



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

**The surveillance and molecular characterization of *Chlamydophila*
psittaci in feral and racing pigeons in Thailand**

โดย สุวัรักษ์ วรรณรัตน์

1 กรกฎาคม 2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

The surveillance and molecular characterization of *Chlamydophilla psittaci* in feral and racing pigeons in Thailand

ชื่อผู้วิจัย

1. Suwarak Wannaratana
2. Somsak Pakpinyo

สังกัด

Rajamangala University of Technology Tawan-OK
Chulalongkorn University

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

รหัสโครงการ : TRG5780005

ชื่อโครงการ : The surveillance and molecular characterization of *Chlamydophilla psittaci* in feral and racing pigeons in Thailand

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : สุวรัชย์ วรรณรัตน์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

E-mail Address : swannaratana@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 years

Abstract:

Chlamydophilla psittaci (*C. psittaci*), an obligated intracellular gram-negative bacteria, causes an important zoonotic disease in humans namely psittacosis. This organism has been found in 460 avian species spanning in 30 orders of avian. The objectives of this study were to determine the prevalence of *C. psittaci* in feral and racing pigeons in central Thailand and to evaluate the persistency of *C. psittaci* surviving in various temperature conditions. The cloacal swab (CS) samples were collected from 150 feral pigeons and 150 racing pigeons. The CS samples were pooled (5 CS per 1 pooled sample) and inoculated into 7 day-old embryonated chicken eggs for bacterial isolation. Bacterial identification was conducted by PCR analysis using major outer membrane gene (*ompA*) specific primers. Our result showed that 6.7% of pooled samples (2/30) of feral pigeons were PCR positive while all of pooled samples of racing pigeons was PCR negative. Characterization of partial *ompA* gene sequence of Thai *C. psittaci* suggested that the bacteria belong to genotype B. Bacterial persistence study showed that *C. psittaci* could survive at 56°C for up to 72 hrs. In conclusion, *C. psittaci* could be found in feral pigeons in central Thailand. The bacteria can survive in equatorial temperature area. Thus, the public health awareness of *C. psittaci* infection in humans should be concerned.

Keywords : Feral and racing pigeons, *Chlamydophilla psittaci*, Psittacosis

เชื้อ *Chlamydophila psittaci* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ก่อให้เกิดโรคไขหวัดนกแก้ว หรือ โรค psittacosis ในมนุษย์ โดยมีนกหรือสัตว์ปีกเป็นแหล่งรังโรค วัตถุประสงค์ของการศึกษารุ่นนี้เพื่อสำรวจหาอุบัติการณ์ของเชื้อ *C. psittaci* ในนกพิราบบ้านและนกพิราบแข่งที่อาศัยในเขตภาคกลางของประเทศไทย โดยสุ่มเก็บตัวอย่างด้วยวิธี cloacal swab จากช่องทวารร่วม (cloaca) ของนกพิราบแข่งจำนวน 150 ตัวอย่าง และนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติจำนวน 150 ตัวอย่าง จากนั้นนำ swab มารวมกัน (pooled) 5 swab เป็น 1 ตัวอย่าง ฉีดลงในไข่ไก่ฟักอายุ 7 วัน และตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน 16s RNA และยีน *ompA* ของเชื้อ *C. psittaci* โดยผลการทดลองพบตัวอย่างที่ให้ผลบวก 2 ตัวอย่าง (pooled) จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างจากนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติ คิดเป็น 6.7% ในขณะที่ตัวอย่างจากนกพิราบแข่งให้ผลลบ เมื่อนำตัวอย่างเชื้อ *C. psittaci* ที่แยกได้ทั้งสองตัวอย่างมาวิเคราะห์และถอดรหัสพันธุกรรมพบว่า ตัวอย่างที่แยกเชื้อได้นั้นเป็นเชื้อ *C. psittaci* genotype B นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความทนทานของเชื้อ *C. psittaci* ที่อุณหภูมิต่างๆพบว่า เชื้อ *C. psittaci* ที่แยกเชื้อได้ในประเทศไทยนั้นสามารถคงอยู่ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ได้เป็นระยะเวลามากกว่า 72 ชั่วโมง จากผลการทดลองสรุปได้ว่า เชื้อ *C. psittaci* มีการแพร่กระจายในประชากรนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติในประเทศไทย ดังนั้นการเฝ้าระวังทางด้านสาธารณสุขและมาตรการป้องกันการติดเชื้อ *C. psittaci* จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ควรต้องเร่งปรับปรุงพัฒนา

คำสำคัญ : นกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติและนกพิราบแข่ง เชื้อแบคทีเรีย *C. psittaci*
โรคไขหวัดนกแก้ว

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคไขหวัดนกแก้ว หรือ โรค psittacosis หรือ avian chlamydiosis เป็นโรคติดเชื้อที่มีนกเป็นแหล่งรังโรค สามารถพบได้ในนกมากกว่า 467 สายพันธุ์ หรือมากกว่า 30 order จากทั้งหมด 50 order ของสัตว์ปีก (Kaleta and Taday, 2003) โดยมีสาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรียชื่อ *Chlamydophila psittaci* (Stewardson and Grayson, 2010) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอยู่ในตระกูล *Chlamydiaceae* เชื้อแบคทีเรียมีลักษณะรูปร่างกลมและเป็นแบคทีเรียแบบชนิดที่ต้องพึ่งพาอาศัยเซลล์ (obligate intracellular bacteria) หรืออาศัยอยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตอื่นเท่านั้น อาการผิดปกติของสัตว์ปีกที่ติดเชื้อแสดงออกส่วนใหญ่อยู่ที่บริเวณระบบทางเดินหายใจ เช่น มีน้ำมูก น้ำตา เยื่อตาขาวอักเสบ ร่วมกับอาการป่วยทั่วไปอื่นๆ เช่น ท้องเสีย ลักษณะสิ่งขับถ่ายมีสีเหลือง ซึม ไม่กินอาหาร ในสัตว์ป่วยที่ติดเชื้อบางตัวอาจแสดงอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตหรืออาจไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ (Vanrompay et al., 1995) ในขณะที่รายงานการติดเชื้อ *C. psittaci* ในมนุษย์มีรายงานครั้งแรกในปี 1879 (Harris and Williams, 1985) ต่อมาในปี 1893 ชื่อโรค psittacosis จึงได้ถูกตั้งขึ้นและตามมาด้วยชื่อโรค Ornithosis ได้ถูกตั้งขึ้นเพิ่มเติมในปี 1941 เนื่องจากในขณะนั้นได้มีผู้ป่วยติดเชื้อ *C. psittaci* จากไก่งวง (Anderson and Vanrompay, 2008) และตั้งแต่ปี 1879 เป็นต้นมาการแพร่ระบาดของโรคเริ่มขยายวงกว้างมากขึ้นโดยมีรายงานการระบาดที่กรุงปารีสประเทศฝรั่งเศสในปี 1892-1896 ที่เมือง Zuelpich ประเทศเยอรมันในปี 1929 และในช่วงปี 1929-1930 เชื้อ *C. psittaci* ได้แพร่ระบาดทั่วทั้งทวีปยุโรปและสหรัฐอเมริกา (Pospischil, 2009) โดยประมาณการว่าในขณะนั้นทั่วโลกมีผู้ป่วยติดเชื้อ *C. psittaci* ทั้งหมด 766 คน เสียชีวิต 112 คน จากหลักฐานเอกสารต่างๆ เชื่อว่าสาเหตุหลักของการแพร่ระบาดในครั้งนั้นเกิดจากการนำเข่านกแก้วเป็นจำนวนมากมาจากประเทศในแถบทวีปแอฟริกาใต้ (Vanrompay et al., 1995) นอกจากนี้ Vanrompay และคณะ (2007) ได้รายงานว่าตั้งแต่ปี 1988 ถึงปี 2003 มีรายงานผู้ติดเชื้อ *C. psittaci* ในสหรัฐอเมริกามากกว่า 953 ราย ซึ่งผู้ป่วยที่ติดเชื้อเกือบทั้งหมดมีประวัติการสัมผัสหรือประวัติเกี่ยวข้องกับนก โดยนอกจากนกในกลุ่ม *Psittaciformes* จะเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของเชื้อนี้แล้ว นกหรือสัตว์ปีกชนิดอื่นก็สามารถนำโรคหรือเป็นพาหะแพร่กระจายเชื้อนี้มาสู่คนได้ โดย Harkinezhad และคณะ (2009) พบว่านกที่น่าจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดการระบาดของโรค Psittacosis ในประเทศ Belgium คือนกพิราบ และผลการตรวจทางซีรัมวิทยาของนกพิราบในประเทศแถบทวีปยุโรปตั้งแต่ปี 1966-2005 แสดงให้เห็นว่านกพิราบมีประวัติการสัมผัสเชื้อ *C. psittaci* อยู่ในช่วงประมาณ 10-96.6 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ยคิดเป็น 42.3 เปอร์เซ็นต์ (Dickx et al., 2010; Magnino et al., 2009; Haag-Wackernagel, 2004) โดยสามารถเพาะแยกเชื้อ *C. psittaci* ได้จากนกพิราบเฉลี่ยประมาณ 13.2 เปอร์เซ็นต์ (Magnino et al., 2009)

เนื่องจากความนิยมของนกสวยงามที่นับวันจะเป็นที่นิยมเพิ่มมากขึ้นประกอบกับสภาวะการณของประชากรนกพิราบที่อาศัยอยู่ในบริเวณตัวเมืองเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว

ดังนั้นการสำรวจหาเชื้อ *C. psittaci* จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเตรียมความพร้อมในการรับมือหากเกิดการระบาดของเชื้อ *C. psittaci* ขึ้นในประเทศไทยและเพื่อเป็นฐานข้อมูลสำหรับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อ *C. psittaci* ต่อไปในอนาคต

ทบทวนวรรณกรรม

โรค Psitacosis หรือโรคไขหวัดนกแก้วเป็นโรคสัตว์สู่คน โดยคนติดเชื้อแบคทีเรีย *Chlamydophila psittaci* จากนกในกลุ่ม Psittaciformes เช่น นกแก้ว หรืออาจจะเรียกอีกชื่อหนึ่งคือ Ornithosis ในกรณีที่คนติดเชื้อ *C. psittaci* จากสัตว์ปีกในสายพันธุ์อื่น (Rohde et al., 2010) เชื้อแบคทีเรีย *C. psittaci* อยู่ในตระกูล *Chlamydiaceae* สามารถแบ่งออกเป็นสายพันธุ์ย่อยได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Chlamydia* และ *Chlamydophila* โดยในสายพันธุ์ *Chlamydophila* ประกอบไปด้วยสมาชิกที่อยู่ในตระกูลนี้ 7 ตัว ได้แก่ *C. abortus* และ *C. pecorum* พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม *C. psittaci* พบได้ในสัตว์ปีก *C. felis* พบได้ในแมว *C. caviae* พบได้ในหนูตะเภาและสุกร และ *C. pneumoniae* พบได้ในมนุษย์ โดยเชื้อ *C. psittaci* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แบบมีผนังเซลล์ ประกอบไปด้วย nucleoids แบบไม่มีเยื่อหุ้มแต่มีสารพันธุกรรมบรรจุอยู่ภายใน (Stewardson and Grayson, 2010; Harkinezhad et al., 2009) เชื้อแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแบบชนิดที่ต้องพึ่งอาศัยเซลล์ (obligate intracellular bacteria) เพราะไม่สามารถสังเคราะห์ ATP และ GTP ขึ้นมาใช้เองได้ เนื่องจากขาด cytochromes pigment ที่ช่วยในกระบวนการ electron transport โดยทั่วไปเชื้อ *C. psittaci* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.2-2.0 μm . ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของเชื้อ และสามารถแบ่งระยะการเจริญของเชื้อออกได้เป็น 3 ระยะ คือ ระยะ elementary body (EB) หรือระยะ infectious form ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อ *C. psittaci* เข้าไปยึดเกาะกับผนังเซลล์ของโฮสต์ และเข้าสู่โฮสต์เซลล์โดยกระบวนการ endocytosis โดยเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในระยะนี้จะมีลักษณะรูปร่างทรงกลมขนาดประมาณ 0.2-0.3 μm . ระยะต่อมาคือระยะ reticulate body (RB) หรือระยะ non-infectious ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อ *C. psittaci* อาศัยอยู่ภายใน cytoplasm ของโฮสต์เซลล์เรียบร้อยแล้ว โดยเชื้อ *C. psittaci* จะมีขนาดใหญ่ขึ้นโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-2.0 μm และแบ่งตัวแบบ binary fission และระยะสุดท้ายคือระยะ intermediate body (IB) ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาสั้นๆ ภายหลังจากการแบ่งตัวแบบ binary fission เรียบร้อยแล้ว เพื่อรอที่จะพัฒนาไปเป็นระยะ EB และส่งออกไปยังเซลล์เป้าหมายอื่นต่อไป (Anderson and Vanrompay, 2008; Vanrompay et al., 1995)

เนื่องจากเชื้อ *C. psittaci* มีผนังเซลล์ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน 2 ชั้น ได้แก่ major outer membrane (MOMP) และ minor protein เหมือนกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งเชื้อ *C. psittaci* ออกเป็น serovars ต่างๆ ได้โดยอาศัยคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนที่แตกต่างกันของ MOMP ได้เป็น 8 serovars ประกอบไปด้วย serovar A, B, C, D, E, F, WC และ M56 อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามาใช้เพิ่ม

มากขึ้นโดยพิจารณาที่ความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ที่ยื่น outer membrane protein A (*ompA*) ซึ่งสามารถแบ่งเชื้อ *C. psittaci* ออกเป็น genotype ต่างๆกันได้ทั้งหมด 9 genotype คือ A, B, C, D, E, F, G, H และ E/B โดยที่แต่ละ serovars หรือแต่ละ genotype มีความจำเพาะพบได้ในสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น serovar A พบได้ทั่วไปในนกกลุ่ม *Psittiformes* ในขณะที่ serovar B พบได้ในนกกลุ่ม *Columbiformes* เช่น นกพิราบ หรือนกเขา เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *C. psittaci* 6 serovars หรือ 7 genotype สามารถพบและก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ปีกได้เกือบทุกชนิดยกเว้น serovar WC หรือ genotype G ที่ก่อโรคเฉพาะในวัวและ serovar M56 หรือ genotype H ที่ก่อโรคเฉพาะในหนู (Stewardson and Grayson, 2010; Anderson and Vanrompay, 2008; Vanrompay et al., 1995)

โรค psittacosis นี้ได้ถูกกล่าวถึงเป็นครั้งแรกในปี 1879 โดยหมอชาวสวิสเซอร์แลนด์ชื่อ Jacob Ritter ซึ่งเขาได้รายงานเกี่ยวกับกลุ่มอาการที่พบในผู้ป่วยเจ็ดราย โดยผู้ป่วยสามรายเสียชีวิต และจากการสืบสวนโรคพบว่านกน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการระบาดของโรค (Harris and Williams, 1985) ต่อมาในปี 1893 ที่ประเทศฝรั่งเศส Morange ได้รายงานเกี่ยวกับกลุ่มอาการในคนที่ติดเชื้อจากนกแก้วโดยแสดงอาการคล้ายผู้ป่วยด้วยโรคไขหวัดใหญ่ ร่วมกับอาการผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ และตั้งชื่อโรคนี้ว่า psittacosis ในช่วงปี 1929-1930 เชื้อ *C. psittaci* ได้แพร่ระบาดไปทั่วทั้งทวีปยุโรปและอเมริกา (Pospischil, 2009) ซึ่งในช่วงแรกของการแพร่ระบาดนั้นพบว่านกในกลุ่ม *Psittiformes* คือสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาด จนกระทั่งในปี 1932 ได้มีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *C. psittaci* จากไกขึ้นเป็นครั้งแรก (Verminnen et al., 2008) และในปี 1939 ที่ประเทศแอฟริกาใต้และเป็นครั้งแรกที่สามารถแยกเชื้อ *C. psittaci* ได้จากนกพิราบ (Anderson and Vanrompay, 2008) ต่อมาในปี 1942 Smadel และคณะ (1943) ได้รายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *C. psittaci* ขึ้นเป็นครั้งแรกจากนกพิราบที่ New York ประเทศสหรัฐอเมริกา ตามมาด้วยรายงานผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *C. psittaci* จากเป็ดในปี 1948 (Vanrompay et al., 1995) จนถึงปัจจุบันยังคงมีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *C. psittaci* อย่างต่อเนื่อง โดยมีรายงานจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *C. psittaci* จาก 24 ประเทศทั่วโลก ตั้งแต่ปี 1996-2007 เป็นจำนวนมากถึง 6,593 คน (Beekman and Vanrompay, 2009) หรือมีการประมาณการว่าในประเทศสหรัฐอเมริกาจะมีโอกาสพบผู้ป่วยติดเชื้อนี้ประมาณ 0.01 รายต่อทุกๆจำนวนประชากร 100,000 คน (Stewardson and Grayson, 2010) ในขณะที่สถานการณ์การระบาดของเชื้อ *C. psittaci* ในทวีปเอเชียพบว่ามีรายงานการระบาดในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน ออสเตรเลีย และล่าสุดมีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *C. psittaci* เป็นครั้งแรกที่ประเทศเวียดนาม (Cheng et al., 2013; DieuNgan et al., 2013; Matsui et al., 2008) โดยผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *C. psittaci* ส่วนมากพบว่ามีการสัมผัสนก หรืออุจจาระของนกมาก่อน (Rohde et al., 2010) โดยการติดเชื้อส่วนใหญ่จะเป็นการติดต่อผ่านทางหายใจคือผู้ป่วยได้รับเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ EB ที่ถูกขับปะปนออกมาพร้อมกับอุจจาระหรืออาจได้รับเชื้อผ่านทางสัมผัสโดยตรงกับสิ่งคัดหลั่งของนกที่ติดเชื้อ (Stewardson and Grayson, 2010) ซึ่งระยะเวลาของการติดเชื้อ *C. psittaci* ออกสู่สิ่งแวดล้อมจะแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด โดย

เช่น จากการทดลองให้เชื้อ *C. psittaci* แก่ลูกไก่อายุ 8 วัน ผ่านทาง intra-air-sac พบว่าลูกไก่ที่ได้รับเชื้อสามารถขับเชื้อแบคทีเรียปะปนออกมากับอุจจาระได้นานถึง 28 วัน (Takahashi et al., 1988)

ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวพบว่านกพิราบที่ติดเชื้อสามารถแพร่กระจายเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อมได้เป็นระยะเวลานาน ในขณะที่ข้อมูลทางด้านความทนทานของเชื้อ *C. psittaci* ในสิ่งแวดล้อมมีจำกัด ประกอบกับความนิยมในการเลี้ยงนกสวยงามที่นับวันจะเพิ่มมากขึ้นทำให้มีการนำเข้า-ส่งออกนกสวยงามต่างถิ่นเป็นจำนวนมาก (FAO, 2011) รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิโลกที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อเส้นทางการอพยพย้ายถิ่นของนกป่า (Reed et al., 2003) รวมไปถึงปัญหาประชากรนกพิราบที่นับวันจะทวีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Magnino et al., 2009) ปัจจัยต่างๆเหล่านี้มีส่วนช่วยเพิ่มโอกาสเสี่ยงของการแพร่กระจายเชื้อ *C. psittaci* ให้เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นการศึกษาสำรวจหาความชุกของเชื้อ *C. psittaci* ในนกพิราบและการศึกษาเกี่ยวกับความทนทานของตัวเชื้อ *C. psittaci* ในสิ่งแวดล้อมจึงเป็นสิ่งสำคัญเพราะนอกจากตัวเชื้อ *C. psittaci* จะก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขแล้ว ข้อมูลด้านการระบาดและความทนทานของเชื้อ *C. psittaci* ยังเป็นข้อมูลสำคัญที่ช่วยวางแผนเตรียมความพร้อมเพื่อลดความสูญเสียหากเกิดสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อนี้ขึ้นในประเทศไทย รวมถึงยังเป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับเชื้อนี้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์:

1. เพื่อสำรวจหาเชื้อ *C. psittaci* ในนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติและนกพิราบแข่งที่อาศัยอยู่ในเขตภาคกลาง
2. เพื่อถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ *C. psittaci* จากตัวอย่างที่เก็บได้จากนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติและนกพิราบแข่ง
3. เพื่อทดสอบความทนทานของเชื้อ *C. psittaci* สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยภายใต้อุณหภูมิต่างๆ

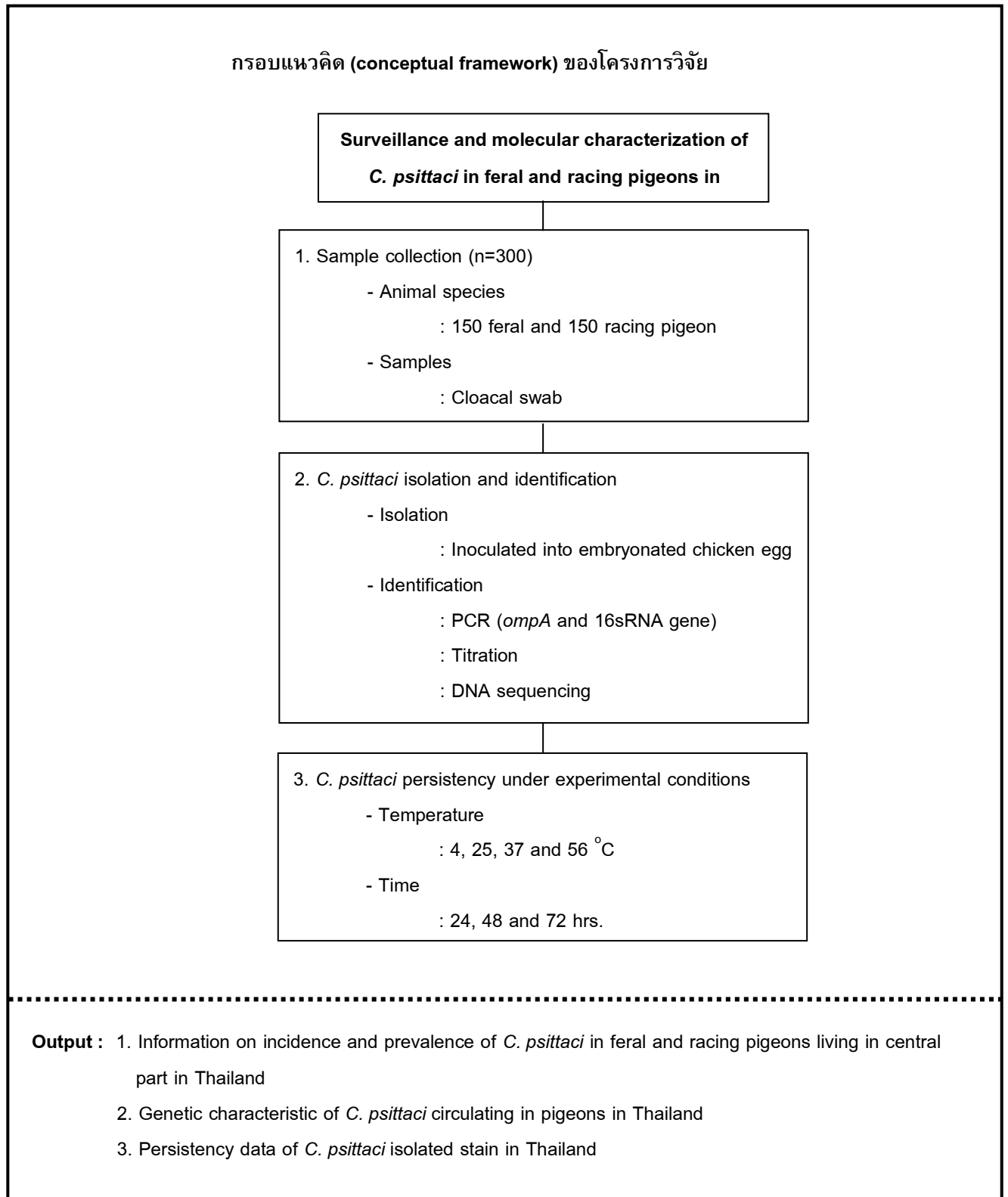
ระเบียบวิธีวิจัย :

ระเบียบวิธีวิจัยเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวแบ่งออกเป็น 2 ระยะ (ภาพที่ 1) ประกอบไปด้วย

ระยะที่ 1 การสำรวจและการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ *C. psittaci* ในนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติและนกพิราบแข่งที่อาศัยอยู่ในเขตภาคกลาง

ระยะที่ 2 การทดสอบความทนทานของเชื้อ *C. psittaci* สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยภายใต้อุณหภูมิต่างๆ

ภาพที่ 1 ขั้นตอนในการทำโครงการวิจัย



ระยะที่ 1 การสำรวจและการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ *C. psittaci* ในนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติและนกพิราบแข่งที่อาศัยอยู่ในเขตภาคกลาง

การเก็บตัวอย่างเพื่อการเพาะแยกเชื้อ *C. psittaci*

- สุ่มเก็บตัวอย่างจากนกพิราบอาศัยตามและนกพิราบแข่งที่อาศัยในเขตบริเวณภาคกลาง จำนวน 300 ตัวอย่าง ด้วยวิธี cloacal swab จากช่องทวารร่วม (cloaca) โดยเก็บ swab ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ sucrose-phosphate-glutamine (SPG) และมียาปฏิชีวนะ gentamicin ผสมอยู่
- Vortex ที่ความเร็วรอบสูงสุด ระยะเวลา 10 วินาที
- แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 0.3 มล. ที่ผ่านการ vortex แล้วนำไปตรวจหาพันธุกรรมของเชื้อโดยวิธี PCR ส่วนที่เหลือเก็บที่ -80 °C เพื่อรอนำไปเพาะแยกเชื้อที่ห้องปฏิบัติการต่อไป

การเพาะแยกเชื้อ

- นำตัวอย่างที่เก็บในตู้ -80 °C ปลอ่ยให้ละลายในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อให้ยาปฏิชีวนะที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SPG ออกฤทธิ์กำจัดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นออกไป
- เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 500 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 20 นาที
- เก็บส่วนใสที่อยู่บริเวณกลางหลอด และนำส่วนใสปริมาตร 0.2 ม.ล. pooled รวมกัน 5 swab/1 pooled sample
- ฉีด pooled sample ปริมาตร 0.5 มล. ลงในไข่ไก่ฟักอายุ 6-7 วัน เข้าทาง yolk sac
- ส่องไข่ไก่ฟักเป็นระยะเวลา 10 วัน หากไข่ไก่ฟักตายภายในช่วงระยะเวลา 1-3 วัน หลังการฉีดเชื้อ ให้ฉีดไข่ไก่ฟักซ้ำอีกครั้ง
- หากไข่ไก่ฟักตายในช่วงระยะเวลา 3-10 วัน หลังการฉีดเชื้อ ให้เก็บ yolk sac membrane ในรูปแบบ 10% suspension เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทาง PCR ต่อไป

การตรวจหาระดับความเข้มข้นของเชื้อ *C. psittaci*

- นำเชื้อ *C. psittaci* ที่แยกได้มาทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-5}
- นำตัวอย่างที่เจือจางในแต่ dilution ฉีดลงในไข่ไก่ฟักอายุ 7 วัน เข้าทาง yolk sac

- ส่องไข่ไก่ฟักเป็นระยะเวลา 10 วัน หากไข่ไก่ฟักตายหลังจากวันที่ 3 ให้เก็บ yolk sac membrane มาตรวจหาพิษสุนัขเชื้อมด้วยวิธี PCR
- จัดบันทึกผลการทดลอง และคำนวณหาค่า 50% egg lethal dose (ELD₅₀) ด้วยวิธีของ Reed & Muench (1938)

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีทาง PCR

- นำตัวอย่างที่ส่งสัยมา extraction โดยใช้ชุด DNA extraction kit
- ตรวจพิษสุนัขเชื้อม *C. psittaci* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *ompA* gene ของเชื้อม *C. psittaci* (Denamur et al., 1991) และยีน 16sRNA (Everett & Andersen, 1999)
- ตรวจดูผลที่ได้ภายใต้เครื่อง UV transillumination

การถอดรหัสและวิเคราะห์พันธุกรรมของเชื้อม *C. psittaci*

- ตัด agarose gel ตรงตำแหน่งยีนที่ต้องการ
- ทำความสะอาดเจลด้วยชุดทำความสะอาดเจล
- ส่งตัวอย่าง DNA เพื่อไปวิเคราะห์หาลำดับเบส
- นำผลลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่อยู่ใน Gene bank และวิเคราะห์ผลต่อไปด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MegaAlign (DNASTAR)
- นำเสนอความสัมพันธ์ของเชื้อม *C. psittaci* ในรูปของโครงสร้างสัมพันธ์ (phylogenetic tree)

ระยะที่ 2 การทดสอบความทนทานของเชื้อม *C. psittaci* สายพันธุ์ที่แยกได้ใน

ประเทศไทยภายใต้ภูมิต่าง ๆ

- นำเชื้อม *C. psittaci* ที่แยกได้ ปริมาตร 0.2 มล. แบ่งใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล.
- จากนั้นนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C, 37 °C และ 56 °C
- เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดคือ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ให้นำหลอดทดลองดังกล่าวออกเพื่อนำไป extract DNA และวิเคราะห์ต่อ ด้วยวิธี real-time PCR (Lee & Suarez, 2004)
- เฉพาะกลุ่มตัวอย่างที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ให้นำเชื้อม *C. psittaci* ส่วนที่เหลือมาฉีดลงในไข่ไก่ฟักเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการติดเชื้อที่หลงเหลืออยู่
- หากไข่ไก่ฟักตายในระยะเวลา 3-10 วันหลังจากฉีดเชื้อม เก็บ yolk sac membrane ในรูปแบบ 10% suspension เพื่อทำการตรวจ

วิเคราะห์ด้วยวิธีทาง PCR โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน *ompA* ของเชื้อ *C.psittaci*

ผลการวิจัย :

ระยะที่ 1 การสำรวจและการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ *C. psittaci* ในนกพิราบ ที่อาศัยตามธรรมชาติและนกพิราบแข่งที่อาศัยอยู่ในเขตภาคกลาง ผลการเก็บตัวอย่างเพื่อการเพาะแยกเชื้อ *C. psittaci*

ผลการเก็บตัวอย่างนกพิราบกลุ่มเป้าหมายจำนวนทั้งสิ้น 364 ตัวอย่าง ระหว่างช่วงเดือน มิถุนายน 2557 – มิถุนายน 2558 ประกอบด้วย นกพิราบ แข่ง จำนวน 150 ตัวอย่าง นกพิราบบ้านหรือนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติ จำนวน 214 ตัวอย่าง จากจังหวัดกรุงเทพมหานคร (220) , ชลบุรี (n=30), ลพบุรี (n=25) และนครปฐม (n=25) (ตารางที่ 1)

ผลการเพาะแยก การตรวจพิสูจน์ และการตรวจหาระดับความเข้มข้น ของเชื้อ *C. psittaci*

หลังจากฉีด pooled sample ลงในไข่ไก่ฟักเข้าที่บริเวณ yolk sac พบว่าตัวอย่างจากนกพิราบแข่งจำนวน 30 ตัวอย่าง (pooled sample) ให้ผลลบทั้งหมด ในขณะที่ตัวอย่างจากนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติให้ผลบวก 2 ตัวอย่าง ซึ่งตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกคิดเป็น 6.67% จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง (pooled sample) และตั้งชื่อตัวอย่างดังนี้ CP/TH/16 และ CP/TH20 ภายหลังการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของเชื้อ *C. psittaci* โดยให้ผลความเข้มข้นของเชื้ออยู่ที่ 3.2 และ 3.89 ELD₅₀/ml ตามลำดับ

ผลการถอดรหัสและวิเคราะห์พันธุกรรมของเชื้อ *C. psittaci*

ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ *C. psittaci* จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยได้ถอดรหัสพันธุกรรมบางส่วนของยีน *ompA* gene ซึ่งมีความยาวของลำดับ นิวคลีโอไทด์ 1,066 และ 1,058 เบส ตามลำดับ นำรหัสพันธุกรรมดังกล่าวมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ โดยเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของ *ompA* gene จากตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทยกับเชื้อ *C. psittaci* ที่มีการอ้างอิงในฐานข้อมูล (Genbank) ด้วยวิธี cluster analysis (ภาพที่ 2)

ผลการวิเคราะห์ % nucleotide identity ของยีน *ompA* ของเชื้อ *C. psittaci* ที่แยกได้จากนกพิราบในประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อ *C. psittaci* ที่มีการอ้างอิงในฐานข้อมูล พบว่ามี % nucleotide identity สูง (100%) กับเชื้อ

C. pisttaci ที่แยกได้จากไก่อรง ประเทศเบลเยียม (41A12) และเชื้อ *C. pisttaci* ที่แยกได้จากนกพิราบประเทศสหรัฐอเมริกา (CP3) โดยเชื้อ *C. pisttaci* ที่แยกได้จากนกพิราบในประเทศไทย เป็นเชื้อ *C. pisttaci* genotype B

ระยะที่ 2 การทดสอบความทนทานของเชื้อ *C. psittaci* สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยภายใต้อุณหภูมิต่าง ๆ

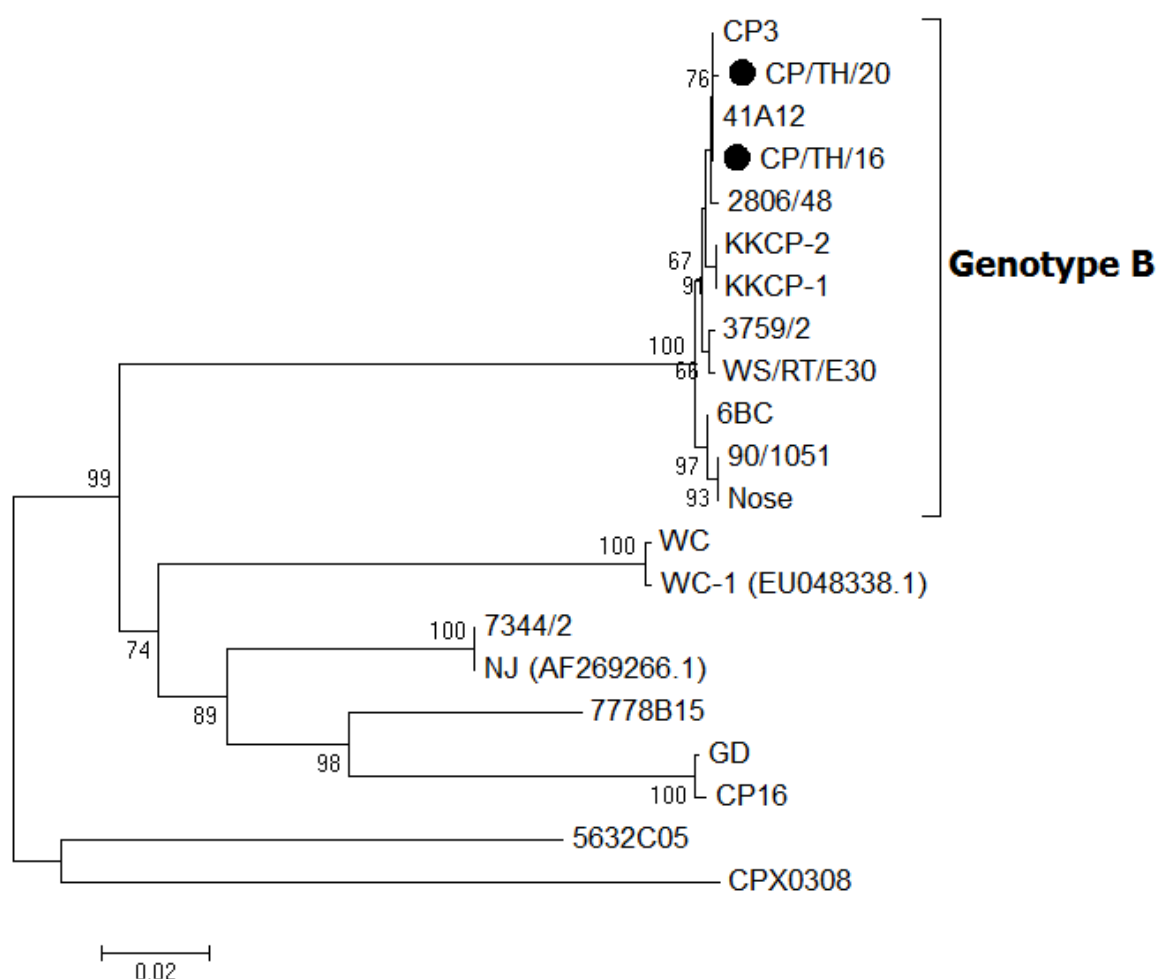
ผลการทดสอบความคงทนของเชื้อ *C. psittaci* โดยคัดเลือกตัวอย่างที่มีระดับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียสูงสุดมาทำการทดสอบ ได้แก่ ตัวอย่างเบอร์ CP/TH/20 ซึ่งในการทดสอบความทนทานนี้ได้ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำพบว่าเชื้อ *C. psittaci* สามารถอยู่ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นระยะเวลานานถึง 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) และเมื่อนำเชื้อ *C. psittaci* ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในแต่ละช่วงอุณหภูมิมานี้ดลงในไข่ไก่ฟักเพื่อตรวจสอบความสามารถในการติดเชื้อ *C. psittaci* พบว่าไข่ไก่ฟักตายในช่วงระยะเวลา 5-7 วัน และให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติ (มิ.ย. 57-มิ.ย. 58)

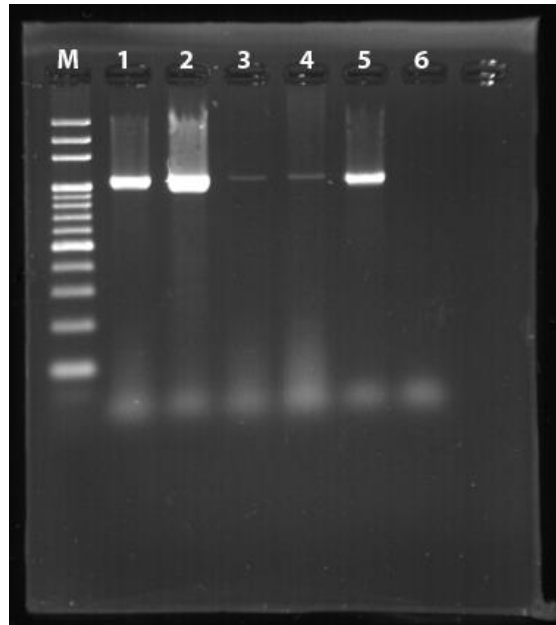
No. of pooled samples	Location	Virus isolation	PCR results
1	Chonburi	-	-
2	Chonburi	+	+
3	Chonburi	-	-
4	Chonburi	-	-
5	Chonburi	-	-
6	Chonburi	+	+
7	Nakorn pathum	+	-
8	Nakorn pathum	-	-
9	Nakorn pathum	-	-
10	Nakorn pathum	-	-
11	Nakorn pathum	-	-
12	Bangkok	-	-
13	Bangkok	-	-
14	Bangkok	-	-
15	Bangkok	-	-
16	Bangkok	-	-
17	Bangkok	-	-
18	Bangkok	-	-
19	Bangkok	-	-
20	Bangkok	-	-
21	Bangkok	-	-
22	Bangkok	-	-
23	Bangkok	-	-
24	Bangkok	-	-
25	Bangkok	-	-
26	Lopburi	-	-
27	Lopburi	-	-
28	Lopburi	+	-
29	Lopburi	+	-
30	Lopburi	-	-

ตารางที่ 2 การทดสอบความคงทนของเชื้อ *C. psittaci* ที่อุณหภูมิต่างๆ

Storage temperatures (°C)	Log copy number/ml		
	24 hr	48 hr	72 hr
4	11.31±4.45	6.77±6.20	5.75±4.98
25	4.04±4.0	6.27±3.73	2.12±1.18
37	8.95±6.55	6.03±2.51	3.34±2.12
56	8.56±6.4	10.42±12.29	11.34±2.83



ภาพที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Phylogenetic analysis) ของยีน *ompA* ของเชื้อ *C. psittaci* ที่แยกได้จากนกพิราบที่อาศัยในประเทศไทย ตัวเลขแสดงค่า % bootstrap และวงกลมแสดงเชื้อ *C. psittaci* ที่แยกได้ในการศึกษา



ภาพที่ 3 แสดงผล PCR ของ 10% yolk sac membrane suspension ของกลุ่มตัวอย่างทดลอง ภายใต้อุณหภูมิต่างกัน ที่ระยะเวลา incubate 72 ชั่วโมง โดยใช้ primer ที่ความจำเพาะต่อยีน *ompA* ของเชื้อ *C. psittaci* lane M: marker ขนาด 100 bp; 1: ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C; 2: ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 25°C; 3: ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C; 4: ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 56°C; 5: positive control (1021 bp), 6: negative control

สรุปและอภิปรายผล:

การวิจัยครั้งนี้ได้คัดเลือกประชากรนกพิราบเป้าหมาย ได้แก่ ฟาร์มนกพิราบแข่งจำนวน 3 ฟาร์ม ในเขตจังหวัดกรุงเทพมหานคร และนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติในพื้นที่ภาคกลาง หรือบริเวณแหล่งชุมชนที่มีประชากรนกพิราบหนาแน่น ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้สามารถเพาะแยกเชื้อและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *C. psittaci* ได้จากนกพิราบที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติในจังหวัดชลบุรีจำนวน 2 ตัวอย่าง จากจำนวน pooled samples 30 ตัวอย่าง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความชุกของการติดเชื้อ *C. psittaci* เท่ากับ 6.7% ซึ่งสอดคล้องใกล้เคียงกันกับการศึกษาของ Stenzel และคณะ (2014) ที่พบว่าเปอร์เซ็นต์ความชุกของการติดเชื้อ *C. psittaci* ในนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติในประเทศโปแลนด์คิดเป็น 7.6% และในประเทศไทยที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Sariya และคณะ (2015) พบว่าเปอร์เซ็นต์ความชุกของการติดเชื้อ *C. psittaci* ในนกพิราบคิดเป็น 10.8% โดยปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบทำให้เกิดความแตกต่างกันระหว่างเปอร์เซ็นต์ความชุกในการศึกษานี้กับการศึกษาก่อนหน้าคือน่าจะมีผลกระทบมาจากภาวะความเครียด ซึ่งภาวะความเครียดมีสาเหตุใ้มนำหลายประการ เช่น การเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูผสมพันธุ์ หรือ ความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหารบริเวณที่นกพิราบอาศัยอยู่ เป็นต้น (Stenzel et al., 2014) ในขณะที่การศึกษานี้กลุ่มตัวอย่างที่เก็บมาจากนกพิราบแข่งให้ผลการเพาะแยกเชื้อ

เป็นลบทั้งหมด ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Ling และคณะ (2015) ที่สามารถเพาะแยกเชื้อ *C. psittaci* ได้จากนกพิราบแข่งในประเทศจีน สาเหตุที่ทำให้เกิดความแตกต่างกันระหว่างผล การศึกษานี้ น่าจะมีสาเหตุมาจากจำนวนประชากรนกพิราบ โดยในประเทศจีนกีฬาแข่งนกพิราบ ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากอีกทั้งประเทศจีนยังเป็นผู้นำทางด้านกีฬาประเภทนี้ในระดับโลก เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศไทยที่มีจำนวนประชากรนกพิราบแข่งในปริมาณที่น้อยกว่า (Smith, 2012)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Phylogenetic analysis) ของยีน *ompA* ของเชื้อ *C. psittaci* ที่แยกได้จากนกพิราบที่อาศัยในประเทศไทยพบว่ามี ความใกล้เคียงกัน (100% identity) กับเชื้อ *C. psittaci* strain 41A12 และ CP3 ที่แยกได้จากไก่วงที่ประเทศเบลเยียมในปี 2005 (Geens et al., 2005) และ นกพิราบที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 1958 (Bush & Everett, 2001) ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์บ่งบอกว่าเชื้อ *C. psittaci* ที่แยกได้จากนกพิราบที่อาศัยในประเทศไทยทั้ง 2 ตัว เป็น *C. psittaci* genotype B ซึ่งเป็น genotype ที่พบได้บ่อยในนกพิราบ (Geigenfeind et al., 2012; Magnino et al., 2009) และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้วิธี neighbor-joining algorithm แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *C. psittaci* genotype B ที่แยกได้จากนกพิราบที่อาศัยในประเทศไทยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ คล้ายคลึงกันกับ เชื้อ *C. psittaci* genotype B ที่แยกได้ในประเทศอื่นๆ บ่งบอกได้ว่านกพิราบ เป็นโฮสต์ที่สำคัญในการแพร่กระจายเชื้อ *C. psittaci* genotype B

ผลการทดสอบความทนทานของเชื้อ *C. psittaci* ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ได้แก่ 4, 25, 37 และ 56 °C โดยการเลือกช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบแตกต่างกันนั้นดำเนินการ ภายใต้พื้นฐานข้อมูลสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย (Climatological Group, 2012) รวมไปถึงระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบในครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งการคัดเลือกช่วงระยะเวลาดังกล่าวพิจารณาจากข้อมูลพื้นฐานของระยะเวลาที่ เชื้อ *C. psittaci* ใช้ในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ซึ่งระยะเวลาจะแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ แต่โดยเฉลี่ยพบว่าอยู่ที่ 24-72 ชั่วโมง (Bastidas et al., 2013) ซึ่งจากผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่าเชื้อ *C. psittaci* ที่แยกได้ในประเทศไทยสามารถมีชีวิตอยู่ภายใต้อุณหภูมิ 56 °C ได้เป็น ระยะเวลาจนถึง 72 ชั่วโมง โดยสาเหตุที่ทำให้เชื้อ *C. psittaci* สามารถคงอยู่ที่อุณหภูมิสูงได้ เป็นระยะเวลายาวนานเนื่องมาจากเชื้อ *C. psittaci* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ผนังเซลล์ประกอบ ไปด้วย glycolipid ซึ่งมีส่วนช่วยป้องกันตัวเชื้อจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Kramer et al., 2006) ประกอบกับการที่ผนังเซลล์ของเชื้อ *C. psittaci* มียีน *htrA* ซึ่งทำหน้าที่คอยช่วยเหลือให้เชื้อ แบคทีเรียสามารถคงอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมที่อุณหภูมิสูง (Patel et al., 2014) โดยผลการทดสอบ ความทนทานของเชื้อ *C. psittaci* ที่ได้จากการศึกษารั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Tjam และ คณะ (1984) ที่พบว่าเชื้อ *Chlamydia trachomatis* สามารถมีชีวิตโดยปนเปื้อนอยู่ในอุปกรณ์ ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4 °C ได้นานถึง 48 ชั่วโมง และจากการศึกษาของ Kramer และคณะ (2006) พบว่าเชื้อ *C. psittaci* สามารถมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่อุณหภูมิ 4 °C ได้นานถึง 15 วัน แต่

อย่างไรก็ตามผลของการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาภายใต้สภาวะในห้องปฏิบัติการที่ยังไม่ได้ นำปัจจัยเรื่องความชื้นเข้ามาพิจารณาร่วมด้วย

โดยสรุปการสำรวจอุบัติการณ์ของเชื้อ *Chlamydophila psittaci* ในนกพิราบที่อาศัย ตามธรรมชาติและนกพิราบแข่งที่อาศัยในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยในระหว่างปี พ.ศ. 2557-2558 มีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บตัวอย่างจากนกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติ และนกพิราบ แข่งมาเพาะแยกและตรวจพิสูจน์เชื้อด้วยวิธี PCR ซึ่งสามารถทำให้ทราบถึงอุบัติการณ์การติดเชื้อ *C. psittaci* ในนกพิราบ ทราบสายพันธุ์และทราบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *C. psittaci* ที่ระบาดในประเทศไทย ผลการวิจัยพบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อ *C. psittaci* ได้จากนกพิราบที่ อาศัยตามธรรมชาติ จำนวน 2 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง (pooled sample) คิดเป็น 6.7% ซึ่งแสดงให้เห็นว่านกพิราบที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติของประเทศไทยมีการติดเชื้อ *C. psittaci* วัตถุประสงค์ที่สองของการวิจัยนี้คือเพื่อทดสอบความทนทานของเชื้อ *C. psittaci* สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย เพื่อให้ทราบถึงความทนทานของเชื้อในสภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ผลการวิจัยพบว่าเชื้อ *C. psittaci* สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยสามารถมีชีวิตอยู่ภายใต้ อุณหภูมิ 56°C ได้นานถึง 72 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *C. psittaci* มีความคงทนต่อสภาวะ อากาศร้อนภายในประเทศไทย

ดังนั้นผลการวิจัยในครั้งนี้สนับสนุนข้อสมมุติฐานที่ว่าเชื้อ *C. psittaci* มีการระบาดใน ประชากรนกพิราบที่อาศัยอยู่ในประเทศไทย ประกอบกับข้อมูลทางด้านความทนทานของเชื้อ *C. psittaci* ในสิ่งแวดล้อม การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ การเปรียบเทียบพันธุกรรมกรรมของเชื้อ *C. psittaci* มีประโยชน์ทำให้ทราบชนิดสายพันธุ์ การติดเชื้อ *C. psittaci* ในประชากรนกพิราบ ทราบข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ และทราบข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาถึงที่มาของเชื้อ ช่วย ให้สามารถดำเนินการวางแผนควบคุม ป้องกัน การแพร่กระจายของเชื้อทั้งในประชากร นกพิราบ และป้องกันการเกิดโรคระหว่างสัตว์สู่คนได้

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต :

1. การศึกษาครั้งนี้ได้จำกัดขอบเขตของการศึกษาเฉพาะพื้นที่ในเขตบริเวณภาคกลาง เท่านั้น ซึ่งพื้นที่ที่ทำการศึกษาอาจจะยังมีพื้นที่ไม่ครอบคลุมเพียงพอ
2. การศึกษาความทนทานของเชื้อ *C. psittaci* ควรจำปัจจัยทางด้านความชื้นเข้ามา พิจารณาร่วมด้วย และควรเพิ่มระยะเวลาการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ ให้นานมากยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม:

- Anderson, A., and D. Vanrompay, 2008: Avian Chlamydiosis (Psittacosis, Ornithosis). In: Fadly, A. M., J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. E. Swayne, and Y. M. Saif (eds), *Disease of Poultry* 12nd Edn, pp. 971-988. Iowa State University Press, Ames, IA
- Bastidas, R. J., C. A. Elwell, J. N. Engel, and R. H. Valdivia, 2013: Chlamydial intracellular survival strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3, a010256.
- Beeckman, D. S., and D. C. Vanrompay, 2009: Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect.* 15, 11-17.
- Bush, R. M., and K. D. Everett, 2001: Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51, 203-220.
- Cheng, Y. J., K. Y. Lin, C. C. Chen, Y. L. Huang, C. E. Liu, and S. Y. Li, 2013: Zoonotic atypical pneumonia due to *Chlamydophila psittaci*: first reported psittacosis case in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 112, 430-3.
- Climatological Group, 2012: Meteorological Development Bureau Meteorological Department. [WWW Document]. URL http://www.tmd.go.th/en/archive/Thailand_climate.pdf (accessed on 15 December 2015).
- Denamur, E., C. Sayada, A. Souriau, J. Orfila, A. Rodolakis, and J. Elion, 1991: Restriction pattern of the major outer membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *C.psittaci*. *J Gen Microbiol.* 137, 2525-30.
- Dickx, V., D. S. Beeckman, L. Dossche, P. Tavernier, and D. Vanrompay, 2010: *Chlamydophila psittaci* in homing and feral pigeons and zoonotic transmission. *J Med Microbiol.* 59, 1348-1353.
- Dieu Ngan, T. T., S. Thomas, M. Larsson, P. Horby, N. N. Diep, V. Q. Dat, N. V. Trung, N. H. Ha, H. Rogier van, N. Van Kinh, and H. F. Wertheim, 2013: First report of human psittacosis in Vietnam. *J Infect.* 66, 461- 464.
- Everett, K. D., and A. A. Andersen, 1999: Identification of nine species of the *Chlamydiaceae* using PCR-RFLP. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 803-13.
- Geens, T., A. Desplanques, M. Van Loock, B. M. Bonner, E. F. Kaleta, S. Magnino, A. A. Andersen, K. D. Everett, and D. Vanrompay, 2005: Sequencing of the *Chlamydophila psittaci ompA* gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. *J Clin Microbiol.* 43, 2456-2461.

- Geigenfeind, I., D. Vanrompay, and D. Haag-Wackernagel, 2012: Prevalence of *Chlamydia psittaci* in the feral pigeon population of Basel, Switzerland. *J Med Microbiol.* 61, 261-265.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2011: International trade in wild birds, and elated bird movements in Latin America and the Caribbean. Rome: Office of Knowledge Exchange, Research and Extension. 1-25.
- Haag-Wackernagel, D., and H. Moch, 2004: Health hazards posed by feral pigeons. *J Infect.* 48, 307-313.
- Horn, M., A. Collingro, S. Schmitz-Esser, C. L. Beier, U. Purkhold, B. Fartmann, P. Brandt, G. J. Nyakatura, M. Droege, D. Frishman, T. Rattei, H. W. Mewes, and M. Wagner, 2004: Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science.* 304, 728-730.
- Harkinezhad, T., T. Geens and D. Vanrompay, 2009: *Chlamydophila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. *Veterinary microbiology*, 135, 68-77.
- Harris, R. L. and T. W. Williams, Jr., 1985: "Contribution to the Question of Pneumotyphus": a discussion of the original article by J. Ritter in 1880. *Reviews of infectious diseases*, 7, 119- 122.
- Kaleta, E. F., and E. M. Taday, 2003: Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.* 32, 435-461.
- Kramer, A., I. Schwebke, and G. Kampf, 2006: How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 6, 130.
- Lee, C. W., and D. L. Suarez, 2004: Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *J Virol Methods.* 119, 151-158.
- Ling, Y., H. Chen, X. Chen, X. Yang, J. Yang, P. M. Bavoil, and C. He, 2015: Epidemiology of *Chlamydia psittaci* Infection in Racing Pigeons and Pigeon Fanciers in Beijing, China. *Zoonoses Public Health.* 62. 401-406.
- Magnino, S., D. Haag-Wackernagel, I. Geigenfeind, S. Helmecke, A. Dovc, E. Prukner-Radovcic, E. Residbegovic, V. Ilieski, K. Laroucau, M. Donati, S. Martinov, and E. F. Kaleta, 2009: Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. *Vet Microbiol.* 135, 54-67.
- Matsui, T., K. Nakashima, T. Ohyama, J. Kobayashi, Y. Arima, T. Kishimoto, M. Ogawa, Y. Cai, S. Shiga, S. Ando, I. Kurane, K. Tabara, A. Itagaki, N. Nitta, H. Fukushi,

- A. Matsumoto, and N. Okabe, 2008: An outbreak of psittacosis in a bird park in Japan. *Epidemiol Infect.* 136, 492- 495.
- Patel, P., L. De Boer, P. Timms, and W. M. Huston, 2014: Evidence of a conserved role for *Chlamydia* HtrA in the replication phase of the chlamydial developmental cycle. *Microbes Infect.* 16, 690-694.
- Pospischil, A., 2009: From disease to etiology: historical aspects of *Chlamydia*-related diseases in animals and humans. *Drugs of today*, 45 Suppl B, 141-146.
- Reed, K. D., J. K. Meece, J. S. Henkel and S. K. Shukla, 2003: Birds, migration and emerging zoonoses: west nile virus, lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clinical medicine & research*, 1, 5-12.
- Reed, L.J., and H.A. Muench, 1938: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493-497.
- Rohde, G., E. Straube, A. Essig, P. Reinhold, and K. Sachse, 2010: Chlamydial zoonoses. *Dtsch Arztebl Int.* 107. 174-180.
- Smadel, J. E., M. J. Wall and A. Gregg, 1943: An Outbreak of Psittacosis in Pigeons, Involving the Production of Inclusion Bodies, and Transfer of the Disease to Man. *The Journal of experimental medicine*, 78, 189-204.
- Sariya, L., P. Prompiram, S. Tangsudjai, K. Poltep, T. Chamsai, C. Mongkolphan, K. Rattanaivibul, and V. Sakdajivachareon, 2015: Detection and characterization of *Chlamydophila psittaci* in asymptomatic feral pigeons (*Columba livia domestica*) in central Thailand. *Asian Pac J Trop Med.* 8, 94-97.
- Smith, T, 2012: British Homing World. Available at: <http://www.rpra.org/wp-content/uploads/2012/05/China-No1-in-the-Racing-Pigeon-World.pdf> (accessed on 2 January 2016).
- Stenzel, T., D. Pestka, and D. Choszcz, 2014: The prevalence and genetic characterization of *Chlamydia psittaci* from domestic and feral pigeons in Poland and the correlation between infection rate and incidence of pigeon circovirus. *Poult Sci.* 93, 3009-3016.
- Stewardson, A. J. and M. L. Grayson, 2010: Psittacosis. *Infect Dis Clin North Am*, 24, 7-25.
- Takahashi, T., I. Takashima, and N. Hashimoto. 1988. Shedding and transmission of *Chlamydia psittaci* in experimentally infected chickens. *Avian Dis.* 32, 650-8.
- Tjiam, K. H., B. Y. van Heijst, J. C. de Roo, A. de Beer, T. van Joost, M. F. Michel, and E. Stolz, 1984: Survival of *Chlamydia trachomatis* in different transport media and at different temperatures: diagnostic implications. *Br J Vener Dis.* 60, 92-94.

- Verminnen, K., B. Duquenne, D. De Keukeleire, B. Duim, Y. Pannekoek, L. Braeckman and D. Vanrompay, 2008: Evaluation of a *Chlamydophila psittaci* infection diagnostic platform for zoonotic risk assessment. *Journal of clinical microbiology*, 46, 281-285.
- Vanrompay, D., T. Harkinezhad, M. van de Walle, D. Beeckman, C. van Droogenbroeck, K. Verminnen, R. Leten, A. Martel and K. Cauwerts, 2007: *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerging infectious diseases*, 13, 1108-1110.
- Vanrompay, D., R. Ducatelle and F. Haesebrouck, 1995: *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Veterinary microbiology*, 45, 93-119

ภาคผนวก ก

รายละเอียดพันธุกรรมของยีน *ompA* ของเชื้อ *C. pisttaci* ที่แยกได้จากนกพิราบในประเทศไทย
จำนวน 2 สาย

1. CP/TH/16

Contig Length: 1446 bases
Average Length/Sequence: 1153 bases
Total Sequence Length: 3459 bases

5':AATCGGCATTATTGTTTGCCGCTACGGGTTCCGCTCTCTCCTTACAAGCCT
TGCCTGTAGGGAACCCAGCTGAACCAAGTTTATTAATCGATGGCACTATGTGGGAAG
GTGCTTCAGGAGATCCTTGCGATCCTTGCGCTACTTGGTGTGACGCCATTAGCATCC
GCGCAGGATACTACGGAGATTATGTTTTCGATCGTGTATTAAGTTGATGTGAATAA
AACTTTTAGCGGCATGGCTGCAACTCCTACGCAGGCTACAGGTAACGCAAGTAATAC
TAATCAGCCAGAAGCAAATGGCAGACCGAACATCGCTTACGGAAGGCATATGCAAG
ATGCAGAGTGGTTTTCAAATGCAGCCTTCCTAGCCTTAAACATTTGGGATCGCTTCG
ACATTTTCTGCACCTTAGGGGCATCCAATGGATACTTCAAATCAAGTTCGGCTGCATT
CAACTTGTTGGGTTAATAGGGTTTTAGCTACCAACTCAACCTCTACCGATCTTCCA
ATGCAACTTCCTAACGTAGGCATTACCCAAGGTGTTGTGGAATTTTATACAGACACAT
CATTTTCTTGGAGCGTAGGTGCACGTGGAGCTTTATGGGAATGTGGTTGTGCAACTT
TAGGAGCTGAGTTCCAATACGCTCAATCTAATCCTAAGATTGAAATACTCAACGTCAC
TTCAAGCCCAGCACAAATTTGTGATTCACAAACCAAGAGGCTATAAAGGAGCTAGCTC
GAATTTTCCTTTACCTATAACGGCTGGAACAACAGAAGCTACAGACACCAAATCAGC
TACAATTAATACCATGAATGGCAAGTAGGCCTCGCCCTGTCTTACAGATTGAATATG
CTTGTTCCATATATTGGCGTAAACTGGTCAAGAGCAACTTTTGATGCTGATACTATCC
GCATTGCTCAACCTAAATTAATCGGAGATTCTTAACATTACTACATGGAACCCAAG
CCTTCTAGGATCAACCACTGCTTTGCCAATAATAGTGGTAAGGATGTTCTATCTGAT
GTCTTGCAAATTGCTTCGATTCAGATCAACAAAATGAA:3'

2. CP/TH/20

Contig Length: 1446 bases
Average Length/Sequence: 1137 bases
Total Sequence Length: 3412 bases

5':GGCATTATGTTTGCCGCTACGGGTYCCGCTCTCTCCTTACAAGCCTTGCC
TGTAGGGAACCCAGCTGAACCAAGTTTATTAATCGATGGCACTATGTGGGAAGGTGC
TTCAGGAGATCCTTGCGATCCTTGCGCTACTTGGTGTGACGCCATTAGCATCCGCGC
AGGATACTACGGAGATTATGTTTTCGATCGTGTATTAAGTTGATGTGAATAAACT

TTTAGCGGCATGGCTGCAACTCCTACGCAGGCTACAGGTAACGCAAGTAATACTAAT
CAGCCAGAAGCAAATGGCAGACCGAACATCGCTTACGGAAGGCATATGCAAGATGC
AGAGTGGTTTTCAAATGCAGCCTTCCTAGCCTTAAACATTTGGGATCGCTTCGACATT
TTCTGCACCTTAGGGGCATCCAATGGATACTTCAAATCAAGTTCGGCTGCATTCAAC
TTGGTTGGGTTAATAGGGTTTTTCAGCTACCAACTCAACCTCTACCGATCTTCCAATGC
AACTTCCTAACGTAGGCATTACCCAAGGTGTTGTGGAATTTTATACAGACACATCATT
TTCTTGGAGCGTAGGTGCACGTGGAGCTTTATGGGAATGTGGTTGTGCAACTTTAGG
AGCTGAGTTCCAATACGCTCAATCTAATCCTAAGATTGAAATACTCAACGTCACTTCA
AGCCCAGCACAAATTTGTGATTCACAAACCAAGAGGCTATAAAGGAGCTAGCTCGAAT
TTTCCTTTACCTATAACGGCTGGAACAACAGAAGCTACAGACACCAAATCAGCTACA
ATTAAATACCATGAATGGCAAGTAGGCCTCGCCCTGTCTTACAGATTGAATATGCTTG
TTCCATATATTGGCGTAAACTGGTCAAGAGCAACTTTTGATGCTGATACTATCCGCAT
TGCTCAACCTAAATTAAAATCGGAGATTCTTAACATTACTACATGGAACCCAAGCCTT
CTAGGATCAACCACTGCTTTGCCCAATAATAGTGGTAAGGATGTTCTATCTGATGTCT
TGCAAATTGCTTCGATTCAGATCAACAAAA:3'

ภาคผนวก ข

ภาพกิจกรรมและรายละเอียดตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง

1. ฟาร์มนกพิราบแข่งในจำนวน 3 ฟาร์ม ในพื้นที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้แก่ เขตธนบุรี และ เขตบางคอแหลม โดยลักษณะการเลี้ยงจะเลี้ยงอยู่ภายในอาคารพานิชย์ความสูง 3-4 ชั้น

2. นกพิราบที่อาศัยตามธรรมชาติ

: พื้นที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร บริเวณวัดวัดระฆังโฆสิตารามวรมหาวิหารและวันยานนาวา

: จังหวัดนครปฐม บริเวณศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์

: จังหวัดชลบุรี บริเวณสถานีเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ วัดสันติภักดิ์ มหาวิทยาลัยบูรพา

: จังหวัดลพบุรี บริเวณเขตอำเภอเมือง

ภาพแสดงลักษณะภายในกรงเลี้ยงของฟาร์มนกพิราบแข่งฟาร์มที่ 1 เขตธนบุรี



ภาพแสดงลักษณะของกรงทางด้านนอก



ภาพแสดงลักษณะภายนอกอาคาร





ภาพแสดงพื้นที่ภายในกรงของฟาร์มนกพิราบแข่งฟาร์มที่ 2 เขตบางคอแหลม





ภาพแสดงพื้นที่ภายในกรงของฟาร์มนกพิราบแข่งฟาร์มที่ 3 เขตบางคอแหลม







ภาพแสดงลักษณะที่ پایติดขาของนกพิราบแข่งที่มาจากประเทศอังกฤษ (GB: Great Britain)



ภาพแสดงลักษณะที่ پایติดขาของนกพิราบแข่งที่มาจากประเทศฝรั่งเศส (FR: France)



ภาพแสดงกรงชนส่งนกพิราบแข่ง





ภาพแสดงการเก็บตัวอย่าง cloacal swab





ภาคผนวก ค

1. การนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงาน International Conference on Veterinary Science 2014 (ICVS 2014) ระหว่างวันที่ 16-18 ธันวาคม 2557
2. การนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงาน The 15th Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC 2016) ระหว่างวันที่ 20-22 เมษายน 2559