

## การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

มัญชรี ทัตติยพงศ์\* มยุรี ไวยครุฑ กิ่งดาว หมอแก้ว  
สุภาวรรณ งามจิตต์เอื้อ มณฑกานต์ วงศ์ภากร

กลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เขตกลาง จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

\*ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 0-2579-8908-14 ต่อ 325 โทรสาร 0-2579-8918-19 E-mail: munchareet@dld.go.th

### บทคัดย่อ

โรคไทเลอริโอซิส (Theileriosis) เป็นโรคปรสิตในเลือดซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อไทเลอเรีย (*Theileria* spp.) ตรวจพบได้บ่อยในสัตว์เคี้ยวเอื้องของประเทศไทยและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์และเศรษฐกิจ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. ที่ตรวจพบในสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยรวบรวมตัวอย่างเลือดสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เพื่อชันสูตรโรคปรสิตในเลือดระหว่างเดือนสิงหาคม – ธันวาคม 2556 ซึ่งมีตัวอย่างเลือดที่พบเชื้อ *Theileria* spp. ด้วยวิธีเลือดป้ายสไลด์ย้อมสีจำนวน 101 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างเลือดจากโค 86 ตัวอย่าง กระบือ 13 ตัวอย่าง และกระทิง 2 ตัวอย่าง และเมื่อทดสอบด้วยวิธี PCR ที่จำเพาะต่อยีน MPSP พบว่าให้ผลบวกจำนวน 72 ตัวอย่าง โดยพบแถบสารพันธุกรรมขนาด 815 คู่เบส จากนั้นสุ่มตัวอย่างแบบง่ายจำนวน 26 ตัวอย่าง มาทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. ร่วมกับตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank โดยการสร้าง phylogenetic tree สามารถจำแนกได้ 11 type ประกอบด้วย Type 1-8 และ N1-N3 ซึ่งตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อ *Theileria* spp. ที่ไม่ก่อโรครุนแรง (benign theileriosis) และพบว่าตัวอย่างจัดอยู่ใน Type 3 (2/26), 6 (16/26), 7 (7/26) และ N1 (1/26) ผลการวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงของสายนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาพบว่าอยู่ในช่วง 58.1-100% และเมื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่างจาก Type 3, 6, 7 และ N1 พบตำแหน่งที่แตกต่างของแต่ละ Type จำนวน 8, 15, 8 และ 10 ตำแหน่งตามลำดับ โดยมีค่าความคล้ายคลึงกันโดยรวม 65.7-100% การศึกษานี้ทำให้เห็นว่าเชื้อ *Theileria* spp. ในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่พบในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอย่างมาก

คำสำคัญ: ไทเลอเรีย สัตว์เคี้ยวเอื้อง ยีน MPSP

## บทนำ

โรคไทเลอริโอซิส (Theileriosis) เกิดจากเชื้อโปรโตซัวไทเลอเรีย (*Theileria* spp.) จัดอยู่ในตระกูล Theileriidae เป็นเชื้อขนาดเล็กและมีรูปร่าง (shape) แตกต่างกันไป เช่น กลม (round) รูปไข่ (oval) รูปคอมม่า (comma) และรูปแท่ง (rod) มักอาศัยในเม็ดเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยเฉพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องสามารถจัดกลุ่มเชื้อ *Theileria* spp. ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อที่ก่อความรุนแรง (malignant lymphoproliferative theileriosis) ได้แก่ *Theileria annulata* และ *T. parva* ก่อให้เกิดอัตราการตายและอัตราการป่วยสูงเนื่องจากเชื้อมีการเพิ่มปริมาณในต่อมน้ำเหลือง ก่อนเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต โดยพบการแพร่ระบาดในพื้นที่แอฟริกา และกลุ่มเชื้อที่ไม่ก่อความรุนแรง (benign theileriosis) ได้แก่ *T. sergenti/buffeli/orientalis* พบการแพร่ระบาดในเขตเอเชีย ออสเตรเลีย และรัสเซีย (Uilenberg, 1981; Fujisaki et al., 1994; Chansiri et al., 1999) โดยเชื้อทั้ง 2 กลุ่มนี้มีเห็บเป็นพาหะนำเชื้อแต่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นเห็บชนิดใด ในประเทศไทยมีการตรวจพบเชื้อ *Theileria* spp. ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2514 โดยพบเชื้อในโคพื้นเมืองทางภาคใต้ (ปิยะ, 2514) ต่อมา มีรายงานพบเชื้อในโคนมในภาคกลาง (สถาพร และฉวีวรรณ, 2531) และโคพื้นเมืองทางภาคเหนือ (อิทธิพล และคณะ, 2532) โดยทั่วไปสัตว์ที่ติดเชื้อมักไม่แสดงอาการป่วยเด่นชัด แต่การติดเชื้อมักก่อปัญหาต่อสุขภาพสัตว์และนำไปสู่ความสูญเสียทางเศรษฐกิจตามมาได้ เนื่องจากการติดเชื้อในสัตว์ที่อยู่ในภาวะเครียดหรือในสัตว์สายพันธุ์พื้นเมืองมักทำให้เกิดอาการป่วยรุนแรง โดยพบอาการ เบื่ออาหาร ไข้สูง อ่อนเพลีย น้ำนมลด โลหิตจางรุนแรงและทำให้สัตว์ตายได้ (Aparna et al., 2011)

การตรวจวินิจฉัยโรคนี้ทำได้โดยการตรวจหาเชื้อ *Theileria* spp. ในเลือดสัตว์ด้วยวิธีเลือดป้ายสไลด์ย้อมสี (stained blood smear) แต่เนื่องจากรูปร่างของปรสิตในเม็ดเลือดแดงในตระกูลนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกันจนไม่สามารถจำแนกชนิดได้ จึงต้องอาศัยลักษณะของโรค และระบาดวิทยาในการจำแนกชนิด (มานพ, 2545) ถึงแม้ว่าเชื้อแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่จากการศึกษาทางชีวโมเลกุล พบว่าเชื้อเหล่านี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยยีนที่นิยมใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม (molecular marker) คือ ยีนที่ควบคุมการสร้าง major piroplasm surface protein (MPSP) ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกในระยะที่เชื้ออยู่ในเม็ดเลือดแดง (RBC stage) ในการศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงชีวโมเลกุลและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. โดยใช้ allele-specific PCR amplification พบว่าสามารถแบ่งลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. ออกเป็น 5 ไทป์ (Type) ได้แก่ Buffeli type (B1 และ B2 type), Chitose type (C type), Ikeda type (I type), และ Thai type (Kawazu et al., 1992; Matsuba et al., 1993; Kubota et al., 1996; Sarataphan et al., 1999; Inoue et al., 2001) ต่อมาได้มีการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และ phylogenetic tree ของยีนเดียวกัน พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ถึง 8 type ได้แก่ Type 1-8 (Jeong et al., 2010; Yokoyama et al., 2011) และการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้ พบว่าสามารถแยก *Theileria* spp. เพิ่มอีก 3 type คือ Type N1-N3 (Altangerel et al., 2011; Bawm et al., 2014; Sivakumar et al., 2014) ในประเทศไทยมีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. โดยอาศัยยีน MPSP และ small subunit ribosomal RNA (ssrRNA) พบว่าเชื้อ *Theileria* spp. มีความใกล้ชิดกับเชื้อในกลุ่ม *T. sergenti/buffeli/orientalis*

ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ก่อโรครุนแรง (Kakuda et al., 1998; Sarataphan et al., 1999) และจากการศึกษาของ Kakuda et al. (1998) พบว่าเชื้อที่พบในประเทศไทยมีลักษณะทางพันธุกรรมไม่สัมพันธ์กับเชื้อที่แยกได้จากประเทศจีนและสหรัฐอเมริกา ต่อมา Sarataphan et al. (1999) ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. จากโคโดยอาศัยยีน MPSP ของเชื้อในกลุ่ม benign *Theileria* พบว่าเชื้อมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับ B1 type, C type และ Thai type จากนั้น Sarataphan et al. (2003) ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. จากโคและกระบือโดยอาศัยยีนเดียวกัน พบว่าเชื้อมีลักษณะใกล้เคียงกับ C type และ Thai type โดย C type ที่พบมีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายกับเชื้อสายพันธุ์ที่พบในประเทศอินโดนีเซียมากกว่าประเทศญี่ปุ่น ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลว่าเชื้อ *Theileria* spp. ที่ตรวจพบในประเทศไทยมีลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมหรือไม่ ดังนั้นการศึกษารั้วนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. ที่ตรวจพบในสัตว์เคี้ยวเอื้องในระหว่างเดือนสิงหาคม – ธันวาคม 2556 และศึกษาลักษณะความสัมพันธ์และความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อ *Theileria* spp. ที่พบในประเทศไทยและเชื้อที่พบจากประเทศอื่น ๆ เพื่อเป็นการเฝ้าระวังเชื้อทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่างเลือด (Blood samples)

ตัวอย่างเลือดของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ส่งมาตรวจชันสูตรโรคที่กลุ่มปรีสตีวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างเดือนสิงหาคม – ธันวาคม 2556 ซึ่งตรวจพบเชื้อ *Theileria* spp. โดยวิธี stained blood smear รวมจำนวน 101 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างเลือดจากโคจำนวน 86 ตัวอย่าง กระบือจำนวน 13 ตัวอย่าง และกระทิงจำนวน 2 ตัวอย่าง

### การสกัดสารพันธุกรรม (DNA extraction)

สกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างเลือดที่ตรวจพบเชื้อ *Theileria* spp. ด้วยชุดสกัด Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่านำมาใช้งาน

### การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA amplification)

เพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อ *Theileria* spp. ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Kakuda et al. (1998) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะต่อยีน MPSP ประกอบด้วย forward primer 5'-CACGCTATGTTGTCCAAGAG-3' และ reverse primer 5'-GCAAGTGGTGAGAACTTGTGCGAC-3' ซึ่งให้ผลผลิต PCR (PCR product) ขนาด 815 bp มีขั้นตอนโดยย่อคือ เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย 10× buffer (Qiagen, Germany), dNTPs (Qiagen) 2 mM,

forward และ reverse primer อย่างละ 0.5  $\mu$ M, Taq DNA polymerase (HotStarTaq<sup>TM</sup>, Qiagen) 2.5 unit และเติม distilled water จนครบปริมาตร 18  $\mu$ l จากนั้นเติม DNA template 2  $\mu$ l นำส่วนผสมที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยี่ห้อ Thermo Scientific<sup>TM</sup> รุ่น Px2 Thermal Cycler (Thermo Scientific<sup>TM</sup>, USA) โดยใช้ PCR condition ดังนี้ initial denaturation ที่ 95°C นาน 5 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 95°C นาน 1 นาที annealing ที่ 59°C นาน 1 นาที และ extension ที่ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วย final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที นำ PCR product ที่ได้ไปแยกด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วย้อม ethidium bromide เพื่อวิเคราะห์ขนาดของ PCR product ภายใต้แสง UV เปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวกและลบ

### การหาลำดับเบส (DNA sequencing)

สุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ PCR มาทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยปรับปริมาตรของส่วนผสมของปฏิกิริยาเป็น 40  $\mu$ l ตามวิธี PCR ข้างต้น จากนั้นตัด agarose gel ที่มีแถบ PCR product (ขนาด 815 bp) และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ GenepHlow<sup>TM</sup> Gel/PCR Kit (Geneaid) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (direct sequencing) โดยใช้ BigDye v3.1 Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) ด้วยเครื่อง Applied Biosystems Prism 3130X1 genetic analyzer (Applied Biosystems)

### การวิเคราะห์ลำดับเบสและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MPSP ของตัวอย่างที่ศึกษาด้วยโปรแกรม Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>) และเรียงเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบขนาน (multiple sequence alignment) กับตัวอย่างอื่นจากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ดังแสดงใน Table 1 ด้วยโปรแกรม Muscle (Edgar, 2004) สร้างและวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยวิธี Maximum likelihood และทดสอบความเชื่อมั่นของ phylogenetic tree ด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง โดยมี *T. annulata* และ *T. parva* เป็นตัวนอกกลุ่ม (outgroup) และหาค่าความคล้ายคลึงกัน (Percent similarity) ของลำดับ นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม MEGA 6 version 6.06 (Tamura et al., 2013) เรียงเทียบแบบขนานและวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999)

Table 1. *Theileria* MPSP gene sequences used in this study.

| Type | GenBank accession no. | Host          | Country                   |
|------|-----------------------|---------------|---------------------------|
| 1    | D12689                | Cattle        | Japan                     |
|      | AB571978              | Cattle        | China                     |
|      | AB016279              | Water buffalo | Russia                    |
|      | AB560819              | Cattle        | Vietnam                   |
|      | AB571938              | Cattle        | Mongolia                  |
|      | AB562544              | Cattle        | Thailand                  |
|      | AB016280              | Cattle        | Japan                     |
|      | JN648696              | Tick          | Korea                     |
|      | AB871339              | Cattle        | Myanmar                   |
| 2    | D87190                | Cattle        | Korea                     |
|      | D11046                | Cattle        | Japan                     |
|      | DQ078264              | -             | China                     |
|      | JN648700              | Tick          | Korea                     |
| 3    | AB701456              | Cattle        | Sri Lanka                 |
|      | AB571893              | Cattle        | Mongolia                  |
|      | AB562541              | Cattle        | Thailand                  |
|      | AB562579              | Water buffalo | Thailand                  |
|      | D87189                | Cattle        | Australia                 |
|      | D87207                | Cattle        | Taiwan                    |
|      | AB008369              | Cattle        | UK                        |
|      | AB871349              | Cattle        | Myanmar                   |
| 4    | AB562561              | Water buffalo | Thailand                  |
|      | AB871316              | Cattle        | Myanmar                   |
| 5    | AB701448              | Cattle        | Sri Lanka                 |
|      | AB602383              | Tick          | Mongolia                  |
|      | AB562552              | Cattle        | Thailand                  |
|      | AB560827              | Cattle        | Vietnam                   |
|      | AB491347              | Cattle        | Japan                     |
|      | AB571967              | Cattle        | China                     |
|      | D87198                | -             | Korea                     |
|      | AB871347              | Cattle        | Myanmar                   |
| 6    | AB010702              | Cattle        | USA                       |
|      | AF236093              | Cattle        | China                     |
|      | GQ180192              | Yak           | China                     |
|      | AB010703              | Cattle        | Thailand (Kamphaeng saen) |
| 7    | AB701452              | Cattle        | Sri Lanka                 |
|      | AB562533              | Cattle        | Thailand                  |
|      | AB218430              | Cattle        | Japan (Okinawa)           |
|      | AB571887              | Cattle        | Mongolia                  |
|      | AB560823              | Cattle        | Vietnam                   |
|      | AB562581              | Water buffalo | Thailand                  |
|      | AF102500              | Cattle        | Indonesia                 |
|      | AB081329              | Cattle        | Thailand (Narathiwat)     |
|      | AB871368              | Cattle        | Myanmar                   |
|      | HQ444179              | Cattle        | India                     |
| 8    | D50304                | Cattle        | Japan                     |
|      | D87191                | Cattle        | Korea                     |
|      | D87205                | Cattle        | Japan                     |
| N1   | AB845491              | Water buffalo | Sri Lanka                 |
|      | AB560833              | Sheep         | Vietnam                   |
|      | AB016277              | Water buffalo | Vietnam                   |
| N2   | AB560829              | Water Buffalo | Vietnam                   |
|      | AB562566              | Water buffalo | Thailand                  |
| N3   | AB571901              | Cattle        | Mongolia                  |
|      | AB562532              | Cattle        | Thailand                  |
|      | AB562560              | Water buffalo | Thailand                  |
|      | AB571884              | Cattle        | Vietnam                   |

- = no data

## ผลการศึกษา

จากตัวอย่างเลือดทั้งหมด 101 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อยีน MPSP ด้วยวิธี PCR (MPSP-PCR assay) รวมจำนวน 72 ตัวอย่าง (Table 2) ประกอบด้วยตัวอย่างเลือดโคจากจังหวัดน่าน จำนวน 47 ตัวอย่าง ตัวอย่างเลือดโคจากจังหวัดสิงห์บุรีจำนวน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างเลือดจากกรุงเทพมหานครเป็นโค จำนวน 16 ตัวอย่าง กระบือจำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดกระทิงจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยยีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 815 bp (Figure 1)

Table 2. Summary results of PCR, sequencing and phylogenetic analyses.

| Province          | Host          | Number of samples | Number of PCR positive samples | Sequenced samples | Number of samples in each MPSP type |    |   |    |
|-------------------|---------------|-------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------------------------|----|---|----|
|                   |               |                   |                                |                   | 3                                   | 6  | 7 | N1 |
| Nan               | Cattle        | 51                | 47                             | 11                | 0                                   | 11 | 0 | 0  |
| Lopburi           | Water buffalo | 12                | 0                              | 0                 | -                                   | -  | - | -  |
| Singburi          | Cattle        | 6                 | 6                              | 5                 | 2                                   | 0  | 3 | 0  |
| Bangkok           | Cattle        | 29                | 16                             | 7                 | 0                                   | 3  | 4 | 0  |
|                   | Water buffalo | 1                 | 1                              | 1                 | 0                                   | 0  | 0 | 1  |
| Prachuapkhirikhan | Gaur          | 2                 | 2                              | 2                 | 0                                   | 2  | 0 | 0  |
| Total             |               | 101               | 72                             | 26                | 2                                   | 16 | 7 | 1  |



Figure 1. Example of PCR amplification products (815 bp) in ethidium bromide-stained agarose gel. Lane M: 100 bp DNA ladder; lane P: Positive control; lane N: Negative control; lane 1-22: *Theileria* DNA samples.

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MPSP ของตัวอย่างที่ศึกษาและจากฐานข้อมูล GenBank โดยการสร้าง phylogenetic tree (Figure 2) พบว่าสามารถจัดกลุ่มของสายนิวคลีโอไทด์ได้ 11 type (Type 1-8 และ N1-N3) และแยกจากกลุ่ม outgroup ได้อย่างชัดเจน (bootstrap 100%) โดยตัวอย่างที่ศึกษาจัดอยู่ใน Type 3 จำนวน 2 ตัวอย่าง (Singburi-3 และ 5) Type 6 จำนวน 16 ตัวอย่าง

(Prachuapkhirikhan-1 และ 2; Nan-4, 6, 11, 13, 19, 22, 24, 26, 29, 42 และ 47; Bangkok-4, 21 และ 22) Type 7 จำนวน 7 ตัวอย่าง (Singburi-1, 2 และ 4; Bangkok-7, 10, 14 และ 24) และ Type N1 จำนวน 1 ตัวอย่าง (Bangkok-30) และพบว่ามีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide similarity) ของตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดอยู่ในช่วง 58.1-100% (ไม่แสดงข้อมูล) เมื่อแยกแต่ละ Type พบว่าตัวอย่างที่ศึกษาใน Type 3, 6, และ 7 มีค่าความคล้ายคลึงกันภายในกลุ่ม 99.2%, 97.4-100% และ 96.4-100% ตามลำดับ (Table 3 A-C) และเมื่อนำตัวอย่างที่ศึกษามาวิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank พบว่ากลุ่มตัวอย่างใน Type 3, 6, 7 และ N1 มีค่าความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 98.3-99.9%, 87.9-100%, 95.1-100% และ 96.8-98.4% ตามลำดับ (Table 3 A-D)

จากการศึกษาโดยนำสายนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างถอดรหัสเป็นสายกรดอะมิโนแล้วนำมาเรียงเทียบกับแบบขนานกับตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank ในแต่ละ Type (Figure 3) พบว่าในแต่ละ Type มีตำแหน่งที่เป็นลักษณะเฉพาะแตกต่างกัน (specific site of amino acid) โดย Type 3 พบ 8 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ 9, 42, 60, 91, 131, 157, 174 และ 213) Type 6 พบ 15 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ 12, 22, 24, 29-31, 38, 53, 97, 104, 126, 138-163, 176, 188, 199, 234-235 และ 246) Type 7 พบ 8 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ 94, 139, 144, 148, 164, 173, 183 และ 185-186) และ Type N1 พบ 10 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ 12, 37, 39, 43, 57, 165, 190, 192, 212 และ 246) เมื่อนำตัวแทนตัวอย่างของแต่ละ Type มาวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันของลำดับสายกรดอะมิโน (amino acid similarity) พบว่าอยู่ในช่วง 65.7-100% (Table 4) โดยกลุ่มตัวอย่างที่อยู่ใน Type 3, 6, 7 และ N1 มีค่าความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 97.2-99.2%, 88.7-100%, 96.4-100% และ 94.8% ตามลำดับ





Table 3. Similarity analysis of *Theileria* nucleotide sequences for Type 3 (A), Type 6 (B), Type 7 (C) and Type N1 (D) from this study (shown in red) compared with sequences available in GenBank.

A) Type 3

|    |              | 1 | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |
|----|--------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1  | 3-AB701456   |   | 98.4 | 98.6 | 98.4 | 98.6 | 98.4 | 98.4 | 98.8 | 98.8 | 99.1 |
| 2  | 3-AB571893   |   |      | 98.6 | 98.4 | 98.6 | 98.4 | 98.4 | 98.3 | 98.8 | 99.1 |
| 3  | 3-AB562541   |   |      |      | 99.9 | 99.7 | 99.6 | 99.6 | 98.6 | 99.1 | 99.2 |
| 4  | 3-AB562579   |   |      |      |      | 99.6 | 99.5 | 99.5 | 98.4 | 99.0 | 99.1 |
| 5  | 3-D87189     |   |      |      |      |      | 99.6 | 99.6 | 98.6 | 99.1 | 99.2 |
| 6  | 3-D87207     |   |      |      |      |      |      | 99.6 | 98.4 | 99.0 | 99.1 |
| 7  | 3-AB008369   |   |      |      |      |      |      |      | 98.4 | 99.0 | 99.1 |
| 8  | 3-Singburi-3 |   |      |      |      |      |      |      |      | 99.2 | 99.0 |
| 9  | 3-Singburi-5 |   |      |      |      |      |      |      |      |      | 99.5 |
| 10 | 3-AB871349   |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |

B) Type 6

|    |                       | 1 | 2   | 3   | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   |
|----|-----------------------|---|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1  | 6-AB010702            |   | 100 | 100 | 88.2 | 88.2 | 88.2 | 88.1 | 88.0 | 88.1 | 88.1 | 88.1 | 88.1 | 88.1 | 88.1 | 88.1 | 88.1 | 88.1 | 88.1 | 88.1 | 87.9 |
| 2  | 6-AF236093            |   |     | 100 | 88.2 | 88.6 | 88.6 | 88.5 | 88.3 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 87.9 |
| 3  | 6-GQ180192            |   |     |     | 88.2 | 88.2 | 88.2 | 88.5 | 88.3 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 88.5 | 87.9 |
| 4  | 6-AB010703            |   |     |     |      | 98.8 | 98.8 | 97.3 | 97.2 | 97.3 | 97.3 | 97.3 | 97.3 | 97.3 | 97.3 | 97.3 | 97.3 | 97.3 | 97.3 | 97.3 | 97.2 |
| 5  | 6-Prachuapkhirikhan-1 |   |     |     |      |      | 100  | 97.5 | 97.4 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.4 |
| 6  | 6-Prachuapkhirikhan-2 |   |     |     |      |      |      | 97.5 | 97.4 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.5 | 97.4 |
| 7  | 6-Nan-4               |   |     |     |      |      |      |      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |
| 8  | 6-Nan-6               |   |     |     |      |      |      |      |      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |
| 9  | 6-Nan-11              |   |     |     |      |      |      |      |      |      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |
| 10 | 6-Nan-13              |   |     |     |      |      |      |      |      |      |      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |
| 11 | 6-Nan-19              |   |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |
| 12 | 6-Nan-22              |   |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |
| 13 | 6-Nan-24              |   |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |
| 14 | 6-Nan-26              |   |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |
| 15 | 6-Nan-29              |   |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |
| 16 | 6-Nan-42              |   |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 100  | 100  | 100  | 100  |
| 17 | 6-Nan-47              |   |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 100  | 100  | 100  |
| 18 | 6-Bangkok-21          |   |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 100  | 100  |
| 19 | 6-Bangkok-22          |   |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 100  |
| 20 | 6-Bangkok-4           |   |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |

C) Type 7

|    |              | 1 | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   |
|----|--------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1  | 7-AB701452   |   | 99.2 | 98.9 | 96.4 | 96.1 | 95.7 | 95.5 | 99.1 | 99.2 | 98.0 | 99.2 | 98.8 | 99.2 | 97.5 | 96.8 | 99.1 | 98.8 |
| 2  | 7-AB562533   |   |      | 99.3 | 97.1 | 96.8 | 96.4 | 96.2 | 99.4 | 99.5 | 98.3 | 99.5 | 99.1 | 99.5 | 97.9 | 97.5 | 99.4 | 99.1 |
| 3  | 7-AB218430   |   |      |      | 96.3 | 96.1 | 95.6 | 95.5 | 99.0 | 99.2 | 97.9 | 99.2 | 98.9 | 99.2 | 97.7 | 96.8 | 99.0 | 98.8 |
| 4  | 7-AB571887   |   |      |      |      | 99.2 | 98.8 | 97.8 | 96.8 | 96.9 | 96.0 | 96.9 | 96.5 | 96.9 | 96.7 | 99.1 | 96.8 | 96.5 |
| 5  | 7-AB560823   |   |      |      |      |      | 99.1 | 97.8 | 96.5 | 96.7 | 95.7 | 96.7 | 96.2 | 96.7 | 96.4 | 99.1 | 96.5 | 96.2 |
| 6  | 7-AB562581   |   |      |      |      |      |      | 97.4 | 96.1 | 96.2 | 95.6 | 96.2 | 95.8 | 96.2 | 96.0 | 98.7 | 96.1 | 95.8 |
| 7  | 7-AF102500   |   |      |      |      |      |      |      | 96.0 | 96.1 | 95.1 | 96.1 | 95.7 | 96.1 | 96.1 | 98.4 | 96.0 | 95.7 |
| 8  | 7-AB081329   |   |      |      |      |      |      |      |      | 99.9 | 98.7 | 99.9 | 99.5 | 99.9 | 97.9 | 97.2 | 99.7 | 99.5 |
| 9  | 7-Bangkok-7  |   |      |      |      |      |      |      |      |      | 98.8 | 100  | 99.6 | 100  | 98.0 | 97.3 | 99.9 | 99.6 |
| 10 | 7-Bangkok-10 |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 98.8 | 98.7 | 98.8 | 98.4 | 96.4 | 98.7 | 98.4 |
| 11 | 7-Bangkok-14 |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 99.6 | 100  | 98.0 | 97.3 | 99.9 | 99.6 |
| 12 | 7-Bangkok-24 |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 99.6 | 97.6 | 96.9 | 99.5 | 99.2 |
| 13 | 7-Singburi-4 |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 98.0 | 97.3 | 99.9 | 99.6 |
| 14 | 7-Singburi-1 |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 97.1 | 97.9 | 97.8 |
| 15 | 7-Singburi-2 |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 97.2 | 96.9 |
| 16 | 7-AB871368   |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 99.5 |
| 17 | 7-HQ444179   |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |

D) Type N1

|   |               | 1 | 2    | 3    | 4    |
|---|---------------|---|------|------|------|
| 1 | N1-AB845491   |   | 97.6 | 96.8 | 97.2 |
| 2 | N1-AB560833   |   |      | 98.0 | 98.4 |
| 3 | N1-AB016277   |   |      |      | 97.9 |
| 4 | N1-Bangkok-30 |   |      |      |      |

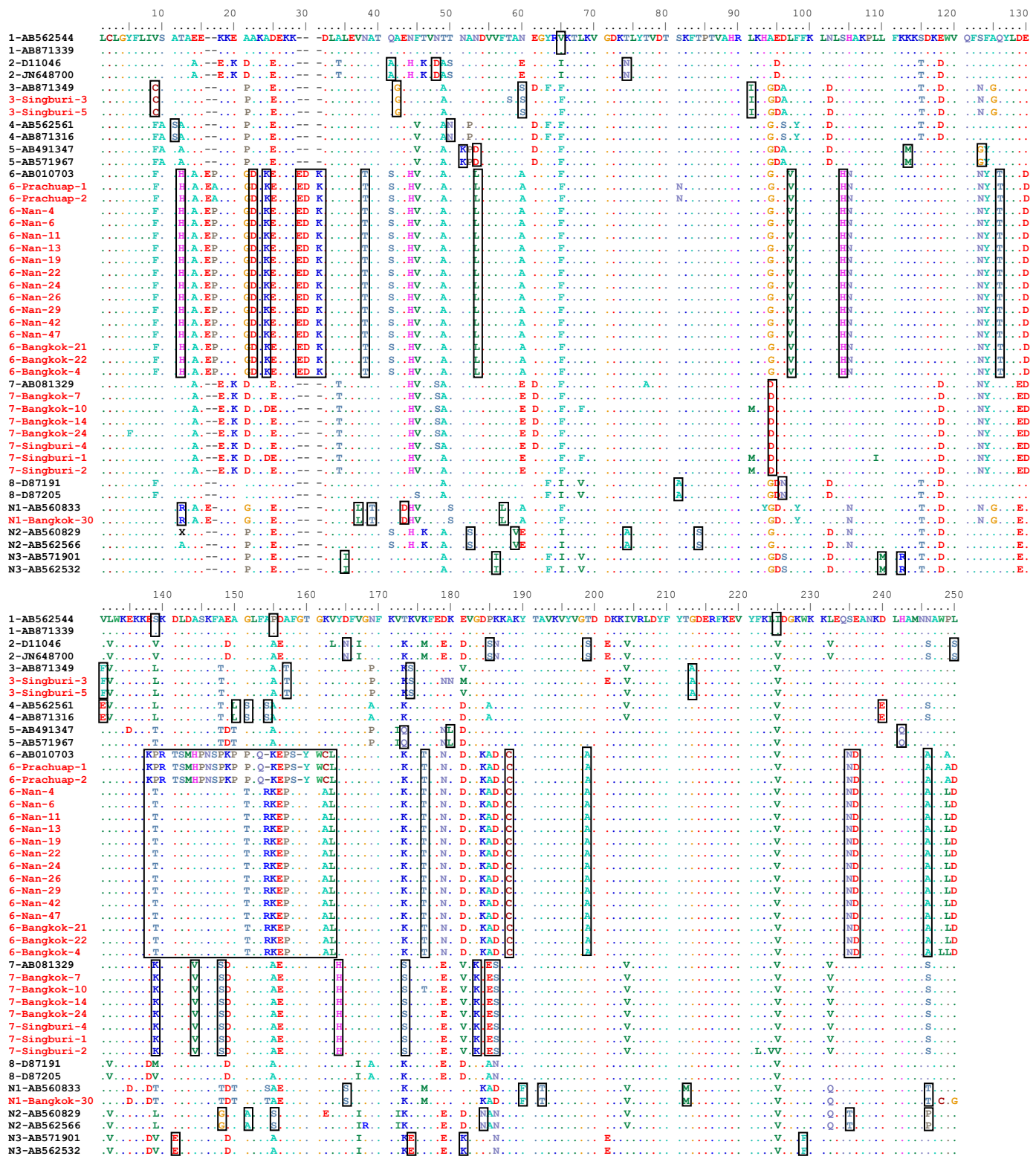


Figure 3. Multiple alignments of deduced MPSP amino acid sequences of *Theileria* spp. isolated in this study (shown in red) and published sequences retrieved from GenBank database.

วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (Thai-MAH eJournal): ISSN 1905-5048, <http://mah.dcd.go.th>, Volume 9 Number 2 (Sep – Dec 2014) : 1-17

11

## วิจารณ์และสรุป

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำตัวอย่างเลือดในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ตรวจพบเชื้อ *Theileria* spp. ด้วยวิธี stained blood smear มาตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. โดยใช้ MPSP-PCR assay พบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมในเลือดของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ได้แก่ โค กระบือ และกระทิง จาก 4 จังหวัด คิดเป็นร้อยละ 71.29 (72/101) โดยไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมในตัวอย่างเลือดโคจากจังหวัดน่านจำนวน 4 ตัวอย่าง ตัวอย่างเลือดกระบือทั้งหมดจากจังหวัดลพบุรี และตัวอย่างเลือดโคจากกรุงเทพมหานครจำนวน 13 ตัวอย่าง อาจเนื่องมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (packed cell volume; PCV) จำนวนเชื้อปรสิตในเลือด (level of parasitemia) และการสกัดสารพันธุกรรม ซึ่งอาจส่งผลต่อความสามารถในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อในตัวอย่างเลือด (detection limit) ของ MPSP-PCR assay (Eamens et al., 2013)

จากการศึกษา phylogenetic tree โดยใช้สายนิวคลีโอไทด์ของยีน MPSP จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ MPSP-PCR assay และตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 11 type สอดคล้องกับการศึกษาของ Altangerel et al. (2011) ซึ่งทำการศึกษาในตัวอย่างเลือดจากโคและกระบือในประเทศไทย การศึกษาของ Bawm et al. (2014) ซึ่งทำการศึกษาในตัวอย่างเลือดโคในประเทศพม่า และการศึกษาของ Sivakumar et al. (2014) ซึ่งทำการศึกษาในตัวอย่างเลือดกระบือในประเทศศรีลังกา นอกจากนี้ยังสามารถแยกกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาออกจากกลุ่มเชื้อที่ก่อโรครุนแรง (U22888 และ Z48740) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่าเชื้อ *Theileria* spp. ที่พบในประเทศไทยมีลักษณะทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเชื้อที่ไม่ก่อโรครุนแรง คือ *T. sergenti/buffeli/orientalis* (Kakuda et al., 1998; Sarataphan et al., 1999; Altangerel et al., 2011) โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวอย่างเลือดโคจัดอยู่ใน 3 type (Type 3, 6 และ 7) ส่วนตัวอย่างเลือดกระทิงจัดอยู่ใน Type 6 และตัวอย่างเลือดกระบือจัดอยู่ใน และ Type N1 ซึ่งพบจำนวน Type น้อยกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Altangerel et al. (2011) ที่ทำการศึกษตัวอย่างเลือดโค จำนวน 200 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดกระบือ จำนวน 255 ตัวอย่าง จากพื้นที่ 3 จังหวัดในภาคเหนือและ 5 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเชื้อ *Theileria* spp. ที่พบในโคและกระบือในประเทศไทยนั้น จัดอยู่ใน 5 type (Type 1, 3, 5, 7 และ N3) และ 7 type (Type 1, 3, 4, 5, 7, N2 และ N3) ตามลำดับ

ตัวอย่างจากการศึกษาครั้งนี้เชื้อ *Theileria* spp. ส่วนใหญ่ (16/26) จัดกลุ่มอยู่ใน Type 6 ซึ่งเป็นตัวอย่างเลือดโคที่มาจากจังหวัดน่านและกรุงเทพมหานคร รวมถึงตัวอย่างเลือดกระทิงจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยพบว่าตัวอย่างเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกันภายในกลุ่มสูงถึง 97.4-100% (Table 3B) และมีความใกล้เคียงกับตัวอย่างเลือดโคจากกำแพงแสน (AB010703) ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Sarataphan et al. (1999) ด้วยวิธี allele-specific PCR พบว่าตัวอย่างเลือดโคจากกำแพงแสนนี้จัดอยู่ใน Thai type นอกจากนี้ยังพบว่าภายใน Type 6 มีตัวอย่างจากประเทศจีน (AF236093 และ GQ180192) และสหรัฐอเมริกา (AB010702) ซึ่งแยกออกเป็นกิ่งย่อยอย่างชัดเจน (bootstrap 99%) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งรายงานเชื้อที่พบในประเทศไทย (AB010703) มีความแตกต่างจากลักษณะทางพันธุกรรมของทั้ง 2 ประเทศ (Kakuda et al., 1998) สำหรับใน

Type 7 พบตัวอย่างของการศึกษานี้จำนวน 7 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างเลือดโคจากจังหวัดสิงห์บุรีและกรุงเทพมหานคร มีค่าความคล้ายคลึงกันภายในกลุ่มสูงถึง 96.4-100% (Table 3C) โดยตัวอย่างส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับตัวอย่างจากประเทศอินเดีย (HQ444179) ประเทศพม่า (AB871368) และจังหวัดนราธิวาส (AB081329) และมีตัวอย่างเลือดโคจากจังหวัดสิงห์บุรีจำนวน 1 ตัวอย่างที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อที่พบจากประเทศอินโดนีเซีย (AF102500) สอดคล้องกับการศึกษาของ Sarataphan et al. (2003) ด้วยวิธี allele-specific PCR ที่รายงานว่าลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. จากโคและกระบือที่พบซึ่งจัดอยู่ใน C type นั้น มีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกับเชื้อที่พบในประเทศอินโดนีเซีย (AF102500) ส่วนตัวอย่างที่พบใน Type 3 จำนวน 2 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างเลือดโคจากจังหวัดสิงห์บุรี มีค่าความคล้ายคลึงกันสูงถึง 99.2% (Table 3A) ต่างจากการศึกษาของ Altangerel et al. (2011) ที่รายงานว่าใน Type 3 พบตัวอย่างเลือดโคจากทุกพื้นที่ที่ทำการศึกษาในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบตัวอย่างเลือดกระบือซึ่งจัดอยู่ใน Type N1 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sivakumar et al. (2014) ซึ่งรายงานพบเชื้อจากตัวอย่างเลือดกระบือจากประเทศศรีลังกาและจัดอยู่ใน Type N1 และ N2 ในทางตรงข้ามการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทยโดย Altangerel et al. (2011) กลับพบว่าตัวอย่างเลือดกระบือจัดอยู่ใน Type N2 และ N3 อย่างไรก็ตามในการศึกษารุ่นนี้ไม่พบตัวอย่างใน Type 2 เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย (Sarataphan et al., 1999; Sarataphan et al., 2003; Altangerel et al., 2011) นอกจากนี้ผลการศึกษารุ่นนี้ยังชี้ให้เห็นว่าแหล่งที่มาของตัวอย่างไม่มีความสัมพันธ์กับการจัดกลุ่มของ phylogenetic tree

เมื่อศึกษาถึงลำดับกรดอะมิโนพบว่าในแต่ละ Type มีตำแหน่งของกรดอะมิโนที่จำเพาะแตกต่างกัน โดย Type 3 พบ 8 ตำแหน่ง Type 6 พบ 15 ตำแหน่ง Type 7 พบ 8 ตำแหน่ง และ Type N1 พบ 10 ตำแหน่ง (Figure 3) และเมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนใน Type 6 โดยเฉพาะกลุ่ม Thai type พบว่ามีความแตกต่างกันของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 138-163 สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างเลือดกระทิงทั้ง 2 ตัวอย่างมีกรดอะมิโนที่เหมือนกับตัวอย่างโคจากกำแพงแสน (AB010703) และกลุ่มตัวอย่างเลือดโคจากจังหวัดน่านและกรุงเทพมหานคร ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของ phylogenetic tree และมีค่าความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่างอยู่ในช่วง 89.0-89.5% (Table 4) ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าตัวอย่างโคจากกำแพงแสน (AB010703) และจากประเทศจีนมีความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่งเดียวกันเช่นกัน (Kakuda et al., 1998) และจากการศึกษาตำแหน่งของกรดอะมิโนที่จำเพาะของเชื้อในแต่ละ Type ของประเทศเกาหลีในปี 2012 พบว่ามีการพบตำแหน่งกรดอะมิโนที่จำเพาะเพิ่มขึ้นจากปี 2010 (Kang et al., 2012) ชี้ให้เห็นว่าเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมอยู่ตลอดเวลา จึงควรทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. ในประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า *T. orientalis* เป็นสาเหตุของการตายของโคพันธุ์ลูกผสมในทางตอนใต้ของประเทศอินเดีย (HQ444179) ซึ่งเชื่อมีความใกล้เคียงในระดับจีโนมเลกุลกับตัวอย่างจากจังหวัดนราธิวาสของประเทศไทย (AB081329) และตัวอย่างจากประเทศอินโดนีเซีย (AF102500) (Aparna et al., 2011) รวมถึงมีรายงานพบอุบัติการณ์ของเชื้อ *T. orientalis* สายพันธุ์ใหม่ในประเทศออสเตรเลียที่เกิดจากการกลายพันธุ์ทำให้เชื้อสามารถก่อโรครุนแรงขึ้นและเกิดการระบาดในหลายพื้นที่ (Kamau et al., 2011)

จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *Theileria* spp. ที่พบในประเทศไทยนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอย่างมาก อีกทั้งยังไม่ทราบถึงพาหะที่นำเชื้อชนิดนี้อย่างชัดเจน จึงควรศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มจำนวนประชากรสัตว์ที่ศึกษาและเก็บตัวอย่างจากหลากหลายพื้นที่ รวมถึงพาหะนำเชื้อและแนวทางการติดต่อของเชื้อ เพื่อเฝ้าระวังและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มปรสิตวิทยาและกลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ช่วยเหลืองานด้านเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณ น.สพ.ดร. ณชัย ศรราชพันธุ์ ที่เอื้อเฟื้อเชื้อ *Theileria* spp. ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมบวกในการศึกษาครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

- ปิยะ อรรถกานนท์. 2514. การตัดม้ามโคเพื่อการศึกษาพยาธิในเม็ดโลหิต. สัตวแพทยสาร. 22(2): 39-46.
- มานพ ม่วงใหญ่. 2545. ไทเลอเรีย. วิทยาสัตว์เซลล์เดียวทางสัตวแพทย์. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ. หน้า 197-203.
- สถาพร จิตตपालพงศ์ และฉวีวรรณ เลียววิจักขณ์. 2531. การสำรวจพยาธิโปรโตซัวในเลือดของโคนมที่หนองโพ. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 26. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. ระหว่างวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2531. หน้า 9-14.
- อิทธิพล ชัยชนะพูนพล พัทธรา วิฑูรกุล และสุรพงษ์ อุดมพันธ์. 2532. ปัญหาพยาธิของโคนมขาวดำพันธุ์แท้. การประชุมวิชาการด้านปศุสัตว์ ครั้งที่ 8. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ระหว่างวันที่ 7-9 มิถุนายน 2532. หน้า 40-46.
- Altangerel, K., Sivakumar, T., Inpankaew, T., Jittapalapong, S., Terkawi, M.A., Ueno, A., Xuan, X., Igarashi, I. and Yokoyama, N. 2011. Molecular prevalence of different genotypes of *Theileria orientalis* detected from cattle and water buffaloes in Thailand. J. Parasitol. 97: 1075-1079.
- Aparna, M., Ravindran, R., Vimalkumar, M.B., Lakshmanan, B., Rameshkumar, P., Kumar, K.G., Promod, K., Ajithkumar, S., Ravishankar, C., Devada, K., Subramanian, H., George, A.J. and Ghosh, S. 2011. Molecular characterization of *Theileria orientalis* causing fatal infection in crossbred adult bovines of South India. Parasitol. Int. 60: 524-529.

- Bawm, S., Shimizu, K., Hirota, J., Tosa, Y., Htun, L.L., Maw, N.N., Thein, M., Kato, H., Sakurai, T. and Katakura, K. 2014. Molecular prevalence and genetic diversity of bovine *Theileria orientalis* in Myanmar. *Parasitol. Int.* 63: 640–645.
- Chansiri, K., Kawazu, S., Kamio, T., Terada, Y., Fujisaki, K., Philippe, H. and Sarataphan, N. 1999. Molecular phylogenetic studies on *Theileria* parasites based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Vet. Parasitol.* 83: 99–105.
- Eamens, G.J., Gonsalves, J.R., Jenkins, C., Collins, D. and Bailey, G. 2013. *Theileria orientalis* MPSP types in Australian cattle herds associated with outbreaks of clinical disease and their association with clinical pathology findings. *Vet. Parasitol.* 191: 209–217.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797.
- Fujisaki, K., Kawazu, S. and Kamio, T. 1994. The taxonomy of the bovine *Theileria* spp. *Parasitol. Today.* 10: 31–33.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Inoue, M., Van Nguyen, D., Meas, S., Ohashi, K., Sen, S., Sugimoto, C. and Onuma, M. 2001. Survey of *Theileria* parasite infection in cattle in Cambodia and Vietnam using piroplasm surface protein gene-specific polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 1155–1157.
- Jeong, W., Yoon, S.H., An, D.J., Cho, S.H., Lee, K.K. and Kim, J.Y. 2010. A molecular phylogeny of the benign *Theileria* parasites based on major piroplasm surface protein (MPSP) gene sequences. *Parasitol.* 137: 241–249.
- Kakuda, T., Shiki, M., Kubota, S., Sugimoto, C., Brown, W.C., Chansiri, K., Sarataphan, N. and Onuma, M. 1998. Phylogeny of benign *Theileria* species from cattle in Thailand, China and the U.S.A. based on the major piroplasm surface protein and small subunit ribosomal RNA genes. *Int. J. Parasitol.* 28: 1261–1267.
- Kamau, J., de Vos, A.J., Playford, M., Salim, B., Kinyanjui, P. and Sugimoto, C. 2011. Emergence of new types of *Theileria orientalis* in Australian cattle and possible cause of theileriosis outbreaks. *Parasit. Vectors.* 4: 22-32.
- Kang, S.W., Nguyen, L.T.K., Noha, J.H., Reddy, K.E., Kweon, C.H. and Choe, S.E. 2012. Phylogenetic analysis of benign *Theileria* species based on major piroplasm surface protein (MPSP) genes from ticks of grazing cattle in Korea. *Vet. Parasitol.* 189: 145–152.

- Kawazu, S., Sugimoto, C., Kamio, T. and Fujisaki, K. 1992. Analysis of the genes encoding immunodominant piroplasm surface proteins of *Theileria sergenti* and *Theileria buffeli* by nucleotide sequencing and polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56: 169–175.
- Kubota, S., Sugimoto, C., Kakuda, T. and Onuma, M. 1996. Analysis of immunodominant piroplasm surface antigen alleles in mixed populations of *Theileria sergenti* and *T. buffeli*. *Int. J. Parasitol.* 26: 741–747.
- Matsuba, T., Kubota, H., Tanaka, M., Hattori, M., Murata, M., Sugimoto, C. and Onuma, M. 1993. Analysis of mixed parasite populations of *Theileria sergenti* using cDNA probes encoding a major piroplasm surface protein. *Parasitol.* 107: 369–377.
- Sarataphan, N., Kakuda, T., Chansiri, K. and Onuma, M. 2003. Survey of benign *Theileria* parasites of cattle and buffaloes in Thailand using allele-specific polymerase chain reaction of major piroplasm surface protein gene. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 133-135.
- Sarataphan, N., Nilwarangkoon, S., Tananyutthawongse, C., Kakuda, T., Onuma, M. and Chansiri, K. 1999. Genetic diversity of major piroplasm surface protein genes and their allelic variants of *Theileria* parasites in Thai cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 991–994.
- Sivakumar, T., Tattiyapong, M., Fukushi, S., Hayashida, K., Kothalawala, H., Silva, S.S., Vimalakumar, S.C., Kanagaratnam, R., Meewewa, A.S., Suthaharan, K., Puvirajan, T., de Silva, W.K., Igarashi, I. and Yokoyama, N. 2014. Genetic characterization of *Babesia* and *Theileria* parasites in water buffaloes in Sri Lanka. *Vet. Parasitol.* 200: 24-30.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Uilenberg, G. 1981. Theilerial species of domestic livestock. In: *Advances in the Control of Theileriosis*. Edited by A.D. Irvin, M.P. Cunningham and A.S. Young. Martinus Nijhoff, The Hague. p. 4–37.
- Yokoyama, N., Ueno, A., Mizuno, D., Kuboki, N., Khukhuu, A., Igarashi, I., Miyahara, T., Shiraishi, T., Kudo, R., Oshiro, M., Zakimi, S., Sugimoto, C., Matsumoto, K. and Inokuma, H. 2011. Genotypic diversity of *Theileria orientalis* detected from cattle grazing in Kumamoto and Okinawa prefectures of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 305–312.



## Molecular characterization of *Theileria* spp. in ruminants

Muncharee Tattiyapong\* Mayuree Waiyakroot Kingdao Mohkeaw

Supawan Ngamjiteu Montakan Vongpakorn

Parasitology Section, National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Kasetklang, Chatuchak, Bangkok 10900 Thailand

\*Corresponding author: Tel. 0-2579-8908-14 ext. 325 Fax 0-2579-8918-19 E-mail: [munchareet@dld.go.th](mailto:munchareet@dld.go.th)

### Abstract

Theileriosis is a haemoparasitic disease caused by *Theileria* spp., which is commonly detected in ruminants in Thailand. The *Theileria* infection has an impact on animal health and economic. The objective of this study was to determine the genetic diversity of *Theileria* spp. found in ruminants. Among the ruminant blood samples submitted to Parasitology Section, National Institute of Animal Health during August – December 2013, 101 samples including 86 cattle blood samples, 13 water buffalo blood samples and 2 gaur blood samples were positive for *Theileria* spp. by stained blood smear. When using PCR method to detect MPSP gene of *Theileria* spp., 72 out of 101 samples were positive showing the expected band of 815 bp. Twenty-six PCR product samples were simple randomly selected and successfully sequenced. The MPSP gene sequences were then analyzed by phylogenetic tree construction along with other *Theileria* sequences retrieved from GenBank. The phylogram formed 11 types containing Type 1-8 and N1-N3. All of MPSP gene sequences obtained in this study clustered with the benign *Theileria* sequences and found in Type 3 (2/26), 6 (16/26), 7 (7/26), and N1 (1/26). The sample sequences demonstrated nucleotide similarity of 58.1-100%. Multiple alignments of deduced amino acid sequences showed specific amino acid sites of each type: 8, 15, 8 and 10 for Type 3, 6, 7 and N1, respectively. The overall similarity of MPSP sequences was 65.7-100%. These findings revealed that *Theileria* spp. circulating in ruminants in Thailand have high levels of genetic diversity.

Keywords: *Theileria* spp., ruminants, MPSP gene