การตรวจหาโรคไข้เห็บโดยใช้วิธี PCR ในโคนมพันธุ์ TMZ

Detection of Tick-born Disease with Polymerase Chain Reaction (PCR) in Dairy TMZ

จักริน ศรีวโรทัย (Jakarin Sriwarothai)[1] มนต์ชัย ดวงจินดา (Monchai Duangjinda)[2]*
วิโรจน์ ภัทรจินดา (Virote Pattarajinda)[2] ยุพิน ผาสุข (Yupin Phasuk)[2]
อนันตชัย ชัยยศวิทยากุล (Anantachai Chaiyotwittayakun)[3] ยวงยศ จินดาทะจักร (Youngyot Jindatajak)[4]

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ *Anaplasma maginale*, *Babesia bovis* และ *Babesia bigemina* โดยใช้วิธีฟิล์มเลือดและวิธี PCR พร้อมทั้งเปรียบเทียบตำแหน่งของการเก็บตัวอย่างเลือดต่อเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดโคจากเส้นเลือดที่คอและโคนหางจากโคนมพันธุ์ TMZ (75% Holstein Fresian) จำนวน 200 ตัวที่ไม่ได้รับยาฆ่าพยาธิในเลือดเป็นเวลา 3 เดือน แบ่งตัวอย่างเลือดไปตรวจหาเชื้อ *A. maginale*, *B. bovis* และ *B. bigemina* 2 วิธี คือ วิธีฟิล์มเลือดและวิธี PCR ผลการศึกษาพบว่า การตรวจหาเชื้อ *A. maginale*, *B. bovis* และ *B. bigemina* ด้วยวิธี PCR มีความถูกต้องแม่นยำมากกว่าการตรวจด้วยวิธีฟิล์มเลือด ($p<0.05$) และไม่พบความแตกต่างของตำแหน่งของการเก็บตัวอย่างเลือด ต่อเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ ($p>0.05$) ผลจากการทำ serial dilution พบว่าเทคนิค PCR สามารถตรวจพบเชื้อได้หาก DNA ของเชื้อ *A. maginale* หรือ *B. bigemina* ที่ระดับ 0.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรขึ้นไป ส่วน *B. bovis* ต้องมี DNA ของเชื้อเข้มข้น 0.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

Abstract

The objectives of this research are to compare the detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* by blood smearing and PCR technique; and to compare the blood-collection location with the infection percent. All cattle used in this study have not been treated by Anti-blood parasite for at least 3 months. Blood samples from jugular vein and tail vein were investigated by blood smear and PCR technique for *A. maginale*, *B. bovis* and *B. bigemina*. PCR technique has higher sensitivity and accuracy compared to blood smear technique ($p<0.05$) for *A. maginale*, *B. bovis* and *B. bigemina*. In addition there were no differences of infection percentage between blood collection location ($p>0.05$). The result from serial dilution showed that the least amount of DNA to detect the infection were 0.1 ng/μl for *A. maginale* and *B. bigemina* and 0.7 ng/μl for *B. bovis*.

คำสำคัญ: ไข้เห็บ PCR โคนม

Keywords: Tick bond, PCR, Dairy Cattle

[1]*นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*อาจารย์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3]*อาจารย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[4]*กรมปศุสัตว์*
**corresponding author, e-mail: jauuveha@hotmail.com*

บทนำ

โรคไข้เห็บเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัว หรือพยาธิในเลือด 3 ชนิดที่มีเห็บโค (*Boophilus* sp.) เป็นพาหะ ได้แก่ *Anaplasma maginale*, *Babesia bovis* และ *Babesia bigemina* (นิดารัตน์ และคณะ, 2543) ซึ่งเป็นโรคที่ทำให้เกิดสูญเสียรายได้ของเกษตรกรอย่างมาก เนื่องจากเชื้อ *Babesia bovis* จะไปทำลายเม็ดเลือดแดง เกิด hemoglobinaria (ปัสสาวะมีสีแดงเนื่องจาก hemoglobin) โลหิตจาง และร่างกายขาดออกซิเจน ในโคนมที่เป็นชนิดเฉียบพลันจะตายทันที ชนิดรุนแรงจะทำให้สูญเสียผลผลิต น้ำนมลด และมีอาการทางประสาทส่วนกลางให้เห็นได้ด้วย ในเชื้อ *Babesia bigemina* จะไม่รุนแรงเท่าเชื้อ *Babesia bovis* ส่วนในเชื้อ *Anaplasma maginale* จะมีทั้งรุนแรงและเรื้อรัง อาการขั้นแรกจะซึม เบื่ออาหาร เฉื่อยชา ไข้สูง นมลด ฉับพลัน น้ำหนักลดและดีซ่าน อาจหมดลมหายใจโดยง่ายถ้ามีการเคลื่อนไหวมาก ๆ (ประทีป และคณะ, 2534) วิธีการป้องกันสามารถทำได้โดยการใช้ยาฆ่าพยาธิภายนอกหรือยาฆ่าเห็บ ซึ่งต้องใช้ให้มีความเข้มข้นที่ถูกต้อง และจะต้องกำจัดเห็บก่อนวางไข่ แต่สำหรับการเลี้ยงโคนมและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทยที่อยู่ในเขตอบอุ่นฝนตกชุก การกำจัดให้โคนมปราศจากเห็บจึงกระทำได้ยาก (พนิดา, 2544) การตรวจหาโรคไข้เห็บนั้นทำได้โดยการย้อมฟิล์มเลือด แล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งในการตรวจพบของโรคไข้เห็บ สามารถตรวจพบได้ยาก ถ้าสัตว์นั้นมีจำนวนเชื้ออยู่น้อย หรือสัตว์เป็นพาหะ อีกทั้งสไลด์ไม่สะอาดและการที่ขนาดของเกล็ดเลือดที่ติดสีย้อมนั้นจะมีความเหมือนกันกับโรคไข้เห็บมาก จึงทำให้ผู้ตรวจอาจตรวจผิดได้ (อัมพวัน, 2539)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการตรวจหาโรคไข้เห็บ มาใช้เทคนิคนี้เรียกว่า Polymerase Chain Reaction (PCR) (Figueroa et al., 1993; Tananyutthawongese et al., 1999; Massung and Slater., 2003; Echaide et al., 2005) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เฉพาะบริเวณที่ต้องการให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายชุดในหลอดทดลอง (มนต์ชัย และคณะ, 2545) จึงสามารถทำการตรวจหาเชื้อโรคไข้เห็บได้จากการตรวจจาก DNA ของเชื้อได้โดยตรง (Echaide et al., 1998) ทำให้สามารถจำแนกเชื้อได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ *Anaplasma maginale*, *Babesia bovis* และ *Babesia bigemina* โดยใช้วิธีฟิล์มเลือดและวิธี PCR พร้อมทั้งเปรียบเทียบตำแหน่งของการเก็บตัวอย่างเลือดต่อเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ

วิธีการดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างประชากรและข้อมูลที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ใช้โคนมพันธุ์ TMZ จำนวน 200 ตัว จากสถานีวิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพญากลาง อำเภอลำสนธิ จังหวัดลพบุรี โดยเลือดโคที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้จากโคที่ไม่ได้รับฆ่าพยาธิในเลือดเป็นเวลา 3 เดือน คือ ตั้งแต่เดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2547 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝนที่มีการระบาดของโรคพยาธิในเลือด

การสกัด genomic DNA ตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดโคจากเส้นเลือดที่คอ และโคนหางใส่หลอดทดลอง test tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี 0.5 M EDTA อยู่ 1 มิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร/ตัว และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อสกัด genomic DNA จากวิธีการของ มนต์ชัย และคณะ (2545) โดยนำเลือดที่ได้มาปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนของเม็ดเลือดแดงใส่ micro tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่จำนวน 100 ไมโครลิตร ล้างตะกอนเม็ดเลือดแดงด้วย 0.9 เปอร์เซ็นต์ NaCl 1 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ให้สะอาด จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ทำการสกัด genomic DNA โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป pure-gene

และทำการตกตะกอน DNA ด้วย iso-propanol 1 มิลลิลิตร ล้างตะกอนด้วย ethanal 75 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร 2 รอบ ผึ่งตะกอนให้แห้ง จากนั้นจึงละลายด้วยสารละลาย DNA hydration 20-30 ไมโครลิตร แล้วตรวจหาแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ 0.8 เปอร์เซ็นต์ agrarose gel จากนั้นจึงตรวจสอบจากความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อเจือจางให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร รอการใช้งานในขั้นตอนต่อไปที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจหาโรคไข้เห็บด้วยวิธีฟิล์มเลือด

การตรวจหาโรคไข้เห็บด้วยวิธีฟิล์มเลือดโดยส่งสไลด์ตรวจที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ตอนบน) มีขั้นตอนดังนี้ นำเลือดโคที่เจาะได้มาหยดลงบนสไลด์ และทำการ smear เพื่อให้เลือดกระจายไปทั่วแผ่นสไลด์ ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไป fixed ด้วย absolute methyl alcohol เป็นเวลา 5 นาที นำสไลด์ย้อมสี Giemsa จากนั้นนำสไลด์ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจหาโรคไข้เห็บ ด้วยวิธี PCR

นำ genomic DNA ที่สกัดได้ มาทำการเพิ่มชิ้นส่วน DNA ของโรคไข้เห็บ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ของ *A. marginale* (Am01 และ Am02), *B. bovis* (BbF และ BbR) และ *B. bigemina* (BgF และ BgR) 6 primer ซึ่งมีลำดับของ sequence ดังนี้

Am01 5' TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA 3'
Am02 5' TACACGTGCCCTACCGACTTA 3'
BbF 5' TTTGGTATTTGTCTTGGTCAT 3'
BbR 5' ACCACTGTAGTCAAACTCACC 3'
BgF 5' TAGTTGTATTTCAGCCTCGCG 3'
BgR 5' AACATCCAAGCAGCTAHTTAG 3'

หมายเหตุ: H คือ เบส A หรือ C หรือ T

โดยในการทำ PCR แต่ละ reaction ประกอบด้วย น้ำ reverse osmosis (RO) ผ่านการ autoclave 2 ครั้ง จำนวน 4.1 ไมโครลิตร, DNA ที่สกัดจากเลือดแดงของโค มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 1 ไมโครลิตร, 50 นาโนโมล MgCl จำนวน 0.8 ไมโครลิตร, 10XPCR-buffer จำนวน 1ไมโครลิตร, dNTPs (1.25 มิลลิลิตร/ไมโครลิตร) จำนวน 1 ไมโครลิตร, primer forward และ primer reverse (5 มิลลิโมล/ ไมโครลิตร)อย่างละ 1 ไมโครลิตร และ Taq DNA Polymerras (5 ยูนิต/ไมโครลิตร) จำนวน 0.1 ไมโครลิตร โดยมีวงรอบการทำ PCR เริ่มที่ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบ โดยเชื้อ *A. marginale* denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 58 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และจบด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Echaide et al., 1998) ในส่วนของเชื้อ *B. bigemina* และ *B. bovis* initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที primer annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 45 นาที และ primer extension ที่ 73 องศาเซลเซียส 45 วินาที และจบด้วย final extension ที่ 73 องศาเซลเซียส 7 นาที (Tananyutthawongese et al., 1999) ด้วยเครื่อง themal cycle (Corbett research, Australia)

จากนั้นนำ PCR-Product ที่ได้ ตรวจหาแถบ DNA ของเชื้อ *B. bigemina*, *B. bovis* และ *A. marginale* ด้วยวิธี electrophoresisโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที ด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ agrarose gel เสร็จแล้วจึงย้อมแผ่นเจลด้วย Gelstar™ (Gelstar INC.NY) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นถ่ายภาพเก็บข้อมูลโคที่มีเชื้อและไม่มีเชื้อ โดยดูจากการปรากฏของแถบ DNA

การทำ serial dilution ด้วยวิธี PCR ในการตรวจโรคไข้เห็บ

นำ DNA อ้างอิงของเชื้อ *B. bigemina*, *B. bovis* และ *A. marginale* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์ บางเขน หน่วยอณูวินิจฉัย ทำการหาความเข้มข้นด้วย spectrophotometer (comspec® m350t double beam uv-visible, UK) จากนั้น

ทำ 2 fold serial dilution โดยมีสัดส่วน DNA อ้างอิง 1 ไมโครลิตรด้วยน้ำ reverse osmosis (RO) ผ่านการ autoclave 2 ครั้ง 1 ไมโครลิตร นำมาทำ PCR แล้วตรวจโดยวิธี electrophoresisด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ agrarose gel เสร็จแล้วจึงย้อมแผ่นเจลด้วย Gelstar™ (Gelstar INC.NY)

การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณเปอร์เซ็นต์การติดโรคไข้เห็บ

นำผลที่ได้จากการตรวจโรคไข้เห็บ ด้วยวิธีฟิล์มเลือด และวิธี PCR มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ มีสูตรดังนี้

เปอร์เซ็นต์ของการติดเชื้อ = (จำนวนโคที่ตรวจพบเชื้อ/จำนวนโคทั้งหมด) x 100

เปอร์เซ็นต์ของการไม่ติดเชื้อ = 100 - เปอร์เซ็นต์ของการติดเชื้อ

เปรียบเทียบวิธีฟิล์มเลือด และวิธี PCR ในการตรวจโรคไข้เห็บ

ทำการเปรียบเทียบผลการตรวจเชื้อ *A. maginale* ด้วยวิธีฟิล์มเลือด และวิธี PCR ทดสอบ Chi-square ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistic Analysis System (SAS, 1985)

เปรียบเทียบตำแหน่งของการเจาะเลือดในการตรวจเชื้อ *A. maginale* ด้วยวิธี PCR

เปรียบเทียบผลการตรวจเชื้อ *A. maginale* โดยใช้วิธี PCR ระหว่างการเจาะเลือดโคที่คอและโคนหาง ด้วยวิธี logistic regression โดยมีรูปแบบโมเดลเป็น

$$\ln\left(\frac{P_i}{1 - P_i}\right) = \beta_0 + \beta_i X_i + \varepsilon_{ij}$$

กำหนดให้

P_i = ค่าความน่าจะเป็น (probability) ของการตรวจพบหรือไม่พบโรคไข้เห็บ

β_0 = จุดตัดแกน y (intercep)

β_i = ค่าสัมประสิทธิ์ regression ของการเจาะเลือด

X_i = ตัวแปรดัมมี่ของการเจาะเลือดเมื่อ I = 0, 1 แสดงการเจาะเลือดที่คอหรือโคนหาง

ε_{ij} = ค่าความคลาดเคลื่อน (random error term)

และนำค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้มาคำนวณความน่าจะเป็นของการตรวจพบเชื้อที่คอ (P_i) และโคนหาง มีสูตรดังนี้ (Hayter, 2002)

$$P_i = e^{\beta_0+\beta_i}/(1 + e^{\beta_0+\beta_i})$$

กำหนดให้

β_0 = ค่าประมาณของ intercept

β_i = ค่าประมาณของ regression coefficient ของการเจาะเลือดโคที่คอหรือที่โคนหางอัลลีล

e = exponential constant

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการเปรียบเทียบวิธีฟิล์มเลือด และวิธี PCR ในการตรวจโรคไข้เห็บ

การตรวจหาโรคไข้เห็บในโคนมพันธุ์ TMZ ด้วยวิธีฟิล์มเลือด พบว่าให้ผลการติดเชื้อ *A. maginale* 1 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบเชื้อ *B. bovis* และ เชื้อ *B. bigemina* และการตรวจด้วยวิธี PCR ให้ผลการติดเชื้อโคที่ติดเชื้อจะพบ DNA ขนาด 345 bp (รูปที่ 1), 446 bp (รูปที่ 2) และ 689 bp (รูปที่ 3)ตามลำดับ โดยเชื้อ *A. maginale* 58 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *B. bovis* 1 เปอร์เซ็นต์ และ เชื้อ *B. bigemina* 1 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดสอบด้วย Chi-square จากผลการตรวจหาเชื้อ *A. maginale* พบว่าด้วยวิธีฟิล์มเลือดและวิธี PCR มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงตารางที่ 1

ผลการตรวจเชื้อ *A. maginale* จากทั้งสองวิธีให้ผลแตกต่างกันเนื่องจากการใช้วิธี PCR การตรวจหาเชื้อ *A. maginale* เป็นการตรวจโดยตรงจาก DNA ถ้าไม่มี DNA ของเชื้อ *A. maginale* จะตรวจไม่พบแต่จากการตรวจโดยใช้ฟิล์มเป็นการตรวจโดยใช้ตาเปล่าดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จึงทำให้เกิดความผิดผลาดเนื่องจาก

ปัจจัยต่าง ๆ เช่น สไลด์ไม่สะอาด การที่ขนาดรูปร่างของเกล็ดเลือดที่ติดสีย้อมนั้นมีความเหมือนกันกับเชื้อ *A. maginale* มาก เม็ดสีย้อมมีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อ *A. maginale* และจำนวนของเชื้อมีอยู่ปริมาณน้อยหรืออาจเป็นโคที่ที่มีโรคแฝงอยู่โดยไม่แสดงอาการ จึงทำให้เกิดความผิดพลาดค่อนข้างมากในการตรวจหาเชื้อ *A. maginale* ด้วยวิธีฟิล์มเลือด

ผลการทำ serial dilution ด้วยวิธี PCR ในการตรวจโรคไข้เห็บ

จากการทำ serial dilution ด้วยวิธี PCR พบว่าเชื้อ *A. maginale* และเชื้อ *B. bigemina* สามารถที่จะตรวจพบเชื้อได้ปริมาณ DNA น้อยมาก คือ 0.107 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4) และ 0.117 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 5) ตามลำดับ แต่ในส่วนของเชื้อ *B. bovis* จะต้องมีปริมาณ DNA มากกว่า คือ 0.675 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 6)

ผลการเปรียบเทียบตำแหน่งของการเจาะเลือดในการตรวจเชื้อ A. maginale ด้วยวิธี PCR

การเจาะเลือดโคที่คอและที่โคนหางจากโคนมพันธุ์ TMZ พบว่าเลือดที่มาจากคอมีการติดเชื้อ 54.6 เปอร์เซ็นต์ ในเลือดที่มาจากหางมีการติดเชื้อ 60.2 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) จากการทดสอบด้วยวิธี logistic regression ความน่าจะเป็นในการตรวจเชื้อ *A. maginale* ของการเจาะเลือดที่คอ คือ 66.67 เปอร์เซ็นต์ และความน่าจะเป็นของการเจาะเลือดที่หาง คือ 70.06 เปอร์เซ็นต์ ผลการเปรียบเทียบตำแหน่งการเจาะเลือดพบว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

เนื่องจากในการเจาะเลือดโคมาตรวจหาเชื้อ *A. maginale* นิยมที่จะเจาะเลือดที่โคนหางหรือใบหู เพราะการไหลเวียนของเลือดในบริเวณนี้จะไหลช้าจึงทำให้เชื้อ *A. maginale* มารวมกันอยู่สามารถตรวจพบเชื้อ *A. maginale* ได้ง่าย แต่จากการทดสอบทางสถิติที่ได้ค่าไม่แตกต่างกันนั้นเป็นเพราะว่าการตรวจหาเชื้อ *A. maginale* โดยใช้วิธี PCR ไม่ขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อ *A. maginale* ว่ามีมากหรือน้อย ทำให้สามารถที่จะตรวจพบเชื้อ *A. maginale* ได้ ดังนั้นในการเจาะเลือดโคมาตรวจหาเชื้อ *A. maginale* สามารถใช้ได้ดีทั้งเลือดที่เจาะจากคอ หรือโคนหาง ในโคนมพันธุ์ TMZ

สรุปผลการวิจัย

วิธี PCR สามารถใช้ในการตรวจโรคไข้เห็บในโคนมพันธุ์ TMZ ได้ถูกต้องแม่นยำมากกว่าการตรวจด้วยวิธีฟิล์มเลือดเนื่องจากการใช้วิธี PCR เป็นการตรวจจาก DNA ของเชื้อโดยตรง และแม้เชื้อจะมีปริมาณน้อยในการตรวจหาเชื้อ *A. maginale* สามารถใช้ได้ดีทั้งเลือดที่เจาะจากคอ หรือโคนหางและระดับของปริมาณ DNA ของเชื้อต่ำสุดที่จะตรวจหาได้ด้วยเทคนิค PCR ได้แก่ 0.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรสำหรับ *A. maginale* และ *B. bigemina* และ 0.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรสำหรับ *B. bovis*

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยครั้งนี้ ได้รับการสนับสนุนงบประมาณเพื่อการวิจัยจากโครงการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางชีวภาพเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน และโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ขอขอบคุณ ศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์ บางเขน หน่วยอณูวินิจฉัย ที่อนุเคราะห์ ตัวอย่าง DNA ของเชื้อโรคไข้เห็บ และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพญากลาง กรมปศุสัตว์ อำเภอลำสนธิ จังหวัดลพบุรี ที่อำนวยความสะดวกทางด้านการเก็บตัวอย่างเลือด

เอกสารอ้างอิง

นิดารัตน์ ไพรคณะฮก เชาวพุทธิ์ บุญมาทิต และนพพร ศราธพันธุ์. 2543. สภาวะของโรคและการทำนายความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคไข้เห็บโคของโคนมในบางจังหวัดของประเทศไทย. **วารสารสัตวแพทย์** 10: 13-23.

ประทีป เปมะโยธิน ชิต ศิริวรรณ์ และชัยศิริ มหันตชัย สกุล. 2534. การศึกษาระบาดวิทยาของโรคไข้เห็บ. **สัตวแพทยสาร** 42: 131-136.

พนิดา พลสีลา. 2544. **การศึกษาชนิดของตัวเห็บที่พบในป่า สัตว์ป่า-สัตว์เลี้ยงในจังหวัดขอนแก่น.** วิทยานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มนต์ชัย ดวงจินดา ยุพิน ผาสุข และสจี กัณหาเรียง. 2545. ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการปรับปรุงพันธุ์. **เอกสารประกอบการสอนวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการปรับปรุงพันธุ์สัตว์.** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อัมพวัน ตฤษณารมย์. 2539. **คู่มือสุขภาพโคนมสำหรับเจ้าหน้าที่.** ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ สำนักงานปศุสัตว์เขต 5 กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Echaide, S.T., Bono, M.F., Lugaresi, C., Aguirre, N., Mangold, A., Moretta, R., Farber, M. and Mondillo, C. 2005. Detection of antibodies against *Anaplasma marginale* in milk using a recombinant MSP5 indirect ELISA. **Vet Microbiol** 106: 287-292

Echaide, S.T., Donald, P.K., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Suarez, C.E. and McElwain, T.F. 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **Clin Microbiol** 36: 777-782.

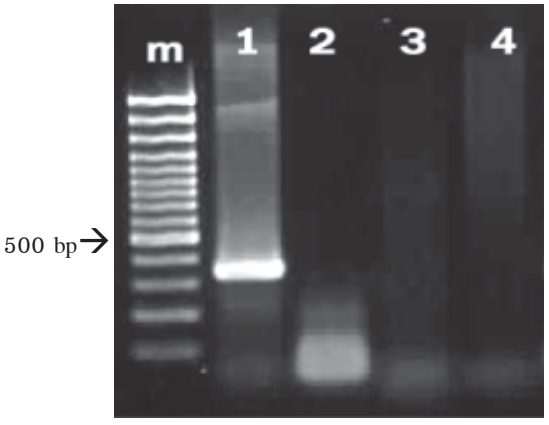
Figueroa, J.V., Chieves., L.P., Johnson, G.S. and Buening, G.M. 1993. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Vet Parasitol** 50: 59-81.

Hayter, A. J. 2002. **Probability and statistics for engineers and scientists.** 2nd ed. Georgia, U.S.A.: Georgia Institute of Technology.

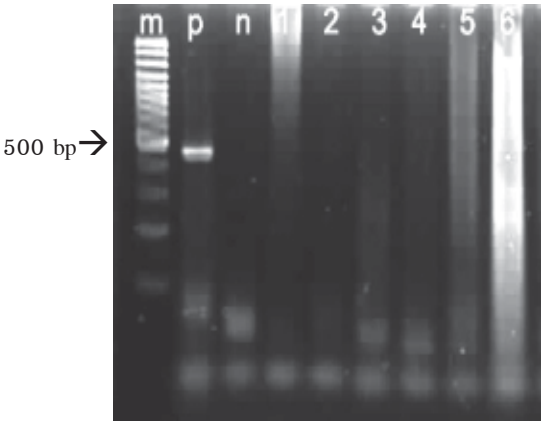
Massung R.F., and Slater, K.G. 2003. Comparison of PCR Assays for Detection of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. **Clin Microbiol** 41: 717-722.

SAS. 1985. **User's Guide: statistic, V.6.12.** Cary, North Carolina, U.S.A.: SAS Institute Inc.

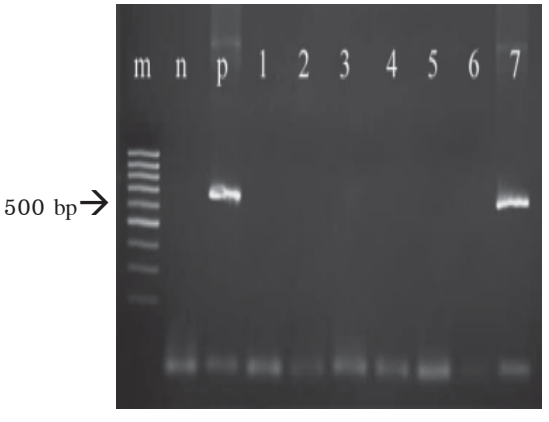
Tananyutthawongese, C., Saengsombut, K., Sukhumsirichat, W., Uthaisang, W., Sarataphan, N. and Chansiri, K. 1999. Detection of bovine hemoparasite infection using mutiplex polymerase chain reaction. **Sci Asia** 25:85-90.



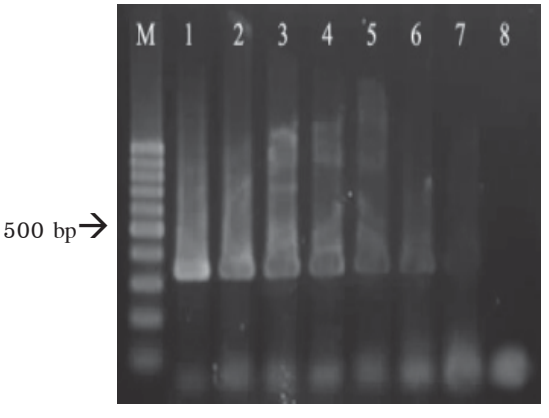
รูปที่ 1 การตรวจหาเชื้อ *A. marginale* โดย m = maker, 1 = DNA *A. marginale*, 2 = DNA *B. bigemina*, 3 = DNA *B. bovis* และ 4 = DNA *T. evasi*



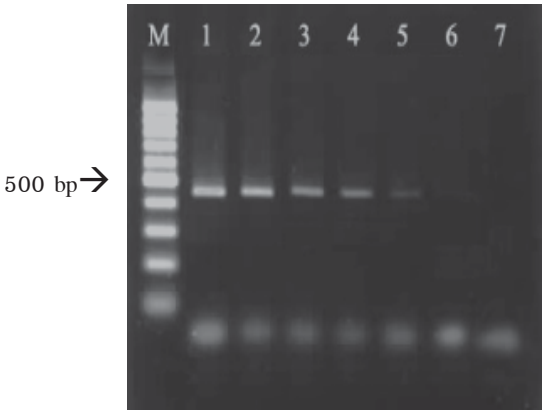
รูปที่ 2 การตรวจหาเชื้อ *B. bovis* โดย m = maker, p = DNA *B. bovis*, n = negative control และ 1–6 = DNA โคตัวที่ 1–6 ไม่พบเชื้อ *B. bovis*



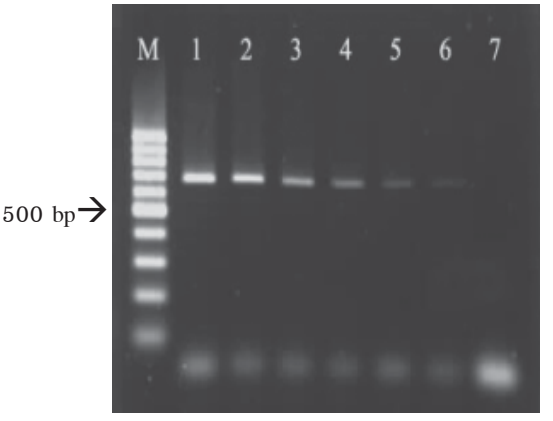
รูปที่ 3 การตรวจหาเชื้อ *B. bigemina* โดย m = maker, p = DNA *B. bigemina*, n = negative control, 1 – 6 = DNA โคตัวที่ 1–6 ตรวจไม่พบเชื้อ *B. bigemina* และ 7 = DNA โคตัวที่ 7 ตรวจพบเชื้อ *B. bigemina*



รูปที่ 4 การทำ serial dilution ของเชื้อ *A. marginale* ด้วยวิธี PCR โดย m = maker, 1 = dilution 1:1, 2 = dilution 1:2, 3 = dilution 1:4, 4 = dilution 1:8, 5 = dilution 1:16, 6 = dilution 1:32, 7 = dilution 1:64 และ 8 = dilution 1:128



รูปที่ 5 การทำ serial dilution ของเชื้อ *B. bovis* ด้วยวิธี PCR โดย m = maker, 1 = dilution 1:1, 2 = dilution 1:2, 3 = dilution 1:4, 4 = dilution 1:8, 5 = dilution 1:16, 6 = dilution 1:32, และ 7 = dilution 1:64



รูปที่ 6 การทำ serial dilution ของเชื้อ *B. bigemina* ด้วยวิธี PCR โดย m = maker, 1 = dilution 1:1, 2 = dilution 1:2, 3 = dilution 1:4, 4 = dilution 1:8, 5 = dilution 1:16, 6 = dilution 1:32, และ 7 = dilution 1:64

ตารางที่ 1 ผลการตรวจพบเชื้อ *A. maginale*, *B. bovis* และ *B. bigemina* โดยใช้วิธีฟิล์มเลือดและวิธี PCR

วิธีที่ใช้ตรวจ	*A. maginale*		*B. bovis*	*B. bigemina*
	จำนวน	เปอร์เซ็นต์	เปอร์เซ็นต์	เปอร์เซ็นต์
ผลตรวจโดยใช้วิธีฟิล์มเลือด	200	1	0	0
ผลตรวจโดยใช้วิธี PCR	200	58	1	1

P = 0.001

ตารางที่ 2 ผลการตรวจเชื้อ *A. maginale* ของการเจาะเลือดโคที่คอและที่โคนหาง

ตำแหน่งที่เจาะเลือด	มีเชื้อ		ไม่มีเชื้อ	
	จำนวน	เปอร์เซ็นต์	จำนวน	เปอร์เซ็นต์
เจาะที่คอ	65	54.6	54	45.4
เจาะที่โคนหาง	44	60.2	29	39.8

P = 0.443