



ศึกษาการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่เพอริเมอเรส และวิธี buffy coat smear เพื่อตรวจหา *Trypanosoma evansi* ในกระปือ ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

กมลพร ปัญจะ^{1,*} ธนิตา สนั่นเมือง¹ และธนภุต จันทรคง¹

¹คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตบางพระ จังหวัดชลบุรี 20110 ประเทศไทย

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์ คือ ศึกษาการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่เพอริเมอเรส และวิธี Buffy coat smear เพื่อตรวจหา *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) ในกระปือ ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย การเจาะเก็บเลือดกระปือ ทำในระหว่างเดือนกรกฎาคม – ธันวาคม พ.ศ. 2559 จำนวนทั้งหมด 80 ตัวอย่าง จากจังหวัดฉะเชิงเทรา (40 ตัว) และสระแก้ว (40 ตัว) ตัวอย่างทั้งหมดถูกทดสอบด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่เพอริเมอเรส วิธี buffy coat smear และค่าของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) ค่าพลาสมาโปรตีน (PP) รวมทั้งเก็บข้อมูลลักษณะการเลี้ยงของแต่ละฟาร์ม ผลการทดสอบสรุปว่า ตัวอย่างจากจังหวัดสระแก้ว ไม่พบเชื้อ *T. evansi* แต่พบเชื้อใน 2 ตัวอย่างจากจังหวัดฉะเชิงเทรา การตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่เพอริเมอเรส และวิธี buffy coat smear ให้ผลตรงกัน โดยมี sensitivity 100% และ specificity 100% ทั้งสองวิธี ความชุกของเชื้อจากตัวอย่างทั้งหมด คือ 2.5 % (2/80) ในจังหวัดฉะเชิงเทรา พบว่า มีค่าความชุกของโรคอยู่ที่ 5% (2/40) แต่ในจังหวัดสระแก้วตรวจไม่พบโรคนี้ ผลวิเคราะห์ลักษณะการเลี้ยง พบว่า เกษตรกรทั้งหมดในจังหวัดฉะเชิงเทรา และ 80% ในจังหวัดสระแก้ว เลี้ยงกระปือร่วมกับสัตว์ชนิดอื่น นอกจากนี้ยังพบว่า มีแมลงพาหะในกระปือเกือบทุกตัวอย่าง (78/80) ผลค่าเฉลี่ยของ PCV ในตัวอย่างของจังหวัดสระแก้ว (33 ± 2 %) มากกว่า ของจังหวัดฉะเชิงเทรา (29 ± 5 %) ผลค่าเฉลี่ย PP ในตัวอย่างของจังหวัดฉะเชิงเทรา (9.2 ± 0.8 g/dL) มากกว่า ของจังหวัดสระแก้ว (8.8 ± 0.8 g/dL) แต่ข้อมูลลักษณะการเลี้ยง แมลงพาหะ ค่าเฉลี่ย PCV และ PP ไม่มีความสัมพันธ์ ต่อการพบเชื้อ *T. evansi* ในกระปือ

คำสำคัญ: *Trypanosoma evansi*, PCR , Buffy coat smear

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2561. 13(2): 161-170.

E-mail address: Kamonporn.pa@gmail.com

Study on Using Polymerase Chain Reaction and Buffy Coat Smear Method for *Trypanosoma evansi* Detection in Buffalos of Eastern Thailand

Kamonporn Panja^{1,#}, Thanida Sananmuang¹, and Thanakrit Jankong¹

¹Faculty of Veterinary Medicine, Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Bang Phra,
Chon Buri 20110, Thailand

Abstract: The objective of this study was to study on using polymerase chain reaction (PCR) and Buffy coat smear method for *Trypanosoma evansi* detection in buffalos of eastern Thailand. Samples were collected from buffalo blood during July - December 2016. There were 80 samples; 40 samples from Chachoengsao province and the others were collected from Sa Kaeo province. All the samples were tested by PCR and buffy coat smear method. Packed cell volume (PCV) and plasma protein (PP) of samples were measured and data of husbandry management in each farm were recorded. Results from this study revealed that there was no *T. evansi* infection in sample from Sa Kaeo province. But, two infected samples of Chachoengsao province were found by both PCR and Buffy coat smear method. Therefore, PCR and buffy coat smear method had 100% sensitivity and 100 % specificity. The prevalence of all samples was 2.5% (2/80). Prevalence of Chachoengsao province was 5% (2/40) while the disease was not detected in Sa Kaeo province. Analysis of husbandry management showed that all of farmers in Chachoengsao and 80 % of farmers in Sa Kaeo province raise buffalos with other animals. In addition, vector insects were found in almost all buffalos (78/80). The average PCV of samples in Sa Kaeo province (33 ± 2 %) were more than those of Chachoengsao province (29 ± 5 %). The average PP of Chachoengsao province (9.2 ± 0.8 g/dL) were more than Sa Kaeo province (8.8 ± 0.8 g/dL). However, data of husbandry management, vector insects, PCV and PP did not relate to found *T. evansi* infection in buffalos

Keywords: *Trypanosoma evansi*, PCR , Buffy coat smear

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2018. 13(2): 161-170.

E-mail address: Kamonporn.pa@gmail.com

บทนำ

Trypanosoma evansi เป็นหนึ่งในโรคปรสิตชนิดหนึ่งที่สำคัญในประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ปรสิตชนิดนี้ส่งผลกระทบต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ป่าหลายชนิด เชื้อนี้เป็นปรสิตในเลือด โค และ กระบือ ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค Trypanosomiasis หรือโรคเซอรา (surra) ซึ่งทำให้เกิดการแท้งในโคและกระบือ (ไพฑูล , 2557) ทำให้เกิดภาวะลูกตายก่อนคลอด กตภูมิคุ้มกันและลดประสิทธิภาพของวัคซีนบางตัว โดยเฉพาะวัคซีนโรคคอบวม (Hemorrhagic septicaemia) ทำให้การทำวัคซีนมีประสิทธิภาพลดลง จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการระบาดของโรคคอบวมของกระบือในปีที่ผ่านมา (OIE Terrestrial Manual, 2012) การก่อโรคของ *Trypanosoma evansi* จะมีโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า variable surface glycoprotein (VGS) โดยโปรตีนชนิดนี้สามารถจะเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันโดยเปลี่ยนแปลงผิวของโปรตีนชนิดนี้ (OIE,2012) นอกจากนี้ เชื้อ *Trypanosoma evansi* ยังลดประสิทธิภาพของวัคซีนโรคปากเท้าเปื่อย (Food and mouth disease) และอหิวาห์สุกร (Classical swine fever) (Payne et al., 1993) ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อชนิดนี้ ยังก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจค่อนข้างสูงเพราะสามารถแพร่กระจายได้ง่ายและรวดเร็ว ทำให้ผลผลิตต่ำ เสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสัตว์ บางตัวอาจป่วยโดยแสดงอาการหรือไม่แสดงอาการก็ได้ (Hunngerford,1990; Blezinger, 1998) สัตว์ที่ไม่แสดงอาการอาจป่วยจะเป็นแหล่งรังโรค (reservoir) และสามารถแพร่กระจายโรคไปยังโค กระบือและสัตว์อื่นๆ เช่น ม้า ช้าง เสือ สุนัข สุกร กวาง เป็นต้น นอกจากการเกิดโรคในประเทศไทยแล้วในประเทศอินเดียรายงานคนติด

Trypanosoma evansi ซึ่งจัดเป็นโรคอุบัติใหม่ในประเทศอินเดีย ทั้งนี้ในปัจจุบันพบว่าจำนวนประชากรกระบือลดลงและจังหวัดชลบุรีเป็นหนึ่งในจังหวัดที่มีประชากรกระบือลดลงจากปี พ.ศ. 2553 – 2554 โดยลดลงมากเป็นอันดับที่ 4 ของประเทศ (ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์, 2554)

การวินิจฉัยโรคนี้สามารถทำได้โดยการตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกเชื้อ (Identification of the agent) และการตรวจวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยา (Serological tests) เช่น buffy coat smear (OIE,2012) นอกจากนี้การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่นิยมนำมาตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma evansi* เนื่องจากให้ผลที่จำเพาะเจาะจง (specificity) และมีความไวต่อเชื้อ (sensitivity) มากกว่าวิธีการตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และซีรั่มวิทยา เนื่องจากเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *T. evansi* โดยตรงจากเลือดสัตว์ โดยสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมได้แม้มีปริมาณเพียง 0.01- 0.001 พิโคกรัมหรือเทียบเท่ากับการตรวจหาเชื้อปรสิตเพียง 1 ตัวต่อมิลลิลิตรในกระแสเลือด วิธีการทางอณูชีวโมเลกุลนี้ นิยมนำมาใช้ เพื่อสำรวจความชุกของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในแง่ของการจำแนกเชื้อ การตรวจหาเชื้อซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเฝ้าระวัง ตลอดจนการป้องกันการเกิดโรคอุบัติใหม่หรือการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อชนิดนี้ได้อีกทางหนึ่ง (ไพฑูล ,2557)

จากเหตุผลข้างต้นผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญที่ต้องมีการเปรียบเทียบเชื้อ *Trypanosoma evansi* ด้วยวิธี buffy coat smear และ เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR) รวมทั้งศึกษาลักษณะการเลี้ยง การมีแมลงเป็นพาหะ

ค่าเฉลี่ยของ PCV และ PP เพื่อเฝ้าระวังการระบาดของโรคจากกระป๋องมาสู่สัตว์ชนิดต่างๆ เช่น ม้า วัว สัตว์ป่า และคน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ และยังผลทางอ้อมเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการอนุรักษ์กระบือในประเทศไทยอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma evansi* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่เพอริเมอเรสและวิธี buffy coat smear

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างจากเส้นเลือดบริเวณคอปริมาตร 3 ซีซี จากกระป๋องที่เลี้ยงภายในจังหวัดฉะเชิงเทราจำนวน 40 ตัวจากจำนวน 10 ฟาร์ม และจากสระแก้วจำนวน 40 ตัวจากจำนวน 10 ฟาร์ม ในระหว่างเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 มาปั่นที่ด้วยความเร็ว 3,300 g ใส่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบ

การสกัดสารพันธุกรรม

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA extraction) โดยใช้ชุดสกัดการพันธุกรรม Exgene blood SV mini (Geneall®, Seoul, Korea) โดยมีขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมพอสังเขปดังนี้ เติมน้ำ Proteinase K solution (20mg/ml) จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง buffy coat 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาติ หลังจากนั้นใส่สาร Buffer BL จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดี หลังจากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 10 นาติ ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นใส่ absolute ethanol จำนวน 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดมาใส่ใน SV column นำไปปั่น

เหวี่ยงที่ด้วยความเร็ว 13,500 g นาน 1 นาติ หลังจากนั้นทำการทิ้งของเหลวที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง และนำ column ที่มีสารพันธุกรรมติดอยู่ที่แผ่นกรอง (filter) มาทำการใส่สาร buffer BW จำนวน 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำ column ที่มีสารพันธุกรรมติดอยู่มาทำการใส่สาร buffer TW จำนวน 700 ไมโครลิตร และนำไปปั่นด้วยความเร็วและเวลาเท่าเดิม จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 g เป็นเวลา 1 นาติเพื่อทำให้แผ่นกรองในคอลัมน์แห้ง ในขั้นตอนสุดท้ายทำการละลายสารพันธุกรรมที่กรองได้ด้วยสาร buffer AE จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาติแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,500 g เป็นเวลา 1 นาติ ก็จะได้สารพันธุกรรมที่ต้องการ

ทำการวัดความเข้มข้นของสารพันธุกรรมที่สกัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ (spectrophotometer NanoDrop™2000c, MA, USA) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 ratio และทำการเจือจางสารพันธุกรรมที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้น อยู่ระหว่าง 1.5 – 2.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับปฏิกิริยาพอลิเมอเรสในขั้นต่อไป

ปฏิกิริยาพอลิเมอเรส

นำตัวอย่างสารพันธุกรรมที่สกัดได้จะถูกมาทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (NyxTechnix, USA) ในการศึกษาเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในครั้งนี้ทางคณะผู้ศึกษาได้ใช้ไพรเมอร์ TBR1/2 ตามวิธีการของ Masiga และคณะ (1992) โดยมีลำดับเบสดังนี้ Forward primer GAATATTAACAATGCGCAG Reward primer CCATTTATTAGCTTTGTTGC ขนาดของ PCR product เท่ากับ 164 bp

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ที่ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างจะมีปริมาตร 20 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดสารพันธุกรรมจำนวน 2 ไมโครลิตร สารละลาย Gotaq® Green master mix (promega, WI, USA) จำนวน 10 ไมโครลิตร forward primer และ reverse primer (ความเข้มข้น 10 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$) จำนวนอย่างละ 2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นจำนวน 4 ไมโครลิตร โดยอุณหภูมิและเวลาสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ในการศึกษาครั้งนี้มีรายละเอียดดังต่อไปนี้ ขั้นตอนการเตรียมการทำงานของเอนไซม์ taq DNA polymerase ที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 วินาที ตามด้วยขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมซึ่งประกอบด้วย 1) การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (DNA denaturation) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที 2) การจับของไพรเมอร์กับสายดีเอ็นเอ (Annealing) ที่ 60 องศาเซลเซียส เวลา 60 วินาที 3) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension) ที่ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที โดยขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมขั้นตอนนี้จะปรับตั้งให้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมนี้ทำซ้ำเป็นจำนวน 30 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 วินาที เพื่อให้การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอเกิดอย่างสมบูรณ์

ตัวอย่างที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์จะถูกนำมาตรวจหาขนาดของสารพันธุกรรมเป้าหมายด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยใช้ agarose gel (Invitrogen, CA, USA) ในสารละลาย Tris borate (TBE) buffer (90 mM Tris, 90 mM boric acid and 2 mM EDTA, pH 8) แล้วนำไปผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำ agarose gel ไปแช่ในสารละลายร้อยละ 5

ของเอธิเดียมโบรไมด์ (Promega, WI, USA) นาน 15 นาที แล้วแช่ต่อน้ำสะอาดนาน 10 นาที ทำการอ่านผลด้วยเครื่อง Gel Documentation System (Witeg, Wertheim, Germany)

การตรวจหา *Trypanosoma evansi* ด้วยวิธีการ Buffy coat smear

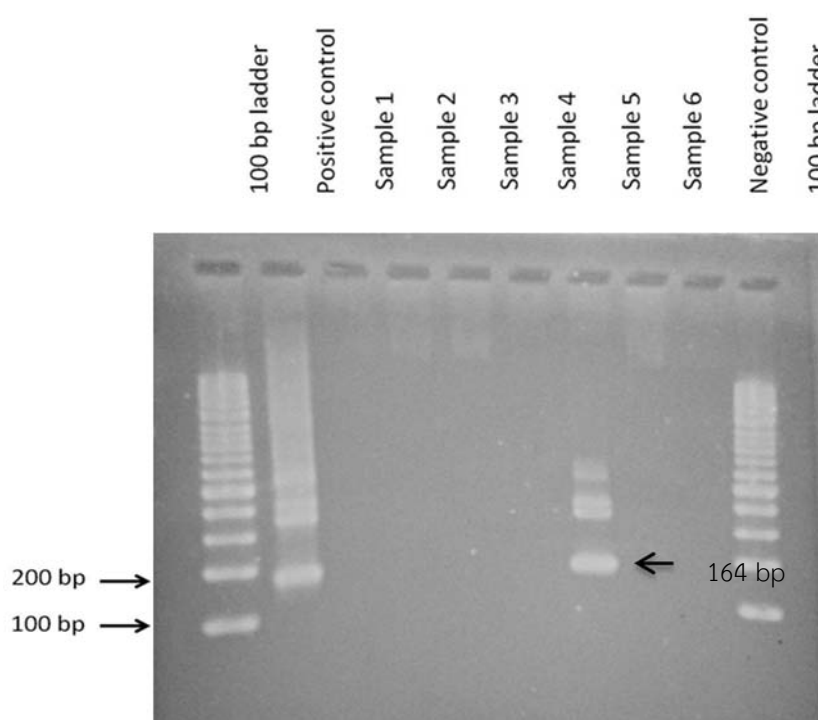
นำตัวอย่าง buffy coat ไปตรวจหา *Trypanosoma evansi* ด้วย วิธีการ Buffy coat smear สามารถเตรียมได้โดยใช้ capillary tube ดูดเลือดมาประมาณค่อน tube นำไป ปั่น โดยใช้แรงเหวี่ยงที่ 15,00 g นาน 5 นาที ต่อมาใช้ใบเลื่อยตัด capillary tube ตรงใต้บริเวณรอยต่อชั้น buffy coat และชั้นเม็ดเลือดแดงเคาะชั้น Buffy coat บน slide ใช้ cover slip smear ให้บางรอให้ฟิล์ม Buffy coat แห้ง ทิ้งไว้ 5 นาทีต่อมาหยดสี Wright's stain ให้ท่วมฟิล์ม Buffy coat ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วใส่น้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย ผสมให้เข้ากันกับสี Wright's stain โดยใช้ลูกยางเป่าเบา ๆ ให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาที ล้างด้วยน้ำประปา เช็ดด้านหลัง slide ให้สะอาด รอให้แห้งนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย X100 (oil immersion len)

ผลการศึกษา

จากตัวอย่างเลือดกระบือทั้งหมด 80 ตัวอย่าง จังหวัดฉะเชิงเทรา 40 ตัวอย่าง และจังหวัดสระแก้ว 40 ตัวอย่าง โดยสุ่มตัวอย่างด้วยวิธี simple random ตรวจพบเชื้อ *Trypanosoma evansi* ทั้งหมด 2 ตัวอย่าง ในพื้นที่ภาคตะวันออก โดยศึกษาระหว่างช่วงเดือนระหว่างเดือนมีนาคม – กันยายน พ.ศ. 2559 ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตารางแสดงผลการตรวจ *Trypanosoma evansi* ด้วยวิธีการ Buffy coat smear และปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส

	ตัวอย่าง ทั้งหมด	ผลลบจากการทดสอบ		ผลบวกจากการทดสอบ	
		Buffy coat smear	PCR	Buffy coat smear	PCR
สระแก้ว	40	40	40	0	0
ฉะเชิงเทรา	40	38	38	2	2

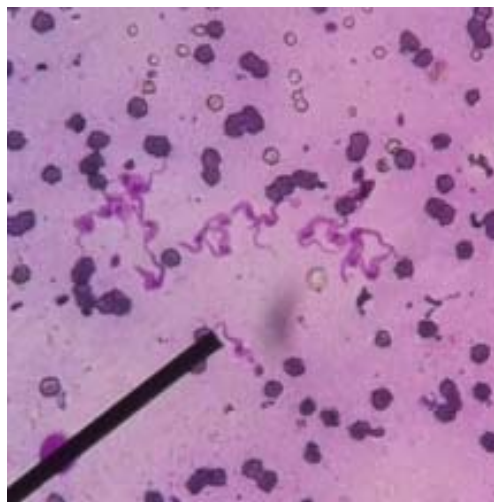


รูปที่ 1 รูปแสดงผล gel electrophoresis: ตัวอย่างที่ 1-4, 6 และตัวอย่างควบคุมลบ (negative control) ให้ผลลบ, ตัวอย่างที่ 5 และ ตัวอย่างควบคุมบวก (positive control) ซึ่งมีขนาดของสารพันธุกรรมเป้าหมายที่ 164 base pair (bp)

วิจารณ์ผลการทดลอง

รายงานผลการศึกษาทั้งหมด 80 ตัวอย่าง จาก จังหวัดฉะเชิงเทรา (40 ตัว) และ สระแก้ว (40 ตัว) ตัวอย่างทั้งหมดถูกทดสอบด้วย เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ เพอริเมอเรส, วิธี buffy coat smear และหาค่าของ เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) ค่าพลาสมาโปรตีน (PP) รวมทั้งเก็บข้อมูลลักษณะการเลี้ยงของแต่ละฟาร์ม

ผลการทดสอบสรุปว่า ตัวอย่างจากจังหวัดสระแก้ว ไม่พบเชื้อ *T. evansi* แต่พบเชื้อใน 2 ตัวอย่างจาก จังหวัดฉะเชิงเทรา การตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และวิธี buffy coat smear ให้ผลตรงกัน โดยมี sensitivity 100% และ specificity 100% ทั้ง สองวิธี ความชุกของเชื้อจากตัวอย่างทั้งหมด คือ 2.5 % (2/80) ในจังหวัดฉะเชิงเทราพบว่ามีค่าความชุก



รูปที่ 2 รูปภาพแสดงเชื้อ *Trypanosoma evansi* จากการตรวจด้วยวิธี buffy coat smear และการย้อมสี modify wright giemsa ที่กำลังขยายขนาด 40 เท่า

ของโรคอยู่ที่ 5% (2/40) แต่ในจังหวัดสระแก้วตรวจไม่พบโรคนี้ ผลวิเคราะห์ลักษณะการเลี้ยง พบว่าสภาพการเลี้ยงของกระป๋องทั้งหมด 80 ตัว มีการเลี้ยงกระป๋องร่วมกับสัตว์ชนิดอื่น 72 ตัว แต่เป็นโรคแค่เพียง 2 ตัว ดังนั้นแสดงว่าลักษณะการเลี้ยงรวมไม่มีผลต่อการเกิดโรค เมื่อวิเคราะห์ลักษณะการมีแมลงเป็นพาหะพบว่าจากกระป๋องทั้งหมด 80 ตัว มีกระป๋องที่มีแมลงเป็นพาหะทั้งหมด 78 ตัว แต่เป็นโรคเพียง 2 ตัว ดังนั้นแสดงว่าลักษณะการมีแมลงเป็นพาหะไม่มีผลต่อการเกิดโรค

อาการที่แสดงโดยทั่วไปของโรคเซอร่า มักมีไข้สูงโดยเฉพาะในระยะเรื้อรังจะแสดงอาการโดยมีไข้ขึ้นๆลงๆ น้ำหนักลด ซึม ไม่กินอาหาร เกิดภาวะเลือดจาง หรือเกิดภาวะดีซ่าน อาจพบจุดเลือดออกตามเยื่อเมือก ต่อม่าน้ำเหลืองโต อาจมีหรือไม่มีอาการบวม น้ำ มีรายงานว่าโรคนี้มีการแสดงอาการทางประสาท มักพบได้ในม้า สุนัข โค กระบือ กวาง และ หมู ีหมาลายัน ในม้าส่วนใหญ่จะแสดงอาการทางระบบประสาท เช่น เดินไม่สัมพันธ์กัน เป็นอัมพาตเริ่มจากสองขาหลังจนในที่สุดเกิดกล้ามเนื้อฝ่อลีบทำให้ไม่

สามารถเดินได้เป็นปกติ (Marc Desquesnes, et all. 2013) จากกลุ่มอาการสภาวะเลือดจางดังกล่าวข้างต้นจึงได้มีการตรวจหาค่า PCV และ PP เพื่อหาความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคเซอร่าพบว่า โดยสภาวะปกติค่า PCV ของกระป๋องจะอยู่ที่ 30.25-50.8 % (Mahmoud R. Abd Ellah et al., 2013) พบว่ากระป๋องที่มีค่า PCV ต่ำกว่า 30 มีทั้งหมด 25 ตัว พบเป็นโรคเพียง 2 ตัว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าค่า PCV ที่ต่ำกว่ามาตรฐานไม่ได้สัมพันธ์กับความเป็นโรค เมื่อวิเคราะห์ค่า PP พบว่าในสภาวะปกติค่า PP ในกระป๋องอยู่ที่ 5.6-8.1 g/dL พบว่ากระป๋องที่มีค่าพลาสมาโปรตีนสูงกว่า 8.1 มีทั้งหมด 65 ตัว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าค่า PP ที่สูงกว่ามาตรฐานจึงไม่ได้สัมพันธ์กับการเป็นโรค

การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ยิมนำมาตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma evansi* เนื่องจากให้ผลที่จำเพาะเจาะจง (specificity) และมีความไวต่อเชื้อ (sensitivity) มากกว่าวิธีการตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และซีรัมวิทยา เนื่องจากเป็นการ

ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *T. evansi* โดยตรงจากเลือดสัตว์ โดยสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมได้แม้มีปริมาณเพียง 0.01- 0.001 พิโคกรัมหรือเทียบเท่ากับการตรวจหาเชื้อปรสิตเพียง 1 ตัวต่อมิลลิลิตรในกระแสเลือด วิธีการทางอณูชีวโมเลกุลนี้ นิยมนำมาใช้ เพื่อสำรวจความชุกของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในแง่ของการจำแนกเชื้อ การตรวจหาเชื้อซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเฝ้าระวัง ตลอดจนการป้องกันการเกิดโรคอุบัติใหม่หรือการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อชนิดนี้ได้อีกทางหนึ่ง (ไพฑูล ,2557) แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และวิธี buffy coat smear ให้ผลตรงกัน โดยมี sensitivity 100% และ specificity 100% ทั้งสองวิธี เนื่องจาก เชื้อ *T. evansi* ตัวนี้อาจจะอยู่เฉพาะที่ใดที่หนึ่งในร่างกายสัตว์ ดังนั้นถ้าเจาะเลือดไปไม่พบจุดที่เชื้ออยู่โอกาสเจอเชื้อก็จะน้อยลงจึงทำให้ sensitivity และ specificity มีค่าเท่ากัน

สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจเชื้อ *T.evansi* ด้วยวิธีการของ buffy coat smear ให้ผลเช่นเดียวกับ วิธีการตรวจ PCR ลักษณะการเลี้ยงร่วมกับสัตว์อื่น การมีแมลงเป็นพาหะ การที่ค่าของ PCV และ PP ไม่เป็นไปตามมาตรฐานนั้นไม่เกี่ยวข้องกับการเป็นโรคเซอร์รา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมปศุสัตว์ ปศุสัตว์จังหวัด ชลบุรี นาย นิพนธ์ เข้มกลัด กลุ่มพัฒนาสุขภาพสัตว์จังหวัด ชลบุรี น.สพ.เชษฐาภักดิ์ ดาราพงศ์ นายสัตวแพทย์ชำนาญการ ปศุสัตว์จังหวัดสระแก้ว นายอำพันธ์ เวฬุตันติ กลุ่มพัฒนาสุขภาพสัตว์จังหวัดสระแก้ว น.สพ.

ไทยวิวัฒน์ วรรณสุข นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ นายประวุฒิ ปุริสพันธ์ ปศุสัตว์อำเภออุไรประเทศ ปศุสัตว์จังหวัดฉะเชิงเทรา นายสาโรช งามคำ กลุ่มพัฒนาสุขภาพสัตว์จังหวัดฉะเชิงเทรา สพ.ญ.ฉัตรสุดา ชุมเกษียร นายสัตวแพทย์ชำนาญการ สพ.ญ.ปรารง รอบคอบ นายสัตวแพทย์ปฏิบัติการ สพ.ญ.สุพรรณาศศิณทล นายสัตวแพทย์ปฏิบัติการ นายสมศักดิ์ ศิริติกุล สัตวแพทย์ผู้อาวุโส นายสุจน์ พวงศรี สัตวแพทย์ชำนาญาน นายศวีรพงศ์ เกียรติามรงค์ ปศุสัตว์อำเภอวังสมบูรณ์ สพ.ญ.นันทรัตน์ รัตนติตะกุล ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศ.ดร.สถาพร จิตपालพงศ์ และ นายสุกรินทร์ มหาสวัสดิ์

เอกสารอ้างอิง

- พิพล สุขสายไทยชนะ นิมิตร เชื้อเงิน ธีรพรรณ ภูมิภมร พัทธกร ณ สงขลาและประภัสสร เขวานสกุล. 2554. ผุงกระบือติดเชื้อ *Trypanosoma evansi*: การศึกษาเปรียบเทียบกับโลหิตวิทยา. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39: 325-331.
- พิพล สุขสายไทยชนะ. 2544. ศึกษาวิธี antigen detection ELISA ในการชันสูตรเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในกระบือ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาสัตว สาขาสัตวแพทยศาสตร์: 316-320.
- ไพฑูล แก้วหอม. 2557. การใช้วิธีทางอณูชีวโมเลกุล ตรวจหาเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในเลือดโคและกระบือ. วารสารสัตวแพทยมหาวิทยาลัย.9(1): 49-61.

- มานวิภา ผลภาค และสาทิติ ผลภาค. 2556. การติดเชื้อ ทริปปาโนโซมา อีแวนชาย ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 8(2): 32-55.
- วีรพล ทวีนนท์ เจษฎา จิกาวานนท์ สารพร พรตระกูล พิพัฒน์ เชี่ยวชาญ กระจำงโพธิ์ พิทยา ภาภิรมย์ และวชิราภรณ์ กัมปาวรรณ. 2544. ความชุกของทริปปาโนโซมาอีแวนชีย ในฟาร์มโคนมและฟาร์มสุกรในเขตจังหวัดขอนแก่น. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ขอนแก่น. 16(1): 53-58.
- Flávia Howes Aleksandro Schafer Da Silva, Cristiane de Lima Athayde, Marcio Machado Costa, Marcos Matoso Burgo Corrêa, Kaio Cesar Simiano Tavares, Luiz Claudio Miletto, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Anne Santos do Amaral, Anne Santos do Amaral and Claudete Schmidt. 2011. A New Therapeutic Protocol for Dogs Infected with *Trypanosoma evansi*. Acta Scientiae Veterinariae.39 (3): 1-4.
- Ellah, M. R. A., A. Ellah, M. I. Hamed, D. R. Ibrahim, and H. Z. Rateb. 2013. Reference Values for Hematological and Serum Biochemical Constituents in Buffalo's Heifers. International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants, Assiut University, Egypt : Journal of Animaland Veterinary Advances.10 (6): 85-92.
- Desquesnes, M., A. Dargantes, D. Lai, Z. Lun, P. Holzmuller, and S. Jittapalapong. 2013. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Transmission, Epidemiology and Control, Impact, and Zoonotic Aspects. BioMed Research International 2013 (321237): 1-20.
- Mathieu, P. 2013. The effect of the DNA preparation method on the sensitivity of PCR for the detection of *Trypanosoma evansi* in rodents and implications for epidemiological surveillance efforts. Veterinary Parasitology. 191: 203-208.
- Murrina. 2009. Surra (cited September 2015) :<http://mysrf.org/pdf/pdfhttp://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/surra.pdf>, Institute for international Cooperation in animal: 1-5.
- Sarataphan, N. 2012. Selection of *Trypanosoma evansi* Isolates for Antibody Detection in Cattle Deers Horses and Elephants using Agglutination Test. National Institute of Animal Health. 12(5): 1-10.
- The World Organisation for Animal Health. 2012. *TRYPANOSOMA EVANSI* INFECTION (SURRA). OIE Terrestrial Manual: 314-323 <http://www.oie.int/>

fileadmin/Home/eng/Health_standards
/tahm/2.01.21_TRYPANO_SURRA.pdf
(cited MAY 2015).

Jittapalapong, S. 2009. Prevalence of
Trypanosoma evansi Infection
Causing Abortion in Dairy Cows in
Central Thailand. Kasetsart Journal
(Nat. Sci.) 43: 53-57.

Baticados, W. N., D. L. Castro and A. M.
Baticados. 2011. Parasitological and
PCR detection of *Trypanosoma*
evansi in buffaloes from Luzon
Philippines. Ceylon Journal of Science
(Bio. Sci.) 40 (2): 141-146.

