Journal of Agri. Research & Extension 39(2): 105-115

ความชุกของการติดเชื้อ *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia canis* *Anaplasma platys* และ *Trypanosoma evansi* ในสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่

Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia canis* *Anaplasma platys* and *Trypanosoma evansi* Infections in Dogs in Chiang Mai

เพ็ญนภา ตาคำ[1] วิลาวรรณ เรือนสิทธิ์[1] Dante Fabros Jr.[1] พิชานันท์ สืบสอาด[1] อรอนงค์ เส้งเล่า[1]
ทิพย์กมล ธิการาช[1] วรพัฒน์ ประชาศิลป์ชัย[2] ชลลดา โสดารัตน์[2] พชรพร ตาดี[3] ไพโรจน์ พงศ์กิดาการ[3]
ปัฐมา เจริญตัณฑนกุล[4] รัญจวน อิสรรักษ์[5] เรือนแก้ว ประพฤติ[6] และวศิน เจริญตัณฑนกุล[1*]
Pennapa Takam[1], Wilawan Ruansit[1], Dante Fabros Jr.[1], Pichanan Suebsaard[1]
Onanong Seng-Lao[1], Thipkamon Thikarach[1], Worapat Prachasilchai[2], Chollada Sodarat[2]
Phacharaporn Tadee[3], Phairot Phongkidakarn[3], Pattama Charerntantanakul[4]
Runjuan Isararuk[5], Reankeaw Praphet[6] and Wasin Charerntantanakul[1*]

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290
[2]ภาควิชาคลินิกสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50100
[3]คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290
[4]คลินิกสัตวแพทย์ปัฐ เชียงใหม่ 50290
[5]คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา สงขลา 90000
[6]สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290
[1]Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290
[2]Department of Companion Animal and Wildlife Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University Chiang Mai, Thailand 50100
[3]Faculty of Animal Science and Technology, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290
[4]Pat Veterinary Clinic, Chiang Mai, Thailand 50290
[5]Faculty of Agricultural Technology, Songkhla Rajabhat University, Songkhla, Thailand 90000
[6]Institute of Product Quality and Standardization, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290
*Corresponding author: wasin@mju.ac.th

Received: *May 12, 2020*
Revised: *April 08, 2021*
Accepted: *July 15, 2021*

Abstract

This study determined the prevalence of blood parasite infections in dogs in Chiang Mai, using multiplex polymerase chain reaction (PCR) developed in our laboratory. It also generated database of blood parasite infections in dogs for launching veterinary services of Faculty of Veterinary Medicine, Maejo University. Blood was collected from 870 dogs in 19 districts. Multiplex PCR was conducted to detect *VirB9* gene of *Ehrlichia canis*, *18S rRNA* gene of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis*, and *groEl* gene of *Anaplasma platys*. Single PCR was used to detect *VSG* gene of *Trypanosoma evansi*. The results

showed that dogs had the highest prevalence for *H. canis* infection (331 dogs: 56.7%), followed by *E. canis* (6 dogs: 1%), *A. platys* (5 dogs: 0.9%), and *B. canis* (2 dogs: 0.3%), respectively. Some dogs had co-infections with two or more parasites, which were *H. canis* + *B. canis* (191 dogs: 32.7%), followed by *E. Canis* + *H. canis* (15 dogs: 2.6%), *H. canis* + *A. platys* (12 dogs: 2.1%), *E. canis* + *H. canis* + *B. canis* (8 dogs; 1.4%), *H. canis* + *B. canis* + *A. platys* (8 dogs: 1.4%), *E. canis* + *H. canis* + *A. platys* (2 dogs: 0.3%), and *E. canis* + *H. canis* + *B. canis* + *A. platys* (4 dogs: 0.7%). No *T. evansi* infection was found. There was no association between blood parasite infections and gender and age range of dogs. There was a significant association between low blood parasite infection and availability of veterinary services within the 10 kilometers from the dog residences.

Keywords: prevalence, blood parasites, dog, Chiang Mai, multiplex polymerase chain reaction

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเลือดในสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ และเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการให้บริการทางสัตวแพทย์ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดสุนัขจำนวน 870 ตัว จาก 19 อำเภอ นำมาตรวจหาสารพันธุกรรมของยีน *VirB9* ของเชื้อ *Ehrlichia canis* ยีน *18S rRNA* ของเชื้อ *Hepatozoon canis* และ *Babesia canis* และยีน *groEl* ของเชื้อ *Anaplasma platys* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ และยีน *VSG* ของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส พบสุนัขติดเชื้อ *H. canis* มากที่สุด (331 ตัว: ร้อยละ 56.7) รองลงมาคือ *E. canis* (6 ตัว: ร้อยละ 1) *A. platys* (5 ตัว: ร้อยละ 0.9) และ *B. canis* (2 ตัว: ร้อยละ 0.3) ตามลำดับ สุนัขบางตัวติดเชื้อตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ได้แก่ *H. canis* + *B. canis* (191 ตัว: ร้อยละ 32.7) รองลงมาคือ *E. canis* + *H. canis* (15 ตัว: ร้อยละ 2.6) *H. canis* + *A. platys* (12 ตัว: ร้อยละ 2.1) *E. canis* + *H. canis* + *B. canis* (8 ตัว: ร้อยละ 1.4) *H. canis* + *B. canis* + *A. platys* (8 ตัว: ร้อยละ 1.4) *E. canis* + *H. canis* + *A. platys* (2 ตัว: ร้อยละ 0.3) และ *E. canis* + *H. canis* + *B. canis* + *A. platys* (4 ตัว: ร้อยละ 0.7) ไม่พบการติดเชื้อ *T. evansi* ในสุนัขทั้งหมดที่ศึกษา การติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับเพศและช่วงอายุของสุนัข แต่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการมีหน่วยบริการทางสัตวแพทย์ใกล้บ้านในระยะ 10 กิโลเมตร

คำสำคัญ: ความชุก พยาธิในเลือด สุนัข เชียงใหม่ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์

คำนำ

โรคพยาธิในเลือด (Blood parasites) ในสุนัขเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ เชื้อโปรโตซัว เช่น *Trypanosoma evansi*, *Hepatozoon canis*, *Babesia canis* และ *Babesia gibsoni* เชื้อริกเกตเซีย เช่น *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma platys* และ *Anaplasma phagocytophila* และเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Bartonella vinsonii* (Little, 2010; Baneth, 2011; Chomel, 2011; Solano-Gallego *et al*., 2016) โรคนี้สามารถพบได้ทั่วโลก และพบได้บ่อยในประเทศไทย (Suksawat *et al*., 2001; Piratae *et al*., 2015; Liu

et al., 2016; Piratae *et al.*, 2019) สำหรับประเทศไทยพาหะที่สำคัญของโรคนี้ คือ เห็บสุนัขสีน้ำตาล (*Rhipicephalus sanguineus*) และเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยคือ *E. canis* (ก่อโรค Ehrlichiosis), *H. canis* (ก่อโรค Hepatozoonosis), *B. canis* (ก่อโรค Babesiosis) และ *A. platys* (ก่อโรค Anaplasmosis) (Jittapalapong *et al.*, 2006; Laummaunwai *et al.*, 2014; Piratae *et al*., 2015; Liu *et al*., 2016) สุนัขติดเชื้อ *E. canis*, *B. canis* และ *A. platys* จากการถูกเห็บสุนัขสีน้ำตาลที่มีเชื้อกัดและเชื้อถูกปล่อยผ่านทางน้ำลายของเห็บเข้าสู่กระแสเลือดของสุนัข และติดเชื้อ *H. canis* จากการกินเห็บที่มีเชื้อเข้าไป (Pantchev *et al*., 2015) เชื้อ *T. evansi* (ก่อโรค Trypanosomiasis) เป็นเชื้อก่อโรคที่ไม่ได้ติดต่อผ่านทางเห็บสุนัขสีน้ำตาลแต่ติดต่อผ่านทางเหลือบตัวเมีย (*Tabanus* spp.) ซึ่งสุนัขติดเชื้อจากการถูกเหลือบตัวเมียที่มีเชื้อกัดและเชื้อถูกปล่อยผ่านทางน้ำลายของเหลือบเข้าสู่กระแสเลือดของสุนัข การติดเชื้อนี้ในสุนัขพบได้ไม่บ่อยในประเทศไทย

สุนัขที่ติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเลือดในระยะแรกมักไม่แสดงอาการป่วย โรคนี้มีระยะฟักตัวประมาณ 2-3 สัปดาห์ เชื้อจะติดเข้าสู่เซลล์เป้าหมายต่าง ๆ เช่น เชื้อ *E. canis*, *E. ewingii* และ *E. chaffeensis* จะติดเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยต์ (Monocyte) และลิมโฟซัยต์ (Lymphocyte) เชื้อ *H. canis* ติดเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยต์และนิวโทรฟิล (Neutrophil) เชื้อ *B. canis* และ *B. gibsoni* ติดเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง เชื้อ *A. platys* และ *A. phagocytophila* ติดเข้าสู่เกล็ดเลือด (Platelets) เชื้อ *B. vinsonii* ติดเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (Endothelial cells) และเชื้อ *T. evansi* แบ่งตัวเพิ่มจำนวนอยู่ในน้ำเลือด (Plasma) (Skotarczak, 2003; Carrade *et al.*, 2009; Baneth *et al.*, 2015) อาการทางคลินิกที่พบบ่อยของโรคพยาธิในเลือด ได้แก่ ไข้สูง ซึม โลหิตจาง และเยื่อเมือกซีด สุนัขบางตัวที่ติดเชื้อ *E. canis* จะมีเลือดกำเดาออกง่าย (Epistaxis) และอาจแสดงอาการทางประสาทร่วมด้วย สุนัขบางตัวที่ติดเชื้อ *H. canis* อาจแสดงอาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อขาหลัง ทำให้ลุกยืนลำบาก สุนัขบางตัวที่ติดเชื้อ *T. evansi* อาจแสดงอาการเยื่อบุตาอักเสบ น้ำตาไหล และกระจกตาขุ่น สุนัขอายุน้อยจะมีอาการป่วยรุนแรงและอัตราการตายสูงกว่าสุนัขโต

การวินิจฉัยโรคพยาธิในเลือดสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การย้อมฟิล์มเลือดบาง (Thin blood smear) ด้วยสี Wright Giemsa เพื่อตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การตรวจหาแอนติบอดี (Antibody) โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (Rapid test kit) ซึ่งปัจจุบันสามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อได้เพียง 4 ชนิด คือ *E. canis*, *E. ewingii*, *A. platys* และ *A. phagocytophila* และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) สูง สามารถตรวจเชื้อได้ทุกชนิดและเป็นวิธีทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ตรวจวินิจฉัยยืนยันการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเลือด

ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิค PCR แบบมัลติเพล็กซ์ (Multiplex PCR: mPCR) ที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. canis*, *H. canis* และ *B. canis* พร้อมกันได้ (Nithikadpanich *et al*., 2019) และต่อมาได้พัฒนาต่อยอดเทคนิค mPCR ให้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *A. platys* ได้เพิ่มขึ้นอีกหนึ่งเชื้อ ซึ่งเทคนิค mPCR ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะและความไว ในการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อที่มีดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณเพียงเล็กน้อย (10^1 copy numbers) ซึ่งช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจหาสารพันธุกรรมทีละเชื้อ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการติดเชื้อ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis*, *A. platys* และ *T. evansi* ในสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่ ด้วยปฏิกิริยา mPCR และ Single PCR (สำหรับ *T. evansi*)

อุปกรณ์และวิธีการ

สุนัขและการเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำที่ขาหน้า (Cephalic vein) ของสุนัขจำนวน 870 ตัว ระหว่างเดือนมกราคมถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2562 จาก 19 อำเภอในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ ไชยปราการ (17 ตัว) เชียงดาว (59 ตัว) จอมทอง (8 ตัว) ดอยหล่อ (21 ตัว) ดอยสะเก็ด (120 ตัว) ดอยเต่า (28 ตัว) ฝาง (52 ตัว) หางดง (21 ตัว) ฮอด (5 ตัว) กัลยาณิวัฒนา (37 ตัว) แม่อาย (71 ตัว) แม่แจ่ม (48 ตัว) แม่ออน (57 ตัว) แม่วาง (71 ตัว) อมก๋อย (52 ตัว) สะเมิง (72 ตัว) สันป่าตอง (75 ตัว) สันทราย (4 ตัว) และเวียงแหง (52 ตัว) (Figure 1) โดยสุนัขทั้งหมดมีสุขภาพดีและได้รับความยินยอมจากเจ้าของสุนัข คณะผู้วิจัยเดินเก็บเลือดสุนัขตามบ้านเรือนร่วมกับอาสาสมัครประจำหมู่บ้าน หรือเก็บเลือดสุนัขที่มารับบริการฉีดวัคซีนพิษสุนัขบ้าที่หน่วยบริการประจำอำเภอ ยกเว้น 2 อำเภอ ได้แก่ ดอยสะเก็ดและสันป่าตอง ที่สุนัขทั้งหมดอยู่ในศูนย์พักพิงสุนัขจรจัด จำนวนสุนัขที่เจาะเก็บเลือดขึ้นอยู่กับความยินยอมของเจ้าของสุนัข และความร่วมมือของสุนัขในการเจาะเก็บเลือด เก็บตัวอย่างเลือดใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA (BD Vacutainer, USA) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ งานวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (Approval No. MACUC 005S/2562)

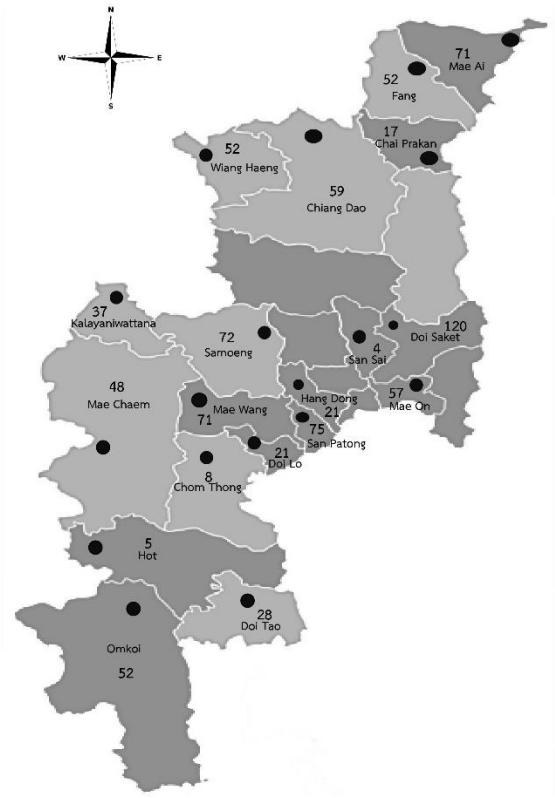


Figure 1 Geographical map illustrating districts in Chiang Mai and numbers of dogs in each district recruited for blood collection

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดภายใน 12 ชั่วโมง หลังเก็บตัวอย่าง ถ่ายตัวอย่างเลือดปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มล. กลับหลอด 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส และทำซ้ำ 2 ครั้งโดยเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มล. ผสมกับตะกอนให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เสร็จแล้วเติมสาร 5% Chelex resin (Sigma-Aldrich, USA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Proteinase K (Invitrogen, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 มก./มล.) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 56°ซ. นาน 30 นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 95°ซ. นาน 10 นาที จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร โดยเครื่อง Nanodrop 2000/ 2000C Spectrophotometer V1.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) และเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20°ซ.

ปฏิกิริยา mPCR และ PCR

เตรียมปฏิกิริยา mPCR เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *VirB9* ของ *E. canis* ยีน *18S rRNA* ของ *H. canis* และ *B. canis* และยีน *groEL* ของ *A. platys* (Nithikadpanich *et al.*, 2019) โดยมีสภาวะ Initial-denaturation (94°ซ. นาน 3 นาที) ตามด้วยวงจร PCR ซึ่งประกอบด้วย Denaturation (94°ซ. นาน 30 วินาที) Annealing (58°ซ. นาน 30 นาที) และ Extension (68°ซ. นาน 30 วินาที) จำนวน 35 รอบ และ Final extension (72°ซ. นาน 10 นาที) ปฏิกิริยา mPCR ประกอบด้วย Quick Taq® HS DyeMix (Toyobo, Japan) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (Primer) ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (Table 1) ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร

เตรียมปฏิกิริยา Single PCR เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *VSG* ของเชื้อ *T. evansi* โดยมีสภาวะและวงจร PCR เช่นเดียวกับของ mPCR ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 500 nM (Ravindran *et al.*, 2008) ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 10 ไมโครลิตร

แยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยใช้ 1.5% อะกาโรสเจล (Agarose gel; Biobasic, Canada) ใน Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer (Biobasic) ใช้กระแสไฟฟ้า 70 โวลต์ ในเวลา 60 นาที จากนั้นย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) (Biobasic) เปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงเหนือม่วง (Ultraviolet) ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร บันทึกภาพด้วยเครื่อง GelMax® UV Gel Imager (Labortechnik, Germany)

Table 1 Primer sequences for gene specific amplification including *E. canis VirB9*, *H. canis* and *B. canis 18S rRNA*, *A. platys groEL*, and *T. evansi VSG*

Pathogen	Gene	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Conc. (nM)	Product size
E. canis	*VirB9*	Ehr1401F	CCATAAGCATAGCTGATAACCCTGTTACAA	200	380
		Ehr1780R	TGGATAATAAAACCGTACTATGTATGCTAG		
H. canis	*18S rRNA*	Hs462F	TGTGTACAAAGGGCAGGGACG	100	462
		Hs462R	GCGGCTTAATTTGACTCAACAC		
B. canis	*18S rRNA*	Ba103F	CCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACA	200	619
		Ba721R	CCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCTCAAG		
A. platys	*groEL*	Ap724F	AAGGCGAAAGAAGCAGTCTTA	400	724
		Ap724R	CATAGTCTGAAGTGGAGGAC		
T. evansi	*VSG*	Te227F	TGCAGACGACCTGACGCTACT	500	227
		Te227R	CTCCTAGAAGCTTCGGTGTCCT		

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้น ได้แก่ เพศ อายุ และการมีบริการทางสัตวแพทย์ในระยะ 10 กิโลเมตรจากบ้าน และตัวแปรตาม ได้แก่ การติดเชื้อ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis*, *A. platys* และ *T. evansi* โดยใช้สถิติทดสอบแบบ Chi-square test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

ผลการวิจัยและวิจารณ์

จากสุนัขทั้งหมดจำนวน 870 ตัว พบสุนัขที่มีการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเลือดจำนวน 584 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 67.1) แบ่งเป็นการติดเชื้อก่อโรคเพียงชนิดเดียว (Single infection) จำนวน 344 ตัว (ร้อยละ 58.9) และการติดเชื้อร่วมกันตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป (Combined infections) จำนวน 240 ตัว (ร้อยละ 41.1) (Table 2)

การติดเชื้อก่อโรคเพียงชนิดเดียว พบสุนัขติดเชื้อ *H. canis* มากที่สุด (331 ตัว: ร้อยละ 56.7) รองลงมาคือ *E. canis* (6 ตัว: ร้อยละ 1) *A. platys* (5 ตัว: ร้อยละ 0.9) และ *B. canis* (2 ตัว: ร้อยละ 0.3) ตามลำดับ การติดเชื้อร่วมกันพบการติดเชื้อ *H. canis* + *B. canis* (191 ตัว: ร้อยละ 32.7) มากที่สุด รองลงมาคือ *E. canis* + *H. canis* (15 ตัว: ร้อยละ 2.6) *H. canis* + *A. platys* (12 ตัว: ร้อยละ 2.1) *E. canis* + *H. canis* + *B. canis* (8 ตัว: ร้อยละ 1.4) *H. canis* + *B. canis* + *A. platys* (8 ตัว: ร้อยละ 1.4) *E. canis* + *H. canis* + *B. canis* + *A. platys* (4 ตัว: ร้อยละ 0.7) และ *E. canis* + *H. canis* + *A. platys* (2 ตัว: ร้อยละ 0.3) ไม่พบการติดเชื้อ *T. evansi* ในสุนัขทั้งหมดที่ศึกษา เมื่อวิเคราะห์สัดส่วนของการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเลือดพบว่าสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่ติดเชื้อ *H. canis* ในสัดส่วนมากที่สุด (ร้อยละ 67.5) รองลงมาคือ *B. canis* (ร้อยละ 25.2) *E. canis* (ร้อยละ 4.1) และ *A. platys* (ร้อยละ 3.2) ตามลำดับ การศึกษาในลักษณะเดียวกันในจังหวัดนครพนมด้วยวิธี Single PCR พบสุนัขติดเชื้อ *H. canis* (ร้อยละ 44.2) *E. canis* (ร้อยละ 9.3) และ *B. canis* (ร้อยละ 7) (Juasook *et al.*, 2016) และในจังหวัดสงขลา

พบสุนัขติดเชื้อ *H. canis* (ร้อยละ 18.8) *B. canis* (ร้อยละ 9.4) *A. platys* (ร้อยละ 4.4) และ *E. canis* (ร้อยละ 3.9) (Liu *et al.*, 2016)

อำเภอที่มีความชุกของการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเลือดสูงที่สุดคือ ฮอด (5/5 ตัว: ร้อยละ 100) รองลงมาคือ สะเมิง (71/72 ตัว: ร้อยละ 98.6) ดอยเต่า (27/28 ตัว: ร้อยละ 96.4) เวียงแหง (48/52 ตัว: ร้อยละ 92.3) ดอยหล่อ (19/21 ตัว: ร้อยละ 90.5) จอมทอง (7/8 ตัว: ร้อยละ 87.5) แม่ออน (48/57 ตัว: ร้อยละ 84.2) เชียงดาว (48/59 ตัว: ร้อยละ 81.4) อมก๋อย (42/52 ตัว: ร้อยละ 80.8) แม่อาย (55/71 ตัว: ร้อยละ 77.5) ดอยสะเก็ด (90/120 ตัว: ร้อยละ 75) ไชยปราการ (12/17 ตัว: ร้อยละ 70.6) สันป่าตอง (48/75 ตัว: ร้อยละ 64) ฝาง (26/52 ตัว: ร้อยละ 50) สันทราย (2/4 ตัว: ร้อยละ 50) หางดง (10/21 ตัว: ร้อยละ 47.6) แม่แจ่ม (19/48 ตัว: ร้อยละ 39.6) แม่วาง (7/71 ตัว: ร้อยละ 9.9) และกัลยาณิวัฒนา (0/37 ตัว: ร้อยละ 0) ตามลำดับ (Table 2)

การติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเลือดพบได้ทั้งในสุนัขเพศผู้และเพศเมียในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 67.9 และ 66.2 ตามลำดับ) (Table 3) การติดเชื้อส่วนใหญ่พบในช่วงอายุ 7-10 ปี (ร้อยละ 74.1) รองลงมาคือ อายุน้อยกว่า 1 ปี (ร้อยละ 70.3) 4-7 ปี (ร้อยละ 67.4) 1-4 ปี (ร้อยละ 65.8) และมากกว่า 10 ปี (53.9) ตามลำดับ ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการติดเชื้อพยาธิในเลือดกับเพศ (p-value=0.66) และช่วงอายุของสุนัข (p-value=0.35) (Table 3)

การติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเลือดในกลุ่มอำเภอที่มีหน่วยบริการทางสัตวแพทย์ เช่น โรงพยาบาลสัตว์และคลินิกรักษาสัตว์ในระยะไม่เกิน 10 กิโลเมตรจากที่เลี้ยงสุนัข พบว่ามีค่าเฉลี่ยความชุกของการติดเชื้อน้อยกว่ากลุ่มอำเภอที่ไม่มีหน่วยบริการทางสัตวแพทย์ (ร้อยละ 64.7 และ 70.8 ตามลำดับ) โดยอำเภอที่มีหน่วยบริการทางสัตวแพทย์ในระยะไม่เกิน 10 กิโลเมตรจากที่เลี้ยงสุนัขมี 8 อำเภอ ได้แก่ ดอยเต่า ดอยหล่อ แม่ออน ดอยสะเก็ด สันป่าตอง สันทราย หางดง และแม่วาง (Table 3) การที่มีหน่วยบริการทางสัตวแพทย์ใกล้กับสถานที่เลี้ยงสุนัขอาจทำให้สุนัขได้รับการดูแลด้านสุขภาพได้มากขึ้น โดยพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างอัตราการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเลือดที่ต่ำลงกับการมีหน่วยบริการทางสัตวแพทย์ในระยะไม่เกิน 10 กิโลเมตรจากที่เลี้ยงสุนัข (p-value=0.00)

ผลการศึกษานี้สร้างองค์ความรู้ใหม่ในเรื่องความชุกของการติดเชื้อพยาธิในเลือดในสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาในลักษณะนี้มาก่อน งานวิจัยนี้มีข้อจำกัดคือ การขาดฐานข้อมูลจำนวนประชากรสุนัขในแต่ละอำเภอของจังหวัดเชียงใหม่ ทำให้ไม่สามารถหาจำนวนตัวอย่างสุนัขที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในแต่ละอำเภอได้ นอกจากนั้นคือการได้รับความยินยอมจากเจ้าของสุนัขในการเก็บตัวอย่างเลือด และความร่วมมือของสุนัขในการเก็บตัวอย่างเลือด เช่น วิ่งหนี ไม่ยอมให้จับตัว และมีพฤติกรรมดุร้าย เป็นต้น

Table 2 Prevalence of blood parasite infections in dogs in Chiang Mai, Thailand

District	#Examined	# Infected																#Uninfected
		E	H	B	A	T	E+H	E+B	E+A	H+B	H+A	B+A	E+H+B	E+H+A	E+B+A	H+B+A	E+H+B+A	
Chai Prakan	17	0	8	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	5
Chiang Dao	59	0	40	0	1	0	2	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	11
Chom Thong	8	0	3	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1
Doi Lho	21	1	6	1	0	0	0	0	0	8	0	0	2	0	0	1	0	2
Doi Saket	120	2	43	1	3	0	3	0	0	27	5	0	2	0	0	2	2	30
Doi Tao	28	1	11	0	0	0	0	0	0	14	0	0	1	0	0	0	0	1
Fang	52	0	19	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	26
Hang Dong	21	0	5	0	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0	0	0	0	11
Hot	5	0	2	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Kanlayaniwattana	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37
Mae Ai	71	0	36	0	0	0	0	0	0	18	1	0	0	0	0	0	0	16
Mae Chaem	48	0	11	0	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	0	1	0	29
Mae On	57	0	18	0	0	0	0	0	0	25	2	0	0	0	0	3	0	9
Mae Wang	71	2	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	64
Om Koi	52	0	28	0	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	10
Sa Moeng	72	0	53	0	0	0	4	0	0	13	0	0	1	0	0	0	0	1
San Patong	75	0	25	0	0	0	6	0	0	9	2	0	1	2	0	1	2	27
San Sai	4	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Wiang Haeng	52	0	18	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	4
Total	**870**	**6**	**331**	**2**	**5**	**0**	**15**	**0**	**0**	**191**	**12**	**0**	**8**	**2**	**0**	**8**	**4**	**286**

E, H, B, A and T indicate *E. canis*, *H. canis*, *B. canis*, *A. platys* and *T. evansi,* respectively. E+H = *E. canis* and *H. Canis*; E+B = *E. canis* and *B. Canis*; E+A = *E. canis* and *A. Platys*; H+B = *H. canis* and *B. canis*; H+A = *H. canis* and *A. Platys*; B+A = *B. canis* and *A. Platys*; E+H+B = *E. canis*, *H. canis*, and *B. canis*; E+H+A = *E. canis*, *H. canis*, and *A. platys* E+B+A = *E. canis*, *B. canis*, and *A. Platys*; H+B+A = *H. canis*, *B. canis*, and *A. Platys*; E+H+B+A = *E. canis*, *H. canis*, *B. canis*, and *A. Platys*

Table 3 Risk factor analysis (gender, age group, and veterinary service availability) for blood parasite infections in dogs in Chiang Mai

Risk factor	# Examined	# Infected	# Uninfected	P-value (2-sided Pearson Chi-square)
Gender				0.66
Male	476 (54.7%)	323 (67.9%)	153 (32.1%)	
Female	394 (45.3%)	261 (66.2%)	133 (33.8%)	
Age group (year)				0.35
<1 Puppy	158 (18.2)	111 (70.3)	47 (29.8)	
1-4 Juvenile	453 (52.1)	298 (65.8)	155 (34.2)	
4-7 Adult	175 (20.1)	118 (67.4)	57 (32.6)	
7-10 Presenile	58 (6.7)	43 (74.1)	15 (25.9)	
>10 Senile	26 (3.0)	14 (53.9)	12 (46.2)	
Veterinary service availability within 10 km				0.00
Yes	397 (45.8%)	251 (63.2%)	146 (36.8%)	
No	473 (54.4%)	333 (70.4%)	140 (29.6%)	
Total	**870 (100%)**	**584 (67.1%)**	**286 (32.9%)**	**-**

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้รายงานการพบการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเลือดในสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่ โดยเชื้อที่พบได้แก่ *H. canis* (พบในสัดส่วนมากที่สุด) รองลงมาคือ *B. canis*, *E. canis* และ *A. platys* ตามลำดับ และไม่พบการติดเชื้อ *T. evansi* การติดเชื้อพบในเกือบทุกอำเภอและทุกช่วงอายุของสุนัขที่ศึกษา และอัตราการติดเชื้อที่ต่ำลงมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการมีหน่วยบริการทางสัตวแพทย์ใกล้บ้าน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร จาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2563

เอกสารอ้างอิง

Baneth, G. 2011. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology** 181(1): 3-11.

Baneth, G., S. Harrus, A. Gal and I. Aroch. 2015. Canine vector-borne co-infections: *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in the same host monocytes. **Veterinary Parasitology** 208(1): 30-34.

Carrade, D.D., J.E. Foley, D.L. Borjesson and J.E. Sykes. 2009. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 23: 1129-1141.

Chomel, B. 2011. Tick-borne infections in dogs-an emerging infectious threat. **Veterinary Parasitology** 179(4): 294-301.

Jittapalapong, S., O. Rungphisutthipongse, S. Maruyama, J.J. Schaefer and R.W. Stich. 2006. Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1081: 479-488.

Juasook, A., T. Boonmars, P. Sriraj, R. Aukkanimart, T. Jitjuk, P. Sudsarn and W. Maleewong. 2016. Prevalence of tick-borne pathogens in quarantined dogs at Nakornpranom animal quarantine station, Thailand. **Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine** 11(1): 1-9.

Laummaunwai, P., P. Sriraj, R. Aukkanimart, T. Boonmars, S. Boonjaraspinyo, S. Sangmaneedet, P. Potchimplee, P. Khianman and W. Maleewong. 2014. Molecular detection and treatment of tick-borne pathogens in domestic dogs in Khon Kaen, Northeastern Thailand. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 45(5): 1157-1166.

Little, S.E. 2010. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America; Small Animal Practice** 40(6): 1121-1140.

Liu, M., N. Ruttayaporn, V. Saechan, C. Jirapattharasate, P. Vudriko, P.F.A. Moumouni and H. Suzuki. 2016. Molecular survey of canine vector-borne diseases in stray dogs in Thailand. **Parasitology International** 65(4): 357-361.

Nithikadpanich, C., P. Takam and W. Charerntantanakul. 2019. Development of multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* and *Babesia canis* in canine blood. **Journal of Agricultural Research & Extension** 36(2): 80-90. [in Thai]

Pantchev, N., S. Pluta, E. Huisinga, S. Nather, M. Scheufelen, M.G. Vrhovec, A. Schweinitz, H. Hampel and R.K. Straubinger. 2015. Tick-borne diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian dogs; status quo and review of distribution, transmission, clinical findings, diagnostics and prophylaxis. **Parasitology Research** 114(Suppl.1): S19-54.

Piratae, S., K. Pimpjong, K. Vaisusuk and W. Chatan. 2015. Molecular detection of *Ehrlichia canis, Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in stray dogs in Mahasarakham province, Thailand. **Annals of Parasitology** 61(3): 183-187.

Piratae, S., P. Senawong, , P. Chalermchat, W. Harnarsa and B. Sae-chue. 2019. Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* and the association of infections with hematological responses in naturally infected dogs in Kalasin, Thailand. **Veterinary World** 12(1): 131.

Ravindran, R., J.R. Rao, A.K. Mishra, K.M.L. Pathak, N. Babu, C.C. Satheesh and R. Rahul. 2008. *Trypanosoma evansi* in camels, donkeys and dogs in India: comparison of PCR and light microscopy for detection. **Veterinarski Arhiv** 78: 89-94.

Skotarczak, B. 2003. Canine ehrlichiosis. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine** 10: 137-141.

Solano-Gallego, L., A. Sainz, X. Roura, A. Estrada-Peña and G. Miró. 2016. A review of canine babesiosis: the European perspective. **Parasites & Vectors** 9(1): 336.

Suksawat, J., Y. Xuejie, S.I. Hancock, B.C. Hegarty, P. Nilkumhang and E.B. Breitschwerdt. 2001. Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 15(5): 453-462.