	-	-	+	+	+
วิธี LAMP-LFD	+	-	+	+	-	-	+	+	+

* + : ผลการตรวจหาเป็นบวก, - : ผลการตรวจหาเป็นลบ

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การวิจัยเรื่องการพัฒนาวิธี simplex PCR และ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ควบคู่กับ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีก หลังจากได้ผลการดำเนินงานวิจัยแล้วสามารถสรุปและอภิปรายผลการวิจัยได้ดังนี้

การตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในลำไส้ไก่ (*G. g. domesticus*) และเป็ด (*A. p. domesticus*) พบพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* โดยใช้ลักษณะที่สำคัญในการระบุชนิดคือ ลักษณะ scolex, รูปร่างและจำนวนชั้น rostellar hook, ลักษณะ sucker, รูปแบบการเปิดของ genital pore และจำนวนไข่ที่บรรจุในแต่ละแคปซูลไข่ ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับรายงานของ Butboonchoo และคณะ (2016), McDougald (2020), Sawada (1964), Sawada (1965) และ Yamaguti (1959) จากนั้นจึงนำพยาธิทั้ง 3 ชนิดไปยืนยันชนิดโดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *18S rDNA* และ/หรือ บริเวณ ITS2 แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank สำหรับยืนยันผลจากลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า พยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด มีค่าความเหมือนกับพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ที่มีรายงานในฐานข้อมูลถึงร้อยละ 100 ซึ่งสอดคล้องกับผลการระบุชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยา

การตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* แต่ละชนิดด้วยวิธี simplex PCR โดยออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ ITS2 ได้ไพรเมอร์จำเพาะทั้งหมด 3 คู่ คือ (1) ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *R. echinobothrida* (R.echiF: 5’-TTCTTCACCCTCTTAGCCCTTCTA-3’, R.echiR: 5’-TCCCACCAAACTCCTGCTG-3’) (2) ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *R. tetragona* (R.tetF: 5’-CGTTGTGTGTTGTGTGTGTA-3’, R.tetR: 5’-ACCCACAGTACCCACAG-3’) และ (3) ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *R. cesticillus* (R.cesF: 5’-GGATTAACTGTCTATGGCTGGTT-3’, R.cesR: 5’-CTCACGCACACACATCG-3’) ซึ่งไพรเมอร์แต่ละคู่มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกันตามที่แสดงในตาราง 9 และมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 0.05 ng/µl, 0.5 ng/µl และ 0.05 ng/µl ตามลำดับ โดยมีขนาดเป้าหมายผลิตภัณฑ์ของ *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* เท่ากับ 473 bp, 352 bp และ 397 bp ตามลำดับ ดังนั้นการตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ด้วยวิธี simplex PCR จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถตรวจหา *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ

หนอนพยาธิชนิดอื่น ๆ ที่มีการติดร่วม รวมถึงโฮสต์เฉพาะ นอกจากนี้ยังเป็นงานวิจัยแรกที่ออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด

การพัฒนาวิธีตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ด้วยวิธี LAMP โดยออกแบบไพรเมอร์ด้วยวิธี manual design จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *28S rDNA* ของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิดคือ *R. echinobothrida* (accession numbers: MT856353, MT856354, MT856355), *R. tetragona* (accession numbers: MT856359, MT856360, MT856361) และ *R. cesticillus* (accession numbers: MT856356, MT856357, MT856358) ได้ไพรเมอร์ 4 เส้น ได้แก่ ไพรเมอร์คู่นอก (F3-RAI: 5’-TCGGTTGCGGCTTTTGCTAC-3’, B3-RAI: 5’-GACGTGCG TGCCAGATACCAT-3’) และไพรเมอร์คู่ใน (FIP-RAIBi: 5’-Biotin-AGACTGGCAATACCACCG GTCGTTTTTGGCCGTCTGGTCAGTGCAC-3’, BIP-RAI: 5’-CTGTTGCGTGTTATCGTGCA TCCACCTTTTCCTTGCACAGTCACTTTCACCACC-3’) โดยไพรเมอร์ทำปฏิกิริยาเหมาะสมที่อุณหภูมิ 66 °C ระยะเวลา 60 นาที โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับหนอนพยาธิที่มีรายงานการติดร่วมกัน และโฮสต์เฉพาะ นอกจากนี้ความไวการเกิดปฏิกิริยาสำหรับตรวจหา *R. echinobothrida*, *R. tetragona* และ *R. cesticillus* ที่ความเข้มข้น DNA ต่ำสุดเท่ากับ 50 pg/µl, 0.5 pg/µl และ 0.5 ng/µl ตามลำดับ ดังนั้นความไวเฉลี่ยที่สามารถตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิดได้เท่ากับ 0.5 ng การศึกษาก่อนหน้านี้มีการประยุกต์ใช้วิธี LAMP ตรวจหาหนอนพยาธิหลายชนิดเช่น Chen และคณะ (2011) ตรวจหา *Angiostrongylus cantonensis* จากยีน *18S rDNA* โดยมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 1 fg/µl และ Feng และคณะ (2017) ใช้วิธีการ LAMP ที่จำเพาะต่อยีนในไมโทคอนเดรียของพยาธิตัวตืดชนิด *Echinococcus granulosus*, *E. shiquicus*, *Taenia crassiceps*, *T. pisiforms* และ *T. hydatigena* โดยมีความไวในการตรวจหาเท่ากับ 10 pg/µl และ *E. multilocularis*, *T. multiceps* เท่ากับ 1 pg/µl เป็นต้น แม้ว่าความไวในการตรวจหาของไพรเมอร์ LAMP ในการศึกษานี้จะต่ำกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ เนื่องจากไพรเมอร์ LAMP ที่ผู้วิจัยออกแบบในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ให้ไพรเมอร์สามารถเข้าทำปฏิกิริยา และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของพยาธิตัวตืดทั้ง 3 ชนิดได้ ดังนั้นในกระบวนการออกแบบไพรเมอร์บางเส้น จึงไม่เป็นไปตามหลักการออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสม เช่น ค่า GC content, ค่า self-dimer และค่า hetero-dimer มากหรือต่ำกว่าค่าที่เหมาะสม รวมไปถึงการที่มีนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งในไพรเมอร์ไม่สามารถจับกับบริเวณเป้าหมายได้ นอกจากนี้ Notomi และคณะ (2000) ได้กล่าวไว้ว่าความไวของปฏิกิริยา LAMP ขึ้นอยู่กับขนาดของผลิตภัณฑ์เป้าหมายรูปร่าง dumbbell โดยขนาดของ ผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมควรมีความยาวอยู่ระหว่าง 130-200 bp แต่ขนาดของผลิตภัณฑ์ของ

พยาธิตัวตืดทั้ง 3 ชนิดในการศึกษานี้มีความยาวมากกว่า 200 bp ด้วยเหตุผลนี้จึงอาจส่งผลให้ค่าความไวของไพรเมอร์ในการศึกษานี้น้อยกว่าการศึกษาอื่น ๆ แต่ไพรเมอร์ของการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจหาได้ครอบคลุมพยาธิตัวตืดทั้ง 3 ชนิดในปฏิกิริยาเดียวกัน ซึ่งช่วยลดขั้นตอนการออกแบบ ระยะเวลา และประหยัดงบประมาณการสังเคราะห์ไพรเมอร์ สำหรับการตรวจหาทีละชนิด ดังนั้นการตรวจหาด้วยวิธี LAMP ของการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับตรวจหาการติดพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิดใน ไก่ และเป็ดอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค LFD เพื่อลดระยะเวลาและขั้นตอนในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยออกแบบให้ไพรเมอร์ FIP-RAIBi ติดฉลากด้วย biotin ไว้ด้าน 5’ และ DNA probe ถูกออกแบบให้จำเพาะต่อผลิตภัณฑ์ LAMP ของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* เท่านั้น (Probe-RAI: 5’-FITC-GATCGCAGATG GGAGG) ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง fluorescein isothiocyanate (FITC) ด้าน 5’ เช่นกัน จากนั้นทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมและระยะเวลาในการบ่ม DNA probe พบว่าความเข้มข้น DNA probe ที่เหมาะสมเท่ากับ 2 pmol ด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 66 °C เป็นระยะเวลา 5 นาที สามารถเห็นการปรากฏแถบสีที่เส้น test line ได้ชัดเจนและรวดเร็วที่สุด ซึ่งการใช้ความเข้มข้น DNA probe ที่ 20 และ 200 pmol จะไม่ปรากฏแถบสีบนเส้น test line เนื่องจาก DNA probe ที่มี FITC ติดอยู่จะเกิดการแย่งจับกับ colloidal gold-conjugated anti FITC antibody ที่บริเวณ conjugate pad ของแผ่น LFD ทำให้ผลิตภัณฑ์ LAMP จับกับ colloidal gold-conjugated anti FITC antibody ได้น้อย เมื่อผลิตภัณฑ์ LAMP เคลื่อนที่ไปจับกับ biotin ligand ที่ test line จึงไม่ปรากฏแถบสีจาก colloidal gold ในทางกลับกันหากความเข้มข้น DNA probe น้อยเกินไป ผลิตภัณฑ์ LAMP บางส่วนก็จะไม่มี DNA probe จับอยู่ ทำให้เมื่อไปจับกับ biotin ligand บนเส้น test line ก็จะไม่เกิดสีขึ้น (Kiatpathomchai, Jaroenram, Arunrut, Jitrapakdee, & Flegel, 2008) การตรวจสอบด้วยเทคนิค LFD เป็นการตรวจสอบผลที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว สามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบผลได้อย่างน้อย 30 นาที รวมถึงไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์การทำ gel electrophoresis และเครื่องฉายแสงสีน้ำเงิน (LED transilluminator) ส่งผลให้วิธี LAMP-LFD ได้รับความนิยมในการตรวจหาปรสิตหลายชนิดเช่น *Meloidogyne* spp., *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *Toxoplasma gondii* และ *Paragonimus westermani* (Kongkasuriyachai, Yongkiettrakul, Kiatpathomchai, & Arunrut, 2017; Lalle, Possenti, Dubey, & Pozio, 2018; Niu et al., 2011; Xunhui et al., 2019; Yang, Li, Wang, Chen, & Du, 2016)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาด้วยวิธีสัณฐานวิทยา, simplex PCR, LAMP และ LAMP-LFD พบว่าการตรวจหาด้วยวิธีอณูชีววิทยาทั้ง 3 วิธี สามารถระบุพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ได้ตรงกัน และสอดคล้องกับผลจากลักษณะสัณฐานวิทยา โดยทุกวิธีมีค่าร้อยละความถูกต้องเท่ากับ 100 ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 วิธีเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ ความแม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูงสำหรับใช้ในการตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีที่แตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์ของการศึกษาเช่น วิธี simplex PCR เป็นวิธีที่สามารถระบุถึงชนิดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ได้ ซึ่งเหมาะสำหรับการศึกษาเชิงระบาดวิทยาหรือการกระจายตัวของพยาธิที่ต้องการทราบถึงชนิด แต่ก็เป็นวิธีที่มีขั้นตอนยุ่งยากและใช้เวลานาน วิธี LAMP เป็นวิธีที่สามารถตรวจหาพยาธิตัวตืดทั้ง 3 ชนิดได้ในเวลาเดียวกัน โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม สามารถใช้เพียง heat box หรือ water bath ในการตรวจหา ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะกับการตรวจสิ่งส่งตรวจ สำหรับวินิจฉัยการติดเชื้อเพื่อทำการรักษา เนื่องจากพยาธิตัวตืดทั้ง 3 ชนิดก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่คล้ายคลึงกัน จึงใช้ยารักษาชนิดเดียวกันคือ Praziquantel (Dasgupta et al., 2010; El-Bahy & Bazh, 2015; Rajendran & Nadakal, 1988) ทำให้การตรวจหาไม่จำเป็นต้องทราบถึงชนิดพยาธิ แต่พัฒนาให้สามารถตรวจหาครอบคลุมได้ทั้ง 3 ชนิด สำหรับใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจรักษาเท่านั้น และวิธี LAMP-LFD เป็นวิธีการตรวจหาเช่นเดียวกับวิธี LAMP แต่พัฒนาการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค LFD สำหรับทดแทนข้อจำกัดการตรวจสอบผลด้วย gel electrophoresis ที่ต้องทำในห้องปฏิบัติการ เพื่อเพิ่มความสะดวกและรวดเร็ว รวมถึงการนำไปประยุกต์ใช้งานในภาคสนาม

การศึกษาครั้งนี้ได้รายงานลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้ยังเป็นรายงานแรกที่สร้างไพรเมอร์และ DNA probe สำหรับวิธี simplex PCR และ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ควบคู่กับ lateral flow dipstick (LFD) เพื่อใช้ในการตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในสัตว์ปีกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการวินิจฉัยเพื่อวิเคราะห์แนวทางการรักษาสัตว์ที่ติดเชื้อได้อย่างทันท่วงที ตลอดจนเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวัง ป้องกัน และควบคุมพื้นที่ที่มีการระบาดของพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ไม่ให้กระจายเป็นวงกว้างต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การพัฒนาวิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ควบคู่กับ lateral flow dipstick (LFD) สำหรับตรวจหาตรวจหาพยาธิตัวตืดสกุล *Raillietina* ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบในห้องปฏิบัติการเท่านั้น โดยยังไม่ได้นำไปใช้จริงในภาคสนาม ดังนั้นก่อนนำไปใช้จริงจึงควรมีการทดสอบสภาวะและกระบวนการอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น การสกัด DNA พยาธิจากอุจจาระของโฮสต์ การหาวิธีสกัด DNA โดยไม่ใช้ชุดสกัด ลดขั้นตอนการผสมสารเคมี หรือการทดสอบทำปฏิกิริยา LAMP ใน water bath เพื่อให้มีสภาวะใกล้เคียงกับภาคสนามมากที่สุดก่อนนำไปใช้จริงให้เกิดประโยชน์ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

Ackert, J. (1936). The cysticercoid of the fowl tapeworm *Raillietina cesticillus*. *Transactions of the American Microscopical Society, 55*(1), 97-100.

Adams, E. R., Schoone, G. J., El Safi, S., & Schallig, H. D. (2010). Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 82*(4), 591-596.

Ai, L., Li, C., Elsheikha, H., Hong, S., Chen, J., Chen, S., . . . Zhu, X. (2010). Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Veterinary Parasitology, 174*(3-4), 228-233.

Alkharigy, F. A., El Naas, A. S., & Maghrbi, A. A. E. (2018). Survey of parasites in domestic pigeons (*Columba livia*) in Tripoli, Libya. *Open Veterinary Journal, 8*(4), 360-366.

Baer, J. G., & Sandars, D. F. (1956). The first record of *Raillietina* (*Raillietina*) *celebensis* (Janicki, 1902),(Cestoda) in man from Australia, with a critical survey of previous cases. *Journal of Helminthology, 30*(2-3), 173-182.

Barber, K., Mkoji, G., & Loker, E. (2000). PCR-RFLP analysis of the ITS2 region to identify *Schistosoma haematobium* and *S. bovis* from Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 62*(4), 434-440.

Bartel, M. H. (1965). The life cycle of *Raillietina* (*R.*) *loeweni* Bartel and Hansen, 1964 (Cestoda) from the black-tailed jackrabbit, *Lepus californicus melanotis mearns*. *Journal of Parasitology*, *51*(5), 800-806.

Bartel, M. H., & Hansen, M. (1964). *Raillietina* (*Raillietina*) *loeweni* sp. n.(Cestoda: Davaineidae) from the hare in Kansas, with notes on *Raillietina* of North American mammals. *Journal of Parasitology*, *50*(3), 448-453.

Begum, A., Mukutmoni, M., & Akter, F. (2019). Parasite diversity in mallard: A cross sectional study on *Anas platyrhynchos* from Munshiganj, Dhaka. *Bangladesh Journal of Zoology, 47*(1), 121-128.

Boisvenue, R., & Hendrix, J. (1965). Prophylactic treatment of experimental *Raillietina cesticillus* infections in chickens with Yomesan. *Journal of Parasitology*, *51*(4), 519-522.

Butboonchoo, P., & Wongsawad, C. (2017). Occurrence and HAT-RAPD analysis of gastrointestinal helminths in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) in Phayao province, northern Thailand. *Saudi Journal of Biological Sciences, 24*(1), 30-35.

Butboonchoo, P., Wongsawad, C., Rojanapaibul, A., & Chai, J.-Y. (2016). Morphology and molecular phylogeny of *Raillietina* spp.(Cestoda: Cyclophyllidea: Davaineidae) from domestic chickens in Thailand. *Korean Journal of Parasitology, 54*(6), 777-786.

Catelli, C. T. E., Poglayen, G., & Gadale, A. T. O. (1999). Preliminary study of the helminths of the chicken digestive tract in Somalia. *Pathologie Infectieuse, 52*(2), 107-112.

Chaisiri, K., Chaeychomsri, W., Siruntawineti, J., Ribas, A., Herbreteau, V., & Morand, S. (2010). Gastrointestinal helminth infections in Asian house rats (*Rattus tanezumi*) from northern and northeastern Thailand. *Journal of Tropical Medicine and Parasitology, 33*(1), 29-35.

Chandler, A. C., & Pradatsundarasar, A. (1957). Two cases of *Raillietina* infection in infants in Thailand, with a discussion of the taxonomy of the species of *Raillietina* (Cestoda) in man, rodents and monkeys. *Journal of Parasitology, 43*(1), 81-88.

Chen, L., & Li, H. (2014). Biochemical and molecular characterization of the tegument protein RT10 from *Raillietina tetragona*. *Parasitology Research, 113*(3), 1239-1245.

Chen, R., Tong, Q., Zhang, Y., Lou, D., Kong, Q., Lv, S., . . . Lu, S. (2011). Loop-mediated isothermal amplification: rapid detection of *Angiostrongylus cantonensis* infection in *Pomacea canaliculata*. *Parasites & Vectors, 4*(1), 1-7.

Chenchittikul, M., Daengpium, S., Hasegawa, M., Itoh, T., & Phanthumachinda, B. (1983). A study of commensal rodents and shrews with reference to the parasites of medical importance in Chanthaburi Province, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 14*(2), 255-259.

Cheng, T. C. (2012). *General parasitology*: Elsevier.

Das, B., Tandon, V., & Saha, N. (2004). Anthelmintic efficacy of *Flemingia vestita* (Fabaceae): alteration in the activities of some glycolytic enzymes in the cestode, *Raillietina echinobothrida*. *Parasitology Research, 93*(4), 253-261.

Dasgupta, S., Roy, B., & Tandon, V. (2010). Ultrastructural alterations of the tegument of *Raillietina echinobothrida* treated with the stem bark of *Acacia oxyphylla* (Leguminosae). *Journal of Ethnopharmacology, 127*(2), 568-571.

Deardorff, T. L., Schmidt, G. D., & Kuntz, R. E. (1976). Tapeworms from Philippine birds, with three new species of *Raillietina* (*Raillietina*). *Journal of Helminthology, 50*(2), 133-142.

Debnath, M., Prasad, G. B., & Bisen, P. S. (2010). *Molecular diagnostics: promises and possibilities*: Springer Science & Business Media.

Drame, P. M., Fink, D. L., Kamgno, J., Herrick, J. A., & Nutman, T. B. (2014). Loop-mediated isothermal amplification for rapid and semiquantitative detection of *Loa loa* infection. *Journal of Clinical Microbiology, 52*(6), 2071-2077.

El-Bahy, N. M., & Bazh, E. K. (2015). Anthelmintic activity of ginger, curcumin, and praziquentel against *Raillietina cesticillus* (*in vitro* and *in vivo*). *Parasitology Research, 114*(7), 2427-2434.

Eshetu, Y., Mulualem, E., Ibrahim, H., Berhanu, A., & Aberra, K. (2001). Study of gastro-intestinal helminths of scavenging chickens in four rural districts of Amhara region, Ethiopia. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties, 20*(3), 791-793.

Feng, K., Li, W., Guo, Z., Duo, H., Fu, Y., Shen, X., . . . QI, G. (2017). Development of LAMP assays for the molecular detection of taeniid infection in canine in Tibetan rural area. *Journal of Veterinary Medical Science, 79*(12), 1986-1993.

Ghobashy, M., & Taeleb, A. (2015). Molecular characterization of *Raillietina* (*R.*) spp. Ortlepp, 1938 (Cestode: Cyclophyllidea: Davaineidae) infecting domestic and wild bird (*Columba livia* and *Columba livia domestica*). *World Journal of Zoology, 10*(2), 136-141.

Giri, B. R., Roy, B., & Babu, S. P. S. (2013). Evidence of apoptosis in *Raillietina echinobothrida* induced by methanolic extracts of three traditional medicinal plants of Northeast India. *Experimental Parasitology, 134*(4), 466-473.

Han, E. T., Watanabe, R., Sattabongkot, J., Khuntirat, B., Sirichaisinthop, J., Iriko, H., . . . Tsuboi, T. (2007). Detection of four *Plasmodium* species by genus-and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology, 45*(8), 2521-2528.

Hassouni, T., & Belghyti, D. (2006). Distribution of gastrointestinal helminths in chicken farms in the Gharb region-Morocco. *Parasitology Research, 99*(2), 181-183.

Heneberg, P., Sitko, J., & Bizos, J. (2015). Integrative taxonomy of central European parasitic flatworms of the family Prosthogonimidae Lühe, 1909 (Trematoda: Plagiorchiida). *Parasitology International, 64*(5), 264-273.

Hirayama, H., Kageyama, S., Moriyasu, S., Sawai, K., & Minamihashi, A. (2013). Embryo sexing and sex chromosomal chimerism analysis by loop-mediated isothermal amplification in cattle and water buffaloes. *Journal of Reproduction and Development, 59*(4), 321-326.

Horsfall, M. W. (1938). Observations on the life history of *Raillietina echinobothrida* and of *R. tetragona* (Cestoda). *Journal of Parasitology, 24*(5), 409-421.

Iseki, H., Alhassan, A., Ohta, N., Thekisoe, O. M., Yokoyama, N., Inoue, N., . . . Igarashi, I. (2007). Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *Journal of Microbiological Methods, 71*(3), 281-287.

Jaroenram, W., Kiatpathomchai, W., & Flegel, T. W. (2009). Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Molecular and Cellular Probes, 23*(2), 65-70.

Jyrwa, D., Dutta, A., Das, B., & Tandon, V. (2014). Molecular characterization of the Indian poultry nodular tapeworm, *Raillietina echinobothrida* (Cestoda: Cyclophyllidea: Davaineidae) based on rDNA internal transcribed spacer 2 region. *Journal of Parasitic Diseases, 38*(1), 22-26.

Khoshakhlagh, P., Spotin, A., Mahami-Oskouei, M., Shahbazi, A., & Ozlati, M. (2017). Loop-mediated isothermal amplification as a reliable assay for *Toxocara canis* infection in pet dogs. *Parasitology Research, 116*(9), 2591-2597.

Kiatpathomchai, W., Jaroenram, W., Arunrut, N., Jitrapakdee, S., & Flegel, T. (2008). Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Journal of Virological Methods, 153*(2), 214-217.

Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry, 60*(1), 111-120.

Kongkasuriyachai, D., Yongkiettrakul, S., Kiatpathomchai, W., & Arunrut, N. (2017). Loop-mediated isothermal amplification and LFD combination for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Biosensors and Biodetection* (pp. 431-443): Springer.

Lalchhandama, K. (2010). *In vitro* effects of albendazole on *Raillietina echinobothrida*, the cestode of chicken, *Gallus domesticus*. *Journal of Young Pharmacists, 2*(4), 374-378.

Lalle, M., Possenti, A., Dubey, J. P., & Pozio, E. (2018). Loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow dipstick (LAMP-LFD) to detect *Toxoplasma gondii* oocyst in ready-to-eat salad. *Food Microbiology, 70*, 137-142.

Le, T. H., Nguyen, N. T. B., Truong, N. H., & Van De, N. (2012). Development of mitochondrial loop-mediated isothermal amplification for detection of the small liver fluke *Opisthorchis viverrini* (Opisthorchiidae; Trematoda; Platyhelminthes). *Journal of Clinical Microbiology, 50*(4), 1178-1184.

Liang, J.-Y., & Lin, R.-Q. (2016). The full mitochondrial genome sequence of *Raillietina tetragona* from chicken (Cestoda: Davaineidae). *Mitochondrial DNA Part A, 27*(6), 4160-4161.

Littlewood, D. T. J., Waeschenbach, A., & Nikolov, P. N. (2008). In search of mitochondrial markers for resolving the phylogeny of cyclophyllidean tapeworms (Platyhelminthes, Cestoda)-a test study with Davaineidae. *Acta Parasitologica,*

53(2), 133-144.

Macuhova, K., Kumagai, T., Akao, N., & Ohta, N. (2010). Loop-mediated isothermal amplification assay for detection and discrimination of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs directly from sand samples. *Journal of Parasitology, 96*(6), 1224-1228.

Malhotra, S. K., & Capoor, V. (1984). A new cestode *Raillietina* (*Skrjabinia*) *doggaddaensis* n. sp. from *Gallus gallus domesticus* (L.) from India. *Korean Journal of Parasitology, 22*(1), 96-98.

Martínez-Valladares, M., & Rojo-Vázquez, F. A. (2016). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of fasciolosis in sheep and its application under field conditions. *Parasites & Vectors, 9*(1), 1-5.

McDougald, L. R. (2020). Internal parasites. In *Diseases of Poultry*. 13th ed. Wiley-Blackwell, New York City, USA.

Mugambi, R. M., Agola, E. L., Mwangi, I. N., Kinyua, J., Shiraho, E. A., & Mkoji, G. M. (2015). Development and evaluation of a loop mediated isothermal amplification (LAMP) technique for the detection of hookworm (*Necator americanus*) infection in fecal samples. *Parasites & Vectors, 8*(1), 1-7.

Mukaratirwa, S., & Hove, T. (2009). A survey of ectoparasites, cestodes and management of free-range indigenous chickens in rural Zimbabwe. *Journal of the South African Veterinary Association, 80*(3), 188-191.

Nadakal, A., Mohandas, A., John, K., & Muraleedharan, K. (1973). Contribution to the biology of the fowl cestode *Raillietina echinobothrida* with a note on its pathogenicity. *Transactions of the American Microscopical Society*, 273-276.

Ni, X.-W., McManus, D. P., Lou, Z.-Z., Yang, J.-F., Yan, H.-B., Li, L., . . . Shi, W.-G. (2014). A comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with other surveillance tools for *Echinococcus granulosus* diagnosis in canine definitive hosts. *PLoS One, 9*(7), e100877.

Nithiuthai, S., Chungpivat, S., & Sukumavasi, W. (2003). Study of gastro-intestinal helminthes in native chicken and the efficacy of mebendazole against the helminth

parasites. *Thai Journal of Veterinary Medicine, 33*(3), 65-72.

Niu, J.-h., Guo, Q.-x., Jian, H., Chen, C.-l., Yang, D., Liu, Q., & Guo, Y.-d. (2011). Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection, 30*(8), 1063-1069.

Nkouawa, A., Sako, Y., Nakao, M., Nakaya, K., & Ito, A. (2009). Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *Journal of Clinical Microbiology, 47*(1), 168-174.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research, 28*(12), e63-e63.

Nurelhuda, I., Elowni, E., & Hassan, T. (1989a). Anthelmintic activity of praziquantel on *Raillietina tetragona* in chickens. *Parasitology Research, 75*(8), 655-656.

Nurelhuda, I., Elowni, E., & Hassan, T. (1989b). Anticestodal action of oxfendazole on *Raillietina tetragona* in experimentally infected chickens. *British Veterinary Journal, 145*(5), 458-461.

O'Callaghan, M. G. (2004). *Studies on the systematics of the cestodes infecting the emu, Dromaius novaehollandiae (Latham, 1790)* (Doctoral dissertation). The University of Adelaide, Australia

Oliveira, L., Oliveira, F., & Ederli, N. (2017). Description of a new species *Fuhrmannetta jurubatensis* n. sp.(Cestoda, Davaineidae) from *Cerradomys goytaca* Tavares, Pessôa & Gonçalves, 2011 (Rodentia, Cricetidae). *Journal of Helminthology, 95*(5), 612-617.

Olson, P. D., Littlewood, D. T. J., Bray, R. A., & Mariaux, J. (2001). Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution, 19*(3), 443-467.

Owolabi, Y., Jato, I., & Yusuf, K. (2009). A Survey of Parasites of Domesticated Pigeon (*Columba livia domestic*) in Zaria, Nigeria. *International Journal of Soft Computing, 4*(4), 148-150.

Permin, A., Magwisha, H., Kassuku, A., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., &

Gibbons, L. (1997). A cross-sectional study of helminths in rural scavenging poultry in Tanzania in relation to season and climate. *Journal of Helminthology, 71*(3), 233-240.

Pote, L., Couvillion, C., Keirs, R., Schwartz, R., Taylor, R., Hackathorn, J., & Johnson, L. (1992). Dose-Titration to confirm the level of fenbendazole for control of *Raillietina cesticillus* in broiler chickens. *Avian Diseases*, *36*(3), 722-724.

Rahman, S. M., Song, H. B., Jin, Y., Oh, J.-K., Lim, M. K., Hong, S.-T., & Choi, M.-H. (2017). Application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting *cox1* gene for the detection of *Clonorchis sinensis* in human fecal samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases, 11*(10), e0005995.

Rajendran, M., & Nadakal, A. (1988). The efficacy of praziquantel (Droncit R) against *Raillietina tetragona* (Molin, 1858) in domestic fowl. *Veterinary Parasitology, 26*(3-4), 253-260.

Rashwan, N., Diawara, A., Scott, M. E., & Prichard, R. K. (2017). Isothermal diagnostic assays for the detection of soil-transmitted helminths based on the SmartAmp2 method. *Parasites & Vectors, 10*(1), 1-12.

Reid, W. (1942). Certain nutritional requirements of the fowl cestode *Raillietina cesticillus* (Molin) as demonstrated by short periods of starvation of the host. *Journal of Parasitology, 28*(4), 319-340.

Reid, W., Ackert, J. E., & Case, A. (1938). Studies on the life history and biology of the fowl tapeworm *Raillietina cesticillus* (Molin). *Transactions of the American Microscopical Society, 57*(1), 65-76.

Reid, W. M., & Nugara, D. (1961). Description and life cycle of *Raillietina georgiensis* n. sp., a tapeworm from wild and domestic turkeys. *Journal of Parasitology, 47*(6), 885-889.

Ribas, A., Saijuntha, W., Agatsuma, T., Thongjun, C., Lamsan, K., & Poonlaphdecha, S. (2016). Helminths in rodents from Wet Markets in Thailand. *Helminthologia, 53*(4), 326-330.

Roberts, L. S., & Janovy Jr, J. (2009). *Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations*

of parasitology (8 th ed.). New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.

Roy, B., Lalchhandama, K., & Dutta, B. K. (2007). Anticestodal efficacy of *Acacia oxyphylla* on *Raillietina echinobothrida*: a light and electron microscopic studies. *Pharmacologyonline, 1*, 279-287.

Saeed, A. (2007). Efficacy of albendazole against experimental *Raillietina tetragona* infection in chickens. *Research Journal of Pharmacology, 1*, 5-8.

Saijuntha, W., Duenngai, K., & Tantrawatpan, C. (2013). Zoonotic echinostome infections in free-grazing ducks in Thailand. *Korean Journal of Parasitology, 51*(6), 663-667.

Saijuntha, W., Tantrawatpan, C., Sithithaworn, P., Andrews, R. H., & Petney, T. N. (2011). Genetic characterization of *Echinostoma revolutum* and *Echinoparyphium recurvatum* (Trematoda: Echinostomatidae) in Thailand and phylogenetic relationships with other isolates inferred by ITS1 sequence. *Parasitology Research, 108*(3), 751-755.

Salant, H., Abbasi, I., & Hamburger, J. (2012). The development of a loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for *Echinococcus granulosis* coprodetection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 87*(5), 883-887.

Samad, M., Alam, M., & Bari, A. (1986). Effect of *Raillietina echinobothrida* infection on blood values and intestinal tissues of domestic fowls of Bangladesh. *Veterinary Parasitology, 21*(4), 279-284.

Sangvaranond, A. (1994). Parasitic helminths of native chickens in the central part of Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Science), 28*, 402-412.

Sawada, L. (1953). Morphological studies on the fowl cestodes, *Raillietina* (*Paroniella*) *kashiwarensis* n. sp. *Zoologisches Magazin, 62*, 179-185.

Sawada, L. (1965). On the genus *Raillietina* Fuhrmann 1920 (II). *Journal of the Nara Gakugel University, 13*, 5-38.

Sawada, L. (1964). On the genus *Raillietina* Fuhrmann 1920 (I). *Journal of the Nara Gakugei University, 12*, 19-36.

Schultz, R. L. (1940). The genus *Diorchis* Clerc 1903. *American Midland Naturalist, 23*(2),

382-389.

Stunkard, H. W. (1953). *Raillietina demerariensis* (Cestoda), from *Proechimys cayennensis trinitatus* of Venezuela. *Journal of Parasitology, 39*(3), 272-279.

T Salam, S., S Mir, M., & R Khan, A. (2010). The prevalence and pathology of *Raillietina cesticillus* in indigenous chicken (*Gallus gallus domesticus*) in the temperate Himalayan region of Kashmir-short communication. *Veterinarski Arhiv, 80*(2), 323-328.

Wilson, K., Yazwinski, T., Tucker, C., & Johnson, Z. (1994). A survey into the prevalence of poultry helminths in northwest Arkansas commercial broiler chickens. *Avian Diseases*, *38*(1), 158-160.

Xunhui, Z., Qingming, K., Qunbo, T., Haojie, D., Lesheng, Z., Di, L., . . . Tianping, W. (2019). DNA detection of *Paragonimus westermani*: Diagnostic validity of a new assay based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with a lateral flow dipstick. *Acta Tropica, 200*, 105185.

Yamaguti, S. (1958). *Systema Helminthum. Vol. I. The Digenetic Trematodes of Vertebrates-Part II.* New York: Interscience Publishers Inc.

Yamaguti, S. (1959). *Systema Helminthum. vol. II. The cestodes of vertebrates*. New York: Interscience Publishers Inc.

Yang, Y., Li, Q., Wang, S., Chen, X., & Du, A. (2016). Rapid and sensitive detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Veterinary Parasitology, 219*, 71-76.

ประภากร ธาราฉาย. (2560). *โรคสัตว์ปีกและการป้องกัน*. สืบค้นจาก http://www.as2.mju.ac.th/E-Book/t_prapakorn/สศ241/บทที่%2012%20โรคและการป้องกัน%20ปรับปรุง%202560.pdf.

สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์. (2562). *ปริมาณและข้อมูลการส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปปี 2557 - 2561*. สืบค้นจาก http://certify.dld.go.th/certify/index.php/th/2016-05-01-14-50-24/104-2555-2559/1050-2019-07-25-09-15-01

อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์. (2554). *เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)*. สืบค้น

จาก https://he01.tci-
thaijo.org/index.php/JHematolTransfusMed/article/view/4340/3780

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายวศิน พานิช
วัน เดือน ปี เกิด	7 ตุลาคม 2538
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2560 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	16/90 ถนนทวีวัฒนา เขตทวีวัฒนา แขวงศาลาธรรมสพน์ กรุงเทพมหานคร 10170
ผลงานตีพิมพ์	Panich, W., Tejangkura, T., & Chontananarth, T. (2021). Novel high-performance detection of Raillietina echinobothrida, Raillietina tetragona, and Raillietina cesticillus using loop-mediated isothermal amplification coupled with a lateral flow dipstick (LAMP-LFD). Veterinary Parasitology, 292, 109396.