



ความชุก และปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ *Anaplasma marginale* ในโคเนื้อ ในพื้นที่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสลักพระ จังหวัดกาญจนบุรี

นันทิยา แซ่เตียว^{1,2,3} พชรธร ลิ้มกิง⁴ นันทวรรณ ญาติบรรทุง⁵ วังระ นิลเพชร³ ประภา เหล่าสมบูรณ์³
พุทธพร พุ่มโรจน์³ และสถาพร จิตตपालพงศ์^{6,*}

¹ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140, ²ศูนย์ความเป็นเลิศด้าน
เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการ
อุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900, ³สาขาสัตวศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง
จ.ราชบุรี 76000, ⁴สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
จ.ปทุมธานี 12130, ⁵ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
จ.นครปฐม 73140, ⁶ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกและปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ *Anaplasma marginale* ของโคเนื้อที่เลี้ยงภายในเขตอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าสลักพระ จังหวัดกาญจนบุรี โดยเก็บตัวอย่างเลือดโคเนื้อจำนวน 244 ตัวอย่างจากพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสลักพระ ประกอบด้วยพื้นที่ในเขตอำเภอเมือง (94 ตัวอย่าง) อำเภอศรีสวัสดิ์ (25 ตัวอย่าง) และอำเภอบ่อพลอย (125 ตัวอย่าง) โดยทำการตรวจหาการติดเชื้อ *A. marginale* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR- Polymerase chain reaction) จากผลการตรวจพบเชื้อ *A. marginale* ทั้งหมดร้อยละ 54.1 (132/244) และปัจจัยที่นำมาศึกษาการติดเชื้อ *A. marginale* ประกอบด้วย พื้นที่ อายุ เพศ ขนาดฝูง ระบบการเลี้ยง ความหนาแน่นของจำนวนแมลง การถ่ายพยาธิ สัตว์เลี้ยงชนิดอื่นในฟาร์ม จำนวนเห็บที่พบบนตัวและคอกสัตว์ และพื้นที่บริเวณเลี้ยงสัตว์ พบว่าอำเภอบ่อพลอยมีการติดเชื้อ *A. marginale* สูงสุดร้อยละ 77.7 (73/125) รองลงมาคืออำเภอเมืองร้อยละ 45.7 (43/94) และอำเภอศรีสวัสดิ์ร้อยละ 28.07 (16/25) ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการติดเชื้อ *A. marginale* คือ อายุ ขนาดฝูง และความหนาแน่นของจำนวนแมลง ($P < 0.05$) จากผลการศึกษาครั้งนี้ได้ยืนยันถึงการติดเชื้อของโคเนื้อที่อาจเป็นพาหะของโรค Anaplasmosis และเป็นส่วนสำคัญของการแพร่กระจายเชื้อไปยังสัตว์ป่าที่อยู่บริเวณใกล้เคียง

คำสำคัญ: ความชุก โคเนื้อ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสลักพระ *Anaplasma marginale*

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2558. 10(2): 69-80.

E-mail address: fvetspj@ku.ac.th

Prevalence and Risk Factors of *Anaplasma marginale* Infections in Beef Cattle in Salakpra Wildlife Sanctuary, Kanchanaburi Province

Nantiya Saetiew^{1,2,3}, Patcharathorn Simking⁴, Nantawan Yatbantoong⁵,
Watchara ninphet³, Prapa Laosomboon³, Putthaphorn Pumrojana³ and
Sathaporn Jittapalapong^{6,#}

¹Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand; ²Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand; ³Division of Animal Science, Faculty of Science and Technology Mubanchombueng Rajabhat University, Ratchaburi 76000, Thailand; ⁴Division of Animal Health Science, Faculty of Agriculture Technology, Rajamangala University of Technology Thanya-buri, Pathum Thani 12130, Thailand; ⁵Department of Large Animal and Wildlife Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand; ⁶Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, 10900, Thailand

Abstract: The objective of this study was to examine the prevalence and factors associated with *Anaplasma marginale* infections in beef cattle invading natural forest area of Salakpra Wildlife Sanctuary in Kanchanaburi province using polymerase chain reaction (PCR) assays. A total of 244 blood samples from beef cattle were examined for *A. marginale*. Factors associated with *A. marginale* infection including location, age, sex, herd size, insect abundant, deworming, domestic pet in household, tick existed in cattle and barn, and the grazing area management were statistically analyzed. The results revealed that 54.1% of cattle were positive for *A. marginale* infection. Bo Phloi District had the highest infection at 77.7% (73/125). Mueang and Sri Sawat District beef cattle were infected with the organism at the rate of 45.7% (43/94) and 28.1% (16/25), respectively. The potential significant factors associated with *A. marginale* infections were age, herd size and insect abundant ($P<0.05$). The present study has confirmed the presence of Anaplasmosis carriers, which have the potential role for transmission to nearby livestock or wildlife.

Keywords: Prevalence, Beef cattle, Salakpra Wildlife Sanctuary, *Anaplasma marginale*

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2015. 10(2): 69-80.

E-mail address: fvetspj@ku.ac.th

บทนำ

เชื้อริกเก็ตเซียชนิด *Anaplasma marginale* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดการตายในฝูงโค กระบือเพิ่มมากขึ้น โดยเห็บและแมลงดูดเลือดหลายชนิดเป็นพาหะ โดยเฉพาะเห็บ (Tabanus) การถ่ายทอดเชื้อเป็นแบบโดยตรง คือ เชื้อผ่านออกจากเห็บหรือแมลงแล้วเข้าสู่ตัวสัตว์โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงโคที่เป็นโรคพบอาการทั้งแบบรุนแรงและแบบเรื้อรัง อาการสำคัญคือ ไข้สูง เยื่อเมือกซีด เบื่ออาหาร หายใจหอบ น้ำนมลด สัตว์ท้องอาจแท้งลูกได้ บางรายมีอาการดีซ่านร่วมด้วยปัสสาวะมีสีเหลืองคล้ายสีฟางข้าว สัตว์ป่วยที่มีอายุมากจะตายภายใน 1-4 วัน (OIE, 2012)

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *A. marginale* ในประเทศไทยนิยมใช้การย้อมสีฟิล์มโลหิตและตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ซึ่งเป็นการประเมินสุขภาพเบื้องต้นและมีความสำคัญในการตรวจหาปรสิตในเลือดชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย แต่อย่างไรก็ตามวิธีการใช้กล้องจุลทรรศน์มีข้อจำกัดโดยผู้อ่านผลต้องมีความชำนาญในการแยกรูปร่างของเชื้อ *A. marginale* กับเชื้อชนิดอื่น อีกทั้งวิธีการนี้มีความไวต่ำ (low sensitivity) ในการตรวจหาเชื้อ *A. marginale* ในกรณีปริมาณเชื้อในเลือดต่ำวิธีการย้อมสีฟิล์มโลหิตสามารถที่จะตรวจพบเชื้อ 1 ตัว ในเลือดที่มีปริมาณมากกว่า 10^6 /มิลลิลิตร (Gale *et al.*, 1996) สำหรับในกรณีสัตว์ที่เป็นพาหะของโรค *A. marginale* มักมีปริมาณเชื้อในเลือดน้อยกว่า 10^6 /มิลลิลิตร ทำให้การตรวจหาเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ในสัตว์ที่เป็นพาหะของโรคเกิดความผิดพลาดได้ง่าย ดังนั้นในสัตว์ที่มีปริมาณของเชื้อในเลือดต่ำ ควรต้องใช้วิธีการตรวจอื่นๆ ช่วย เช่น การใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction - PCR) เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *A. marginale* อีกวิธีหนึ่งที่มีความ

ไวและความจำเพาะสูงในการตรวจวินิจฉัยโรค (Carelli *et al.*, 2007) โดยในปัจจุบันยีนที่นำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *A. marginale* ได้แก่ ยีนในกลุ่ม major surface protein (*msp*) ประกอบด้วย *msp1a*, *msp1b*, *msp2*, *msp3*, *msp4* และ *msp5* ซึ่งยีน *msp4* มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดโดยมีความจำเพาะและใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *A. marginale* อย่างแพร่หลาย (de la Fuente *et al.*, 2003, 2004)

โรคอะนาพลาสโมซิสมีรายงานพบในประเทศไทยมานานกว่า 50 ปี (กิจ และรำพึง, 2508) และมีรายงานการพบอย่างต่อเนื่อง (จักริน และคณะ, 2551; นิตารัตน์ และคณะ, 2543; ปิยะ และคณะ, 2549; รุจิรัตน์ และสุธี, 2550; วีระศักดิ์ และคณะ, 2549; สถาพร และฉวีวรรณ, 2531; อิทธิพล และพัชรา, 2539; อุษา และคณะ, 2538; Saetiew *et al.*, 2012)

จังหวัดกาญจนบุรี เป็นจังหวัดที่มีพื้นที่การเลี้ยงโคเนื้อมากที่สุดอันดับ 1 ในภาคกลาง (คณะกรรมการยุทธศาสตร์โคเนื้อกรมปศุสัตว์, 2555) ลักษณะภูมิประเทศของจังหวัดกาญจนบุรี ประกอบไปด้วย ทิวเขา หุบเขา และที่ราบลุ่มแม่น้ำ โดยพื้นที่ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นป่าไม้และภูเขา (ร้อยละ 63) (สำนักงานปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์, 2558) ซึ่งมีความหลากหลายของแมลงพาหะนำโรคในพื้นที่ (Muenworn *et al.*, 2010) แต่รายงานการพบโรคยังคงมีอยู่จำนวนน้อย โดยในการศึกษาในครั้งนี้ ทำการศึกษาบริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสลักพระ จ.กาญจนบุรี มีเนื้อที่ประมาณ 858.55 ตารางกิโลเมตร หรือ 536,594 ไร่ตั้งอยู่ในท้องที่ 4 อำเภอ คือ อำเภอเมือง อำเภอศรีสวัสดิ์ อำเภอบ่อพลอย และอำเภอหนองปรือ บริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสลักพระเป็น

แนวพื้นที่กันชนที่อยู่ในความรับผิดชอบของส่วนราชการและพื้นที่บางส่วนถือครองของราษฎรจัดเป็นเขตพื้นที่ควบคุมและส่งเสริมการใช้ประโยชน์โดยพื้นที่บางส่วนมีการเลี้ยงปศุสัตว์ และมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของการเลี้ยงปศุสัตว์ในเขตบริเวณดังกล่าว ทำให้ต้องมีการพิจารณาถึงปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคในพื้นที่เขตกันชนที่เปรียบเสมือนเป็นด่านป้องกันโรคจากพื้นที่ป่าธรรมชาติเข้าสู่ฟาร์มหรือจากฟาร์มสู่เขตพื้นที่ป่าธรรมชาติ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาความชุกและปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ *A. marginale* ของโคเนื้อที่เลี้ยงในเขตอนุรักษ์สัตว์ป่าสลักพระ จ.กาญจนบุรี

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเลือดและการวินิจฉัยโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

ตัวอย่างเลือดจากโคเนื้อจำนวน 244 ตัวเก็บรวบรวมจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสลักพระ จ.กาญจนบุรี ประกอบด้วย พื้นที่ในอำเภอเมือง (94 ตัวอย่าง) อำเภอศรีสวัสดิ์ (25 ตัวอย่าง) และอำเภอบ่อพลอย (125 ตัวอย่าง) โดยใช้การสุ่มตัวอย่างแบบหลายขั้นตอน (Multistage sampling) และการกำหนดขนาดของตัวอย่างโดยใช้ประชากรโคเนื้ออ้างอิงในพื้นที่จำนวน 12,000 ตัว ค่าความชุกคาดการณ์ที่ร้อยละ 30 และระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 จากนั้นคำนวณจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาโดยใช้โปรแกรม Winepiscop version 2.0

ทำการเก็บเลือดจากตำแหน่งหลอดเลือดดำที่คอ (jugular vein) จำนวน 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดเกล็ด Citrate และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เพื่อ

ตรวจด้วยเทคนิค PCR สำหรับการตรวจวินิจฉัยโดยกล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมสีฟิล์มเลือดด้วย Wright & Giemsa เพื่อตรวจหาการติดเชื้อในเม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะเฉพาะ

การเก็บข้อมูล

การบันทึกข้อมูลสุขภาพของโคเนื้อประกอบด้วย อายุ เพศ ภาวะสุขภาพ และพื้นที่เก็บตัวอย่าง แบบสอบถามในการเก็บข้อมูลอื่นๆ ประกอบด้วย ขนาดฝูง (ขนาดเล็ก 1-40 ตัว/ฝูง; ขนาดกลาง 41-80 ตัว/ฝูง; ขนาดใหญ่ มากกว่า 80 ตัว/ฝูง), การจัดการตามฤดู (ฤดูร้อน/ฤดูฝน: เลี้ยงปล่อยในทุ่งหญ้า; เลี้ยงในโรงเรือน), ความหนาแน่นของจำนวนแมลงในคอกสัตว์ (น้อย คือ พบ 0-10 ตัว/โค 1 ตัว; ปานกลาง คือ พบ 11-20 ตัว/โค 1 ตัว ; มาก คือ พบมากกว่า 20 ตัว/โค 1 ตัว), ความหนาแน่นของพื้นที่ป่า (ต่ำ คือ 1-10 ต้น/5 ตร.ม.; ปานกลาง คือ 10-20 ต้น/5 ตร.ม.; สูง คือ มากกว่า 20 ต้น/5 ตร.ม.), การถ่ายพยาธิ (มี; ไม่มีการถ่ายพยาธิ), สัตว์ชนิดอื่นเลี้ยงในฟาร์ม (พบ; ไม่พบ), เห็นบนตัวสัตว์, เห็นในคอกสัตว์, บริเวณเลี้ยงสัตว์ในการปล่อยเพาะเลี้ยง (พื้นที่ในฟาร์ม; พื้นที่สาธารณะ)

การสกัดสารพันธุกรรม (DNA)

เลือดโคปริมาณ 100 ไมโครลิตร และเติม 500 ไมโครลิตร ของ lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl และ Na₂EDTA pH 8.2) แยกสกัด DNA โดยใช้ Phenol/Chloroform ในปริมาตร 1:1 ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เก็บสารละลายส่วนบนสกัดอีกครั้งด้วย Chloroform ในปริมาตร 1:1 ผสมสารทั้งสองชั้นด้วยการเขย่าเบาๆ และนำไปปั่นเพื่อแยกชั้นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิมเก็บ

สารละลายส่วนบนเพื่อนำมาตกตะกอน DNA โดยใช้ absolute ethanol ที่เย็นแล้วล้างด้วย เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ทิ้งไว้ให้แห้งและละลาย DNA ในสารละลาย TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 M EDTA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Sambrook and Russel, 2001)

การเพิ่มจำนวนยีน *msp4*

การเพิ่มจำนวนยีน *msp4* โดยใช้ primers คือ MSP43 (5'-CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAA TCTTGC-3') และ MSP45 (5'-GGGAGCTCCTAT GAATTACAGAGAATTGTTTAC-3') สภาวะและองค์ประกอบสำหรับการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *msp4* ใช้ตามวิธีของ de la Fuente *et al.* (2005) ผลผลิตของ PCR จะมีขนาดประมาณ 849 เบสแพร์ และนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค gel electrophoresis (1% agarose gel) ตัวอย่าง DNA ที่ได้จะส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Bio Service Unit (NSTDA) และนำผลนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อเปรียบเทียบค่าความเหมือนของเชื้อ (% identity) ของลำดับเบสในยีน *msp4*

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของความชุกของการติดเชื้อ *A. marginale* กับปัจจัยเสี่ยงที่มาจากตัวแปรต่างๆ ได้แก่ พื้นที่ ขนาดฝูง อายุ เพศ การจัดการตามฤดูกาล ความหนาแน่นของจำนวนแมลงในคอกสัตว์ ความหนาแน่นของพื้นที่ป่า การถ่ายพยาธิ การมีสัตว์เลี้ยงชนิดอื่นในฟาร์ม เหยื่อที่พบบนตัวสัตว์ เหยื่อที่พบในคอกสัตว์ และบริเวณเลี้ยงสัตว์ในการปล่อยแพะ เล็ม โดยใช้ Odds ratio ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (95% CI) และใช้สถิติวิเคราะห์ Chi-square test เพื่อ

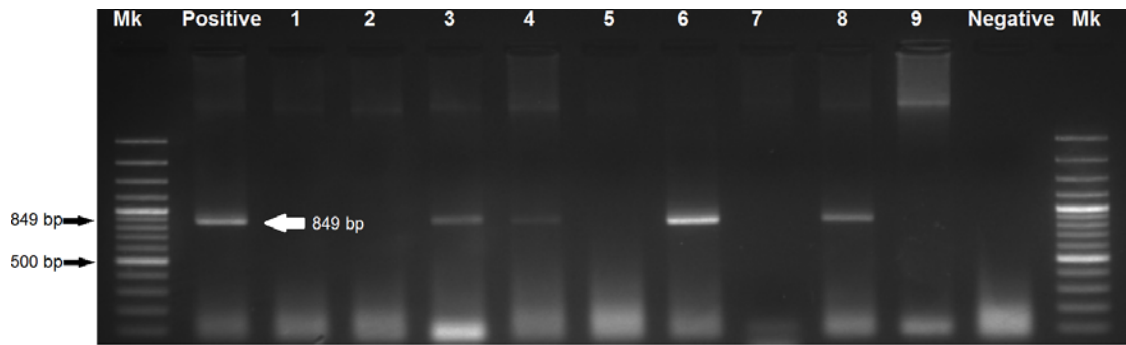
เปรียบเทียบสัดส่วนการตรวจพบเชื้อ *A. marginale* และปัจจัยต่างๆ โดยมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ P -value < 0.05 โดยใช้โปรแกรม Number Cruncher Statistical System programs (NCSS) version 2000 (Kaysville, UT)

ผลการทดลอง

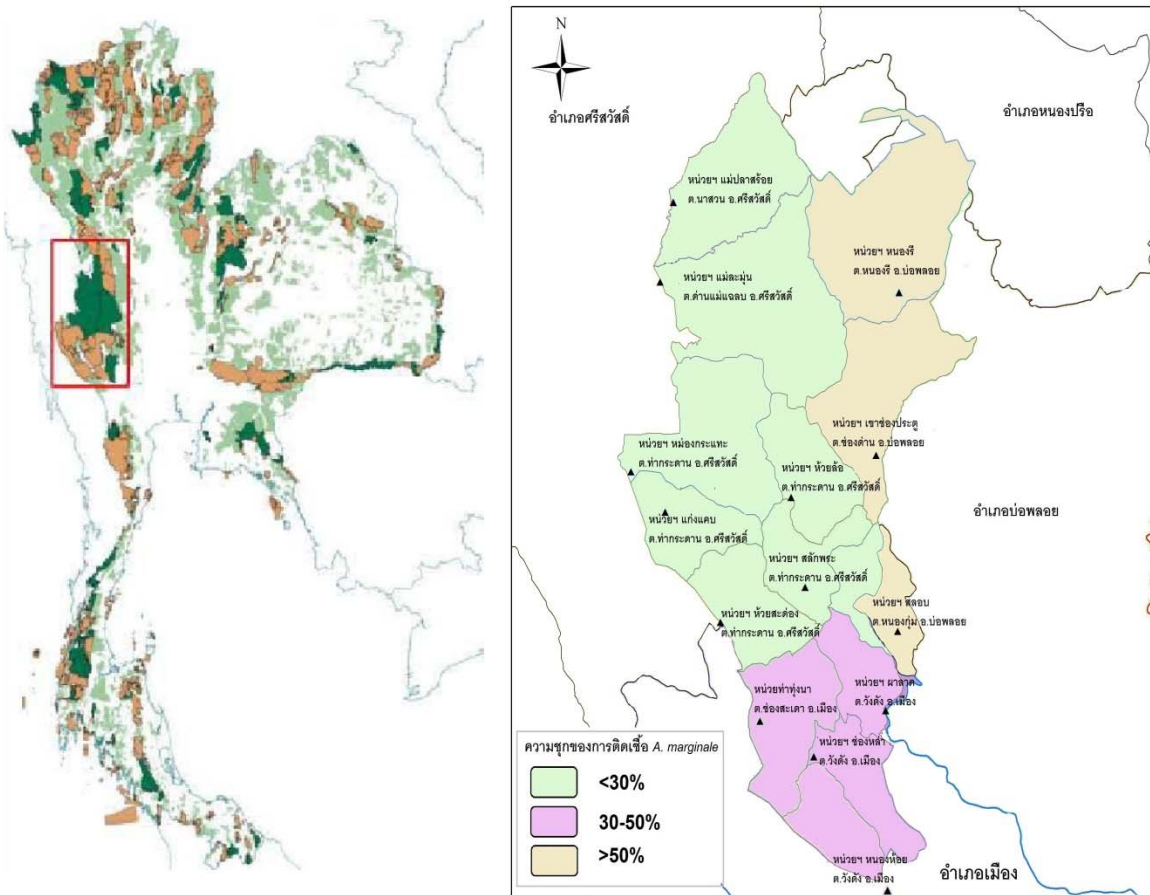
การวิจัยครั้งนี้เป็นการตรวจหาเชื้อ *A. marginale* ในโคเนื้อในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสลักพระ จ.กาญจนบุรี โดยใช้การตรวจฟิล์มเลือดเปรียบเทียบกับเทคนิคทางโมเลกุลจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 244 ตัวอย่างจาก 36 ฟาร์ม

พบการติดเชื้อ *A. marginale* ในโคเนื้อจากการตรวจฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ร้อยละ 2.4 ในขณะที่การตรวจด้วยเทคนิค PCR พบการติดเชื้อร้อยละ 54.1 สำหรับการจำแนกชนิด *Anaplasma* spp. ด้วยเทคนิค PCR โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *msp4* พบว่าคูโพรเมอร์และปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ *Anaplasma* spp. เป้าหมายได้ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 849 เบสแพร์ และเมื่อนำ PCR product ดังกล่าวไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี Sequence analysis (Biodesign) เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล Genbank โดยโปรแกรม BLAST และ alignment ClustalW พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียง (similarity) มีความจำเพาะระดับจีโนมกับ *A. marginale* (accession number: AY 127073) ที่ค่าความเหมือน (% identity) เท่ากับร้อยละ 99

การตรวจด้วยวิธี PCR พบเชื้อร้อยละ 54.1 (132/244) (ตารางที่ 1, รูปที่ 1 และ 2) การติดเชื้อ *A. marginale* สูงสุดพบที่อำเภอบ่อพลอย คือ



รูปที่ 1 การเพิ่มปริมาณของยีน *msp4* โดยใช้ไพรเมอร์ *msp45/msp43* ; Lane Mk คือ 100 เบสแพร์ DNA Ladder Marker, Positive คือ Positive control, Negative คือ Negative control, Land 1-9 คือ ตัวอย่างที่ทำการตรวจ, Lane 3, 4, 6 และ 8 คือ ตัวอย่างที่ติดเชื้อ *A. marginale* ขนาด 849 เบสแพร์



รูปที่ 2 แผนที่แสดงความชุกของการติดเชื้อ *A. marginale* ในโคเนื้อในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสลักพระ จังหวัดกาญจนบุรี

ร้อยละ 77.7 (73/125) รองลงมาคือ อำเภอเมืองและ อำเภอศรีสวัสดิ์ พบร้อยละ 45.7 (43/94) และ 28.1 (16/25) ตามลำดับ ปัจจัยที่นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในการติดเชื้อ *A. marginale* คือ พื้นที่ ขนาดฝูง อายุ เพศ การจัดการตามฤดูกาล ความหนาแน่นของจำนวนแมลงในคอกสัตว์ ความหนาแน่นของพื้นที่ป่า การถ่ายพยาธิ การมีสัตว์เลี้ยงชนิดอื่นในฟาร์ม เหยื่อที่พบบนตัวสัตว์ เหยื่อที่พบในคอกสัตว์ และบริเวณเลี้ยงสัตว์ในการปล่อยแพะเล็ม (ตารางที่ 2) โดยพบว่าปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อ *A. marginale* ได้แก่ อายุ ขนาดฝูง และความหนาแน่นของจำนวนแมลงที่พบในฟาร์ม (ตารางที่ 3) โดยปัจจัยเหล่านี้แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

วิจารณ์ผลการทดลอง

รายงานผลการติดเชื้อ *A. marginale* ในประเทศไทยส่วนใหญ่จะใช้วิธีการตรวจฟิล์มเลือด ย้อมสีดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากทำได้สะดวกและรวดเร็ว เหมาะที่จะใช้ในงานภาคสนามที่ต้องการผลทันทีเพื่อทำการรักษาสัตว์ไม่ให้เกิดอันตรายจากการติดเชื้อ แต่มีข้อจำกัดสำหรับในกรณีที่ต้องการทำการตรวจสัตว์ในจำนวนมากส่งผลให้ต้องใช้เวลานาน และในกรณีที่สัตว์ไม่แสดงอาการของโรค อาจจะมีจำนวนเชื้อในกระแสเลือดไม่มากพอที่จะตรวจพบโดยวิธีนี้ สำหรับผลการศึกษาในครั้งนี้พบการติดเชื้อ *A. marginale* ในโคเนื้อจากการตรวจฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ร้อยละ 2.4 ในขณะที่การตรวจด้วยเทคนิค PCR พบการติดเชื้อร้อยละ 54.07 ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเทคนิค PCR สามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *A. marginale* ในกลุ่มของสัตว์ที่ไม่แสดงอาการการติดเชื้อ โดยให้ผลที่มีความ

แม่นยำสูงกว่าวิธีการตรวจฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ สอดคล้องกับรายงานของ Kaewhom (2014)

สำหรับการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *A. marginale* พบว่าอายุของโคเนื้อมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสัตว์ที่มีอายุมากกว่า 5 ปี เป็นกลุ่มสัตว์ที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *A. marginale* สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปี และ สัตว์ในช่วงอายุ 1-5 ปี (Odds ratio = 3.424, 95% CI = 1.871-6.266, $P=0.001$) ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานของKocan *et al.* (2010) โดยพบว่าในสัตว์ที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปีเป็นช่วงที่ยังมีภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่และการพัฒนาภูมิคุ้มกันอาจจะยาวนานถึงอายุ 2 ปี ทำให้พบการติดเชื้อ *A. marginale* ในกลุ่มสัตว์ช่วงอายุดังกล่าวมีอัตราต่ำกว่า สำหรับการติดเชื้อในสัตว์ที่มีอายุมากกว่า 5 ปี ซึ่งในการศึกษานี้ทำในกลุ่มของสัตว์ที่ไม่ได้แสดงอาการต่อโรค แสดงว่าระดับของเชื้อในกระแสเลือดมีอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งยังคงสามารถกระจายตัวได้ในกรณีที่มีพาหะที่เหมาะสม สัตว์กลุ่มนี้ถือเป็นกลุ่มเสี่ยงทั้งในด้านการกระจายของโรค และการสูญเสียสัตว์ในกรณีที่ระดับภูมิคุ้มกันต่ำ (Silva *et al.*, 2014)

สำหรับการศึกษานาฬิกาของฝูง พบว่าขนาดฝูงสัตว์ที่มีจำนวนมากกว่า 40 ตัวขึ้นไป มีอัตราการติดเชื้อ *A. marginale* ร้อยละ 60.95 (64/105) ซึ่งสูงกว่าฝูงสัตว์ที่มีขนาดต่ำกว่า 40 ตัว (อัตราการติดเชื้อร้อยละ 44.44 (44/99)) โดยแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในฝูงที่มีขนาดตั้งแต่ 40 ตัวขึ้นไป มีปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อ *A. marginale* เท่ากับ 2.89 เท่าของกลุ่มที่มีขนาดฝูงที่

ตารางที่ 1 ผลของความชุกของการติดเชื้อ *A. marginale* ที่ตรวจพบในโคเนื้อในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสลักพระ จังหวัดกาญจนบุรี และความสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ที่ทำการศึกษา

ตัวแปร	จำนวน(ตัว)	จำนวนสัตว์ติดเชื้อ <i>A. marginale</i> (%)	χ^2	df	P-value
พื้นที่					
1. อำเภอเมืองกาญจนบุรี	9	43 (45.74)	4.560	2	0.102
2. อำเภอศรีสวัสดิ์	25	16 (28.07)			
3. อำเภอบ่อพลอย	125	73 (77.66)			
ขนาดฝูง					
1. ขนาดเล็ก (1-40 ตัว)	60	21 (35.00)	11.725	2	0.0028
2.ขนาดกลาง (40-80 ตัว)	105	64 (60.95)			
3.ขนาดใหญ่ (มากกว่า 80 ตัว)	79	47 (59.49)			
อายุ					
1. 0-1 ปี	37	21 (56.76)	16.768	2	0.001
2. 1-5 ปี	129	55 (42.64)			
3. มากกว่า 5 ปี	78	56 (71.79)			
เพศ					
1. เพศผู้	40	19 (47.50)	0.838	1	0.359
2. เพศเมีย	204	113 (55.39)			
การจัดการตามฤดู (ฤดูแล้ง)					
1. เลี้ยงปล่อยในทุ่งหญ้า	231	122 (52.81)	2.880	1	0.089
2. เลี้ยงในโรงเรือน	13	10 (76.92)			
ความหนาแน่นของจำนวนแมลงในคอกสัตว์					
1. น้อย (0-10 ตัว/โค 1 ตัว)	99	44 (44.44)	7.119	2	0.028
2. ปานกลาง (11-20 ตัว/โค 1 ตัว)	50	33 (66.00)			
3. มาก (มากกว่า 20 ตัว/โค 1 ตัว	95	55 (57.89)			
ความหนาแน่นของพื้นที่ป่า					
1. ต่ำ (1-10 ต้น/ 5 ตร.ม.)	84	42 (50.0)	5.451	2	0.065
2. ปานกลาง (10-20 ต้น/ 5 ตร.ม.)	147	79 (53.74)			
3. สูง (มากกว่า 20 ต้น/ 5 ตร.ม.)	13	11 (84.62)			
การถ่ายพยาธิ					
1. มี	195	106 (54.36)	0.026	1	0.870
2. ไม่มี	49	26 (53.06)			
สัตว์ชนิดอื่นเลี้ยงในฟาร์ม					
1. พบ	208	113 (54.33)	0.029	1	0.863
2. ไม่พบ	36	19 (52.78)			
เห็บบนตัวสัตว์					
1. มี	25	9 (36.00)	3.674	1	0.055
2. ไม่มี	219	123 (56.16)			
เห็บในพื้นที่คอกสัตว์					
1. มี	80	91 (55.49)	0.388	1	0.532
2. ไม่มี	164	41 (51.25)			
บริเวณเลี้ยงสัตว์ในการปล่อยแพะเล็ม					
1. พื้นที่ในฟาร์ม	157	90 (57.32)	1.845	1	0.174
2. พื้นที่สาธารณะ	87	42 (48.28)			
รวม	244	132 (54.09)			

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเสี่ยงและการตรวจพบเชื้อ *A. marginale* ที่ตรวจพบจากโคเนื้อในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสลักพระ จังหวัดกาญจนบุรี ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ปัจจัยเสี่ยง	Odd ratio	95% CI	P-value
อายุ			
1.0-1 ปี	1.765	0.844-3.694	0.131
2.1-5 ปี	1		
3.มากกว่า 5 ปี	3.424	1.871-6.266	0.001
ขนาดฝูง			
1. ขนาดเล็ก (1-40 ตัว)	1		
2. ขนาดกลาง (41-80 ตัว)	2.899	1.498-5.607	0.001
3. ขนาดใหญ่ (มากกว่า 80 ตัว)	2.727	1.361-5.466	0.005
ความหนาแน่นของจำนวนแมลง			
1.ต่ำ (0-10 ตัว/โค 1 ตัว)	1		
2.ปานกลาง (11-20 ตัว/โค 1 ตัว)	2.426	1.196-4.919	0.01
3.มาก (มากกว่า 20 ตัว/โค 1 ตัว)	1.718	0.973-3.034	0.06

น้อยกว่า 40 ตัว (OR = 2.899, 95% CI = 1.498-5.607) ซึ่งปัจจัยเสี่ยงนี้เกิดจากความหนาแน่นของจำนวนสัตว์ ทำให้เห็บและแมลงดูดเลือดสามารถที่ดูดกินเลือดสัตว์ที่มีเชื้อ *A. marginale* แล้วนำพาแพร่ไปยังสัตว์ซึ่งปลอดเชื้อที่อยู่ในพื้นที่เดียวกันได้ง่ายขึ้น ทำให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อในฝูงสัตว์ที่มีขนาดมากกว่า 40 ตัว มากกว่าฝูงขนาดน้อยกว่า 40 ตัว (Rodriguez-Vivas *et al.*, 2004) นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการพบเชื้อ *A. marginale* กับความหนาแน่นของจำนวนแมลงที่พบบนตัวสัตว์ โดยสัตว์ที่พบจำนวนแมลงตั้งแต่ 11 ตัวขึ้นไป มีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *A. marginale* เป็น 2.42 เท่า เมื่อเทียบกับสัตว์ที่พบแมลงบริเวณตัวสัตว์น้อยกว่า 11 ตัว ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างการพบเชื้อ *A. marginale* กับ ความหนาแน่นของจำนวนแมลงที่พบบนตัวสัตว์ มีบทบาท

สำคัญในการถ่ายทอดเชื้อ *A. marginale* ในรูปแบบของการนำเชื้อแบบที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (mechanical transmission) การติดเชื้อแบบนี้จะมีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดเชื้อ *A. marginale* มากกว่าการถ่ายทอดเชื้อแบบที่มีการเปลี่ยนแปลง (Biological vector) ที่พบในเห็บ (*Rhipicephalus microplus*) ในขณะที่แมลงดูดเลือดที่มีบทบาทในการนำโรคแบบไม่มีการเปลี่ยนแปลง จะแสดงความถี่ของจำนวนครั้งในการดูดกินเลือดต่อวัน และระยะทางในการบินหาอาหารของแมลงดูดเลือด ทำให้การแพร่กระจายเชื้อเกิดขึ้นได้รวดเร็วในบางพื้นที่ที่มีความหนาแน่นของแมลงดูดเลือด (Costa *et al.*, 2013; Baldacchino *et al.*, 2013)

สำหรับปัจจัยอื่นๆ คือ ความหนาแน่นของพื้นที่ป่า การถ่ายพยาธิ สัตว์ชนิดอื่นในฟาร์ม เห็บบนตัวสัตว์และในคอกสัตว์ บริเวณพื้นที่ในการเลี้ยงสัตว์

ในการปล่อยแพะเล็มจะไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) กับการติดเชื้อ *A. marginale*

สรุป

การติดเชื้อ *A. marginale* ในโคเนื้อในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสลักพระ จังหวัดกาญจนบุรี พบอัตราการติดเชื้อ *A. marginale* ที่สูงในโคเนื้อซึ่งเป็นบริเวณที่มีสัตว์ป่าอาศัยอย่างชุกชุม จัดว่าเป็นพื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายโรคจากปศุสัตว์สู่สัตว์ป่า และจากสัตว์ป่าสู่ปศุสัตว์ ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการวางแผนการควบคุมและป้องกันโรค นอกจากนี้ควรมีการศึกษาความสัมพันธ์ของการติดเชื้อในปศุสัตว์และสัตว์ป่าในบริเวณใกล้เคียง เพื่อติดตามการระบาดที่อาจพบเชื้อนี้ในสัตว์ป่าและอาจทำให้เกิดความสูญเสียต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

กิจ ธีระพัฒน์ และรำพึง ดิสสะมาน. 2508. การทดสอบสถานะการเป็นพาหะของโรคนาพลาสโมซิสในโคกระบือไทยด้วยแอนติเจน. รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์ และชีววิทยา ครั้งที่ 4 สาขาพืชและชีววิทยากับสาขาสัตว์. หน้า 484-487.
คณะกรรมการยุทธศาสตร์โคเนื้อกรมปศุสัตว์. 2555. ยุทธศาสตร์โคเนื้อพ.ศ. 2555-2559. สำนัก

ส่งเสริมและพัฒนาการปศุสัตว์กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 6-24.

จักริน ศรีวิโรทัย มนต์ชัย ดวงจินดา วิโรจน์ ภัทรจินดา ยุพิน ผาสุข อนันตชัย ชัยยศวิทยากุล และยวงยศ จินดาทะจักร. 2551. การตรวจหาโรคไข้เห็บโดยใช้วิธี PCR ในโคนมพันธุ์ TMZ. วารสารวิจัย มช. 13(1): 55-62.

นิตารัตน์ ไพรคณะฮก เขาวฤทธิ บุญมาทิต และนพพร ศราตพันธุ์. 2543. สภาวะของโรคและการทำนายความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคไข้เห็บโคของโคนมในบางจังหวัดของประเทศไทย. วารสารสัตวแพทย์. 10(1): 13-23.

ปิยะ อรรถกานนท์ กิจ ธีระพัฒน์ และรำพึง ดิสสะมาน. 2509. การศึกษาภูมิคุ้มกันของโคพันธุ์ต่างประเทศที่ฉีดวัคซีนอนาพลาสโมซิส. รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 5 สาขาพืชและชีววิทยา สาขาสัตว์ และสาขาเศรษฐศาสตร์เกษตร ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 403-408.

รุจิรัตน์ วรสิงห์ และสุธี รัตนะ. 2550. ประสิทธิภาพในการตรวจพบในเนื้อที่ตรวจพบในพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช. เรื่อง เต็ม การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาสัตว์ และสัตวแพทยศาสตร์. หน้า 329-338.

วีระศักดิ์ ฟุ้งเฟื่อง วัชรภรณ์ รวมธรรม กฤติยา เลิศชุนหะเกียรติ กาญจน์ คุ่มทรัพย์ และสากล กาญจนรจิต. 2549. การติดเชื้อ *Anaplasma* ในเนื้อทรายจากสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าห้วยทรายในจังหวัดเพชรบุรี. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่

- 44 : สาขาสัตว สาขาสัตวแพทยศาสตร. หน้า 557-560.
- สถาพร จิตตपालพงศ์ และฉวีวรรณ เลียงวิจักษ์. 2531. การสำรวจพยาธิโปรโตซัวในเลือดของโคนมที่หนองโพ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 26. หน้า 117-122.
- สำนักการป่าชุมชน กรมป่าไม้. 2558. ฐานข้อมูลป่าชุมชน. Online available: http://www.forest.go.th/community_extension/index.php
- อิทธิพล ชัยชนะพูนผล และพัชรา วิฑูระกุล. 2539. อัตราการติดโรคพยาธิของโคนมในภาคเหนือ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 สาขาสัตว สัตวแพทยศาสตร. หน้า 280-288.
- อุษา เชษฐา รุจิรัตน์ วรสิงห์ และสนอง ศรีนันทพันธ์. 2538. การศึกษาปัญหาพยาธิในโคนมภาคใต้. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33 สาขาสัตว สัตวแพทยศาสตร. หน้า 398-407.
- Baldacchino, F., Muenworn, V., Desquesnes, M., Desoli, F., Charoenviriyaphap, T. and Duvallet, G. 2013. Transmission of pathogens by Stomoxys flies (Diptera, Muscidae): A review. *Parasite*. 20: 26
- Carelli, G., Decaro, N., Lorusso, A., Elia, G., Lorusso, E. and Mari, V. 2007. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet. Microbiol*. 124: 107-114.
- Costa, V.M.M., Ribeiro, M.F.B., Duarte, A. L.L., Manguiera, J. M., Pessoa, A.F.A., Azevedo, S. S., Barros, A.T.M., Riet-Correa, F. and Labruna, M. B. 2013. Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid region. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal*. 22: 207-213.
- De la Fuente, J., Bussche, R.A., Prado, T.M. and Kocan, K.M. 2003. *Anaplasma marginale* msp1a genotype evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. *J. Clin. Microbiol*. 41: 1609–1616.
- De la Fuente, J., Passos, L.M.F., Bussche, R.A. van den, Ribeiro, M.F.B., Facury-Filho, E.J. and Kocan, K.M. 2004: Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol*. 121: 307–316.
- De la Fuente, J., Massung, R. B., Wong, S. J., Chu, F. K., Lutz, M. L., Meli, F. D., Loewenich, A., Grzeszczuk, A., Torina, S., Caracappa, A. J., Mangold, V., Naranjo, S., Stuenkel, S. and Kocan, K.M. 2005. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma marginale* strains. *J. Clin. Microbiol*. 43: 1309–1317.

- Gale, K.R., Dimmock, C.M., Gartside, M., Leatch, G. 1996. *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR. *Int. J. Parasitol.* 26: 1103–1109.
- Kaewhom, P. 2014. Molecular detection of trypanosoma evansi among cattle and buffaloes blood. *J. Mahanakorn Vet. Med.* 9(1): 49-61.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Bouin, E.F., Coetzee, J.F. and Ewing, S.A. 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 167: 95-107.
- Muenworn, V., Duvallet, G., Thainchum, K., Tuntakom, S., Tanasilchayakul, S., Prabaripai, A., Akranakul, P., Sukonthabhirom, S. and Chareonviriyaphap, T. 2010. Geographic distribution of Stomoxyine flies (Diptera: Muscidae) and diurnal activity of *Stomoxys calcitrans* in Thailand. *J. Med. Entomol.* 47: 791-797.
- OIE. 2012: Bovine Anaplasmosis. OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 7th Edition. Office International des Epizooties, Paris, Chapter 2.4.1.
- Rodriguez-Vivas, R. I., Mata, Y., Perez, E. and Wagner, G. 2004. The effect of management factors on the seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos indicus* cattle in the Mexican Tropics. *Trop. Anim. Health Prod.* 36: 135-143.
- Saetiew, N., Simking, P., Saengow, S., Arunvipas, P., Wongnarkpet, S., Sarataphan, N. and Jittapalapong, S. 2012. Molecular prevalence of *Anaplasma* spp. infections of dairy cows in Thailand. Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine, Phuket, Thailand (June 18-21): 56.
- Sambrook, J and Russel, D.W. 2001. Rapid isolation of yeast DNA. In: Molecular cloning, a laboratory manual (Sambrook J. and Russel D.W., eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 631-632.
- Silva, J. B. da, Castro, G. N. de S. and Fonseca, A. H. 2014. Longitudinal study of risk factors for anaplasmosis and transplacental transmission in herd cattle. *Semina: Ciencias Agrarias, Londrina.* 35: 2491-2500.

