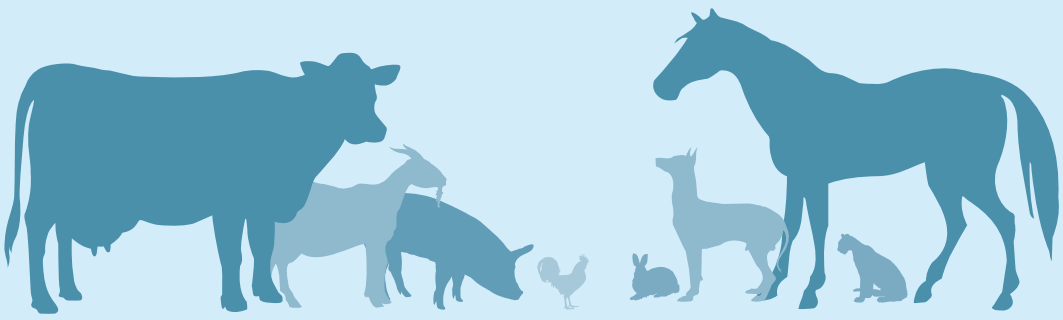
สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

ปีที่ 12 ฉบับที่ 2
กรกฎาคม - ธันวาคม 2560

Volume 12 Number 2
July - December 2017



Faculty of Veterinary Medicine
Mahanakorn University of Technology
www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm
ISSN : 1905-7571

สัตวแพทย์มหานครสาร

Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine

ปีที่ 12 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม 2560

Volume 12 No. 2 July – December 2017

ISSN: 1905-7571

www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ได้จัดทำวารสารทางวิชาการขึ้นด้วยวัตถุประสงค์เพื่อเผยแพร่ผลงานค้นคว้าวิจัยทางวิชาการ รวมถึงกิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับสาขาสัตวแพทยศาสตร์ สัตวบาล และสาขาที่เกี่ยวข้อง ส่งเสริมความสัมพันธ์อันดีระหว่างนักวิชาการที่เกี่ยวข้องกับวิชาชีพสัตวแพทย์ สัตวบาล และเพื่อเผยแพร่เกียรติคุณของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

สำนักงาน: **คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร**
140 ถนนเชื่อมสัมพันธ์ เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530

โทร: 0-2988-3655
โทรสาร: 0-2988-4040

กำหนดตีพิมพ์: ปีละ 2 ฉบับ **ฉบับที่ 1 เดือน มกราคม – มิถุนายน**
ฉบับที่ 2 เดือน กรกฎาคม – ธันวาคม

ค่าสมาชิก:

1 ปี	**140**	**บาท**
2 ปี	**280**	**บาท**
3 ปี	**420**	**บาท**
ตลอดชีพ	**1,000**	**บาท**
ราคาฉบับละ	**70**	**บาท**

สัตวแพทย์มหานครสาร

Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine

คณะที่ปรึกษา / Advisory Committee

อธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — President of Mahanakorn University of Technology

คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ — Dean of Faculty of Veterinary Medicine

รองคณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ — Associate Dean of Faculty of Veterinary Medicine

บรรณาธิการ / Editor

ผศ.รัชกฤช เลิศภัทรโกมล — Assist.Prof.Rachakris Lertpatarakomol

คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

ผู้ช่วยบรรณาธิการ / Assistant Editor

น.สพ.เกียรติชัย โรจนมงคล — Kiatchai Rojanamongkol

คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

กองบรรณาธิการ / Editorial Board

ผศ.สพ.ญ.ดร.จิตรบรรจง เวียงเจริญ — Assist.Prof.Dr.Jitbanjong Wiengcharoen

คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

ผศ.น.สพ.ดร.สำราญ บรรณจิรกุล — Assist.Prof.Dr.Sumrarn Bunnajirakul

คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

น.สพ.ดร.กฤษฎา ขำพูล — Dr. Kissada Khumpoon

คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

น.สพ.อนุสรณ์ จ่าแสนชื่น — Anusorn Jasancheun

คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

ทัศนีย์ ตรัยรัตน์อภิวัน — Tassanee Trairatapiwan

คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

มนตรี แสงลาภเจริญกิจ
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

Montree Sanglapcharoenkit
Faculty of Veterinary Medicine
Mahanakorn University of Technology

รศ.สพ.ญ.ดร.นันทริกา ชันซื่อ
คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Assoc.Prof.Dr.Nantarika Chansue
Faculty of Veterinary Medicine
Chulalongkorn University

ผศ.น.สพ.อดิศร ยะวงศา
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

Assist.Prof.Adisorn Yawongsa
Faculty of Veterinary Medicine
Kasetsart University, Kamphaengsaen campus

ผศ.น.สพ.ดร.สรรเพชญ อังกิติตระกูล
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Assist.Prof.Dr.Sunpetch Angkittitrakul
Faculty of Veterinary Medicine
Khon Kaen University

น.สพ.ดร.วีรพงศ์ ตั้งจิตเจริญ
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Dr.Weerapongse Tangjitjaroen
Faculty of Veterinary Medicine
Chiangmai University

ผศ.ดร.เฉลิมพล เยื้องกลาง
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน
วิทยาเขตสกลนคร

Assist.Prof.Dr.Chalermpon Yuangklang
Faculty of Natural Resources
Rajamangala University of Technology Isan,
Sakon Nakhon Campus

Prof.Dr.Kazuyoshi Taya
Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture and Technology

Prof.Dr.Kazuaki Takehara
Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture and Technology

Prof.Dr.Kazuyuki Taniguchi
Faculty of Agriculture,
Iwate University

Assoc.Prof.Dr.Kazumi Taniguchi
School of Veterinary Medicine,
Kitasato University

Prof.Dr.Anton C. Beynen
Faculty of Natural Resources,
Rajamangala University of Technology-Isan,
Sakon Nakhon campus

ฝ่ายจัดการเว็บไซต์ / JMVM Website Administrator

ฟารีส ชื่นภักดี
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

Faris Cheunpakdee
Faculty of Veterinary Medicine
Mahanakorn University of Technology

ผู้ทรงคุณวุฒิประจำฉบับ / Issue Reviewers

ผศ.ดร.สพ.ญ.วลาสินี มูลอามาตย์

สพ.ญ.ดร.สิริลักษณ์ ดิษเสถียร

ผศ.น.สพ.ดร.จำลอง มิตรชาวไทย

ผศ.น.สพ.อลงกต บุญสูงเนิน

ดร.ไพทูล แก้วหอม

ผศ.ดร.ประดิษฐ์ แสงทอง

น.สพ.ดร.เจษฎา รุ้งภู่ประดิษฐ์

สพ.ญ.ดร.ฐิตารีย์ เลาหรัชตธานินทร์

ผศ.น.สพ.ดร.ทนงศักดิ์ มะมม

น.สพ.ดร.มงคล ชวณิช

สพ.ญ.ดร.พงษ์ศิวะ โสตถิพันธุ์

น.สพ.ดร.กฤษฎา ขำพูล

ผศ.สพ.ญ.ดร.จิตรบรรจง ทุมพงษ์

ผศ.รัชกฤช เลิศภัทรโกมล

ทัศนีย์ ตรัยรัตน์อภิวัน

สพ.ญ.ดร.อุมาพร รุ่งฤกษ์ฤทธิ์

ดร.ทิพวัลย์ จันทะฟอง

บทบรรณาธิการ

สวัสดีผู้อ่านทุกท่าน

วารสารสัตวแพทย์มหานครสารฉบับนี้เป็นปีที่ 12 ฉบับที่ 2 ซึ่งในฉบับนี้ทางวารสารได้มีการปรับเปลี่ยนกองบรรณาธิการวารสาร ซึ่งทางวารสารหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะได้รับความไว้วางใจจากท่านต่อไป อย่างไรก็ตามทางกองบรรณาธิการยังคงมุ่งมั่นพัฒนาวารสารให้ได้คุณภาพสู่มาตรฐานสากลมากยิ่งขึ้น ที่ผ่านมาทางวารสารได้ผ่านการรับรองระบบตรวจสอบรูปแบบบทความสำหรับวารสารใน TCI Format Checker จากศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย (TCI) และศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ต่อจากนี้ไปทางกองบรรณาธิการกำลังดำเนินการนำวารสารเข้าสู่ระบบ Thai Journal Online (ThaiJo 2.0) เป็นลำดับต่อไป เพื่อประโยชน์ในการสืบค้นและการเข้าถึงข้อมูลในวารสารให้แพร่หลายมากยิ่งขึ้น และเป็นการเตรียมความพร้อมในการนำวารสารเข้าสู่ระบบฐานข้อมูลในระดับอาเซียน (Asean Citation Index) ต่อไป

สุดท้ายนี้วารสารฉบับนี้ยังคงมีบทความที่น่าสนใจหลากหลายเรื่อง ซึ่งทางกองบรรณาธิการของวารสารหวังเป็นอย่างยิ่งว่าท่านผู้อ่านทุกท่านจะได้รับความรู้ที่นำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

รัชกฤช เลิศภัทรโกมล

บรรณาธิการ

สัตวแพทย์มหานครสาร

ปีที่ 12 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม 2560

ISSN: 1905 – 7571 **www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm**

สารบัญ

บทความวิจัย

ความชุกทางซีรัมวิทยาต่อ *Encephalitozoon cuniculi* ในโรงฆ่ากระต่ายเนื้อ ณ ตอนกลางของประเทศไทย

ชัญญานุช อินทชาติ ปาลิน จิวากานนท์ ศรสวรรค์ วรรณศิลป์ อรนันท์ อุดมพัฒนากร อรรถวิทย์ โกวิทวที สิริลักษณ์ จาละ ดุษฎี แก้ววงษ์วาลย์ พิพัฒน์พงษ์ จันทร์แดง ปรีดา เลิศวัชระสารกุล และพรชัย สัญฐิติเสรี 35

การศึกษาความชุกของการติดโรคหนอนพยาธิในลำไส้ของลิงหางยาว เขาสามมุข จังหวัดชลบุรี

ภัทธกร บุบผัน รัตน์ติพร โกสุวินทร์ มณิสรา ชาติกุล รุจิรา ต๊ะจันทร์ กัญจน์ธรม โลสันเทียะ และสุชาดา ข้ามสี่ 47

ความชุกของเชื้อ *Theileria spp.* ของแพะในอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว

ไพทูล แก้วหอม และวรรณา ฐิตะสาร 57

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ เพื่อการใช้ประโยชน์และอนุรักษ์อย่างยั่งยืน

สิริวดี พรหมน้อย และสกุณา พัฒนกุลอนันต์ 67

การประเมินภาวะไตเสียหายในสุนัขด้วยตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิด Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)

ธนากร วัฒนพรภิรมย์ เฉลิมพล เล็กเจริญสุข และชยกฤต สินธุสิงห์ 79

การศึกษาการตรวจภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำต่อโรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปอีไลซ่าชนิดต่างๆ ในสุกรขุน

ศักดิ์ชัย เรือนเพชร ทรรศนีย์ บุณยทรรศนีย์ และทิพวัลย์ จันทะฟอง 91

รายงานสัตว์ป่วย

เทคนิคการฟอกเลือดสุนัขที่มีภาวะยูรีเมียเฉียบพลันและภาวะแทรกซ้อน

คาริน วิชชุกิจ ปิยวรรณ ธนะเพิ่ม และเฉลิมพล เล็กเจริญสุข 103

ภาวะตีบแคบเหนือลิ้นหัวใจพัลโมนิกและโรคลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบแต่กำเนิดในลูกสุนัขพันธุ์เฟรนช์ บูลด็อก

ธนวัน มังคละพฤกษ์ และวรุต ชินประหัษฐ์ 115

บทความวิชาการ

โรคมัยโครสปอริดิโอซิส: โรคติดเชื้ออุบัติใหม่และโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในคนและในสัตว์

จิตรบรรจง ทุมพงษ์ 125

Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine

Volume 12 No. 2 July – December 2017

ISSN: 1905 – 7571 www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

Contents

Research article

Slaughterhouse Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Meat Rabbits at Central Part of Thailand

Chanyanuch Intachat, Palin Jiwaganont, Sornsawan Wannasilp, Oranun Udompattanakorn, Attawit Kovitvadhi, Siriluk Jala, Duessadee Kawvongvan, Pipatpong Chandang, Preeda Lertwatcharasarakul, and Pornchai Sanyathitiseree 35

Prevalence of Intestinal Helminthic Infection in Population of Long-tailed Macaques (*Macaca fascicularis*) from Khao Sam Muk, Chonburi Province

Pattakorn Buppan, Rattiporn Kosuwin, Manisara Chartkul, Rujura Tachan, Kantime Losantea, and Suchada Khamsee 47

The Prevalence of *Theileria* spp. of Goat in Watthana Nakhon District, Sa Kaeo Province

Paitoon Kaewhom, and Wanna Thitasarn 57

Genetic Diversity of Native Chicken in Uttaradit Province for Sustainable of Utilization and Conservation

Siriwadee Phromnoi, and Sakuna Phattanakunanan 67

The Detection of Kidney Injury in Dogs by Biomarker: Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)

Tanakorn Wattanapornpilom, Chalermpol Lekcharoensuk, and Chayakirt Sinthusingha 79

Longitudinal Study on Antibodies Detection against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Vaccinated Fattening Pigs by Various Enzyme-linked Immunosorbent Assay Test Kits

Sakchai Ruenphet, Darsaniya Punyadarsaniya, and Tippawan Jantafong 91

Case report

Technique of Hemodialysis in Acute Uremia Dog with Complications

Karin Vichukit, Piyawan Thanaperm, and Chalermpol Lekcharoensuk 103

Congenital Supravalvular and Valvular Pulmonic Stenosis in French Bulldog

Tanawan Mangklabruks, and Warut Chinprahat 115

Review article

Microsporidiosis: An Emerging and Opportunistic Disease in Humans and Animals

Jitbanjong Toompong 125

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วัตถุประสงค์และขอบเขตของเนื้อหา (Aim and Scope)

สัตวแพทย์มหานครสารเป็นวารสารทางวิชาการของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร จัดทำขึ้นเพื่อเผยแพร่ผลงานการค้นคว้าวิจัยทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับสัตวแพทยศาสตร์ สัตวศาสตร์ และวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสัตว์ โดยเนื้อหาจะครอบคลุมตั้งแต่ระดับโมเลกุลและเซลล์ วิทยาศาสตร์พื้นฐาน ชีววิทยาของสัตว์ พฤติกรรมสัตว์ พืชอาหารสัตว์ วิทยาศาสตร์การผลิตสัตว์ วิทยาศาสตร์การสัตวแพทย์ (พื้นฐาน พรีคลินิก และคลินิก) ระบาดวิทยาในสัตว์ สัตวแพทยสาธารณสุข และวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ ตลอดจนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแขนงอื่นๆ ที่มีโอกาสในการพัฒนาและ/หรือประยุกต์ใช้ในวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ได้

คำแนะนำสำหรับการเตรียมบทความ

กองบรรณาธิการวารสาร สัตวแพทย์มหานครสาร ยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่ให้ความสนใจ และกรุณาส่งมาเพื่อเผยแพร่ ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการพิจารณา กองบรรณาธิการมีข้อเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำส่งลงตีพิมพ์

1.1 บทความวิจัย (Research article หรือ Original article) เป็นงานค้นคว้าทดลอง หรืองานวิจัยทางวิชาการที่เกี่ยวกับสัตว์หรือพืชอาหารสัตว์ ทั้งที่ทำในประเทศและ/หรือต่างประเทศ

1.2 บทความวิจัยขนาดสั้น (Short communication) เป็นรายงานผลการวิจัย หรือผลงานทดลองทางด้านวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ เพื่อการเผยแพร่โดยสังเขป หรือเพื่อการนำเสนอประเด็นที่ค้นพบใหม่โดยเผยแพร่เฉพาะส่วนสำคัญอย่างกระชับ

1.3 รายงานสัตว์ป่วย (Case report) เป็นรายงานที่ไม่เคยตีพิมพ์มาก่อนและเกี่ยวข้องกับโรคหรือปัญหาที่พบในสัตว์ ซึ่งทางกองบรรณาธิการพิจารณาเห็นประโยชน์ต่อทางวิชาการสัตวแพทย์

1.4 บทความวิชาการ (Review article) เป็นบทความหรือย่อเอกสารที่เป็นประโยชน์ และเกี่ยวข้องกับวิชาการทางสัตวแพทย์ สัตวบาล และสาขาที่เกี่ยวข้องทุกสาขา โดยการรวบรวมและเรียบเรียงจากเอกสารทางวิชาการ

1.5 บทความปกิณกะ (Miscellany article) เป็นบทความที่เกี่ยวกับการให้ข้อมูลทางวิชาการสำหรับผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ เช่น ปริศนาสัตว์ป่วย ปริศนาเซลล์วิทยาวินิจฉัย

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่จะส่งมาลงพิมพ์ต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยตีพิมพ์ หรือกำลังอยู่ระหว่างพิจารณาเพื่อลงในหนังสือหรือวารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับพิมพ์เป็นภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษ ด้วยอักษร TH Sarabun new 16 บนกระดาษขาวเอ 4 เว้นขอบกระดาษด้านซ้ายและด้านขวา 1 นิ้ว ด้านบนและด้านล่าง 1 นิ้ว โดยความยาวของเรื่องพร้อมตารางและภาพประกอบรวมแล้วไม่เกิน 12 หน้า และให้ใส่หมายเลขหน้าตามลำดับ โดยพิมพ์ด้วยโปรแกรม Microsoft Word (Window 98 หรือเวอร์ชั่นที่สูงกว่า)

2.3 หากต้นฉบับที่จะส่งมีรูปภาพประกอบด้วย ให้แทรกรูปภาพดังกล่าวในตำแหน่งที่เหมาะสมในต้นฉบับ และ Save ไฟล์ต้นฉบับของรูปภาพที่มีความละเอียดสูงลงในแผ่นซีดีข้อมูลแยกจากไฟล์ต้นฉบับ โดยตั้งชื่อไฟล์ของรูปภาพให้สามารถสอบทวนได้ว่าเป็นรูปภาพใดในต้นฉบับ

2.4 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ ในกรณีที่ไม่ผ่านการพิจารณาแต่จะแจ้งให้ทราบ

3. การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

3.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สอดคล้อง สื่อความหมายได้ดีกับเนื้อหาในเรื่อง

3.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมเขียน (Author and Co-authors) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวก และกรุณาบอกหมายเลขโทรศัพท์หรือโทรสาร และ E-mail ของผู้รับผิดชอบ (Corresponding author) เพื่อความรวดเร็วในการติดต่อ โดยให้ระบุอยู่ใต้คำสำคัญ

3.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นๆ ให้ได้เนื้อความครอบคลุมทั้งหมด ในกรณีที่ต้นฉบับภาษาไทยจะต้องมีชื่อเรื่องและบทคัดย่อเป็นภาษาอังกฤษ และต้นฉบับภาษาอังกฤษต้องมีชื่อเรื่องและบทคัดย่อเป็นภาษาไทย บทคัดย่อให้เขียนไว้หน้าสุดท้ายของเรื่องเป็นหน้าหนึ่งต่างหาก

3.4 คำสำคัญ (Keywords) เป็นคำหรือข้อความสั้นๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้นๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 5 คำ ระบุอยู่ใต้บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

3.5 บทนำ (Introduction) บรรยายความเป็นมา และควรมีการตรวจเอกสาร (Literature review) ประกอบด้วย รวมทั้งอธิบายถึงจุดประสงค์ของการทดลอง

3.6 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ในกรณีที่เป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ควรอธิบายอย่างละเอียด ถ้าเป็นวิธีการที่ทราบกันอยู่แล้วและเคยมีผู้ตีพิมพ์แล้ว ไม่ต้องบรรยายซ้ำควรเขียนในลักษณะอ้างอิง และอธิบายเฉพาะส่วนที่ดัดแปลงหรือเพิ่มเติม พร้อมทั้งวิธีวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วย

3.7 ผลการทดลอง (Results) การรายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยายควรให้ละเอียดและเข้าใจง่าย หากเป็นไปได้ควรเสนอผลในรูปตาราง รูปภาพ หรือกราฟ ไม่ควรแสดงถึงผลที่เหมือนกัน ถ้าเป็นตารางควรให้ชัดเจนและขนาดพอเหมาะกับขนาดของหน้าหนังสือ ตารางควรมีความหมายในตัวเอง และต้องมีคำอธิบายเหนือตารางด้วย ในกรณีที่เป็นรูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาวดำหรือสไลด์ หากต้องการให้ตีพิมพ์ภาพสี ทางคณะผู้จัดทำจะพิจารณาถึงความเหมาะสมและค่าใช้จ่าย หากมีหลายรูปต้องเรียงลำดับก่อนหลังพร้อมทั้งมีเครื่องหมายกำหนดบอกด้านบนของรูปด้วยดินสอ และอธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูป คำอธิบายประกอบรูปภาพและตาราง รวมทั้งองค์ประกอบในตารางและรูปภาพให้ใช้เป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด โดยรวบรวมและเรียงตามลำดับให้สอดคล้องกับหมายเลขของรูปภาพและตารางที่นำเสนอ ควรระบุความหมายของสัญลักษณ์ที่ใช้ ในกรณีที่กำหนดเครื่องหมายแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ให้กำกับ *P*-value ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง ทั้งนี้การกล่าวถึงค่า *P*-value ในเนื้อหาของบทความให้ใช้อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เอียง เช่น *P*-value, $P \leq 0.05$ และ $P > 0.05$

3.8 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง การประเมินผล และการตีค่าของผลงาน

การวิจารณ์ผลควรเปรียบเทียบกับผลงานของผู้อื่นที่ได้กระทำมาแล้ว และควรเน้นถึงสิ่งที่ได้ค้นพบ

3.9 สรุป (Conclusion) อาจมีหรือไม่ก็ได้ หากเป็นบทความ การตรวจเอกสาร หรือเป็นการทดลองที่มีหลายข้อ ควรมีบทสรุปที่เขียนใจความสำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านจะได้เข้าใจมากขึ้น

3.10 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือหรือความร่วมมือในการสนับสนุนงานค้นคว้าวิจัย

3.11 เอกสารอ้างอิง (References)

4. การเขียนอ้างอิงในเนื้อเรื่องควรอ้างอิงดังนี้

- **การอ้างอิงให้เขียนเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด** ทั้งการอ้างอิงในเนื้อหาบทความ และในส่วนของเอกสารอ้างอิงด้านท้ายบทความ โดยหากเนื้อหาของเอกสารที่นำมาใช้อ้างอิงเขียนเป็นภาษาอื่น ที่ไม่ใช่ภาษาอังกฤษ ให้เขียนอ้างอิงเป็นภาษาอังกฤษ พร้อมระบุภาษาที่ใช้เขียนในบทความนั้นๆ ไว้ในวงเล็บด้านท้ายสุดของรายการเอกสารอ้างอิงนั้นๆ ตัวอย่างเช่น

Mitchaothai, J., Wiengchareon, J., Chaiworaporn, J., Srenanuan, P. and Yuangklang, C. 2005. Balantidiasis in growing pigs: A case report. *KKU. Vet. Journal*. Vol.15 No.1: 166-174. (in Thai)

{ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่อ้างอิงมาจากบทความภาษาไทย :

จำลอง มิตรชาวไทย จิตรบรรจง เวียงเจริญ จุฑามาศ ชัยวรภร ไพวัลย์ ศรีนานวล และ เฉลิมพล เยื้องกลาง. 2548. ภาวะการติดเชื้อ Balantidium ในสุกรรุ่น: รายงานสัตว์ป่วย. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 15 (1): 166-174. }

- กรณีอ้างอิงจากการตรวจเอกสารโดยผู้อื่นให้ใช้ คำว่า อ้างถึงโดย (Cited by)

- ผู้รายงานเอกสารทั้งที่เป็นคนไทยและชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยคให้ใช้ Mitchaothai *et al.* (2005), Tomato and Danny (2006), Taylor *et al*. (2006) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางและท้ายประโยคให้ใช้ (Mitchaothai *et al.*, 2005), (Tomato and Danny, 2006), (Taylor *et al*., 2006) ตามลำดับ โดยหากในประโยคหรือส่วนของประโยคที่มีเอกสารอ้างอึงมากกว่าหนึ่งเอกสารให้คั่นระหว่าเอกสารด้วยเครื่องหมาย “ ; ”)

- อ้างถึงบุคคล หรือเรื่องที่ไม่เคยตีพิมพ์มาก่อน (Personal comm.) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง

- การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายบทความ ให้เขียนเรียงลำดับพยัญชนะภาษาอังกฤษของชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง (หากมีผู้แต่งมากกว่าหนึ่งคนให้คั่นระหว่างผู้แต่งด้วยเครื่องหมาย “ , ”) ดังตัวอย่าง คือ

Mitchaothai, J., Everts, H., Yuangklang, C., Wittayakun, S., Vasupen, K., Wongsuthavas, S., Srenanul, P., Hovenier, R. and Beynen, A.C. 2008. Digestion and deposition of individual fatty acids in growing-finishing pigs fed diets containing either beef tallow or sunflower oil. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr*. 92 (4): 502-510.

- หากเอกสารอ้างอิงเป็นตำรา ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา ครั้งที่พิมพ์และชื่อบรรณาธิการ (หากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ และจำนวนหน้าทั้งหมด ดังตัวอย่าง คือ

Mamom, T. 2008. Basic Veterinary Histopathology and Practice. 1st ed. Mahanakorn University of Technology publishing. Bangkok. 227 p.

{ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่อ้างอิงมาจากหนังสือภาษาไทย :
ทนงศักดิ์ มะมม. 2551. ตำราจุลพยาธิวิทยาขั้นพื้นฐานทางสัตวแพทย์และบทปฏิบัติการ (Basic Veterinary Histopathology and Practice). พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร. กรุงเทพมหานคร. 227 หน้า. }

- หากเอกสารอ้างอิงเป็นบทความจากการประชุมวิชาการ (Conference proceedings) ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อการประชุมวิชาการ สถานที่จัดประชุม วัน-เดือน-ปีที่ประชุม สำนักพิมพ์ และเลขที่หน้าของบทความ ดังตัวอย่าง คือ

Lertpatarakomol, R., Mitchaothai, J., Trairatapiwan, T. and Lukkananukool, A. 2010. Preliminary survey on intestinal parasite infestation in natural Thai indigenous beef cattle from Kanchanaburi province at a slaughterhouse. Proceedings of the 14th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP), Pingtung, Taiwan, ROC, 23-27 August 2010: 468.

- หากเอกสารอ้างอิงเป็นบทความจากอินเตอร์เน็ท (Internet) ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่เผยแพร่ทางอินเตอร์เน็ท (สืบค้นข้อมูลเมื่อ วัน-เดือน-ปี) ชื่อเรื่อง ชื่อการประชุมวิชาการ สถานที่จัดประชุม วัน-เดือน-ปีที่ประชุม สำนักพิมพ์ และเลขที่หน้าของบทความ ดังตัวอย่าง คือ

Mitchaothai, J., Yuangklang, C., Wittayakun, S., Vasupen, K., Wongsuthavas, S., Srenanul, P., and Beynen, A.C. 2005 (cited 21 December 2010). Mathematical modelling between Pork Colour and Pork and Carcass Qualities in commercial finishing pigs. Available from: http:// www.scisoc.or.th/stt/31/ sec_f/paper/stt31_F0043.pdf.

5. การพิจารณาบทความ

บทความทุกบทความที่ลงตีพิมพ์ในวารสารสัตวแพทย์มหานครสาร เป็นบทความที่ผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิที่เชี่ยวชาญ (Referees) สำหรับแต่ละสาขาอย่างน้อย 2 ท่านต่อบทความ ยกเว้นบทความปกิณกะผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิที่เชี่ยวชาญอย่างน้อย 1 ท่าน

6. การส่งต้นฉบับบทความ

เอกสารที่ต้องส่ง คือ บทความต้นฉบับจริง ที่จัดเตรียมตามคำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วิธีการส่งบทความ คือ ส่งผ่านระบบออนไลน์ ได้ที่ http://www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

7. ชื่อ-ที่อยู่ สำหรับติดต่อวารสาร

บรรณาธิการ สัตวแพทย์มหานครสาร
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร
140 ถ. เชื่อมสัมพันธ์ เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530
โทร. 0-2988-3655 ต่อ 5102-3, โทรสาร 0-2988-4040

หมายเหตุ

1. ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษาอังกฤษและทับศัพท์ภาษาไทยให้พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรเอียง
2. ไม่มีค่าเรื่องลงพิมพ์และผู้เขียนต้องรับผิดชอบค่าพิมพ์ภาพสี หากเป็นความต้องการของผู้เขียน และผู้เขียนผู้รับผิดชอบทุกเรื่องจะได้รับสำเนาพิมพ์
3. ความคิดเห็นใดๆ ที่ลงตีพิมพ์ในวารสารสัตวแพทย์มหานครสารในแต่ละฉบับเป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นที่กองบรรณาธิการของวารสารฯ และผู้ทรงคุณวุฒิต้องเห็นด้วยเสมอไป

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

ความชุกทางซีรัมวิทยาต่อ *Encephalitozoon cuniculi* ในโรงฆ่ากระต่ายเนื้อ ณ ตอนกลางของประเทศไทย

ชัญญานุช อินทชาติ[1] ปาลิน จิวากานนท์[1] ศรสวรรค์ วรรณศิลป์[1] อรนันท์ อุดมพัฒนากร[1] อรรถวิทย์ โกวิทวที[2,6,#] สิริลักษณ์ จาละ[3] ดุษฎี แก้ววงษ์วาลย์[3] พิพัฒน์พงษ์ จันทร์แดง[2] ปรีดา เลิศวัชระสารกุล[4] และพรชัย สัญฐิติเสรี[5]

[1]นิสิตชั้นปีที่ 6, [2]ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900,
[3]ศูนย์วิจัยและบริการวิชาการทางสัตวแพทย์, [4]ภาควิชาพยาธิวิทยา, [5]ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[6]เครือข่ายการปรับปรุงพันธุ์และพันธุศาสตร์สัตว์ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ: เชื้อ *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) เป็นโปรโตซัวในกลุ่ม Microsporidia และความชุกทางซีรัมวิทยาเพิ่มขึ้นในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย ดังนั้นจุดประสงค์การสำรวจครั้งนี้คือ การศึกษาความชุกของ *E. cuniculi* ของกระต่ายเนื้อ ณ ตอนกลางของประเทศไทย กระต่ายขุนจำนวน 264 ตัวที่เข้าโรงฆ่าระหว่างเดือนธันวาคม 2559 ถึง มกราคม 2560 ถูกสุ่มแบบเป็นระบบเพื่อเก็บตัวอย่างซีรัมสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *E. cuniculi* ผลการตรวจทางซีรัมวิทยาพบความชุกของ *E. cuniculi* ในพื้นที่ศึกษามีค่าร้อยละ 42.4 จากการตรวจด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay หลังจากนั้นสัมภาษณ์เจ้าของฟาร์มกระต่ายเกี่ยวกับเครือข่ายการผลิตและข้อมูลพื้นฐาน ทำให้สามารถแบ่งเครือข่ายการผลิตเป็นสองเครือข่ายคือ เครือข่าย A (จังหวัดกาญจนบุรีและราชบุรี) และ เครือข่าย B (จังหวัดเพชรบุรี) ซึ่งไม่มีการแลกเปลี่ยนกระต่ายระหว่างฟาร์มข้ามเครือข่าย นอกจากใช้โรงฆ่าแห่งเดียวกัน ผลบวกทางซีรัมวิทยาของเครือข่าย A (ร้อยละ 20) มีระดับที่ต่ำกว่าเครือข่าย B (ร้อยละ 71.9) ปัจจัยที่แตกต่างกันระหว่างสองเครือข่ายคือ การจัดการฟาร์ม อายุของกระต่ายที่ส่งโรงฆ่า การจัดการด้านอาหารและการระบายอากาศภายในโรงเรือน ซึ่งคาดว่าปัจจัยดังกล่าวเป็นสาเหตุที่ทำให้ระดับความชุกทางซีรัมวิทยาแตกต่างกัน การศึกษาเพื่อบ่งชี้ถึงปัจจัยเสี่ยงถือว่าควรดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อการวางแผนป้องกันและเพิ่มมาตรฐานการผลิตกระต่ายของประเทศไทยต่อไป

คำสำคัญ: กระต่ายเนื้อ *Encephalitozoon cuniculi* ความชุก ประเทศไทย

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ
E-mail address: fvetawk@ku.ac.th

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(2): 35-45.

Slaughterhouse Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Meat Rabbits at Central Part of Thailand

Chanyanuch Intachat[1], Palin Jiwaganont[1], Sornsawan Wannasilp[1], Oranun Udompattanakorn[1], Attawit Kovitvadhi[2,6,#], Siriluk Jala[3], Duessadee Kawvongvan[3], Pipatpong Chandang[2], Preeda Lertwatcharasarakul[4], and Pornchai Sanyathitiseree[5]

[1]Sixth year students, [2]Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University Bangkok 10900 Thailand, [3]Center of Veterinary Research and Service, [4]Department of Pathology, [5]Department of Large Animal and Wildlife Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140 Thailand, [6]Animal Breeding and Genetics Consortium of Kasetsart University (ABG - KU) Bangkok 10900 Thailand

Abstract: *Encephalitozoon cuniculi (E. cuniculi)* is protozoa in the order Microsporidia and its seroprevalence increases in many countries including Thailand. The aim of this study was to investigate the seroprevalence of *E. cuniculi* infection in meat rabbits at Central part of Thailand. Two hundred and sixty four fattening rabbits were selected to collect serum by systematic random sampling which were entered the slaughterhouse during December 2016 to January 2017. The seroprevalence of *E. cuniculi* infection detected by enzyme-linked immunosorbent assay in the study population is 42.4%. Thereafter, the owners of rabbit farm were interviewed on production network and general information. Production network was separated into two groups which was network A (Kanchanaburi and Ratchaburi provinces) and network B (Phetchaburi province) which there were not any exchange between farms across the networks except using the same slaughterhouse. Lower percentage of seropositive results was observed in network A (20%) comparing to network B (71.9%). The differences between two networks are management program, age of slaughter rabbits, nutrition management and ventilation in housing which could be the cause of the contrast seroprevalence. The future survey to identify risk factors should be studied for getting the important information for prevention program and standard improvement on meat rabbit production in Thailand.

Keywords: Meat rabbit, *Encephalitozoon cuniculi*, Prevalence, Thailand

[#]Corresponding author

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

J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(2): 35-45.

บทนำ

Encephalitozoon cuniculi (*E. cuniculi*) เป็นโปรโตซัวในกลุ่ม Microsporidia ที่อาศัยอยู่ในเซลล์แบบถาวร โดยพบการติดเชื้อในกระต่ายมากที่สุด (Harcourt-Brown, 2004) สปอร์เป็นระยะติดต่อ (Infective stage) การติดเชื้อส่วนใหญ่เป็นแบบฉวยโอกาส (Opportunistic infection) ทางติดเชื้อหลักเกิดจากการกินสปอร์ที่ปนเปื้อนในอาหาร น้ำ หรือสิ่งแวดล้อมจากปัสสาวะของกระต่ายที่ติดเชื้อ (Horizontal transmission) หรือติดเชื้อจากแม่สู่ลูก (Transplacental transmission) ส่วนการติดเชื้อทางอากาศเกิดขึ้นได้ยาก (Harcourt-Brown, 2004) กระต่ายที่ติดเชื้อ *E. cuniculi* สามารถแสดงอาการทางคลินิกดังต่อไปนี้คือ อาการทางระบบประสาท เช่น ชัก (Seizure) อัมพฤกษ์ (Paresis) คอเอียง (Head tilt) ภาวะกล้ามเนื้อเสียสหการ (Ataxia) หมุนเป็นวงกลม (Circling) เป็นต้น อาการที่เกี่ยวข้องกับการทำงานล้มเหลวของไต (Renal failure) ดังเช่น ภาวะปัสสาวะมาก (Polyuria) อาการดื่มน้ำมากเรื้อรัง (Polydipsia) อาการถ่ายปัสสาวะบ่อย (Pollakiuria) เป็นต้น และการเกิดภาวะยูเวียอักเสบแบบแกรนูโลมา (Lavazza *et al*., 2016) ซึ่งอาจพบอาการเพียงอย่างเดียวหรือหลายอาการร่วมกัน อย่างไรก็ตามการติดเชื้อส่วนใหญ่มักจะไม่แสดงอาการทางคลินิก (Lertwatcharasarakul *et al*., 2011) ดังนั้นวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นเพื่อยืนยันการติดเชื้อ การตรวจหาแอนติเจนหรือตัวเชื้อสามารถทำได้โดยวิธีทางพันธุศาสตร์ การทำสไลด์เนื้อเยื่อสมองหรือไตร่วมกับการย้อมสีพิเศษ หรือการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Csokai *et al*., 2009) แต่วิธีการดังกล่าวไม่สามารถตรวจในสัตว์ที่มีชีวิต การใช้ตัวอย่างปัสสาวะหรืออุจจาระเพื่อตรวจหาสปอร์ที่ขับออกจากสัตว์ที่ติดเชื้อมีโอกาสพบผลลบลวงได้สูง เนื่องจากยังไม่ทราบรูปแบบการขับออกของสปอร์อย่างชัดเจน (Harcourt-Brown, 2004) ดังนั้นวิธีการตรวจทางซีรัมวิทยาจึงถูกนำมาใช้ ได้แก่ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Indirect immunofluorescent assay (IFA) และ Carbon immunoassay (CIA) ซึ่งมีความแม่นยำในการตรวจไม่แตกต่างกันระหว่างวิธีดังกล่าว (Boot *et al*., 2000) นอกจากนั้นผลบวกทางซีรัมวิทยามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับการตรวจพบตัวเชื้อในสมอง (Csokai *et al*., 2009)

จากรายงานการสำรวจทางซีรัมวิทยาของการติดเชื้อ *E. cuniculi* ในฟาร์มกระต่ายเนื้อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยพบผลบวกอยู่ที่ร้อยละ 14.1 ถึง 75.4 (Santaniello *et al*., 2009; Lonardi *et al*., 2013; Neumayerová *et al*., 2014; Maestrini *et al*., 2017) นอกจากนี้ยังพบผลบวกทางซีรัมวิทยาของกระต่ายเลี้ยงในหลายประเทศที่ร้อยละ 21.9 ถึง 81.7 (Igarashi *et al*., 2008; Tee *et al*., 2011; Baldotto *et al*., 2015; Meng *et al*., 2015; Lavazza *et al*., 2016) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อดังกล่าว การติดเชื้อ *E. cuniculi* ส่งผลต่อสุขภาพและคุณภาพชีวิตของกระต่ายที่เลวลง ซึ่งเชื้อดังกล่าวสามารถก่อโรคในสัตว์ชนิดอื่นรวมถึงมนุษย์ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Malčeková *et al*., 2010; Ozkan *et al*., 2011) กระต่ายถูกผลิตในเชิงเศรษฐกิจเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนที่ดีต่อสุขภาพซึ่งได้รับความนิยมในหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทย โดยมีฐานการผลิตที่สำคัญในจังหวัดกาญจนบุรีและเพชรบุรี (Kovitvadhi *et al*., 2016) จากผลการสำรวจเบื้องต้นพบว่ามีความชุก

ทางซีรัมวิทยาของเชื้อ *E. cuniculi* ในฟาร์มกระต่ายเนื้อ ณ ตอนกลางของประเทศไทยอยู่ที่ร้อยละ 47.5 (Kovitvadhi *et al*., 2017) ซึ่งเสี่ยงต่อการติดเชื้อในมนุษย์ นอกจากนั้นมีการพบสปอร์ในปัสสาวะของเกษตรกรสุขภาพดีที่ทำงานในฟาร์มกระต่ายเนื้อ (Ozkan *et al*., 2011) ดังนั้นการสำรวจหาความชุกของเชื้อ *E. cuniculi* ทางซีรัมวิทยา ณ โรงฆ่ากระต่ายเนื้อจึงเป็นจุดประสงค์ของการสำรวจนี้ ร่วมกับศึกษาเครือข่ายการผลิตกระต่ายเนื้อที่เข้าโรงฆ่าที่ได้ดำเนินการศึกษาและสัมภาษณ์เจ้าของฟาร์มเพื่อค้นหาปัจจัยที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้อง

อุปกรณ์และวิธีการ

กลุ่มประชากรที่ศึกษา การสุ่ม และการคำนวณขนาดตัวอย่าง

กลุ่มประชากรที่ศึกษาคือ กระต่าย ที่ถูกส่งเข้าโรงฆ่าในจังหวัดกาญจนบุรี กระต่ายที่เข้าโรงฆ่าในช่วงเวลาที่ดำเนินการศึกษา (ธันวาคม 2559 ถึง มกราคม 2560) มีจำนวน 830 ตัว จากการคำนวณหาขนาดตัวอย่างทำให้ต้องเก็บตัวอย่างจากกลุ่มประชากรดังกล่าวจำนวน 264 ตัว (Thrusfield, 2007) โดยกำหนดความชุกที่คาดหวังที่ร้อยละ 50 (ใช้ค่าจากการศึกษาเบื้องต้น: Kovitvadhi *et al*., 2017) ค่าคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ที่ร้อยละ 5 และระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 สุ่มเก็บตัวอย่าง ณ โรงฆ่าด้วยวิธีการสุ่มแบบเป็นระบบ (Systematic random sampling) จนได้จำนวนตัวอย่างครบตามที่คำนวณ แหล่งที่มาของกระต่ายที่ถูกเก็บตัวอย่างได้จดบันทึก โดยกระต่ายทุกตัวไม่พบอาการทางคลินิกที่ผิดปกติ การทดลองนี้ได้รับอนุญาตและดำเนินการตามภายใต้การควบคุมจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ACKU59-VET-045)

การเก็บ และเตรียมตัวอย่างซีรัม

เก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 3 มิลลิลิตร ระหว่างกระบวนการฆ่าในหลอดเก็บเลือด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อถึงห้องปฏิบัติการดำเนินการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างเพื่อแยกซีรัม และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจหาแอนติบอดีต่อไป

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ E. cuniculi การคำนวณ และแปลผล

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *E. cuniculi* ใช้ *E. cuniculi* antibody ELISA test kit (Medicago, Sweden) ซึ่งได้ทำตามคำแนะนำของชุดตรวจสอบดังกล่าว เมื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร การดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบของ Control antigen ควรมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.200 และค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบที่มี *E. cuniculi* antigen เคลือบอยู่บนหลุมควรมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.200 ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกที่มี *E. cuniculi* antigen เคลือบอยู่บนหลุม ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.800 นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างจากหลุมที่เคลือบด้วย *E. cuniculi* (A450 *E. cuniculi* coated) หารด้วยค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างจากหลุมที่เคลือบด้วย Control antigen (A450 control antigen coated) ตามสมการด้านล่าง

ค่าที่ใช้พิจารณา = A450 *E. cuniculi* coated / A450 control antigen coated

โดยถ้าค่าที่ใช้พิจารณาที่ได้จากสมการข้างต้นมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 2 จะรายงานผลว่าตัวอย่างดังกล่าวให้ผลบวกต่อแอนติบอดีของ *E. cuniculi* แต่ถ้าค่าที่ออกมาน้อยกว่า 2 จะรายงานผลว่าตัวอย่างดังกล่าวให้ผลลบต่อแอนติบอดีของ *E. cuniculi* จากผลการตรวจหาแอนติบอดีนำมาคำนวณหาค่าความชุกของการติดเชื้อ *E. cuniculi* ในซีรัม กระต่ายโดยนำจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกคูณ 100 แล้วหารด้วยจำนวนตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด

การศึกษาเครือข่ายการผลิตและการสัมภาษณ์เพื่อค้นหาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง

หลังจากการเก็บตัวอย่างได้ดำเนินการสัมภาษณ์ฟาร์มที่ได้ส่งกระต่ายเข้าฆ่าในช่วงเวลาที่ได้ดำเนินการศึกษา ด้วยวิธีการสัมภาษณ์แบบกึ่งโครงสร้าง (Semi-structured interview) เพื่อสอบถามข้อมูลพื้นฐาน การจัดการ ปัญหาที่เกี่ยวข้องกับโรค และเครือข่ายการผลิต โดยนำเสนอผลการสัมภาษณ์ระหว่างเครือข่ายในตารางที่ 2

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความชุกระหว่างจังหวัดและเครือข่ายด้วยวิธี Chi-square test โดยถ้า Expected value น้อยกว่า 5 จะใช้วิธี Fisher's exact test แทน การวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม R (Package=FunChisq, R Development Core Team, 2008) และกำหนดค่ายอมรับนัยสำคัญทางสถิติที่น้อยกว่า 0.05 ใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistic) สำหรับข้อมูลที่ได้จากการสัมภาษณ์สำหรับการอภิปรายความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชุกทางซีรัมวิทยาและปัจจัยที่เกี่ยวข้องระหว่างปัจจัยที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้อง แผนภูมิเครือข่ายการผลิตกระต่ายที่ได้ดำเนินการศึกษาถูกสร้างด้วยโปรแกรม NodeXL (Hansen *et al*., 2010)

ผลและวิจารณ์การทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างซีรัมที่โรงฆ่าพบว่าเป็นกระต่ายเนื้อที่มาจากฟาร์มในพื้นที่สามจังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี เพชรบุรี และราชบุรี โดยสามารถบอกได้ว่ามาจากจังหวัดและเครือข่ายการผลิตใด ซึ่งเป็นการสุ่มตามปริมาณการผลิตกระต่ายในแต่ละฟาร์ม เนื่องจากการส่งกระต่ายในแต่ละจังหวัดจะมีฟาร์ม (K01 และ P05; รูปที่ 1) ที่รวบรวมกระต่ายภายในเครือข่ายแล้วนำมาส่งที่โรงฆ่ากระต่ายที่ได้ดำเนินการศึกษา การตรวจแอนติบอดีต่อ *E. cuniculi* พบว่าการแบ่งตามจังหวัดมีความสัมพันธ์ต่อการพบแอนติบอดีของเชื้อที่ศึกษา ($P<0.001$) โดยจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และกาญจนบุรีมีความชุกของเชื้อจากมากไปน้อยตามลำดับ (ตารางที่ 1) ค่าความชุกรวมทั้งเครือข่ายการผลิตกระต่ายเนื้อ ณ ตอนกลางของประเทศไทยอยู่ที่ร้อยละ 42.4 ซึ่งมีระดับต่ำกว่าที่พบในฟาร์มกระต่ายเนื้อของสาธารณรัฐอิตาลีตอนกลางและตอนเหนือโดยมีความชุกที่ร้อยละ 73.7 (Maestrini *et al*., 2017) และ 75.4 (Lonardi *et al*., 2013) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามความชุกของเชื้อในประเทศอิตาลีทั้งหมด (ร้อยละ 31.6; Santaniello *et al*., 2009) และสาธารณรัฐเช็ก (ร้อยละ 35.6; Neumayerová *et al*., 2014) มีค่าต่ำกว่าที่พบในการสำรวจนี้ ผลบวกทางซีรัมวิทยาในระดับที่สูงคาดว่าเชื้อ *E. cuniculi* เป็นเชื้อประจำถิ่น ซึ่งกระต่ายส่วนใหญ่เคยได้รับการติดเชื้อแล้วจึงทำให้พบผลบวกได้มาก (Lonardi *et al*., 2013; Maestrini *et al*., 2017) ระดับของผลบวกในการศึกษาครั้งนี้ถือว่ามีระดับปานกลางเมื่อเทียบกับประเทศอื่น ดังนั้นการ

Table 1 Serological testing results of *Encephalitozoon cuniculi* based on ELISA

Groups	Positive samples		n	X^2	*P* value
	n	%	(Total)		
Provinces					
Kanchanaburi	13	12.1	107		
Ratchaburi	17	39.5	43		
Phetchaburi	82	71.9	114		
Total	112	42.4	264	80.9	<0.001
Production network					
Network A[1]	30	20.0	150		
Network B[2]	82	71.9	114		
Total	112	42.4	264	71.5	<0.001

[1]Production network A contained 5 farms in Kanchanaburi and Ratchaburi provinces.

[2]Production network B contained 53 farms in Phetchaburi province.

ค้นหาปัจจัยและการวางแผนควบคุมป้องกันจึงเป็นสิ่งสำคัญก่อนที่จะทำให้โรคดังกล่าวกลายเป็นเชื้อประจำถิ่นและยากต่อการกำจัดออกไปจากระบบการผลิตกระต่ายเนื้อ

จากการศึกษาเครือข่ายการผลิตกระต่าย (รูปที่ 1) พบว่ากระต่ายในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี และราชบุรีจะมารวมกันที่ฟาร์มในจังหวัดกาญจนบุรีก่อนส่งเข้าโรงฆ่า (รูปที่ 1: K01) ส่วนฟาร์มในจังหวัดเพชรบุรีก็มีลักษณะเช่นเดียวกัน (รูปที่ 1: P05) ด้วยลักษณะดังกล่าวจึงสามารถจัดแบ่งกลุ่มตามเครือข่ายการผลิตกระต่ายออกเป็นสองเครือข่ายคือ A และ B ตามลำดับ โดยทั้งสองเครือข่ายมีจุดร่วมกันที่โรงฆ่ากระต่ายเพื่อจำหน่ายเนื้อกระต่าย และไม่มีการแลกเปลี่ยนระหว่างเครือข่ายทั้งสอง (รูปที่ 1) เมื่อคำนวณค่าความชุกทางซีรัมวิทยาของเชื้อ *E. cuniculi* พบว่าเครือข่าย A (ร้อยละ 20) มีความชุกน้อยกว่าเครือข่าย B (ร้อยละ 71.9) โดยพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001) ฟาร์มกระต่ายในเครือข่าย A เป็นฟาร์มขนาดใหญ่มีจำนวนแม่พันธุ์ 500-2,000 ตัว ส่วนฟาร์มในเครือข่าย B เป็นฟาร์มขนาดเล็กมีแม่พันธุ์ 50-300 ตัว และมีการแลกเปลี่ยนกระต่ายระหว่างฟาร์มในพื้นที่ ซึ่งเครือข่าย A จะมีการแลกเปลี่ยนกระต่ายกับฟาร์ม K01 เท่านั้น

จากการสัมภาษณ์พบว่าทั้งสองเครือข่ายมีปัจจัยการผลิตที่เหมือนกันดังต่อไปนี้คือลักษณะโรงเรือนแบบเปิด พื้นโรงเรือนเป็นดิน สัตว์ชนิดอื่นสามารถเข้ามาในโรงเรือนได้ วัสดุที่ทำกรงเป็นไม้และลวด มีการคัดเลือกกระต่ายทดแทนจากลักษณะภายนอก และรอบการผลิต (42-60 วัน) ปัญหาสุขภาพพบเป็นประจำคือ ท้องเสีย ไรในหู และเชื้อรา ซึ่งจากการสัมภาษณ์ฟาร์มไม่ได้กล่าวถึงอาการ

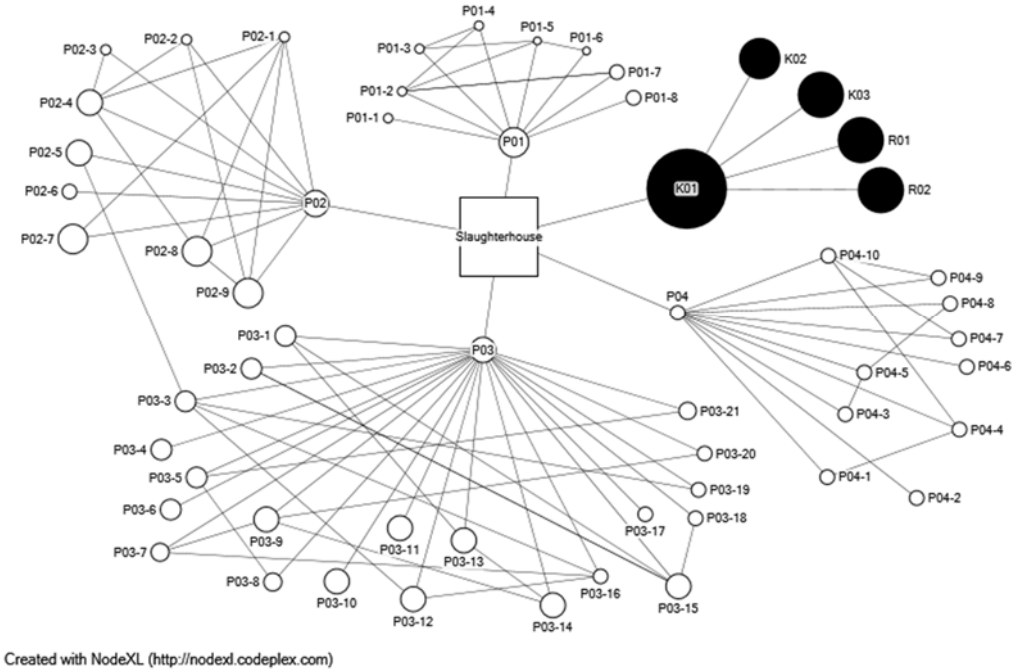


Figure 1 Meat rabbit production network in central part of Thailand. Node size means number of reproductive female rabbits in each farm. Axis present the rabbit exchange activities. White (○) and Black (●) circle node represent farms in zone A and B, respectively. First letter means the province of rabbit farms; K = Kanchanaburi, R = Ratchaburi and P = Phetchaburi.

ผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *E. cuniculi* ซึ่งสอดคล้องกับการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้ที่มักไม่พบอาการทางคลินิกในสัตว์ที่ติดเชื้อ (Santaniello *et al*., 2009; Lonardi *et al*., 2013; Neumayerová *et al*., 2014; Maestrini *et al*., 2017) โดยปัจจัยที่คาดว่าส่งผลต่อระดับความชุกทางซีรัมวิทยาที่แตกต่างกันระหว่างเครือข่าย A (ความชุกต่ำ) และ B (ความชุกสูง) จากการสัมภาษณ์และสังเกตจากการสำรวจฟาร์มมีดังต่อไปนี้

จุดประสงค์ของการเพาะเลี้ยงกระต่ายมีความแตกต่างกันระหว่างสองเครือข่าย กระต่ายที่ผลิตในเครือข่าย A เป็นกระต่ายสายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์มีจุดประสงค์ของการเพาะพันธุ์คือ ขายเนื้อ ซึ่งใช้ระยะเวลาขุนหลังอย่านม (35 วัน) นาน 60-90 วัน ส่วนเครือข่าย B เพาะเลี้ยงกระต่ายพันธุ์ไทยเพื่อขายลูกกระต่ายเป็นสัตว์เลี้ยง โดยกระต่ายที่นำมาส่งโรงฆ่าคือ กระต่ายพ่อแม่พันธุ์คัดทิ้ง ซึ่งมีอายุระหว่าง 6 ถึง 12 เดือน จากอายุกระต่ายที่เข้าฆ่าของเครือข่าย B มากกว่าเครือข่าย A จึงมีโอกาสสัมผัสเชื้อมากกว่าแล้วส่งผลให้ความชุกในเครือข่าย B มีค่าสูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับสำรวจของ Santaniello *et al*. (2009), Tee *et al*. (2011) และ Lonardi *et al*. (2013) ที่พบผลบวกต่อเชื้อจากการตรวจทางซีรัมวิทยาในกระต่ายที่อายุมากกว่า 4 เดือนมากกว่ากระต่ายที่อายุน้อยกว่า 4 เดือน นอกจากนี้การสำรวจความชุกของเชื้อดังกล่าวในกระต่ายแม่พันธุ์พบว่ามีผลบวกมากถึงร้อยละ 75.4 (Lonardi *et al*., 2013) ซึ่งใกล้เคียงกับความชุกในเครือข่าย B ที่ร้อยละ 71.9 ซึ่งเป็นกระต่ายพ่อแม่พันธุ์เหมือนกัน

Table 2 Common and distinct factors between two production networks

Factors	Network	
	A	B
Common		
Conventional housing system	Yes	Yes
Floor of housing	Soil	Soil
Other animals can enter the housing	Yes	Yes
Cage materials	Wood and wire	Wood and wire
Source of replacement rabbits	Outside	Outside
Production cycle	42-60 days	42-60 days
Distinct		
Objective of production	Meat	Pet
Breed	New Zealand White	Local breed
Type of rabbit entering slaughterhouse	Fattening rabbits	Reproductive rabbits[1]
Age of rabbit at slaughterhouse	3-4 months	6-12 months
Productive period	9 months/year	12 months/year
Non-productive period	3 months/year[2]	None
Diets	Only pellets	Pellets and grass[3]
Ventilation	Appropriate	Low

[1]Culling rabbits

[2]March to June (Summer)

[3]Feed restriction was performed for pellets and fresh grass (*Brachiaria mutica*) was fed *ad libitum*

สายพันธุ์กระต่ายที่แตกต่างกันเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่คาดว่าเกี่ยวข้องเพราะส่งผลต่อการจัดรอบการผสม ฟาร์มในเครือข่าย A เพาะเลี้ยงกระต่ายสายพันธุ์สำหรับการผลิตเนื้อซึ่งเป็นสายพันธุ์ต่างประเทศ จากการสัมภาษณ์พบว่าอัตราการผสมติดและอัตรารอดตายของลูกต่ำในฤดูร้อน ดังนั้นฟาร์มจึงมีความจำเป็นที่ต้องคัดทิ้งแม่และพ่อพันธุ์ออกประมาณร้อยละ 50-70 เพื่อลดต้นทุนด้านอาหาร หลังจากนั้นจึงเริ่มผสมพันธุ์เพื่อขยายฝูงใหม่อีกครั้ง ทำให้ระยะเวลาที่ไม่มีการผสมพันธุ์และมีกรงว่างนานประมาณ 3 เดือนต่อปี (มีนาคม-พฤษภาคม) จากการกระทำดังกล่าวส่งผลให้กระต่ายที่มีลักษณะไม่ดีหรือป่วยถูกคัดทิ้งโดยอาจรวมถึงกระต่ายที่ติดเชื้อ *E. cuniculi* จึงส่งผลให้ความชุกในเครือข่าย A มีค่าต่ำ แม่ทดแทนจะคัดเลือกจากแม่พันธุ์ที่สุขภาพดีภายในฟาร์ม ส่วนพ่อพันธุ์จะรับมาจากสถานที่มีการรับรองว่าปลอดเชื้อดังกล่าว ในทางกลับกันเครือข่าย B จะเพาะเลี้ยงกระต่ายพันธุ์ไทยซึ่งมีอัตราผสมติดและอัตรารอดตายของลูกหย่านมสูงตลอดทั้งปี ทำให้ไม่มีการพักคอกหรือหยุดการผลิต ประกอบกับการติดเชื้อ *E.*

cuniculi มักไม่แสดงอาการทางคลินิกจึงส่งผลให้มีโอกาสที่จะใช้พ่อแม่พันธุ์ที่มีเชื้ออยู่แล้วแพร่กระจายต่อไปได้ในฟาร์มเนื่องจากใช้กระต่ายในเครือข่ายเป็นพ่อแม่พันธุ์ทดแทนเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการสำรวจในสาธารณรัฐเช็กที่พบว่าผลบวกทางซีรัมวิทยาของเชื้อมีค่าสูงในการเพาะเลี้ยงในระบบที่ต่อเนื่องและใช้พ่อแม่พันธุ์ทดแทนภายในฟาร์ม (ร้อยละ 43.7) เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในรูปแบบหนาแน่นที่เป็นระบบเข้าหมดออกหมด (ร้อยละ 14.1) (Neumayerová *et al*., 2014)

เครือข่าย B ให้อาหารสำเร็จรูปร่วมกับหญ้าขน (*Brachiaria mutica*) ที่ใช้อุจจาระกระต่ายจากฟาร์มเป็นปุ๋ยซึ่งอาจปนเปื้อนสปอร์ของกระต่ายที่ติดเชื้อ และมีความเสี่ยงที่จะแพร่กระจายเชื้อสู่กระต่ายตัวอื่นเมื่อนำหญ้าดังกล่าวมาใช้เป็นอาหาร เพราะสปอร์ของเชื้อ *E. cuniculi* มีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อม (Malčeková *et al*., 2010; Ozkan *et al*., 2011) ในขณะที่ฟาร์มในเครือข่าย A ใช้อาหารสำเร็จรูปเพียงอย่างเดียวซึ่งคาดว่าช่วยลดความเสี่ยงดังกล่าว ปัจจัยสุดท้ายที่คาดว่าเกี่ยวข้องคือ การระบายอากาศภายในโรงเรือน ถึงแม้ว่าฟาร์มที่ได้ศึกษาจะเป็นฟาร์มเปิดเหมือนกัน แต่พบว่าฟาร์มในเครือข่าย B มีการระบายอากาศที่น้อยกว่าฟาร์มในเครือข่าย A เนื่องจากความสูงของโรงเรือนต่ำกว่า รวมทั้งมีการนำตาข่ายกรองแสงล้อมรอบโรงเรือน การระบายอากาศที่ต่ำย่อมส่งผลให้ของเสียในรูปของแก๊สสะสมอยู่และส่งผลต่อสุขภาพสัตว์ จากการสัมภาษณ์พบว่าฟาร์มในเครือข่าย B มีปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพมากกว่าฟาร์มในเครือข่าย A ซึ่งอาจส่งผลให้ความสามารถในการต่อต้านการติดเชื้อของกระต่ายในเครือข่าย A ต่ำกว่าเครือข่าย B ซึ่งเป็นประเด็นที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ความชุกทางซีรัมวิทยาของเชื้อ *E. cuniculi* ในเครือข่ายผู้ผลิตกระต่ายเนื้อตอนกลางของประเทศไทยมีค่าอยู่ที่ร้อยละ 42.4 หลังจากการสัมภาษณ์พบว่าเครือข่ายการผลิตสามารถแบ่งออกเป็นเครือข่าย A และ B โดยมีความชุกทางซีรัมวิทยาของเชื้อที่ศึกษาอยู่ที่ร้อยละ 20 และ 71.9 ตามลำดับ จากการสัมภาษณ์คาดว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่ส่งผลต่อค่าความชุกที่แตกต่างกันคือ การจัดการฟาร์ม อายุของกระต่ายที่ส่งโรงฆ่า การจัดการด้านอาหาร และการระบายอากาศภายในโรงเรือน ดังนั้นการสำรวจเพื่อค้นหาปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการเกิดโรค *E. cuniculi* และหาสาเหตุของความแตกต่างของความชุกระหว่างสองเครือข่ายซึ่งจะสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในมาตรการควบคุมโรคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร ภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ (CASAF129) และทุนสนับสนุนวิชาการจากกองทุนย่อยพัฒนานิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย และเกษตรกรผู้เพาะพันธุ์กระต่ายในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่าง และสัมภาษณ์

เอกสารอ้างอิง

Baldotto, S.B., Cray, C., Giannico, A.T., Reifur, L. and Montiani-Ferreira, F. 2015. Seroprevalence of *Encephalitozoon*

cuniculi infection in pet rabbits in Brazil. *J. Exot. Pet. Med.* 24: 435-440.

Boot, R., Hansen, A.K., Hansen, C.K., Nozari, N. and Thuis, H.C. 2000. Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab. Anim.* 34: 281-289.

Csokai, J., Joachim, A., Gruber, A., Tichy, A., Pakozdy, A. and Künzel, F. 2009. Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet. Parasitol.* 163: 18-26.

Harcourt-Brown, F.M. 2004. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Sem. Av. Ex. P.* 13 (2): 86-93.

Igarashi, M., Oohashi, E., Dautu, G., Ueno, A., Kariya, T. and Furuya, K. 2008. High Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Pet Rabbits in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 70 (12): 1301-1304.

Kovitvadhi, A., Sanyathitiseree, P., Gasco, L. and Rukkwamsuk, T. 2016. Meat rabbit production in Central, Western and Eastern Thailand: Social network and current status. Proceeding in the 11th World rabbit congress, Qingdao, China, 15-18 June 2016: 403.

Kovitvadhi, A., Jala, S., Kawvongvan, D., Lertwatcharasarakul, P. and Sanyathitiseree, P. 2017. Preliminary study on *Encephalitozoon cuniculi* seroprevalence from meat rabbits. Proceeding in the 55th Kasetsart University annual conference, Bangkok, Thailand, 31 January - 3 February 2017: 73.

Lavazza, A., Chiari, M., Nassuato, C., Giardiello, D., Tittarelli, C. and Grilli, G. 2016. Serological investigation on *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in North-Central Italy. *J. Exot. Pet. Med.* 25: 52-59.

Lertwatcharasarakul, P., Kovitvadhi, A., Aiemsumaung, K., Piempinseat, B., Dittawong, P., Sinsuwonkwat, W., Phatthanakunanan, S., Jala, S., Thayananuphat and Sanyathitiseree, P. 2011. Polymerase chain reaction base-prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in meat rabbits. Proceeding in the 37th International conference on veterinary science (ICVS), Nonthaburi, Thailand, 26-28 October 2011: 81.

Lonardi, C., Grilli, G., Ferrazzi, V., Dal Cin, M., Rigolin, D. and Piccirillo, A. 2013. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in commercially reared rabbit does in Northern Italy. *Res. Vet. Sci.* 94: 295-298.

Maestrini, G., Ricci, E., Cantile, C., Mannella, R., Mancianti, F., Paci, G., D'Ascenzi, C. and Perrucci, S. 2017. *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits: serological screening and histopathological findings. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 50: 54-57.

Malčeková, B., Halánová, M., Sulínová, Z., Molnár, L., Ravaszová, P., Adam, J., Halán, M., Valocký, I. and Baranovič, M. 2010. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon intestinalis* in humans and animals. *Res. Vet. Sci.* 89: 358-361.

Meng, Q., Wang, W.L., Ni, X.T., Li, H.B., Yao, G.Z., Sun, X.L., Wang, W.L. and Cong, W. 2015. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in China. *Korean. J. Parasitol*. 53 (6): 759-763.

Neumayerová, H., Juránková, J., Jeklová, E., Kudláčková, H., Faldyna, M., Kovařčík, K., Jánová, E. and Koudela, B. 2014. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits from different farming systems. *Vet. Parasitol.* 204: 184-190.

Ozkan, O., Ozkan, A.T. and Zafer, K. 2011. Encephalitozoonosis in New Zealand rabbits and potential transmission risk. *Vet. Parasitol.* 179: 234-237.

R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Santaniello, A., Dipineto, L., Rinaldi, L., Menna, L.F., Cringoli, G. and Fioretti, A. 2009. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. *Res. Vet. Sci.* 87: 67-69.

Hansen, D., Shneiderman, B. and Smith, M. 2010. Analyzing Social Media Networks with NodeXL. 1st ed. Morgan Kaufmann publishing. California. 304 p.

Tee, K.Y., Kao, J.P., Chiu, H.Y., Chang, M.H., Wang, J.H., Tung, K.C., Cheng, F.P. and Wu, J.T. 2011. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Taiwan. *Vet. Parasitol.* 183: 68-71.

Thrusfield, M. 2007. Veterinary Epidemiology. 3rd eds. Wiley-Blackwell. Edinburgh. 624 p.

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

การศึกษาความชุกของการติดโรคหนอนพยาธิในลำไส้ของลิงหางยาว เขาสามมุข จังหวัดชลบุรี

ภัทธกร บุบผัน[1,#] รัตน์ติพร โกสุวินทร์[1] มณิสรา ชาติกุล[1] รุจิรา ต๊ะจันทร์[1] กัญจน์ธรม โลสันเทียะ[1] และสุชาดา ข้ามสี่[1]

[1]สาขาวิชาการส่งเสริมสุขภาพ คณะกายภาพบำบัด มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ นครนายก 26120

บทคัดย่อ: การติดโรคหนอนพยาธิและเชื้อโปรโตซัวถือว่าเป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขของคนไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อหนอนพยาธิจากสัตว์สู่คน การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของโรคหนอนพยาธิและเชื้อโปรโตซัวในลำไส้ จากมูลลิงหางยาวในพื้นที่ เขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนมกราคม ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2560 ด้วยวิธี Formalin-ethyl acetate sedimentation technique จำนวนตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 63 ตัวอย่าง พบอัตราการติดเชื้อหนอนพยาธิและโปรโตซัวในลำไส้บางชนิดเท่ากับร้อยละ 84.1 โดยพบการติดเชื้อพยาธิแส้ม้า (*Trichuris trichiura*) สูงที่สุด (ร้อยละ 27) นอกจากนี้ คือ พยาธิปากขอ (Hookworm) (ร้อยละ 25.4) และพบการติดเชื้อโปรโตซัวร้อยละ 73 ได้แก่ *Entamoeba coli* (ร้อยละ 58.7), *Entamoeba histolytica* (ร้อยละ 22.2), *Giardia lamblia* (ร้อยละ 11.1), *Blastocystis hominis* (ร้อยละ 9.5) และ *Endolimax nana* (ร้อยละ 6.3) นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อร่วมกันของหนอนพยาธิและโปรโตซัวร้อยละ 58.7 จากการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าลิงหางยาวเป็นโฮสต์กักตุนโรคหนอนพยาธิที่สำคัญหลายชนิด

คำสำคัญ: ลิงหางยาว ความชุก พยาธิในลำไส้ โปรโตซัว

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(2): 47-55.

E-mail address: pattakorn.b@gmail.com

Prevalence of Intestinal Helminthic Infection in Population of Long-tailed Macaques (*Macaca fascicularis*) from Khao Sam Muk, Chonburi Province

Pattakorn Buppan[1,#], Rattiporn Kosuwin[1], Manisara Chartkul[1], Rujura Tachan[1], Kantime Losantea[1], and Suchada Khamsee[1]

[1]Health Promotion, Faculty of Physical Therapy, Srinakharinwirot University, Nakhon Nayok 2610

Abstract: Infections of helminthes and protozoan may represent a public health problem some area in Thailand. The important infectious of helminthes and protozoan between animal and human. This study aims to determine the intestinal helminthic infection of population from long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) from Khao Sam Muk, Chonburi province during January to April, 2017. All of 63 samples were examined by the formalin ethyl-acetate concentration technique. The result showed that 84.1 percentage samples were positive. Helminths were found including *Trichuris trichiura* 27 percentage and hookworm 25.4 percentage. The 73 percentage of long-tailed macaques were infected with the protozoa including *Entamoeba coli* (58.7 percentage), *Entamoeba histolytica* (22.2 percentage), *Giardia lamblia* (11.1 percentage), *Blastocystis hominis* (9.5 percentage) and *Endolimax nana* (6.3 percentage). Additionally, the study found 58.7 percentagemixed infection of helminths and protozoa. This result indicated that long-tailed macaques were important reservoirs of helminth diseases.

Keywords: *Macaca fascicularis*, Prevalence, Intestinal parasites, Protozoa

[#]Corresponding author

E-mail address: pattakorn.b@gmail.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(2): 47-55.

บทนำ

การติดเชื้อพยาธิในระบบทางเดินอาหารของคนยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนา หนอนพยาธิที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ *Ascaris lumbricoides*, hookworm และ *Trichuris trichiura* (Jones-Engel *et al.*, 2004) ซึ่งเมื่อคนได้รับเชื้อแล้วจะทำให้เกิดอาการต่างๆ ได้แก่ การอุดตันในลำไส้ การดูดซึมอาหารผิดปกติ ภาวะขาดสารอาหาร เกิดภาวะโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก การเจริญเติบโตทางร่างกายช้ากว่าปกติ (Jones-Engel *et al*., 2004) นอกจากนี้การติดเชื้อโปรโตซัวที่สำคัญ เช่น *Entamoeba histolytica* ที่

ทำให้เกิดโรคบิดมีตัว (Amoebiasis) และสามารถเกิดอาการลุกลามทำให้เป็นฝีบิดในตับซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้ (Feng *et al.,* 2011)

ในปัจจุบันการติดเชื้อหนอนพยาธิที่มีสัตว์เป็นพาหะนำโรคเป็นอีกสาเหตุที่สำคัญในการแพร่กระจายเชื้อโรคอย่างต่อเนื่อง จากการตรวจหาความชุกของการติดเชื้อพยาธิในทางเดินอาหารของลิงแสม ณ วนอุทยานโกสัมพี จังหวัดมหาสารคาม โดยทำการเก็บตัวอย่างมูลจากลิงแสมและนำมาตรวจหาไข่พยาธิด้วยวิธีการลอยตัวแบบง่ายด้วยสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต ผลการศึกษาพบว่ามีการปนเปื้อนของไข่พยาธิร้อยละ 45.45 เนื่องจากลิงเป็นสัตว์รังโรคที่ก่อโรคหลายชนิดเข้ามาสู่มนุษย์ (Pumipuntu *et al*., 2013)

ลิงหางยาวหรือลิงแสม จัดเป็นสัตว์อีกประเภทหนึ่งที่สามารถนำโรคมาสู่คนได้ จัดเป็นลิงขนาดกลาง แตกต่างจากลิงชนิดอื่น คือ มีหางยาวโดยเท่ากับความยาวของหัวรวมลำตัว ลำตัวสีเทาถึงสีน้ำตาลแดง แพร่กระจายพันธุ์ที่ค่อนข้างกว้าง มักพบอาศัยตามป่าริมลำน้ำและชายฝั่งทะเลทางภาคใต้ภาคตะวันออก ป่าริมลำน้ำทางภาคตะวันตก ป่าชายเลน และบนภูเขาหินปูน นอกจากนี้ในประเทศไทยยังพบลิงประเภทนี้ตามสถานที่ท่องเที่ยวใกล้ป่า ตามถ้ำหรือวัดต่างๆโดยเฉพาะศาลเจ้าแม่เขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี (Malaivijitnond *et al*., 2008) ซึ่งเป็นสถานที่ท่องเที่ยวอีกที่หนึ่งที่มีลิงอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก ลิงมักจะรับประทานอาหารตามธรรมชาติ ได้แก่ ผัก ผลไม้สด ใบไม้จากธรรมชาติ แหล่งน้ำที่สกปรกจากสถานที่ที่อยู่อาศัย ปัจจัยเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดโรคจากลิงทั้งสิ้น หนึ่งในโรคอาจมาจากเชื้อปรสิตจากมูลลิงซึ่งสามารถติดต่อมาสู่นักท่องเที่ยวได้

จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ คือเพื่อศึกษาความชุกของการติดเชื้อหนอนพยาธิและโปรโตซัวในลำไส้ลิงหางยาวที่อาศัยอยู่บริเวณเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยได้เก็บตัวอย่างมูลลิงหางยาวในบริเวณดังกล่าวมาตรวจสอบหาหนอนพยาธิและโปรโตซัว เพื่อนำผลการศึกษาที่ได้เป็นแนวทางการเฝ้าระวังโรคพยาธิในสัตว์ที่ทำให้ติดต่อสู่คนและการทำสื่อประชาสัมพันธ์ให้ความรู้เกี่ยวกับโรคพยาธิในสัตว์ที่ทำให้ติดต่อสู่คนแก่นักท่องเที่ยวและประชาชนในพื้นที่ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างอุจจาระลิง

สุ่มเก็บตัวอย่างอุจจาระลิงหางยาวในพื้นที่เขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี (รูปที่ 1) ระหว่างเดือนมกราคม ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2560 การคัดเลือกตัวอย่างโดยวิธี Krejcie & Morgan (1970) การสุ่มตัวอย่างโดยการสุ่มแบบไม่อาศัยความน่าจะเป็น โดยการเลือกตัวอย่างแบบบังเอิญ (Accidental sampling) ซึ่งจะได้จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 63 ตัวอย่าง โดยก่อนลงมือเก็บตัวอย่างให้ทำความสะอาดโดยใช้น้ำผสมยาฆ่าเชื้อล้างบริเวณพื้นที่ขับถ่ายของลิงให้สะอาด จากนั้นรอและสังเกตจนลิงขับถ่ายจึงทำการเก็บตัวอย่างมูลลิงโดยใช้ช้อนตักใส่ภาชนะบรรจุขวดพลาสติกที่มีฝาปิดและบันทึกรายชื่อกลุ่มตัวอย่างที่ส่งกระปุกซึ่งมูลลิงที่ได้จะเป็นมูลลิงที่สดใหม่ จากนั้นนำตัวอย่างมูลลิงเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อทำการตรวจหาหนอนพยาธิและโปรโตซัว (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ตำแหน่งของกลุ่มตัวอย่างลิงหางยาวบริเวณเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
(ค้นจาก: https://sites.google.com/site/thxngtheiywcanghwadchlburi/prawati-canghwad-chlburi)



รูปที่ 2 ลักษณะของลิงหางยาวในบริเวณศาลเจ้าแม่เขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

วิธีการตรวจหาปรสิตในตัวอย่างอุจจาระลิง (Beaver *et al.*, 1984)

1. นำอุจจาระลิงหางยาวผสมกับ 10% formaldehyde คนให้เข้ากันแล้วเทลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาดความจุ 15 มิลลิลิตร โดยกรองผ่านผ้าก๊อซสองชั้นจนได้ปริมาตรประมาณ 10 มิลลิลิตร หรือปรับปริมาตรด้วย 10% formaldehyde ในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณน้อย

2. เติม ethyl-acetate ลงในแต่ละหลอดๆ ละ 3 มิลลิลิตร อุดปากหลอดด้วยจุกยางให้แน่นแล้วเขย่า

อย่างแรงเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3. นำหลอดแก้วออกจากเครื่องปั่นอย่างเบามือเพื่อไม่ให้ส่วนของกากอุจจาระที่แยกตัวอยู่ด้านบนลงมาผสมกับส่วนของตะกอนที่ต้องการ ใช้ไม้เขี่ยกากอุจจาระในหลอดให้หลุดออกอย่างระมัดระวัง จากนั้นเทส่วนของกากอุจจาระและของเหลวในหลอดทิ้งอย่างรวดเร็วโดยเหลือของเหลวไว้กับตะกอนประมาณ 1 มิลลิลิตร

4. นำตะกอนก้นหลอดมาตรวจหาเชื้อปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

5. บันทึกภาพ ชนิด และขนาดของหนอนพยาธิและโปรโตซัวในลำไส้ที่ตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ลงในแบบบันทึกผลการตรวจอุจจาระ

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

วิเคราะห์ข้อมูลการติดเชื้อหนอนพยาธิและโปรโตซัวในลำไส้จากมูลลิงหางยาวบริเวณเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ร้อยละ

การทำลายตัวอย่างอุจจาระลิงเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

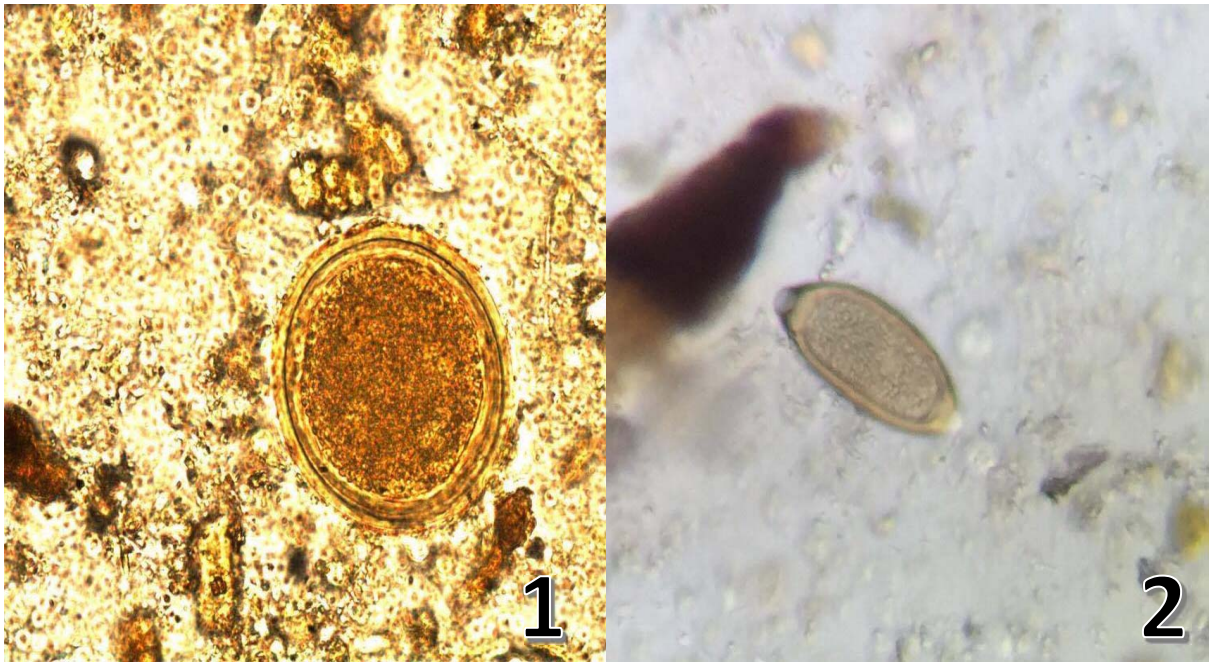
นำตัวอย่างอุจจาระลิงหางยาวที่สิ้นสุดการทดลองและที่เหลือจากการทำวิจัยมาฆ่าเชื้อแบบใช้ความร้อนชื้นโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอดันไอ (autoclave or pressure cooker) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที ก่อนนำไปทิ้ง

ผลการทดลอง

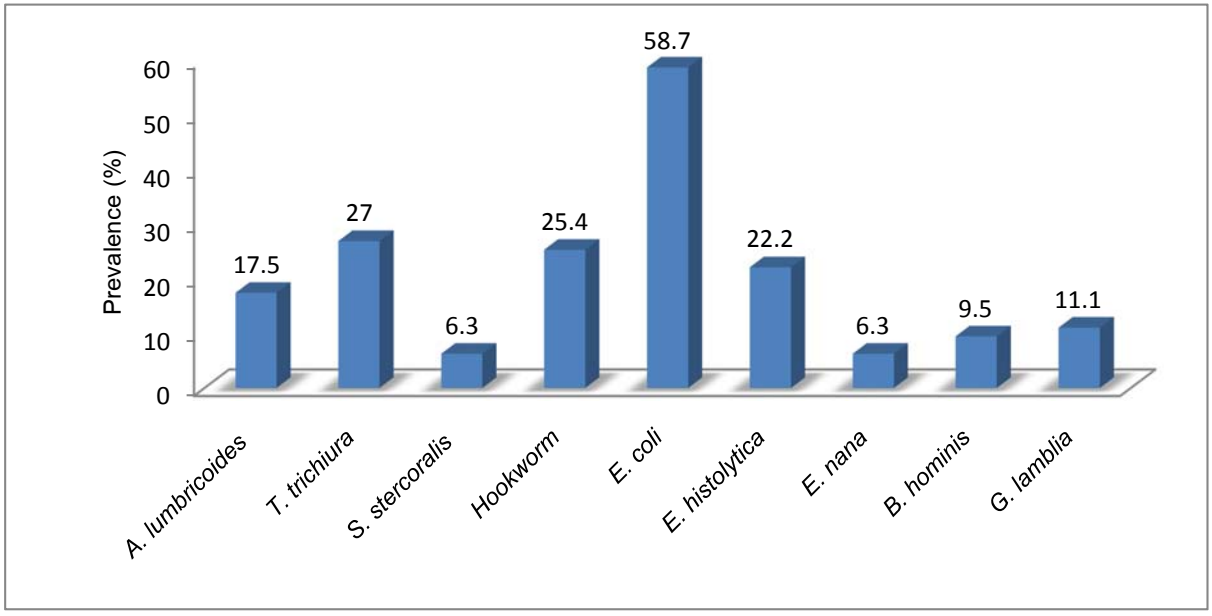
ผลการสำรวจอัตราความชุกของการติดเชื้อหนอนพยาธิและโปรโตซัวในลำไส้ของลิงหางยาวในพื้นที่เขาสามมุข จังหวัดชลบุรี จำนวน 63 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Formalin-ethyl acetate sedimentation technique พบการติดเชื้อของไข่หนอนพยาธิและซิสต์ของโปรโตซัวทั้งหมด 53 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 84.1 โดยพบการติดเชื้อของไข่หนอนพยาธิจำนวน 35 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 55.6 โดยไข่ของหนอนพยาธิที่พบมากที่สุด คือ *T. trichiura* จำนวน 17 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 27, Hookworm คิดเป็นร้อยละ 25.4, *A. lumbricoide* คิดเป็นร้อยละ 17.5 และ *S. stercoralis* คิดเป็นร้อยละ 6.3 (รูปที่ 3) ในส่วนของเชื้อโปรโตซัวพบการติดเชื้อจำนวน 46 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 73 ส่วนซิสต์ของโปรโตซัวที่พบมากที่สุด คือ *E. coli* จำนวน 37 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 58.7 (รูปที่ 4) นอกจากนี้พบว่าโดยส่วนใหญ่จะพบตัวอย่างที่มีการติดเชื้อร่วมกันทั้งไข่พยาธิและซิสต์ของโปรโตซัวมากกว่า 1 ชนิด (multiple infection) คิดเป็นร้อยละ 58.7 (รูปที่ 5)

วิจารณ์ผลการทดลอง

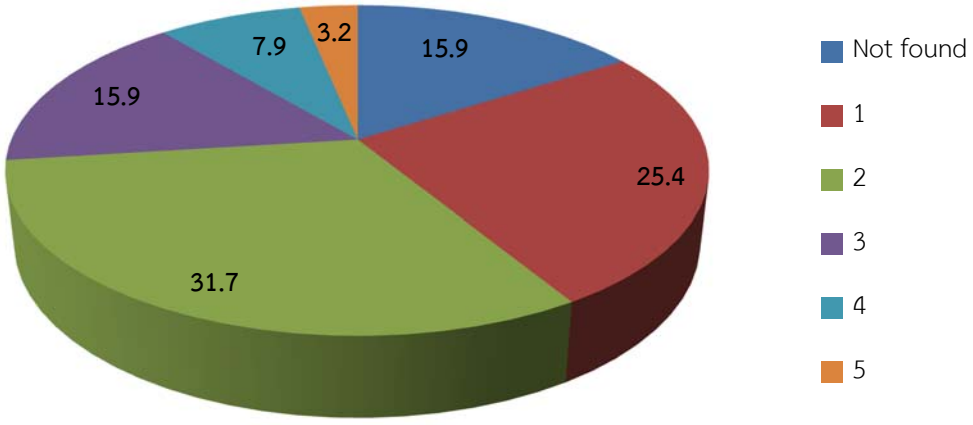
การศึกษาการติดเชื้อหนอนพยาธิและโปรโตซัวในลำไส้ของลิงหางยาวที่อาศัยอยู่บริเวณเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ทั้งหมด 63 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อสูงถึง 53 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 84.1 สอดคล้องกับการศึกษาของ Malaivijitnond *et al.* (2006) ที่ได้รายการติดเชื้อหนอนพยาธิในลำไส้ของลิงหางยาวที่อาศัยอยู่บริเวณสถานที่ท่องเที่ยวในประเทศไทย 9 แห่ง ซึ่งตรวจพบร้อยละ 27.4 และการศึกษาของ Pumipuntu *et al.* (2013) ที่รายงานความชุกของการติดเชื้อพยาธิของลิงหางยาวในวนอุทยานโกสัมพีจังหวัดมหาสารคามที่ตรวจพบร้อยละ 45.45 การศึกษานี้พบความชุกของการติดเชื้อ *T. trichiura* ร้อยละ 27 สูงกว่ารายงานของ Malaivijitnond *et al*. (2006) ที่พบร้อยละ 15.9



รูปที่ 3 ลักษณะหนอนพยาธิในลำไส้ของลิงหางยาวที่ตรวจพบ 1) *Ascaris lumbricoides* และ 2) *Trichuris trichiura* กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 4 ความชุกของหนอนพยาธิและโปรโตซัวในลำไส้ที่ตรวจพบจากลิงหางยาวที่อาศัยอยู่บริเวณเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี



รูปที่ 5 จำนวนตัวอย่างที่พบการติดเชื้อร่วมกันของปรสิตที่ตรวจพบในตัวอย่างอุจจาระลิงหางยาวบริเวณเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี (ร้อยละ)

และ Pumipuntu *et al*. (2013) ที่พบเพียงร้อยละ 9.09 การศึกษานี้พบการติดเชื้อพยาธิตัวกลมกลุ่มสตรองไจลิด (Strongylids) ร้อยละ 6.3 ใกล้เคียงกับรายงานของ Malaivijitnond *et al*. (2006) ที่พบร้อยละ 5.2 นอกจากนี้ยังพบไข่ของหนอนพยาธิชนิดอื่นๆ ได้แก่ *A. lumbricoides* ร้อยละ 17.5 และ Hookworm ร้อยละ 25.4 จากรายงานในต่างประเทศ Casim *et al.* (2015) อัตราความชุกของการติดเชื้อพยาธิและโปรโตซัวในลำไส้ของลิงที่อยู่ในศูนย์วิจัยและกู้ภัยสัตว์ป่าแห่งชาติ เมืองเกซอนซิตี้ ประเทศฟิลิปปินส์ที่ตรวจพบ *B. hominis* ร้อยละ 10 และพบอัตราความชุกของ *E. coli, E. nana, E. histolytica* และ *G. lamblia* ร้อยละ 80, 56, 48 และ 48 ตามลำดับ และพบการติดเชื้อหนอนพยาธิ *T. trichiura* และ *Strongyloides* spp. ร้อยละ 16 และ 8 ซึ่งสูงกว่าการศึกษาของ Jones-Engel *et al.* (2004) พบความชุกของการติดเชื้อปรสิตในลำไส้ลิงสายพันธุ์ต่างๆที่อาศัยอยู่บนเกาะสุลาเวสี ประเทศอินโดนีเซีย โดยตรวจพบ *B. hominis* ร้อยละ 43 ซึ่งสูงกว่าการศึกษาในครั้งนี้ แต่กลับพบว่าความชุกของ *E. coli*, Hookworm, *T. trichiura* และ *A. lumbricoides* ร้อยละ 14, 6, 3 และ 1 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี้ Zanzani *et al.*(2016) ยังได้รายงานการศึกษาปรสิตในลำไส้ลิงหางยาวในสถานปรับปรุงพันธุ์สัตว์ที่ได้รับการจดทะเบียนในประเทศจีนโดยตรวจพบ *T. trichiura* ร้อยละ 1.58 ซึ่งน้อยกว่าการศึกษาในครั้งนี้ แต่ความชุกของ *E. coli, E. nana* และ *B. hominis* สูงกว่าการศึกษาในครั้งนี้ พบร้อยละ 85.19, 79.26 และ 22.2 ตามลำดับ และรายงานของ Feng *et al*. (2011) พบว่ามีความชุกของ *E. coli* ในลำไส้ลิงหางยาวในประเทศจีนสูงมากถึงร้อยละ 94

อย่างไรก็ตาม *E. coli* ละ *E. nana* เป็นโปรโตซัวที่ไม่ก่อให้เกิดโรคทั้งในสัตว์และมนุษย์ ส่วนหนอนพยาธิและโปรโตซัวชนิดอื่นๆที่พบในการศึกษาครั้งนี้สามารถก่อให้เกิดโรคได้ ซึ่งโรคที่เกิดจากปรสิตนั้นอาจจะมีอาการแสดงหรือไม่มีก็ได้ ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบอัตราความชุกของการติดหนอนพยาธิและโปรโตซัวในลำไส้ในลำไส้ของลิงหางยาวที่อาศัยอยู่บริเวณเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี อยู่ในระดับที่ควรเฝ้าระวัง ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลสำคัญที่จะแจ้งให้หน่วยงานทางสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องทราบ และควรจัดให้มีการแนะนำและให้ความรู้แก่นักท่องเที่ยวและประชาชนในพื้นที่

นอกจากนี้จะต้องเพิ่มมาตรการในด้านการดูแลสุขภาพของลิงหางยาวที่อาศัยอยู่บริเวณเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยการทำโปรแกรมการถ่ายพยาธิประจำปีและควบคุมความชุกของพยาธิในทางเดินอาหารของสัตว์เพื่อไม่ให้มีการระบาดมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนสำหรับการดำเนินงานวิจัยจากคณะกายภาพบำบัด มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (องครักษ์) ประจำปี 2560

References

Beaver, P.C., Jung, R.C. and Cupp, E.W. 1984. Examination of specimens for parasitology. *Clinic. Parasitol.* 6(9): 733-758

Casim, L.F., Bandal, M.Z., Gonzales, J.C.B., Valdez, E.M.M., Chavez, G.C.S., and Paller, V.G.V. 2015. Enteroparasites of captive long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) from National Wildlife Research and Rescue Center, Diliman, Quezon City, Philippines. *Asian J. Conserv. Biol*. 4(1): 54-61.

Feng, M., Yang, B., Yang, L., Fu, Y., Zhuang, Y., Liang, L., Xu Q., Cheng X., and Tachibana, H. 2011. High prevalence of Entamoeba infections in captive long-tailed macaques in China. *Parasitol. Res*. 109(4): 1093–1097.

Jones-Engel, L., Engel, G. A., Schillaci, M. A., Froehlich, J., Paputungan, U., and Kyes, R. C. 2004. Prevalence of enteric parasites in pet macaques in Sulawesi, Indonesia. *Am. J. Primatol*. 62(2): 71-82.

Krejcie R.V and Morgan DW. 1970. Determining sampling size for research activities. *J. Educ. Psychol. Mea*s. 30: 607-610.

Malaivijitnond, S., Chaiyabutr, N., Urasopon, N., and Hamada, Y. 2006. Intestinal nematode parasites of long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) inhabiting some tourist attraction sites in Thailand. Proceedings of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand, 1-3 November 2006: 1-3.

Pumipuntu, N., Gerdsuwan, C., Sukma, C., and Khemton, S. 2013. Study the prevalence of parasitic infection of long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*) in Kosumpee forest park, Maha Sarakham province. Proceeding of the 9th Research academic conference at Maha Sarakham University, Maha

Sarakham province, Thailnd, 12-13 September 2013: 518-523. (in Thai)

Zanzani, S. A., Gazzonis, A. L., Epis, S., and Manfredi, M. T. 2016. Study of the gastrointestinal parasitic fauna of captive non-human primates (*Macaca fascicularis*). *Parasitol Res*. 115(1): 307-312.

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

ความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. ของแพะในอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว

ไพทูล แก้วหอม[1,#] และวรรณา ฐิตะสาร[1]

[1]คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว สระแก้ว 27160

บทคัดย่อ: โรคไทเลอริโอซิส (Theileriosis) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Theileria* spp. ซึ่งพบได้ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดแดง และเซลล์เม็ดเลือดขาวของสัตว์เลี้ยงในฟาร์ม เช่น โค กระบือ แพะ แกะ เป็นต้น ปรสิตสกุลนี้ทำให้อัตราการตายสูงในสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากในการเลี้ยงสัตว์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบการระบาดของเชื้อ *Theileria* spp. ของสัตว์เลี้ยงในฟาร์ม ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ การหาความชุกของเชื้อ *Theileria* spp ของแพะจาก 3 ตำบล ได้แก่ ห้วยโจด หนองแวง และท่าเกวียน ในอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว โดยเก็บตัวอย่างเลือดแพะจำนวน 196 ตัว นำมาตรวจสอบโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ผลการทดลองพบว่าผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ที่ได้มีขนาดประมาณ 230 คู่เบส ความชุกของเชื้อ *Theileria* spp ของแพะในเขตตำบลห้วยโจด หนองแวง และท่าเกวียน มีค่าร้อยละ 32.70 (34/104), 57.50 (23/40) และ 46.15 (24/52) ตามลำดับ สำหรับความชุกรวมของอำเภอวัฒนานคร มีค่าร้อยละ 41.33 (81/196) นอกจากนี้ยังศึกษาปัจจัยในการเก็บตัวอย่างที่มีผลต่อการติดเชื้อ *Theileria* spp. พบว่าพื้นที่และช่วงเดือนหรือฤดูกาลของการเก็บตัวอย่างที่ต่างกันมีผลต่อการติดเชื้อ *Theileria* spp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สรุปได้ว่าเทคนิค PCR สามารถนำมาตรวจสอบหาความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. ในเลือดแพะได้ และพบว่าการติดเชื้อ *Theileria* spp. ของแพะในอำเภอวัฒนานครค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเนื่องมาจากเกษตรกรยังไม่ให้ความสำคัญในการป้องกันและกำจัดพาหะนำโรค

คำสำคัญ: ความชุก แพะ *Theileria* spp. เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

E-mail address: Paitoon_k@buu.ac.th

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(2): 57-66.

The Prevalence of *Theileria* spp. of Goat in Watthana Nakhon District, Sa Kaeo Province

Paitoon Kaewhom[1,#] and Wanna Thitasarn[1]

[1]Faculty of Agricultural Technology, Burapha University, Sakaeo Campus, Sakaeo 27160

Abstract: Theileriosis is a disease caused by *Theileria* spp. that infects both red and white blood cells of livestock animal such as cattle, buffalo, goat, and sheep. Theileria parasites have been reported as very pathogenic, causing a high ration of mortality in small ruminants, which can cause severe economic loss in animal husbandry. Therefore, it is necessary to check the epidemiology of *Theileria* spp. of livestock animal. The objective of this study was to investigate the prevalence of *Theileria* spp. of goat in Watthana Nakhon district, Sa Kaeo province. Blood samples of 196 goats were collected from 3 areas of Watthana Nakhon district including Huai Chot and Nong Waeng and Tha Kwian sub-district. The V4 region of 18S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The results demonstrated that the PCR product was approximately 230 bps in length. The prevalence of *Theileria* spp. infection in goat of Huai Chot, Nong Waeng and Tha Kwian sub-district was 32.70% (34/104), 57.50% (23/40), and 46.15% (24/52), respectively. The overall prevalence of *Theileria* spp. infection in goat of Watthana Nakhon district was 41.33% (81/196). In addition, the factors of location, and timing of blood collection affected the prevalence of *Theileria* spp. In summary, PCR technique can be used to determine the prevalence. The goats in Watthana Nakhon district were relatively high infected of *Theileria* spp. probably due to the farmers not to focus on the prevention and elimination of disease vectors.

Keywords: Prevalence, Goat, *Theileria* spp., PCR Technique

[#]Corresponding author

E-mail address: Paitoon_k@buu.ac.th

J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(2): 57-66.

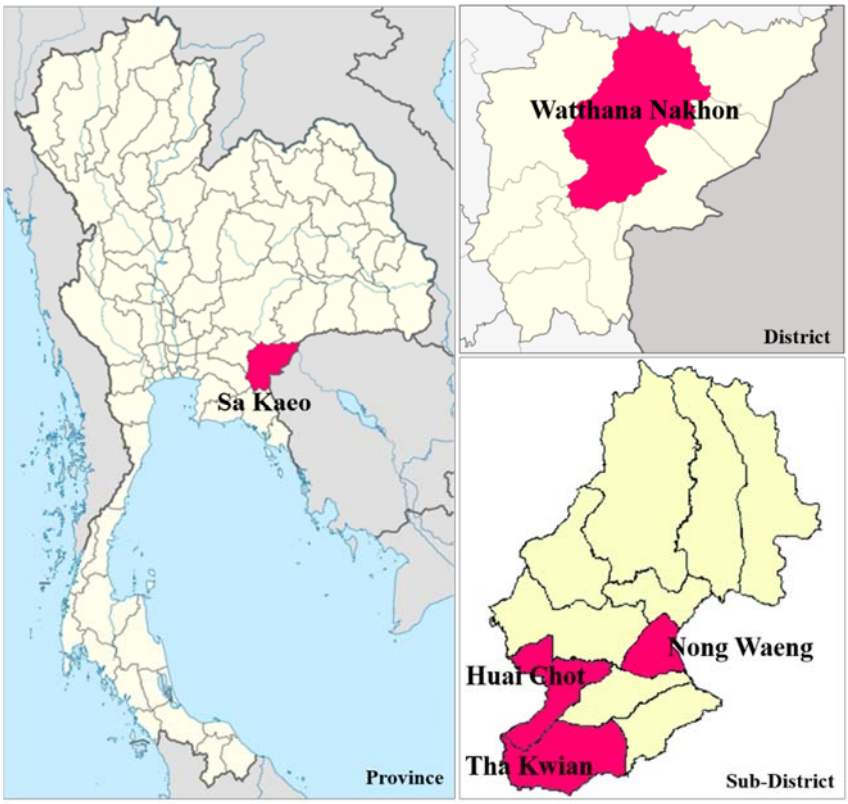
บทนำ

โรคไทเลอริโอซิส (Theileriosis) เกิดจากเชื้อโปรโตซัวไทเลอเรีย (*Theileria* spp.) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด เป็นเชื้อประจำถิ่นจัดอยู่ในตระกูล Theileriidae เชื้อดังกล่าวเป็นโปรโตซัวที่เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว มีรูปร่างที่แตกต่างกันไป โดยบางชนิดมีรูปร่างกลม รูปไข่

และรูปแท่ง โปรโตซัวบางชนิดดำรงชีวิตแบบอิสระและบางชนิดดำรงชีวิตอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ซึ่งโปรโตซัวมักจะอาศัยอยู่ภายในเม็ดเลือดขาวและสามารถพบได้ในเม็ดเลือดแดงของสัตว์โดยเฉพาะในสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โค กระบือ รวมทั้งสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก ได้แก่ แพะ แกะ ซึ่งเชื้อที่ก่อให้เกิดความรุนแรงในโคและกระบือ ได้แก่ *Theileria annulata* และ T. *parva* ที่ก่อให้เกิดอัตราการตาย และอัตราการป่วยสูง เนื่องจากเชื้อมีการเพิ่มปริมาณในต่อมน้ำเหลืองก่อนเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต แต่ในประเทศไทยยังไม่มีการจำแนกชนิดที่ชัดเจน และเชื้อที่ก่อโรครุนแรงในแพะแกะที่มีรายงานของ OIE คือ T. *Lestoquardi* โดยเชื้อทั้ง 2 กลุ่มนี้มีเห็บเป็นพาหะ ได้แก่ เห็บชนิด Amblyomma, Haemaphysalis, Hyalomma และ Rhipicephalus เป็นต้น (Mans *et al*., 2015)

จังหวัดสระแก้วประกอบด้วย 9 อำเภอ ได้แก่ อำเภอเมือง อำเภอวัฒนานคร อำเภอวังน้ำเย็น และอำเภอวังสมบูรณ์ อำเภอเขาฉกรรจ์ อำเภอคลองหาด อำเภอตาพระยา อำเภอโคกสูง อำเภออรัญประเทศ พื้นที่ที่นิยมเลี้ยงโคนม คืออำเภอวังน้ำเย็น และอำเภอวังสมบูรณ์ ส่วนเกษตรกรในพื้นที่อำเภอตาพระยา อำเภออรัญประเทศ อำเภอโคกสูง และอำเภอวัฒนานคร นิยมเลี้ยงโคเนื้อ กระบือ แพะ แกะ ไก่ไข่ สุกร และไก่พื้นเมือง อำเภอวัฒนานครเป็นพื้นที่หนึ่งที่เกษตรกรนิยมเลี้ยงแพะ ในปี พ.ศ. 2559 พบว่ามีจำนวนการเลี้ยงแพะเนื้อประมาณ 1,300 ตัว มีระบบการเลี้ยงแบบกึ่งขังคอก คือ โดยทั่วไปเกษตรกรมักปล่อยแพะให้ออกกินอาหารหรือหญ้าในเวลากลางวัน ซึ่งผู้เลี้ยงจะคอยดูแลตลอดเวลา หรือเป็นบางเวลา และกักขังในตอนกลางคืนในคอกหรือโรงเรือนที่มีแต่หลังคาและผนังคอกกั้นแบบโล่งเท่านั้น ลักษณะการเลี้ยงแบบนี้เป็นที่นิยมเลี้ยงกันมากในปัจจุบัน แต่ระบบการเลี้ยงแบบนี้อาจทำให้เห็บในสกุล Rhiphicephalus ซึ่งเป็นพยาธิภายนอกที่สำคัญในสัตว์เศรษฐกิจสามารถดูดกินเลือดและเกิดการแพร่เชื้อโรคพยาธิในเลือดได้ โดยการติดต่อจะส่งเชื้อผ่านทางต่อมน้ำลายของเห็บ (Anim *et al*., 2013)

สำหรับเชื้อ *Theileria* spp. ก่อให้เกิดโรค East coast fever (ECF) หรือ Ovine theileriosis และ Tropical theileriosis ในแพะ และพบการรายงานการกระจายของเชื้อในสัตว์เคี้ยวเอื้องหลายชนิด เช่น โคเนื้อ (Moumouni *et al*., 2015) โคนม (Pulforda *et al*., 2016) กระบือ (Altangerel *et al*., 2011; Chaisi *et al*., 2011) ม้า (Moretti *et al*., 2010) กวาง (Chae *et al*., 1999; Hana *et al*., 2009) แพะ และแกะ (Cao *et al*., 2013; Irshad *et al*., 2010) การติดเชื้อโรคดังกล่าวในแพะอาจก่อปัญหาต่อสุขภาพสัตว์และนำไปสู่ความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการผลิตปศุสัตว์ เนื่องจากการติดเชื้อในสัตว์ที่อยู่ในภาวะเครียดทำให้เกิดอาการป่วยรุนแรง เกิดโรคโลหิตจาง มีไข้สูง ดีซ่าน ต่อมน้ำเหลืองบวมขยายใหญ่ อ่อนเพลีย โตช้า และปริมาณน้ำนมลดลง โดยการแพร่กระจายของเชื้อดังกล่าวมีแมลงดูดเลือดและเห็บเป็นพาหะนำโรค การวินิจฉัยโดยทั่วไปใช้วิธีการสังเกตอาการป่วยของสัตว์ ส่วนการวินิจฉัยที่แน่นอน ได้แก่ การเก็บตัวอย่างเลือดแพะที่สงสัยไปตรวจทางห้องปฏิบัติการหรือนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือ Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นหนึ่งในทางเลือกของการวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ เพื่อการตรวจสอบการระบาดได้อย่างแม่นยำ ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูงมาก



รูปที่ 1 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่าง 3 ตำบลของอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว

(Kaewhom, 2014) การศึกษาความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. ของแพะในเขตพื้นที่ทางภาคตะวันออกของประเทศไทย จึงมีความจำเป็นในการศึกษาเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการจัดการหาวิธีการป้องกัน การรักษาและการควบคุมปรสิต รวมไปถึงเป็นการเผยแพร่องค์ความรู้หรือข้อมูลแก่หน่วยงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเลือดแพะ

การทดลองครั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดแพะพันธุ์เนื้อที่มีน้ำหนักตัวอยู่ในช่วง 30-60 กิโลกรัม จากพื้นที่อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ ประกอบไปด้วย 3 ตำบล ได้แก่ ตำบลห้วยโจด จำนวน 104 ตัวอย่าง ตำบลหนองแวง จำนวน 40 ตัวอย่าง และตำบลท่าเกวียน จำนวน 52 ตัวอย่าง (ดังแสดงในรูปที่ 1) การเก็บตัวอย่างเลือดแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงเดือนมิถุนายน (ปลายฤดูร้อน) และเดือนตุลาคม (ปลายฤดูฝน) รวมตัวอย่างเลือดแพะทั้งหมดที่นำมาตรวจสอบคือ 196 ตัวอย่าง โดยทำการเจาะเก็บเลือดแพะบริเวณเส้นเลือดดำที่คอ (Jugular vein) หลังจากนั้นนำตัวอย่างเลือดไปเก็บใส่หลอดที่มี EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ

นำตัวอย่างเลือดแพะที่เก็บไว้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี acid phenol extraction method (Chomczynsky *et al.*, 1987) จากนั้นเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน 18S rRNA ที่ต้องการด้วยนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น (primer)

Theileria genus-specific forward primer (5'-GGTAATTCCAGCTCCAATAG-3') และ reverse primer (5'-ACCAACAAAATAGAACCAAAGTC-3') ที่มีความจำเพาะต่อยีนของเชื้อไทเลอเรียทุกชนิด (*Theileria* spp.) โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งมีขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation (อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที) ขั้นตอนที่ 2 Denaturation (อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที) ขั้นตอนที่ 3 Annealing (อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที) ขั้นตอนที่ 4 Extension (อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที) ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย คือ Terminal extension (อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกใน 1% agarose gel เพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ปรากฏ

***ความชุกและความสัมพันธ์ของปัจจัยการเก็บตัวอย่างเลือดกับการติดเชื้อ Theileria* spp.**

นำตัวอย่างที่ให้ผลบวก (Positive) ในแต่ละตำบลมาคำนวณความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. ของแพะในอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว โดยแสดงผลในรูปของร้อยละ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านพื้นที่และช่วงเดือนหรือฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างต่อการติดเชื้อ *Theileria* spp. โดยใช้การทดสอบไคสแควร์ (Chi-square test)

ผลการทดลอง

ผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR

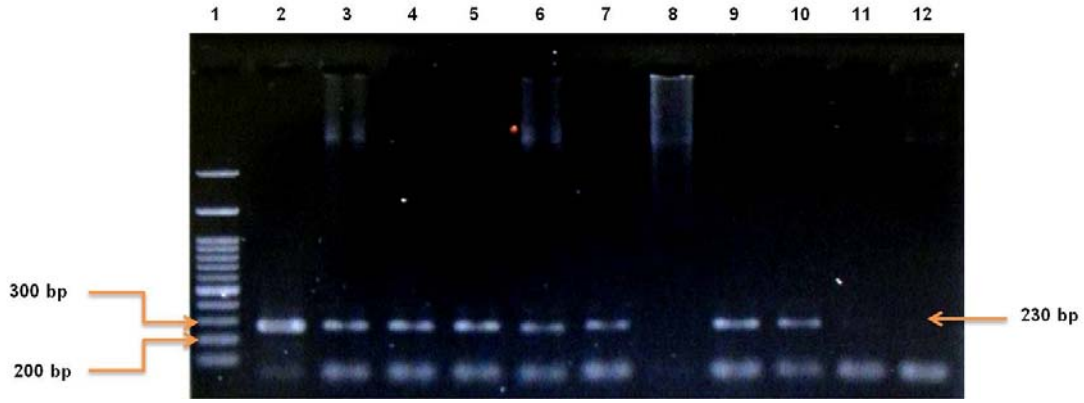
ผลจากการนำตัวอย่างเลือดที่เก็บจากตำบลห้วยโจด ตำบลหนองแวง และตำบลท่าเกวียนของอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว โดยนำมาสกัด DNA ด้วยวิธี acid phenol extraction method จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสกุลของเชื้อไทเลอเรีย (Theileria genus-specific primer) ที่เป็นสาเหตุของโรค theileriosis โดยใช้เทคนิค PCR และนำมาโหลดเพื่อเช็คด้วย 1% agarose gel ซึ่งขนาดความยาวของ PCR product อยู่ในช่วง 200-300 เบสแพร์ ดังแสดงในรูปที่ 2

***ความชุกของเชื้อ Theileria* spp. ของแพะในอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว**

ผลการทดลองจากรูปที่ 2 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเลือดแพะที่มีเชื้อ *Theileria* spp. จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวของ PCR product ประมาณ 230 เบสแพร์ และตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อ *Theileria* spp. จะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งดังกล่าว ซึ่งผลจากการตรวจวินิจฉัยสามารถนำมาคำนวณหาความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. พบว่าความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. ในตำบลห้วยโจด หนองแวง และท่าเกวียนของอำเภอวัฒนานคร คือ ร้อยละ 32.69 57.50 และ 46.15 ตามลำดับ และความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. ในอำเภอวัฒนานคร คือร้อยละ 41.33 ดังแสดงผลในตารางที่ 1

***ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อ Theileria* spp.**

ผลการทดลองจากรูปที่ 2 ตัวอย่างเลือดที่ให้ผลบวก (positive) และให้ผลลบ (negative) นำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านพื้นที่แยกเป็นตำบลและช่วงเดือนหรือฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างกับการติดเชื้อ *Theileria* spp. พบว่าพื้นที่หรือตำบลที่เก็บตัวอย่างเลือด ซึ่งประกอบด้วยตำบลห้วยโจด หนองแวง และท่าเกวียน มีผลต่อการติดเชื้อ *Theileria* spp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 2 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของแพะ Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3-11: ผลของตัวอย่างเลือดแพะของแต่ละตำบลในอำเภอวัฒนานครที่นำมาตรวจวินิจฉัย และ lane 12: negative control

ตารางที่ 1 ความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. ในแพะของแต่ละตำบลของอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว

ตำบล	จำนวนตัวอย่าง	ผล Positive	ความชุก (%)
ห้วยโจด	104	34	32.69
หนองแวง	40	23	57.50
ท่าเกวียน	52	24	46.15
รวมทั้งหมด	196	81	41.33

(P<0.05) และยังพบว่าช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างเลือด ซึ่งเป็นช่วงเดือนมิถุนายน (ปลายฤดูร้อน) และช่วงเดือนตุลาคม (ปลายฤดูฝน) มีผลต่อการติดเชื้อ *Theileria* spp. อย่างมีนัยยิ่งสำคัญทางสถิติ (P<0.01) ดังแสดงในตารางที่ 2

วิจารณ์

ผลการตรวจโดยใช้เทคนิค PCR จากนั้นนำมาแยกด้วย 1% agarose gel ซึ่งขนาดความยาวของ PCR product ประมาณ 230 เบสแพร์ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kgomotso *et al*. (2008) ได้ทำการศึกษาตรวจหาเชื้อ *Theileria parva* ในโคและกระบือป่าเคป (Cape buffalo) ด้วยเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 18S rRNA เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนของ v4 region ซึ่งจะได้ PCR product เท่ากับ 230 เบสแพร์ แต่สำหรับผลการทดลองนี้ก็ยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเชื้อไทเลอเรียชนิดใด (species) ซึ่งจะต้องมีการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของเชื้อหรือใช้วิธีการอื่น เช่น DNA probes, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นต้น

ความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. ของแพะทั้ง 3 ตำบลในอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว คือร้อยละ 41.33 ซึ่งก่อนหน้านี้ยังไม่เคยมีการรายงานความชุกของเชื้อดังกล่าวนี้ในพื้นที่อำเภอวัฒนานคร แต่สำหรับการวิจัยเรื่องความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. พบการรายงานในหลายพื้นที่ทั่วโลก ซึ่งนักวิจัย

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อ *Theileria* spp.

ปัจจัย	จำนวนตัวอย่าง	ผล Positive (%ความชุก)	ค่าสถิติ		
			χ^2	*df*	*P-value*
สถานที่ (ตำบล)			8.01	2	0.0182*
ห้วยโจด	104	34 (32.69)			
หนองแวง	40	23 (57.50)			
ท่าเกวียน	52	24 (46.15)			
ช่วงเวลา			14.81	2	0.0001**
มิถุนายน (ปลายฤดูร้อน)	95	26 (27.37)			
ตุลาคม (ปลายฤดูฝน)	101	55 (54.46)			
Total	196	81 (41.33)			

หมายเหตุ * แสดงความแตกต่างของปัจจัยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

** แสดงความแตกต่างของปัจจัยอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ได้นำเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *Theileria* spp. เพื่อความรวดเร็วและแม่นยำ ซึ่งประกอบไปด้วย Altay *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาหาการติดเชื้อของ *Theileria ovis* ในเม็ดเลือดแดงของแกะในภาคตะวันออกของตุรกี ซึ่งใช้ไพรเมอร์ SSU rRNA genes โดยใช้เทคนิค Nested-PCR พบว่า มีการติดเชื้อ *Theileria ovis* ในแกะคิดเป็นร้อยละ 18.29 (120/656) และในแพะร้อยละ 2.88 (4/139) โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้ตัวอย่างทั้งหมดได้นำมาทดสอบด้วยเทคนิค nested PCR ที่มีความไวต่อเชื้อ *Theileria ovis* ซึ่งผลตรวจพบการติดเชื้อในแกะร้อยละ 58.79 (398/677) และในแพะร้อยละ 11.27 (16/142) Aktas *et al.* (2005) ทำการศึกษาระดับโมเลกุลของการติดเชื้อ Theileria ของแกะในประเทศตรุกี โดยใช้วิธีการทำฟิล์มเลือดบางๆ บนสไลด์ และย้อมด้วยสียิมซ่า (Wright-Giemsa stain) แล้วตรวจดูเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลส โดยใช้ไพรเมอร์ srRNA การตรวจดูเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ตรวจพบว่ามีเชื้อ *Theileria* spp. ร้อยละ 15.05 (34/218) ในขณะที่การตรวจด้วยวิธีเทคนิค PCR พบการติดเชื้อ *Theileria* spp. ร้อยละ 41.02 (90/218) Cao *et al.* (2013) ได้ทำการศึกษาการระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของเชื้อ *Theileria* spp. ในแกะของประเทศจีน และได้สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากแกะจำนวน 198 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค nested polymerase chain reaction (nPCR) ในการตรวจวินิจฉัยซึ่งมีการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน 18S rRNA ผลจากการตรวจวินิจฉัย ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาพบว่า ความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. ใน Yanji, Nongan, Longjing, Toudao และ Jinchang มีค่าเท่ากับร้อยละ 80 40 37 24 และ 32 ตามลำดับ ส่วน Kursat *et al.* (2007) ได้ทำการตรวจหาความชุกของการติดเชื้อในสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก โดยพบความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. เท่ากับร้อยละ

36.08 และความชุกของเชื้อ *Babesia ovis* เท่ากับร้อยละ 5.43 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Theileria* spp. ด้วยเทคนิค PCR ในจังหวัดสระแก้ว การรายงานนี้เป็นผลการตรวจหาความชุกที่มีการรายงานเป็นครั้งแรก ซึ่งมีความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. ค่อนข้างสูง อาจจะมีเหตุผลเนื่องมาจากในพื้นที่ทั้ง 3 ตำบลมีการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่น เช่น โค และกระบือ เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้รูปแบบการเลี้ยงแพะเป็นแบบกึ่งขังคอก ซึ่งจะมีช่วงเวลาที่ให้แพะลงกินหญ้าในแปลง ส่งผลให้การติดต่อของเชื้อผ่านพาหะเป็นไปได้สูง จึงตรวจพบการติดเชื้อสูงตามไปด้วย สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยการเก็บตัวอย่างเลือดซึ่งประกอบด้วย พื้นที่และช่วงเดือนหรือฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างกับการติดเชื้อ *Theileria* spp. จากผลการทดลองพบว่า พื้นที่ที่เก็บตัวอย่างของทั้ง 3 ตำบในอำเภอวัฒนานคร (P<0.05) และช่วงเดือนหรือฤดูกาลที่เป็นช่วงปลายฤดูร้อนและปลายฤดูฝน (P<0.01) ที่เก็บตัวอย่างมีผลการติดเชื้อ *Theileria* spp. สอดคล้องกับรายงานของ Saetiew *et al*., (2014) ซึ่งรายงานผลของฤดูกาลต่อการติดเชื้อ *Anaplasma marginale* ในโคเนื้อ พบว่าฤดูกาลมีผลต่อการติดเชื้อ A. *marginale* ยิ่งในช่วงฤดูฝน และปัจจัยเรื่องเพศไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ A. *marginale*

สรุป

ความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. ของแพะทั้ง 3 ตำบลในอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว คือ ร้อยละ 41.33 แบ่งออกเป็นตำบลห้วยโจด หนองแวง และท่าเกวียน มีค่าเท่ากับร้อยละ 32.70 (34/104), 57.50 (23/40) และ 46.15 (24/52) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยการเก็บตัวอย่างเลือด กับการติดเชื้อ *Theileria* spp. โดยเฉพาะช่วงเดือนหรือฤดูกาลที่เป็นช่วงปลายฤดูฝนที่เก็บตัวอย่างมีผลการติดเชื้อ *Theileria* spp. อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) จากผลการทดลองความชุกของเชื้อ *Theileria* spp. มีค่าค่อนข้างสูงซึ่งอาจมีสาเหตุจากระบบการเลี้ยงเป็นแบบกึ่งขังคอก หรือขาดกำจัดหรือป้องกันแมลงที่เป็นพาหะนำโรค จึงทำให้ติดเชื้อโรคได้ ซึ่งเป็นข้อมูลที่น่าสนใจที่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องจะนำข้อมูลไปพิจารณากำหนดแนวทางและนโยบายในการป้องกันความสูญเสียที่เกิดขึ้นจากโรคพยาธิในเลือด และการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค เพื่อลดความเสียหายที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัย ภายใต้โครงการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชนฐานราก สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 และขอขอบคุณนิสิตกลุ่มวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว และเจ้าหน้าที่สัตวบาลประจำสำนักงานปศุสัตว์อำเภอวัฒนานคร ที่ช่วยเก็บตัวอย่างเลือดแพะในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Altangerel, K., Sivakumar, T. Inpankaew, T. Jittapalapong, S. Terkawi, M.A. Ueno, A. Xuan, X. Igarashi, I. and Yokoyama, N. 2011. Molecular Prevalence of Different Genotypes of *Theileria orientalis* Detected from Cattle and Water

Buffaloes in Thailand. *J. Parasitol.* 97 (6): 1075-1079.

Aktas, M., Altay, K. and Dumanli, N. 2005. Survey of Theileria parasites of sheep in eastern Turkey using polymerase chain reaction. *Small Rumin. Res*. 60: 289-293.

Altay, K., Dumanli, N., Holman, P.J. and Aktas, M. 2005. Detection of *Theileria ovis* in naturally infected sheep by nested PCR. *Parasitol*. 127: 99-104.

Anim, J., Ali Z., Maqbool, A., Muhammad, K., Khan, M.S. and Younis, M. 2013. Prevalence of *Theileria annulata* infected hard ticks of cattle and buffalo in Punjab, Pakistan. *Pak. Veter. J.* 23(1): 20-26.

Cao, S., Zhang, S., Jia, L., Xue, S., Yu, L., Kamyingkird, K., Moumouni, P.F.A., Moussa, A.A.E.M., Zhou, M. Zhang, Y., Terkawi, M.A., Masatani, T., Nishikawa, Y. and Xuan, X. 2013. Molecular detection of Theileria species in sheep from northern China. *J. Vet. Med. Sci*. 75 (9): 1227-1230.

Chae, J.S., Waghela, S.D., Craig, T.M., Kocan, A.A., Wagner, G.G. and Holman, P.J. 1999. Two *Theileria cervi* SSU rRNA gene sequence types found in isolates from white-tailed deer and elk in North America. *W. Diseases*. 35 (3): 458-465.

Chaisi, M.E., Sibeko, K.P., Collins, N.E., Potgieter, F.T. and Oosthuizen, M.C. 2011. Identification of *Theileria parva* and *Theileria* sp. (buffalo) 18S rRNA gene sequence variants in the African Buffalo (*Syncerus caffer*) in southern Africa. *Vet. Parasitol.* 182: 150-162.

Chomczynsky, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol choroform extraction. *Anal. Biochem*. 162: 156-159.

Hana, J.I., Janga, H.J., Leeb, S.J. and Naa, K.J. 2009. High prevalence of *Theileria* spp. in wild Chinese Water Deer (*Hydropotes inermis argyropus*) in South Korea. *Parasitol*. 164 (2-4): 311-314.

Irshad, N., Qayyum, M., Hussain, M. and Qasim, K.M. 2010. Prevalence of Tick Infestation and Theileriosis in Sheep and Goats. *Pak Vet*. 30 (3): 178-180.

Kaewhom, P. 2014. Molecular detection of *Trypanosoma evansi* among cattle and buffaloes blood. *J. Mahanakorn Vet. Med.* 9 (1): 49-61. (in Thai)

Kgomotso, P., Oosthuizen, C., Collins, N., Geysen, D., Rambritch, N., Latif, A., Groenevel, H., Potgieter, F. and Coetzer, J. 2008. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction test for the detection of *Theileria parva* infections in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle. *Parasitol*. 155: 37-48.

Kursat, A., Dumanli, N. and Aktas, M. 2007. Molecular identification, genetic diversity and distribution of Theileria and Babesia species infecting small ruminants. *Parasitol*. 147: 161-165.

Mans, B.J., Pienaar, R. and Latif, A.A. 2015. A review of Theileria diagnostics and epidemiology. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4: 104-118.

Moretti, A., Mangili, V., Salvatori, R., Maresca, C., Scoccia, E., Torina, A., Moretta, I., Gabrielli, S., Tampier, M.P. and Pietrobelli, M. 2010. Prevalence and diagnosis of Babesia and Theileria infections in horses in Italy: A preliminary study. *Vet. Journal*. 184: 346-350.

Moumouni, P.F.A., Aboge, G.O., Terkawi, M.A., Masatani, T., Cao, S., Kamyingkird, K., Jirapattharasate, C., Zhou, M., Wang, G. Liu, M., Iguchi, A., Vudriko, P., Ybanez, A.P., Inokuma, H., Shirafuji-Umemiya, R., Suzuki, H. and Xuan, X. 2015. Molecular detection and characterization of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria species* and *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Kenya. *Parasites & Vectors*. 8: 496.

Pulforda, D.J., McFaddena, A.M.J., Hamiltonb, J.S. and Donaldc, J. 2016. Investigation of the index case herd and identification of the genotypes of *Theileria orientalis* associated with outbreaks of bovine anaemia in New Zealand in 2012. *Vet. Journal.* 64 (1): 21-28.

Saetiew, N., Simking, P., Saengow, S., Kurajog, B., Yimming, B., Saeng-chuto, K., Chimnoi, W., Kengradomkij, C., Yangtara, S., Suksai, S., Thaprathom, N., Seneemanoma, C., Penghirun, K., Desquesnes, M., Herder, S., Morand, S. and Jittapalapong, S. 2014. Seasonal effect on *Anaplasma marginale* infections of beef cattle in previously flooding areas. Proceedings of the 52nd Kasetsart University Annual Conference: Animal, Veterinary Medicine, Nakhon Pathom, Thailand, 4-7 February 2014: 267–277.

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ เพื่อการใช้ประโยชน์และอนุรักษ์อย่างยั่งยืน

สิริวดี พรหมน้อย[1,#] และสกุณา พัฒนกุลอนันต์[2]

[1]หลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์

[2]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

บทคัดย่อ: การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ ด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณไซโตโครมบี โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากไก่พื้นเมืองจำนวนทั้งหมด 22 ตัว จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณไซโตโครมบี ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณไซโตโครมบีของไก่พื้นเมืองมีความยาวประมาณ 560 คู่เบส และทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยการสร้าง Phylogenetic tree พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์เมื่อเทียบกับข้อมูลไก่พื้นเมืองจากแหล่งอื่น โดยแยกออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *G. gallus gallus และ G. gallus spadiceus* และกลุ่มย่อยที่ 2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *G. gallus gallus, G. gallus spadiceus*และ *G. gallus murghi* การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาแรกเกี่ยวกับข้อมูลทางด้านดีเอ็นเอของไก่พื้นเมืองในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการวางแผนการอนุรักษ์ และปรับปรุงพันธุ์ไก่พื้นเมืองของจังหวัดอุตรดิตถ์ต่อไป

คำสำคัญ: ความหลากหลาย ไก่พื้นเมือง ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ ไซโตโครมบี จังหวัดอุตรดิตถ์

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(2): 67-77.

E-mail address: first_pig_2@hotmail.com

Genetic Diversity of Native Chicken in Uttaradit Province for Sustainable of Utilization and Conservation

Siriwadee Phromnoi[1,#] and Sakuna Phattanakunanan[2]

[1]Biology, Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University
[2]Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University. Kamphaeng Saen Campus

Abstract: This study was to investigate genetic diversity of native chicken in Uttaradit Province by using mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome b sequences. A total of 22 native chicken of 9 amphoe in Uttaradit province represented. The 560 bases of mtDNA (cytochrome b) were sequenced and compared to native chicken reported in GenBank, and the phylogenetic tree for the native chickens were constructed based on the cytochrome b sequences. Phylogenetic analyses revealed that Thai native chickens were divided into two lineages. The first lineage was closely related to *G. gallus gallus* and*G. gallus spadiceus*. The second lineage was closely related to *G. gallus gallus, G. gallus spadiceus* and *G. gallus murghi*.This is the first molecular data report of native chicken in Uttaradit Province. The information generated by this study will greatly aid in the establishment of effective breeding programs and conservation genetics of native chicken in Uttaradit.

Keywords: Biodiversity, Native Chicken, Mitochondria DNA, Cytochrome B, Uttaradit Province

[#]Corresponding author
E-mail address: first_pig_2@hotmail.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(2): 67-77.

บทนำ

ไก่พื้นเมือง เป็นมรดกวัฒนธรรมและเป็นแหล่งชีวภาพที่หลากหลาย สร้างอาหารและความมั่นคงในการดำรงชีวิตของเกษตรกรมานานนับร้อยปี เป็นทรัพย์สินภูมิปัญญาอย่างหนึ่งของชาวบ้าน ไก่พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์มีจุดเด่นที่เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว เช่น ความต้านทานโรคและแมลง ทนต่อสภาพแวดล้อม ในประเทศไทยมีการเลี้ยงไก่ประจำถิ่นกันอยู่แล้วในแต่ละภูมิภาค ส่วนใหญ่เลี้ยงเป็นอาชีพเสริมอีกทั้งราคาไก่พื้นเมืองแพงกว่าราคาไก่พันธุ์เนื้อ จึงให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจสูงกว่าขณะที่ต้นทุนการผลิตต่ำมากหรือเกือบไม่มีเลย ในแง่การบริโภคเนื้อมีรสชาติดีกว่าไก่พันธุ์เนื้อจากต่างประเทศ และยังเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่ดีที่สุดอย่างหนึ่งสำหรับเกษตรกร ถ้าหากเกษตรกรรู้จักการปรับปรุงการเลี้ยงดู พยายามศึกษาการป้องกันโรคระบาด รายได้จากไก่พื้นเมืองที่ควรจะได้รับจริงย่อมเพิ่มขึ้นอย่างแน่นอน (เจนรงค์ และคณะ, 2559) แต่

ในปัจจุบันการที่จะหาพันธุ์แท้ของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ต่างๆเป็นเรื่องยากขึ้นทุกที เพราะเกษตรกรส่วนใหญ่ในชนบทที่เลี้ยงไก่พื้นเมืองจะเลี้ยงปล่อย และผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ไม่สนใจแยกสายพันธุ์ หรือผู้เลี้ยงไก่ที่ชนเก่งไม่ค่อยสนใจลักษณะภายนอก มีการเอาไก่พม่าและเวียดนามมาผสมกับไก่พื้นเมืองไทยเพื่อประโยชน์ในการชน ทำให้สายพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยค่อยๆหายไป หากไม่มีการรวบรวมพันธุ์และการอนุรักษ์ให้เป็นระบบอย่างต่อเนื่องแล้ว อาจทำให้สายพันธุ์ไก่พื้นเมืองประจำถิ่นของไทยสูญหายไปได้

จากการสำรวจของกรมปศุสัตว์ในปีพ.ศ. 2558 พบว่าประเทศไทยมีเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่พื้นเมืองจำนวน 2,359,645 ครัวเรือน มีประชากรไก่พื้นเมือง 72,412,376 ตัว ส่วนใหญ่อยู่ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 30,609,198 ตัว และภาคเหนือจำนวน 21,257,134 ตัว (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการ สื่อสาร กรมปศุสัตว์, 2558) เนื่องจากความแตกต่างของฝูงไก่ ภูมิประเทศ วิธีการผสม คัดเลือก และปรับปรุงพันธุ์ ทำให้เกิดความหลากหลายโดยเฉพาะสีขน ซึ่งใช้จำแนกพันธุ์ไก่พื้นเมือง มีไก่พื้นเมืองหลายๆสายพันธ์ที่มีศักยภาพในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นไก่พื้นเมืองพันธุ์แท้และใช้ประโยชน์พันธุ์ในอนาคต การศึกษาความหลากหลายของแหล่งประชากรไก่พื้นเมืองจึงเป็นสิ่งสำคัญ (เจนรงค์ และคณะ, 2559)

ในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ พบว่าในปีพ.ศ. 2554 จำนวนไก่พื้นเมืองทั้งจังหวัดมีอยู่ 842,880 ตัว จากเกษตรกรผู้เลี้ยง 28,160 ราย (ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์, 2554) ต่อมาในปี 2558 พบว่าจำนวนไก่พื้นเมืองลดลงเหลือ 704,310 ตัว จากเกษตรกรผู้เลี้ยง 27,028 ครัวเรือน (กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร, 2558) ซึ่งถือว่าลดลงเป็นจำนวนมาก จากปัญหาการลดลงของปริมาณการเลี้ยงไก่พื้นเมืองดังกล่าว จึงนำมาซึ่งความสนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในจังหวัดอุตรดิตถ์ เพื่อดูศักยภาพของการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการ (Evolution potential) ของประชากรนั้นๆว่าเป็นอย่างไร การที่ประชากรไก่พื้นเมืองมีจำนวนน้อยลงนั้น ย่อมส่งผลทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองลดลงไปได้ จึงต้องศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองที่ยังคงมีชีวิตอยู่เพื่อเป็นแนวทางในการบริหารจัดการความหลากหลายทางชีวภาพ เพื่อสามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

การศึกษาเชิงวงศ์วานวิวัฒนาการระดับโมเลกุล (molecular phylogenetics) ของไก่พื้นเมืองมีความจำเป็นต่อการวางแผนการจัดการที่เหมาะสม เพื่อที่จะอนุรักษ์และปรับปรุงสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองที่มีอยู่ ปัจจุบันการเปรียบเทียบลำดับเบสในดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือมาตรฐานสำหรับการศึกษาเชิงวงศ์วานวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (Peters *et al*., 2005) โดยสามารถวิเคราะห์จากจีโนมหรือบางส่วนของดีเอ็นเอ เพื่อจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นกลุ่มตามระดับความสัมพันธ์ที่เหมือนหรือแตกต่างกัน ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA, mtDNA) บริเวณไซโตโครมบี (cytochrome b) จึงเป็นบริเวณหนึ่งที่นิยมนำมาใช้เพื่อศึกษาเชิงวงศ์วานวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น โค (Mannen *et al*., 2004) สุกร (Giuffra *et al*., 2000) แกะ (Hiendleder *et al*., 2002) แพะ (Odahara *et al*., 2006) ม้า (Vila *et al*., 2001) และไก่ (Liu *et al*., 2006; Lee *et al*., 2007; Pramual *et al*.,

2013; สิริวดี และสมเกียรติ, 2559) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างฐานองค์ความรู้ในเชิงลึกที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอในแง่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ โดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณไซโตโครมบี เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาแนวทางในการอนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์จากไก่พื้นเมืองของจังหวัดอุตรดิตถ์ และประเทศไทยต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างสัตว์ที่ใช้ในการศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างไก่พื้นเมือง โดยคัดเลือกจากไก่พื้นเมืองของเกษตรกรที่ขึ้นทะเบียนกับสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดอุตรดิตถ์ ทั้ง 9 อำเภอ เป็นไก่พื้นเมืองที่มีลักษณะภายนอกที่สมบูรณ์ (พ่อพันธุ์ อายุมากกว่า 6 เดือน, แม่พันธุ์ อายุมากกว่า 7 เดือน, ไก่รุ่น อายุ 2 – 7 เดือน) (ตารางที่ 1) จากนั้นทำการคัดเลือก แล้วทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณโคนปีก (ulnar vein) จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดเก็บในถังใส่น้ำแข็ง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

การตรวจสอบดีเอ็นเอจากเทคนิค PCR

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดโดยใช้ FavorPrepTM Blood/Culture Cell Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN®,Taiwan) จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของไก่พื้นเมืองด้วยวิธีPCR ตามวิธีของ Niu *et al*. (2002) โดยใช้ไพรเมอร์ Forward(cyt *b*) : 5'AGG ACT ACG GCT TGA AAA GC 3' และ Reverse (cyt *b*): 5'ATG TGC CTG ACC GAG GAA CCA G 3' การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอจะใช้ DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) จากนั้นนำ PCR mixture ดังกล่าว เข้าเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ (Thermal Cycler) โดยตั้งอุณหภูมิในแต่ละรอบดังนี้ Denaturation 94°C นาน 30 วินาที Annealing 55°C นาน 30 วินาที และ Extension 72°C นาน 30 วินาที รวมทั้งสิ้น 35 รอบ และตรวจสอบผลผลิต PCR โดยทำการแยกแถบดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้าบนเจล (agarose gel electrophoresis) และจากนั้นทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดยใช้ FavorPrep^{TM}Gel/PCR Purification Mini kit (Favorgen, Taiwan) และทำการส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองที่บริษัท First Base Laboratories SDN BH ประเทศมาเลเซีย

การวิเคราะห์ข้อมูล

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณไซโตโครมบีจากตัวอย่างไก่พื้นเมืองได้รับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blantn) และเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบขนาน (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalW เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างของการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไซโตโครมบีระหว่างประชากรไก่พื้นเมืองในครั้งนี้และไก่พื้นเมืองอื่นที่อยู่ในสกุล Gallus ตามข้อมูลที่รายงานใน GenBank (ตารางที่ 2) โดยมี *Gallus varius* Indonesia (D82912) เป็น outgroup และจัดทำแผนภูมิต้นไม้เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic

ตารางที่ 1 ไก่พื้นเมืองที่ได้จากการคัดเลือกเพื่อเป็นประชากรตัวอย่างในการศึกษา จำนวน 22 ตัวอย่าง

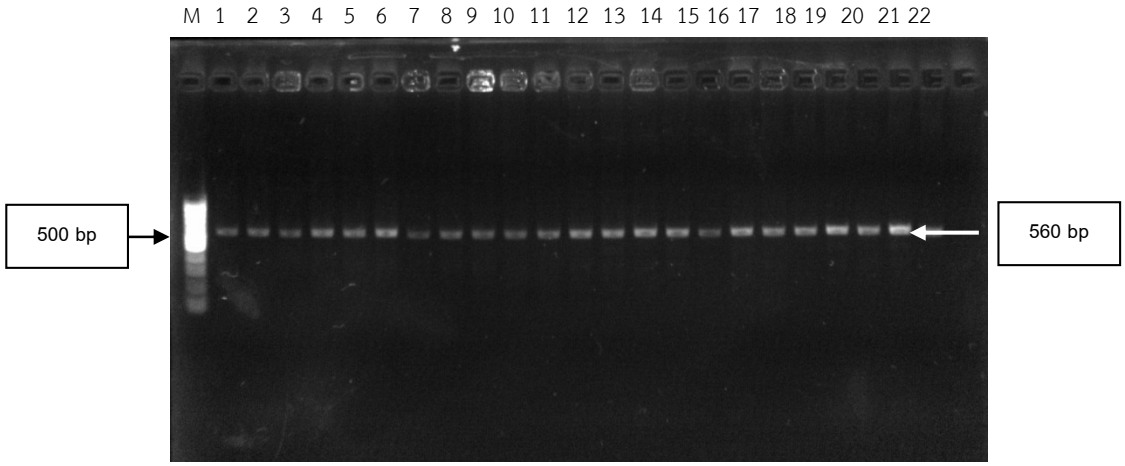
ลำดับที่	รหัส	เพศ	พื้นที่เก็บตัวอย่าง
1	NCF01	เพศเมีย	อำเภอเมือง
2	NCM03	เพศผู้	อำเภอเมือง
3	NCF04	เพศเมีย	อำเภอเมือง
4	NCM05	เพศผู้	อำเภอเมือง
5	NCF06	เพศเมีย	อำเภอทองแสนขัน
6	NCM07	เพศผู้	อำเภอทองแสนขัน
7	NCF08	เพศเมีย	อำเภอท่าปลา
8	NCM09	เพศผู้	อำเภอท่าปลา
9	NCM10	เพศผู้	อำเภอฟากท่า
10	NCF11	เพศเมีย	อำเภอฟากท่า
11	NCM12	เพศผู้	อำเภอฟากท่า
12	NCF13	เพศเมีย	อำเภอบ้านโคก
13	NCF14	เพศเมีย	อำเภอบ้านโคก
14	NCM15	เพศผู้	อำเภอน้ำปาด
15	NCF16	เพศเมีย	อำเภอน้ำปาด
16	NCM17	เพศผู้	อำเภอตรอน
17	NCM18	เพศผู้	อำเภอตรอน
18	NCM19	เพศผู้	อำเภอตรอน
19	NCM20	เพศผู้	อำเภอพิชัย
20	NCM21	เพศผู้	อำเภอพิชัย
21	NCF22	เพศเมีย	อำเภอพิชัย
22	NCF23	เพศเมีย	อำเภอพิชัย

tree) ด้วยวิธี Neighbor – Joining (NJ) โดยใช้โปรแกรม Mega6 ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ เพื่อศึกษาสายวิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์

ผลการวิจัย

การตรวจสอบดีเอ็นเอจากเทคนิค PCR

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างไก่พื้นเมืองในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ ได้จำนวน 22ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวผู้ 13 ตัว และตัวเมีย 9 ตัว จากผลการสกัดดีเอ็นเอของเลือดไก่พื้นเมือง พบว่า ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียล บริเวณ Cytochrome *b* ใน

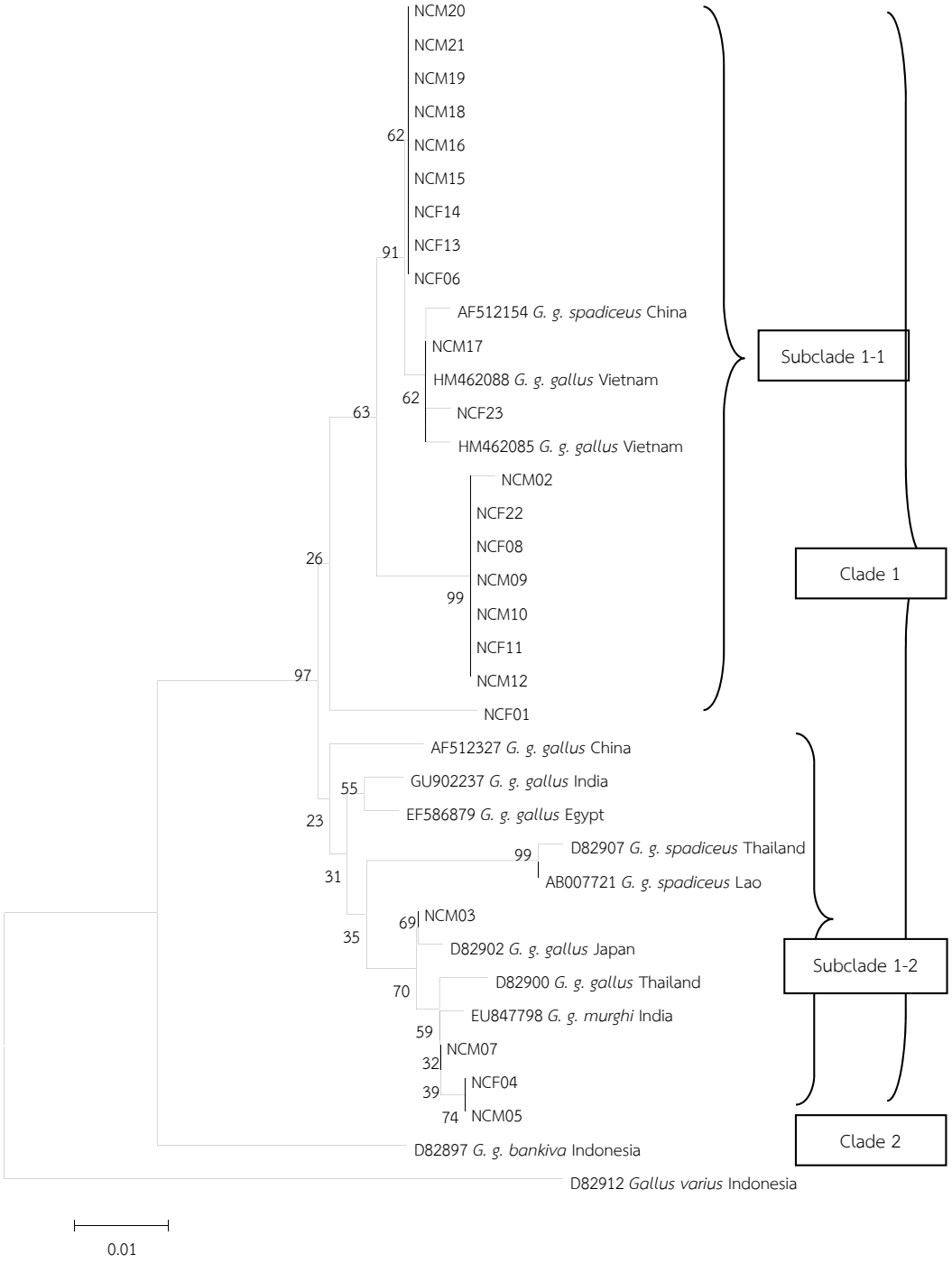


ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน cytochrome b ด้วยเทคนิค PCR Lane M คือ marker ขนาด 100 kbLane ที่ 1-21 แสดงผลแถบดีเอ็นเอของยีน cytochrome b ที่ได้จากเลือดไก่พื้นเมืองจากอำเภอต่างๆในจังหวัดอุตรดิตถ์

ไก่พื้นเมืองมีความยาวประมาณ 560 คู่เบสดังแสดงในภาพที่ 1

ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง

เมื่อสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor- Joining (NJ) ของไก่พื้นเมืองที่ได้จากพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ จำนวน 22 ตัว และไก่พื้นเมืองจากฐานข้อมูล GenBank พบว่า สามารถจำแนกกลุ่มทางพันธุกรรมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (clade) ที่เป็นตระกูลไก่ป่า (*Gallus gallus*) ซึ่งถือเป็นต้นกำเนิดสายพันธุ์ของไก่เลี้ยงทั้งหมดคือ กลุ่มที่ 1 ไก่ที่เป็น *G. g. gallus, G. gallus spadiceus*และ *G. gallus murghi*และกลุ่มที่ 2 ไก่ที่เป็น *G. gallus bankiva*ประเทศอินโดนีเซีย โดยกลุ่มที่ 1 ยังแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ subclade 1-1 เป็นไก่ *G. g. gallus* และ*G. gallus spadiceus*และ subclade 1-2 เป็นไก่ *G. g. gallus, G. gallus spadiceus*และ *G. gallus murghi* ซึ่งตัวอย่างเลือดไก่พื้นเมืองที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จัดอยู่ใน subclade ที่ 1 เท่านั้น โดยจัดอยู่ในทั้ง subclade 1-1 และ 1-2 โดยจำแนกได้ดังนี้ subclade 1-1 จำนวน 18 ตัวอย่าง (NCF01, NCF06, NCF08, NCM09, NCM10, NCF11, NCM12, NCF13, NCF15, NCM15, NCM16, NCM17, NCM18, NCM19, NCM20, NCM21, NCF22 และ NCF23) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไก่พื้นเมืองในประเทศจีน (AF512154) (Liu *et al*., 2006) และเวียดนาม (HM462088 และ HM462085) (Ramadam *et al*., 2011) และใน subclade 1-2 พบจำนวน 4 ตัวอย่าง (NCM03, NCF04, NCM05 และ NCM07) ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไก่พื้นเมืองที่มาจากประเทศจีน (AF512327: Liu *et al*., 2006) อินเดีย (GU902237: Singh and Kumar (unpublished) (EU847798: Kanginakudru *et al*., 2008) อียิปส์ (EF586879: Singh and Kumar (unpublished) ญี่ปุ่น (D82902: Fumihito *et al*., 1996) ลาว (AB007721: Nishibori *et al*., 2005) และประเทศไทย (D82907 และ D82900 : Fumihito *et al*., 1996) และแยกจาก outgroup ที่เป็น *Gallus varius* (Fumihito *et al*., 1996) ที่เป็นตระกูลของไก่ป่าชวาดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 Phylogenetic tree แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง ด้วยโปรแกรม Mega 6 ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor - joining (NJ) และทดสอบความเชื่อมั่นด้วย Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ความหลากหลายทางพันธุกรรม เป็นสิ่งสำคัญสำหรับการพัฒนาการทางด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการปรับปรุงและคัดเลือกสายพันธุ์ ไก่พื้นเมืองที่มีในปัจจุบันจัดอยู่ในสกุล Gallus วงศ์ Phasianidae (Smith, 1998) และอลงกลด (2542) ได้รายงานไว้ว่า ต้นตระกูลของไก่พื้นเมืองนั้นอยู่ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ประกอบไปด้วยไก่ป่า 4 ชนิดได้แก่ ไก่ป่าสีแดง (*Gallus gallus*) ไก่ป่าซีลอน (*Gallus lafayettii*) ไก่ป่าสีเทา (*Gallus sonnerati*) และไก่ป่าชวา (*Gallus varius*) สำหรับไก่ป่าสีแดง (*Gallus gallus*) แบ่งออกได้เป็นชนิดย่อย 5 ชนิดคือ *G. g. gallus, G. g. spadiceus, G. g. bankiva, G. g. marghi* และ *G. g. jabouillei* โดยส่วนใหญ่ *G. gallus* พบการกระจายตัวอยู่ในประเทศจีน เวียดนาม และอินเดีย จัดเป็นไก่สายพันธุ์ดั้งเดิมและเป็นต้นตระกูลของไก่บ้านที่เลี้ยงกันเป็นสัตว์เศรษฐกิจในปัจจุบัน (Pramual *et al*., 2013)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ไก่พื้นเมืองในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ จัดอยู่ในไก่ป่าสีแดง ซึ่งเป็นกลุ่มของ *G. gallus* ทั้งหมด ใกล้เคียงกับ *G. gallus* 3 ชนิดย่อยคือ *G. g. spadiceus* (ของประเทศจีน ลาว และประเทศไทย) *G. g. gallus* (ของประเทศเวียดนาม จีน อินเดีย ญี่ปุ่น และอียิปต์) และ *G. g. marghi* (ของประเทศอินเดีย) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pramual *et al*. (2013) ที่รายงานว่าไก่พื้นเมืองส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ *G. gallus* และสอดคล้องกับการทดลองของ Liu *et al*. (2006) ที่รายงานว่า ไก่พื้นเมืองน่าจะมีต้นกำเนิดมาจากจีน เวียดนาม พม่า ไทย และอินเดีย จาก phylogenetic tree (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่า ไก่พื้นเมืองที่พบในการศึกษาในครั้งนี้ และไก่พื้นเมืองจากประเทศไทยที่ศึกษาโดย Fumihito *et al*. (1996) (D82907 และ D82900) มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับ *G. g. spadiceus*และ *G. g. marghi*และสอดคล้องกับการทดลองของ Pramual *et al*. (2013) ที่รายงานว่าไก่พื้นเมืองจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *G. gallus*3 ชนิดย่อย (*G. g. spadiceus, G. g. gallus*และ *G. g. marghi*) และแตกต่างจาก *G. g. bankiva* ประเทศอินโดนีเซีย

จากการตรวจสอบสายวิวัฒนาการของไก่พื้นเมืองที่ทำการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือ *G. gallus* แต่พบว่า มีความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากในกลุ่มเดียวกันยังสามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยที่ 1 เป็นไก่พื้นเมืองที่อยู่ในบริเวณอำเภอรอบนอกของจังหวัดอุตรดิตถ์ (ทองแสนขัน, อำเภอท่าปลา, อำเภอฟากท่า, อำเภอบ้านโคก, อำเภอน้ำปาด, อำเภอตรอน, อำเภอพิชัย) ส่วนในกลุ่มย่อยที่ 2 เป็นไก่พื้นเมืองที่อยู่ในอำเภอเมือง การแยกเป็น 2 กลุ่มย่อยนี้แสดงให้เห็นเป็นนัยถึงความหลากหลายของประชากรไก่พื้นเมืองของจังหวัด อาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของพื้นที่ กลุ่มย่อยที่ 1 เป็นพื้นที่ห่างจากเมือง บางพื้นที่เป็นที่สูงและเป็นภูเขา ทำให้เรื่องของการคมนาคมที่มีผลต่อการเคลื่อนย้ายไก่มีน้อย มีการผสมเลือดชิด ส่วนกลุ่มย่อยที่ 2 พื้นที่อำเภอเมืองที่มีการคมนาคมสะดวก อาจเป็นสาเหตุให้มีการเคลื่อนย้ายไก่จากพื้นที่อื่นๆเข้ามาปะปน จึงมีความแตกต่างจากอำเภออื่นๆในจังหวัด รวมไปถึงความแตกต่างของการเลี้ยงในแต่ละพื้นที่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของเฉลิมชัย (2546) ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าความแตกต่างระหว่างไก่พื้นเมืองจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดยโสธร กับจังหวัดเลย อาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของพื้นที่

นอกจากนี้ผลการวิจัยที่ได้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Berthouly-Salazar *et al*. (2010) ที่พบความหลากหลายของไก่พื้นเมืองเวียดนามที่จัดอยู่ใน *G. gallus* แต่แยกออกได้เป็นหลายกลุ่มย่อยเช่นกัน และไก่พื้นเมืองเหล่านี้น่าจะมีแหล่งกำเนิดมาจาก

ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จาก Phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า *G. g. spadiceus*, *G. g. gallus* และ *G. g. marghi* มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการกับไก่พื้นเมืองของประเทศไทย แต่ไก่พื้นเมืองจากอินโดนีเซีย *G. g. bankiva* มีสายวิวัฒนาการแยกออกไป แสดงให้เห็นว่า อาจไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางวิวัฒนาการกับไก่พื้นเมืองของประเทศไทย (Fumihito *et al*., 1996; Liu *et al*., 2006; Kanginakudru *et al*., 2008; Pramual *et al*., 2013)

ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นงานแรกที่วิเคราะห์ความหลากหลายระดับดีเอ็นเอของไก่พื้นเมืองทั้ง 9 อำเภอของจังหวัดอุตรดิตถ์ เพื่อเป็นการสร้างฐานองค์ความรู้ในเชิงลึกที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอในการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการบริหารจัดการความหลากหลายทางชีวภาพในเชิงการพัฒนา การปรับปรุงสายพันธุ์ และการอนุรักษ์พันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในระดับท้องถิ่น ยังต้องมีการเพิ่มกลุ่มประชากรในการศึกษา เพื่อให้ทราบที่มาของสายวิวัฒนาการและข้อมูลความหลากหลายที่เกิดจากความแตกต่างของแหล่งที่อยู่อาศัยว่ามีพันธุกรรมเริ่มต้นมาเหมือนหรือแตกต่างกันในแต่ละแหล่งที่อยู่ เพื่อบอกถึงลักษณะของไก่พื้นเมืองที่เป็นสัตว์ประจำถิ่นได้ และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์จากทรัพยากรพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองอย่างยั่งยืนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ ขอขอบพระคุณสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดอุตรดิตถ์ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการติดต่อประสานงาน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เอื้ออำนวยสถานที่และอุปกรณ์ในการศึกษาด้านดีเอ็นเอ และเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่พื้นเมืองในจังหวัดอุตรดิตถ์ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการให้ข้อมูลและตัวอย่างเลือดไก่พื้นเมืองที่ใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. 2558. ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย ปี 2558. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 193 หน้า.

เจนรงค์ คำมงคุณ ชัยตรี บุญดี และอำนวย เลี้ยวธารากุล. 2559. ความหลากหลายของไก่พื้นเมืองในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย. *วารสารแก่นเกษตร* 44 ฉบับพิเศษ 1: (2559). หน้า 37-42.

เฉลิมชัย หอมตา. 2546. การจำแนกสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือด้วยไมโครแซทเทลไลท์-มาร์กเกอร์. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 90 หน้า.

สิริวดี พรหมน้อย และสมเกียรติ ดอนทองแดง. 2559. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่เขียวพาลีในพื้นที่อำเภอพิชัย จังหวัดอุตรดิตถ์ด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรีย. *วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. ปีที่ 11 ฉบับพิเศษ (พฤศจิกายน 2559). หน้า 355-365.

อลงกลด แทนออมทอง. (2542). ที่มาของต้นตระกูลไก่ (Origin of Fowl). *สาส์นไก่*. 3(46): 33-36.

Berthouly-Salazar, C., Rognon, X., Van, T.N., Gely, M., Chi, C.V., Tixier-Boichard, M., Bed'Hom, B., Bruneua, N., Verrier, E., Maillard, J.C. and Michaux, J.R. 2010. Vietnamese chickens: a gate towards Asian genetic diversity. *BMC Genetics*. 11: 53.

Fumihito, A., Miyake, T., Takada, M., Shingu, R., Endo, T., Gojobori, T., Kondo, N. and Ohno, S (1996). Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93: 6792-6795.

Giuffra, E., Kijas, M.H., Amarger, V., Carlborg, O., Jeon, J.T. and Andersson, L. (2000). The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*. 154: 1785-1791.

Hiendleder, S., Kaupe, B., Wassmuth, R. and Janke, A. (2002). Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. Proceeding of Royal Society B: *Biol. Sci*. 296: 893-904.

Kanginakudru, S., Metta, M., Jakati, R.D. and Nagaraju, J. (2008). Genetic evidence from Indian red junglefowl corroborates multiple domestication of modern day chicken. BMC Evolutionary Biology. 8: 174.

Lee, Y.J., Bhuiyan, M.S.A., Chung, H.J., Jung, W.Y., Choi, K.D., Jang, B.G., Paek, W.K., Jeon, J.T., Park, C.S. and Lee, J.H. (2007). Mitochondrial DNA diversity of Korean Ogal chicken. Asian-Austrarian J. Anim. Sci. 20(4): 477-481.

Liu, Y.P., Wu, G.S., Yao, Y.G., Miao, Y.W., Luikart, G., Baig, M., Beja-Pereira, A., Ding, Z.L., Palanichamy, M.G. and Zhang, Y.P. (2006). Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. Mol. Phylogenet. Evol. 38: 12-19.

Mannen, H., Kohno, M., Nagata, Y., Tsuji, S., Bradley, D.G., Yeo, J.S., Nyamsamba, D., Zagdsuren, Y., Yokohama, M., Nomura, K. and Amano, T. (2004). Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation of north eastern Asian cattle. Mol. Phylogenet. Evol. 32: 539-544.

Nishibori, M., Shimogiri, T., Hayashi, T. and Yasue, H. (2005). Melecular evidence for hybridization of species in the genus Gallus except for Gallus varius. Animal *Genetics*. 36: 267-375.

Niu, D., F. Yan, L. Jung, R. Hui, Y. Xu-Ping, C Gong and Z Ya-Ping. (2002). The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds. *Biochem. Genetics*. 40(5/6): 163-174.

Odahara, S., Chung, H.J., Choi, S.H., Yu, S.L., Sasazaki, S., Mannan, H., Park, C.S. and Lee, J.H. (2006). Mitochondrial DNA diversity of Korean natice goats. *Asian-Australian J. Anim. Sci*. 19(4): 482-485.

Peter, J.L., McCracken, K.G., Zhuravlev, Y.N., Lu, Y., Wilson, R.E., Johnson, K.P. and Omland, K.E. (2005). Phylogenetics of wigeons and allies (Anatidae: Anus): The importance of sampling multiple loci and multiple individuals. *Mol. Phylogenet. Evol*. 35: 209-224.

Pramual, P., Meeyen, K., Wongpakam, K. and Klinhom, U. (2013). Genetic diversity of Thai Native Chicken inferred from mitochondrial DNA sequences. *Trop. Nat. Hist*. 13(2): 97-106.

Ramadamptian, H.A.I., Galal, A., Fathi, M.M., El, F.S. and Yakoub, H.A. (2011). Characterization of two Egyptian native chicken breeds using genetic and immunological parameters. *Biotech. Anim. Husbandry.* 27: 1-16.

Smith, E.J., and D.W. Burt. 1998. Parameter of the chicken genome (*Gallus domesticus*). *Anim. Genetic*. 29: 290-294.

Tamura K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.

Vila, C., Leonard, J.A., Gotherstorm, A., Marklund, S., Sandberg, K., Liden, K., Wayne, R.K. and Ellegren, H. (2001). Widespread prigin of domestic horse lineages. *Science*. 291: 474-477.

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

การประเมินภาวะไตเสียหายในสุนัขด้วยตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิด Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)

ธนากร วัฒนพรภิรมย์[1] เฉลิมพล เล็กเจริญสุข[1,Ψ] และชยกฤต สินธุสิงห์[1,#]

[1]ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ถนนงามวงศ์วาน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ: ภาวะไตเสียหายเฉียบพลันทำให้มีความเสี่ยงในการตายที่เพิ่มขึ้นในสุนัข เนื่องจากการวินิจฉัยทางคลินิกด้วยค่ายูเรียในเลือดและซีรั่มครีเอตินีนไม่อาจบ่งชี้ถึงการสูญเสียหน้าที่ของไต และความเสียหายของโครงสร้างของไตในระยะแรกได้ ด้วยเหตุผลนี้การตรวจหาการบาดเจ็บที่ไตในระยะแรกด้วยตัวบ่งชี้ทางชีวภาพจึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัย เพื่อให้การรักษาโรคกระทำได้อย่างรวดเร็ว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ตัวบ่งชี้ Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ผลิตออกมาเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ท่อไตเกิดการบาดเจ็บในการบ่งชี้ภาวะไตเสียหายเฉียบพลันและการประเมินโรคไตในสุนัข โดยการจัดกลุ่มศึกษาอ้างอิงตามเกณฑ์ของ IRIS AKI ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ สุนัขปกติอายุ 1-7 ปี จากการตรวจร่างกาย ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมี และการตรวจปัสสาวะไม่พบความผิดปกติ กลุ่มที่ 2 คือสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีครีเอตินีนปกติ (IRIS AKI ปี 2013 ระดับ I มีครีเอตินีนในเลือด ≤1.6 มก./ ดล.) และกลุ่มที่ 3 คือสุนัขที่มีภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินีนผิดปกติ (IRIS AKI ระดับ II–V โดยครีเอตินีนในเลือด >1.6 มก./ ดล.) เก็บตัวอย่างซีรั่มและปัสสาวะในแต่ละกลุ่มเพื่อตรวจระดับ NGAL (sNGAL และ uNGAL ตามลำดับ) ด้วยชุดทดสอบ Dog NGAL ELISA KIT (BIOPORTO®, Denmark) ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินีนปกติมีค่าเฉลี่ยของ sNGAL และuNGAL มากกว่าสุนัขปกติ อาจเป็นไปได้ว่าสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติเกิดความเสียหายกับไตมากกว่าสุนัขปกติทำให้ค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL มีค่ามากกว่าสุนัขปกติ ดังนั้น sNGAL สามารถบ่งชี้ภาวะไตเสียหายได้ดีกว่าครีเอตินีน นอกจากนั้นค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ในสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีครีเอตินีนปกติมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อไตเกิดความเสียหายมากขึ้นในสุนัขที่มีภาวะไตวายที่มี ครีเอตินีนผิดปกติ จะพบการเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ย uNGAL มากกว่า sNGAL อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มสุนัขปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า uNGAL อาจสามารถใช้บ่งชี้ภาวะไตเสียหายเฉียบพลันได้ดีกว่า sNGAL ดังนั้นการตรวจระดับ NGAL จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการวินิจฉัยเพื่อบ่งชี้ภาวะไตเสียหายเฉียบพลันในสุนัข โดยทำให้ทราบระดับที่ไตเสียหาย การพยากรณ์โรคและติดตามผลการรักษาได้

คำสำคัญ: ภาวะไตเสียหาย ภาวะไตเสียหายเฉียบพลัน ตัวบ่งชี้ในสุนัข Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) สุนัข

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ; [Ψ]ผู้รับผิดชอบบทความร่วม

E-mail address: [#]chameow54@yahoo.com; [Ψ]fvetcpl@ku.ac.th

The Detection of Kidney Injury in Dogs by Biomarker: Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)

Tanakorn Wattanapornpilom[1], Chalermpol Lekcharoensuk[1,Ψ], and Chayakirt Sinthusingha[1,#]

[1]Department of Companion Animal Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Ngam Wong Wan road, Chatuchak district, Bangkok 10900

Abstract: Acute kidney injury commonly causes the high risk of death in dogs because the clinical investigation by blood urea nitrogen and creatinine has failed to identify early stages of kidney dysfunction and structural injury. By this reason, there is important to use the biomarker for diagnosis of early kidney injury and immediate treatment. The objective of this research was to investigate the application of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) canine biomarker, a protein that is increasing when renal tubular cells damage resulted for the acute kidney injury and kidney diseases in dogs. The studied dogs were classified into three groups according to canine IRIS guidelines for grading AKI. Group 1 was defined as 1-7 years-old dogs without clinical or laboratory signs of AKI. Group 2 was defined as dogs with kidney injuries and normal creatinine values (IRIS AKI, 2013, grade I with serum creatinine ≤1.6 mg/dl). Group 3 was defined as renal failure dogs with elevated serum creatinine (IRIS AKI grade II–V with serum creatinine >1.6 mg/dl). Serum and urine samples were taken for NGAL evaluation (sNGAL and uNGAL, respectively) with Dog NGAL ELISA kit (BIOPORTO®, Denmark). The results found that the means of sNGAL and uNGAL in the dogs with kidney injuries and normal creatinine values were higher than normal dogs. It seems that the renal damages in the dogs with kidney injuries and normal creatinine values were severe than normal dogs. In this result, sNGAL could be effective to predict the acute renal injury better than creatinine level. Furthermore, the means of sNGAL and uNGAL were similar in the dogs with kidney injuries and normal creatinine values. Likewise, the level of uNGAL was increased more rapidly than the sNGAL level in dogs with renal failure and elevated serum creatinine compared to normal dogs. This indicated that uNGAL was better than sNGAL for evaluation of acute renal injury. This study showed that NGAL may serve as the marker for prediction of kidney injury, detection of different kidney diseases and evaluation of treatment outcome in dogs.

Keywords: Kidney injury, Acute kidney injury, Canine biomarker, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), Dogs

[#]Corresponding author; [Ψ]Co-corresponding author *J. Mahanakorn Vet. Med*. 2017. 12(2): 79-89.

E-mail address: [#]chameow54@yahoo.com; [Ψ]fvetcpl@ku.ac.th

บทนำ

Acute kidney injury (AKI) หมายถึง ภาวะที่ไตสูญเสียหน้าที่อย่างเฉียบพลันอันอาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงหน้าที่หรือโครงสร้างของไต ภาวะไตเสียหายเฉียบพลันในสุนัขนั้นจะเกิดความเสียหายที่ไตซึ่งไม่พบอาการที่เด่นชัด (Langston, 2010) การเกิดภาวะไตเสียหายเฉียบพลันเกิดขึ้นจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ การขาดเลือด โรคติดเชื้อ การได้รับยาหรือสารพิษ และตับอ่อนอักเสบเฉียบพลัน เป็นต้น (Linda, 2011) โดยจะพบอาการเมื่อไตเสียหายจนส่งผลต่อการขับของเสียออกจากร่างกาย เกิดปัญหาการธำรงดุลอิเล็กโทรไลต์ และฮอร์โมนในร่างกาย (Cowgill and Langston, 2010) การวินิจฉัยทางคลินิกและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการไม่อาจบอกความเสียหายของไตในระยะเฉียบพลันได้ เนื่องด้วยข้อจำกัดบางประการ เช่น ค่ายูเรียและครีเอตินีนจะสูงขึ้นเมื่อหน่วยไตทำงานลดลงมากกว่าร้อยละ 70 ขึ้นไป ดังนั้นค่าทั้งสองนี้จึงมีความไวไม่เพียงพอที่จะบ่งชี้ว่าไตทำงานผิดปกติระยะแรกได้ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆที่รบกวนการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของค่ายูเรียและครีเอตินีน เช่น สัตว์ที่ได้รับโปรตีนต่ำจะมีค่ายูเรียลดลง สัตว์ที่มีมวลกล้ามเนื้อมากและออกกำลังกายมากจะพบค่าครีเอตินีนสูงขึ้น เป็นต้น (Mori *et al*., 2007) ด้วยเหตุนี้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพอาจใช้เป็นทางเลือกในการบ่งชี้ความเสียหายของไตในระยะแรกได้ จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาถึงตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิด Neutrophil Gelatinase - Associated Lipocalin (NGAL) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ไต ตับ และเนื้อเยื่อเพื่อตอบสนองต่อการเกิดพยาธิสภาพ เช่น การอักเสบ ติดเชื้อ การขาดเลือด เนื้องอก และได้รับสารพิษ เพื่อใช้ NGALในการวินิจฉัยโรคไต (Mori and Nakao, 2007) ในภาวะปกติ NGAL จะถูกพบในระดับต่ำ (Schmidt-Ott *et al*., 2006; Devarajan, 2010) แต่หากเซลล์ท่อไตส่วนต้นเกิดการบาดเจ็บ จะพบ NGAL มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเซลล์ท่อไตส่วนต้นไม่อาจดูด NGAL กลับได้ (Mori and Nakao, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษาถึงการใช้ NGAL เป็นตัวบ่งชี้ในสุนัขที่ไตวายเรื้อรัง (Cobrin *et al*., 2012; Lee *et al*., 2012; Nabity *et al*., 2012; Kai *et al*., 2013) และ NGAL ยังเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความไวในการศึกษาสุนัขที่เกิดไตวายเฉียบพลันภายหลังได้รับการศัลยกรรมและหลังจากได้รับ gentamicin (Lee *et al*., 2012; Kai *et al*., 2013) การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการใช้ NGAL ในการวินิจฉัยภาวะไตเสียหายในสุนัขที่เข้ารับการรักษาในทางคลินิก และใช้ NGAL บ่งชี้ความเสียหายของไตก่อนที่จะเข้าสู่ภาวะไตวาย

อุปกรณ์และวิธีการ

สุนัขกลุ่มตัวอย่าง

สุนัข 30 ตัวที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ ถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ สุนัขปกติจำนวน 10 ตัว ประกอบด้วยเพศผู้จำนวน 7 ตัวและเพศเมียจำนวน 3 ตัว โดยมีค่าเฉลี่ยอายุเท่ากับ 5.3 ปี (2-6 ปี) สุนัขในกลุ่มนี้ทุกตัวจะไม่พบความผิดปกติจากการซักประวัติ การตรวจร่างกาย ผลการตรวจค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีโลหิต และผลการตรวจปัสสาวะ กลุ่มที่ 2 คือ สุนัขที่มีรอยโรคที่โครงสร้างไต เช่น พบถุงน้ำหรือเนื้องอกที่ไต แต่มีค่าครีเอตินีนในเลือดปกติ (ตามเกณฑ์ของ IRIS AKI ปี 2013 ระดับ I มีครีเอตินีนในเลือด ≤ 1.6 มก./ ดล.) จำนวน 10 ตัว ประกอบด้วยเพศผู้จำนวน

5 ตัว และเพศเมียจำนวน 5 ตัว มีอายุเฉลี่ย 10.6 ปี (5.4-15.5 ปี) และกลุ่มที่ 3 คือ สุนัขที่มีภาวะไตวายและมีครีเอตินีนผิดปกติ (IRIS AKI ระดับ II–V โดยครีเอตินีนมีค่า >1.6 มก./ ดล.) จำนวน 10 ตัว ประกอบด้วยเพศผู้จำนวน 3 ตัว และเพศเมียจำนวน 7 ตัว มีอายุเฉลี่ย 10.75 ปี (4-15.7 ปี) พันธุ์สุนัขที่ถูกศึกษาในการทดลองนี้คือ พันธุ์ผสม (13 ตัว) ตามมาด้วยพันธุ์ชิสุห์ และพูดเดิล (อย่างละ 4 ตัว) แลบราดอร์ริทรีฟเวอร์ (3 ตัว) โกลเดนริทรีฟเวอร์ (2 ตัว) ร็อตไวเลอร์ (2 ตัว) และไซบีเรียนฮัสกี (2 ตัว) ซึ่งสุนัขทุกตัวจะถูกซักประวัติจากเจ้าของ และบันทึกข้อมูลพื้นฐาน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร โดยแบ่งใส่หลอดผสมสารป้องกันการแข็งตัวชนิด EDTA ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปตรวจค่าทางโลหิตวิทยาซึ่งรวมถึงค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit (%)) และเก็บในหลอดเก็บซีรั่มปริมาณ 4 มิลลิลิตร แยกซีรั่มด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงยี่ห้อ Hettich รุ่น EBA-20 ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที เพื่อนำไปตรวจค่าเคมีโลหิต ได้แก่ ซีรั่มยูเรีย (Blood Urea Nitrogen (BUN)) ซีรั่มครีเอตินีน เอนไซม์ ALT (Alanine Aminotransferase) โปรตีนอัลบูมิน และฟอสฟอรัส การเก็บตัวอย่างปัสสาวะทำโดยการรองเก็บ สวนหรือเจาะเก็บผ่านทางหน้าท้อง ปริมาณ 3-5 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างปัสสาวะทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดกากเซลล์และวิเคราะห์ค่าความถ่วงจำเพาะ (Urine specific gravity; USG) จากนั้นทำการเก็บรักษาตัวอย่างทั้งหมดที่จะวิเคราะห์ NGAL ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ภายใน 4 ชั่วโมงหลังจากที่ทำการเก็บตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างเลือดและปัสสาวะทั้งหมดจะถูกนำไปตรวจระดับ NGAL ด้วยชุดทดสอบ Dog NGAL ELISA KIT (BIOPORTO®, Denmark) ในเวลาเดียวกันทั้งหมด

การตรวจด้วยชุดทดสอบ NGAL ELISA

ทำการตรวจค่า NGAL จากเลือด (sNGAL) และ NGAL จากปัสสาวะ (uNGAL) ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป NGAL ELISA ด้วยหลักการของ sandwich ELISA ตามคู่มือของชุดทดสอบ ซึ่งประกอบด้วย 5 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ 1. นำตัวอย่างและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ทดลองเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) เจือจางตัวอย่างเลือดและปัสสาวะที่ 1 ต่อ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ทดสอบปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมทดสอบที่เคลือบด้วย monoclonal antibody ซึ่งจะทำหน้าที่จับกับ NGAL 2. ใส่ biotinylated monoclonal detection antibody ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมทดสอบและตั้งไว้บนเครื่องเขย่าสารวงรอบ 200 ครั้งต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที สารนี้จะทำหน้าที่เกาะกับ NGAL 3. เติมสาร horseradish peroxidase-conjugated streptavidin ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบ และตั้งไว้บนเครื่องเขย่าสารที่ตั้งค่าไว้ 200 ครั้ง ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาทีเพื่อให้จับกับ biotinylated monoclonal detection antibody ที่เกาะกลุ่ม 4. ทำการล้างส่วนที่ไม่เกาะกลุ่มด้วย 0.01% (w/v) Bronidox (5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane) pH Neutral ซึ่งเป็นสารละลายล้างที่ถูกเจือจางแล้ว 5. เติม tetramethylbenzidine (TMB) ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบ จับเวลาเมื่อเติมสารที่หลุมแรก ปิดปากหลุม และเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ในส่วนที่เกิดการเกาะกลุ่มจากขั้นตอนข้างต้นจะทำปฏิกิริยากับ TMB จนเกิดสีน้ำเงินขึ้น หลังจากนั้นเติม sulfuric acid 0.5 mol/L

pH 0.6 ปริมาณ 100 ไมโครลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยา ซึ่งสารในหลุมทดสอบจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง หลังจากนั้นทำการอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA reader (TECAN sunrise) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 450 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการบอกความเข้มข้นของ NGAL ที่วัดได้ในแต่ละหลุมทดสอบโดยเทียบค่ากับกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ผล

อายุและเพศของสุนัขถูกเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มด้วย Chi-square test และทำการประมวลผลทางสถิติด้วย ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ uNGAL และ sNGAL ของสุนัขทั้งสามกลุ่ม หากค่า *p-value* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วิธี Tukey post-hoc comparison จะถูกใช้ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ความสัมพันธ์ระหว่าง uNGAL และ sNGAL จะวิเคราะห์ด้วยวิธี Pearson correlation โดยที่ *p-value* <0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ผลศึกษาสุนัขทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างของพันธุ์และเพศของสุนัขในแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (*p-value*=0.11 และ 0.20 ตามลำดับ) ดังที่แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพื้นฐานทางคลินิกของ 3 กลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษาในสุนัขที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน จำนวน 30 ตัว ได้แก่ สุนัขปกติ สุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินีนอยู่ในระดับปกติ และสุนัขที่มีภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินีนอยู่ในระดับผิดปกติ

ตัวแปร	**สุนัขปกติ**	**สุนัขที่มีรอยโรคที่ไตที่พบค่าครีเอตินีนอยู่ในระดับปกติ**	**สุนัขที่มีภาวะไตวายที่พบค่าครีเอตินีนผิดปกติ**	***p –value***
จำนวน (ตัว)	10	10	10	
อายุ (ปี)	5.28[a]±3.491	10.63[b]±3.518	10.75[b]±3.439	0.0018
(min-max)	(2-6)	(5.4-15.5)	(4-15.67)	
เพศ				
ผู้	7	5	3	0.2019
เมีย	3	5	7	
พันธุ์				
โกลเดนริทรีฟเวอร์	2	0	0	0.1111
ชิสุห์	0	3	1	
พันธุ์ผสม	5	4	4	
แลบราดอร์ริทรีฟเวอร์	2	0	1	
พูดเดิล	0	3	1	
ร็อตไวเลอร์	0	0	2	
ไซบีเรียนฮัสกี	1	0	1	

จากตารางที่ 2 พบว่าค่ายูเรียในเลือดของสุนัขที่มีภาวะไตวายที่มีค่าครีเอตินีนผิดปกติมีค่าแตกต่างจากกลุ่มสุนัขกลุ่มปกติ และกลุ่มสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่พบค่าครีเอตินีนปกติอย่างมีนัยสำคัญ (*p-value* <0.001) เช่นเดียวกับค่าครีเอตินีนที่พบในสุนัขที่มีภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินีนผิดปกติมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*p-value* <0.001) จากทั้งสองกลุ่ม ส่วนผลการวิเคราะห์ค่าโปรตีนอัลบูมินที่ตรวจได้จากสุนัขปกติแตกต่างจากสุนัขที่มีภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินีนผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p-value* =0.0018) นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ ALT (Alanine transferase) โปรตีนรวม (total protein) ฟอสฟอรัส (phosphorus) เม็ดเลือดขาว (WBC) เกล็ดเลือด (platelets) โปรตีนในพลาสม่า (plasma protein) และค่ากรดด่างของปัสสาวะ (urine pH) จากทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่าความถ่วงจำเพาะของปัสสาวะ (USG) ของสุนัขในกลุ่มที่มีภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินีนผิดปกติมีค่าแตกต่างจากทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (*p-value* =0.005) ส่วนค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของกลุ่มสุนัขปกติมีค่าแตกต่างจากทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (*p-value* <0.001)

ตารางที่ 3 แสดงค่าการวิเคราะห์ทางสถิติของค่า sNGAL และ uNGAL ของสุนัขทั้งสามกลุ่มด้วยโปรแกรม NCSS 2007 [Hintza, J (2007). NCSS, LLC. Kaysville, Utah, www.NCSS.com] เมื่อทำการทดสอบด้วย Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test พบว่าทั้ง sNGAL และ uNGAL ที่ตรวจได้จากสุนัขปกติและจากสุนัขที่มีภาวะไตวายโดยมีค่าครีเอตินีนผิดปกติมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่าเฉลี่ยของทั้ง sNGAL และ uNGAL จากสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีครีเอตินีนปกติไม่พบว่าแตกต่างจากสุนัขปกติและสุนัขไตวายที่มีค่าครีเอตินีนผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p-value* = 0.015 และ 0.010 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด) ของค่าโลหิตวิทยา ค่าชีวเคมีโลหิต และผลวิเคราะห์ปัสสาวะในสุนัข 3 กลุ่ม

ค่าพารามิเตอร์	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	*p-value*
Creatinine (mg %)	1.06±0.11[a] (0.94-1.29)	1.08±0.29[a] (0.68-1.6)	5.55±3.77[b] (1.71-14.5)	0.000066
BUN (mg %)	12.4±3.92[a] (6-21)	23.3±19.40[a] (9-66)	92.9±52.01[b] (14-207)	0.000009
Albumin (gm %)	3.23±0.43[a] (2.4-4.1)	2.8875±0.36[ab] (2.2-3.3)	2.45±0.427[b] (1.9-3.1)	0.001777
Hematocrit (%)	45.33±8.23[a] (31.2-58)	35.11±6.55[b] (22-41.8)	29±8.83[b] (16.1-41.1)	0.000355
Urine specific gravity	1.028±0.013[a] (1.01-1.05)	1.024±0.011[a] (1.01-1.05)	1.011±0.003[b] (1.008-1.020)	0.005224

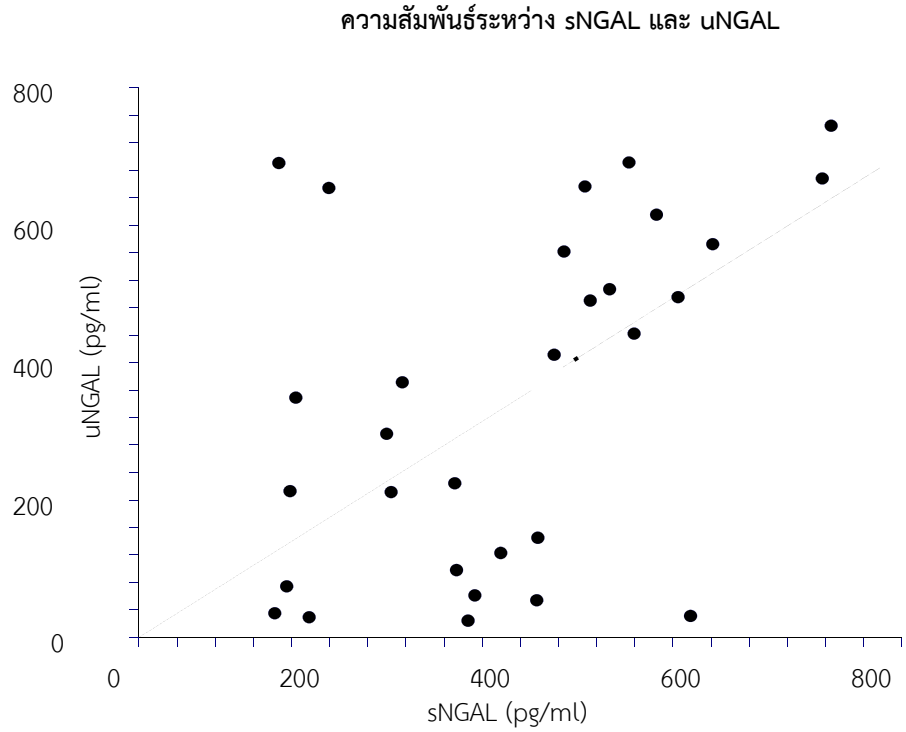
[a,b] ตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p-value* <0.05)

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด) ของค่า sNGAL และ uNGAL ที่ได้จากการศึกษาในสุนัขทั้ง 3 กลุ่ม

NGAL (pg/ml)	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	*p-value*
sNGAL	290.31±133.63[a] (123.73-485.02)	373.34±186.55[ab] (128.49-607.81)	521.10±176.27[b] (254.06-771.42)	0.015
uNGAL	170.04±216.27[a] (0-693.777)	372.03±302.34[ab] (0-731.80)	524.23±190.73[b] (200.19-792.02)	0.010
sNGAL/uNGAL	3.36±2.56 (0.47-7.74)	4.19±6.58 (0.21-18.63)	1.01±0.14 (0.74-1.25)	0.214

[a b] ตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p-value* <0.05)

เมื่อเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง sNGAL และ uNGAL ของสุนัขทุกกลุ่มด้วย Pearson correlations section พบว่า uNGAL มีความสัมพันธ์กับ sNGAL ที่ค่า r =0.86 (*p-value* =0.01) ดังภาพที่ 1 จากสมการพบว่าค่า R^2 เท่ากับ 0.74 เมื่อตัวแปรต้นคือ sNGAL และตัวแปรตาม คือ uNGAL



ภาพที่ 1 กราฟสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า sNGAL และ uNGAL โดยวิเคราะห์ด้วย Linear Regression Plot Section โดยที่แกน Y = uNGAL และแกน X = sNGAL

เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเป็นไปได้อื่นๆ โดยหาอัตราส่วนระหว่าง sNGAL ต่อ uNGAL (sNGAL/uNGAL ratio) พบว่าค่า sNGAL/uNGAL ratio จากทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p-value* =0.214)

วิจารณ์

จากการศึกษาพบว่า sNGAL และ uNGAL ในกลุ่มสุนัขปกติมีค่าแตกต่างจากสุนัขที่พบภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินินผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Steinbach *et al*. (2014) ซึ่งพบว่าสุนัขที่มีภาวะอะโซธีเมียจะมีค่า sNGAL และ uNGAL สูงกว่าสุนัขปกติ นอกจากนี้ Hsu *et al*. (2014) ได้ทำการตรวจระดับ sNGAL และ uNGAL ในสุนัขที่มีภาวะอะโซธีเมียพบว่าสุนัขที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันมีค่า NGAL สูงกว่าสุนัขปกติอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการทดลองนี้พบว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ของสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติ มีค่าอยู่ระหว่างค่าที่ได้จากสุนัขปกติและสุนัขที่พบไตวายที่มีค่าครีเอตินินผิดปกติโดยมีค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ในกลุ่มสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติมีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ของสุนัขปกติ และน้อยกว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ของสุนัขที่พบภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินินผิดปกติตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า sNGAL และuNGAL ไม่สัมพันธ์กับภาวะอะโซธีเมีย แต่มีบทบาทในการพยากรณ์โรคในภาวะไตวายเรื้อรัง และยังแสดงให้เห็นว่า sNGAL เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีถึงความรุนแรงของไตวายในสุนัข สอดคล้องกับการศึกษาของ Hsu *et al*. (2014)

นอกจากนี้การแบ่งกลุ่มร่วมกับผลการทดลองที่พบว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ในสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตและมีค่าครีเอตินินปกติ มากกว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ของสุนัขปกติและน้อยกว่า sNGAL และ uNGAL ของสุนัขที่พบภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินินผิดปกติตามลำดับนั้นมีความสำคัญในการวินิจฉัยภาวะไตเสียหายเฉียบพลันได้รวดเร็ว อันเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มโอกาสรอดชีวิตของสัตว์ป่วย ซึ่งสอดคล้องกับแนวความคิดหลักของงานวิจัยนี้ว่าภาวะไตเสียหายเฉียบพลันจะพัฒนาอาการเป็นระดับขั้น สอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยในคนตามที่ McCullough *et al*. (2013) ที่ได้ประเมินความเสียหายต่อไตและสามารถแบ่งผู้ป่วยได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกับการแบ่งกลุ่มสุนัขที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 จัดเป็นกลุ่มที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของหน้าที่หรือเกิดความเสียหายต่อไต (เปรียบเทียบได้กับกลุ่มสุนัขปกติของการศึกษานี้) กลุ่มที่ 2 พบว่าการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของไตแต่ไม่พบภาวะเสียหายของไต กลุ่มที่ 3 พบว่าเกิดภาวะไตเสียหายที่ไม่แสดงอาการทางคลินิก (กลุ่มที่ 2 และ 3 นี้ เปรียบเทียบได้กับกลุ่มสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินในระดับปกติ) และกลุ่มที่ 4 พบความเสียหายของไตและหน้าที่ของไต (เปรียบเทียบได้กับสุนัขกลุ่มที่ 3 ของการทดลองนี้)

จากการทดลองนี้พบว่ากลุ่มสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติมีค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL มากกว่าสุนัขปกติ อาจเป็นไปได้ว่าสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติเกิดความเสียหายกับไตมากกว่าสุนัขปกติ ทำให้ค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL มีค่ามากกว่าสุนัขปกติ แสดงให้เห็นว่า sNGAL สามารถบ่งชี้ภาวะไตเสียหายได้ดีกว่าค่าครีเอตินิน เนื่องจากค่าครีเอตินีนในซีรั่มไม่ได้

ตอบสนองต่อการเสียหายที่ไตโดยทันทีแต่จะพบว่ามีค่าครีเอตินินสูงขึ้นต่อเมื่อมีอัตราการกรองที่ไตลดลงมากกว่า 40-50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจสามารถบอกได้ว่า sNGAL บ่งชี้ภาวะไตเสียหายได้ดีกว่าค่าครีเอตินินในซีรั่ม สอดคล้องกับการศึกษาของ Singer *et al.* (2011)

โดยปกติ NGAL ถูกสร้างจากเซลล์หลายชนิดและไหลเวียนไปทั่วร่างกายในระดับต่ำจนถูกกรองผ่านไต จากนั้น NGAL จะถูกดูดกลับผ่าน Megalin pathway ใน proximal tubule (Hvidberg *et al*., 2005) จึงพบ NGAL ระดับต่ำในปัสสาวะ แต่หากไตเสียหายเฉียบพลัน NGAL จะถูกดูดกลับในส่วนปลายของท่อไตเฮนเลส์ลูป หน่วยไตส่วนท้าย และท่อรวม ทำให้ NGAL เพิ่มขึ้นในเลือดและปัสสาวะ สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ในสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติ และในสุนัขที่พบภาวะไตวายมีค่าสูงกว่าสุนัขปกติ หากท่อไตส่วนต้นเสียหายอาจมีผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ NGAL ในปัสสาวะต่อไป (Schmidt-Ott, 2011) จากการที่พบว่าค่าเฉลี่ยของ sNGAL และ uNGAL ในสุนัขที่มีรอยโรคที่ไตแต่มีค่าครีเอตินินปกติมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเกิดความเสียหายจึงพบว่า uNGAL มากกว่า sNGAL ในสุนัขที่พบภาวะไตวายและมีค่าครีเอตินินผิดปกติจึงเป็นไปได้ว่า uNGAL บ่งชี้ภาวะไตเสียหายเฉียบพลันได้ดีกว่า sNGAL

ทั้งนี้นอกจากตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิด NGAL ในทางสัตวแพทย์ยังมีตัวบ่งชี้เฉพาะชนิดต่างๆที่ใช้ในการตรวจโรคไต เช่น α1-microglobulin ที่ใช้บ่งชี้ภาวะท่อไตส่วนต้นเสียหาย จึงมีผลต่อการลดการดูดกลับ โดยสามารถตรวจด้วยวิธี western blot จากตัวอย่างปัสสาวะ มีข้อดีคือสามารถคงทนในตัวอย่างที่เป็นกรด แต่มีข้อเสียคืออาจจะพบว่ามีค่าลดลงในรายที่ป่วยเป็นโรคตับ นอกจากนี้ NAG (N-acetyl-β-D-glucosaminidase) ใช้บ่งชี้ภาวะท่อไตส่วนต้นเสียหาย ซึ่งมีข้อดีที่สามารถตรวจได้จากตัวอย่างปัสสาวะชั่วขณะหนึ่ง แต่มีข้อเสียคือภาวะ proteinuria pyuria เพศ hyperthyroidism เบาหวาน ปัสสาวะเป็นด่าง และตัวอย่างที่เก็บไว้นานอาจมีผลต่อค่าที่วัดได้ (Frangogiannis, 2012)

อย่างไรก็ตามการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ NGAL ในซีรั่มและปัสสาวะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิกเพื่อเป็นทางเลือกในการวินิจฉัยอย่างหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ร่วมกับการตรวจในปัจจุบันเพื่อคัดกรองและพยากรณ์การเกิดไตเสียหายเฉียบพลันได้ แต่ควรตระหนักถึงข้อจำกัดบางประการ เนื่องด้วย sNGAL และ uNGAL อาจเพิ่มสูงขึ้นจากปัจจัยบางอย่าง เช่น ไตวายเรื้อรัง ภาวะติดเชื้อ และมะเร็ง เป็นต้น

สรุป

จากผลการศึกษานี้พบว่าการตรวจ NGAL ในซีรั่มและปัสสาวะเป็นทางเลือกหนึ่งในการวินิจฉัยภาวะไตเสียหายเฉียบพลัน ทำให้ทราบระดับความเสียหายของไตและการพยากรณ์โรค ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัย การรักษา และการติดตามผลการรักษา เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของสัตว์ป่วยมากขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นการใช้ NGAL สามารถแก้ปัญหาเรื่องข้อจำกัดในการวินิจฉัยด้วยค่าครีเอตินิน อย่างไรก็ตามการใช้ NGAL ในทางคลินิกควรคำนึงถึงข้อจำกัดบางประการ เนื่องด้วย sNGAL และ uNGAL อาจเพิ่มสูงขึ้นจากปัจจัยบางอย่าง เช่น ไตวายเรื้อรัง ภาวะติดเชื้อ และมะเร็ง เป็นต้น จึงต้องระมัดระวังในการแปลผล อย่างไรก็ตามชุดทดสอบของ NGAL ยังมี

ราคาสูง จึงจำเป็นต้องพัฒนาชุดตรวจที่ใช้สะดวก ให้ผลรวดเร็ว และราคาถูกต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับเงินทุนวิจัยได้รับจากการสนับสนุนโดยทุนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

Cobrin, A., Blois, S., Abrams-Ogg, A.C.G., Kruth, S. and Dewey, C. 2012. Serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) concentration in healthy dogs and dogs with chronic kidney disease. Advanced Renal Therapies Symposium, New York.

Cowgill, L.D. and Langston, C.E. 2010. Acute kidney insufficiency. In: Bartges J, and Polzi, D. eds. Nephrology and Urology of Small Animals. Ames, IA: Blackwell Publishing Ltd: 472–523.

Devarajan, P. 2010. Review: neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)* 15: 419– 428.

Frangogiannis, N.G. 2012. Biomarkers: hopes and challenges in the path from discovery to clinical practice. *Transl. Res*. 159: 197-204.

Hsu, W.L., Lin, Y.S., Hu, Y.Y., Wong, M.L., Lin, F.Y. and Lee, Y.J. 2014. Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin in Dogs with Naturally Occurring Renal Diseases. *J. Vet. Intern Med.* 1-6.

Hvidberg, V, Jacobsen, C., Strong, R.K., Cowland, J.B., Moestrup, S.K. and Borregaard, N. 2005. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. FEBS Lett. Jan 31. 579 (3): 773-7.

Kai, K., Yamaguchi, T., Yoshimatsu, Y., Kinoshita, J., Teranishi, M., and Takasaki, W. 2013. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a sensitive urinary biomarker of acute kidney injury in dogs receiving gentamicin. *J. Toxicol. Sci*. 38: 269–277.

Langston, C.E. 2010. Acute uremia. In: Ettinger, S.J. and Feldman, E.C. eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine. Philadelphia, PA: WB Saunders: 1955–2115.

Lee, Y.J., Hu, Y.Y. and Lin., Y.S. 2012. Urine neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute canine kidney injury. *BMC Vet Rec*. 8: 248.

Linda, R. 2011. Acute Kidney Injury in Dogs and Cats. *Vet. Clin. Small Anim*. 41: 1–14.

McCullough, P.A., Shaw, A.D., Haase, M., Bouchard, J., Waikar, S.S., Siew, E.D.,

Murray, P.T., Mehta, R.L. and Ronco, C. 2013. Diagnosis of acute kidney injury using functional and injury biomarkers: workgroup statements from the tenth Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference. *Contrib Nephrol*. 182: 13-29

Mori, K. and Nakao, K. 2007. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int*. 71: 967–970.

Nabity, M.B., G.E. Lees, R. Cianciolo, M.M. Boggess, J.M. Steiner and J.S. Suchodolski. 2012. Urinary biomarkers of renal disease in dogs with X-linked hereditary nephropathy. *J. Vet. Intern Med.* 26: 282-293.

Schmidt-Ott, K.M., Mori, K., Kalandadze, A., Li, J.Y., Paragas, N., Nicholas, T., Devarajan P. and Barasch, J. 2006. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin mediated iron traffic in kidney epithelia. Current Opinion in Nephrology and Hypertension. 15: 442–449.

Schmidt-Ott, K.M. 2011. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury-where do we stand today? *Nephrol. Dial. Transplant*. 26: 762–764.

Singer, E., Elger, A., Elitok, S., Kettritz, R., Nickolas, T.L., Barasch, J., Luft F.C. and Schmidt-Ott, K.M. 2011. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal failure and predicts outcomes. *Kidney Int*. 80: 405–414.

Steinbach, S., Weis, J., Schweighauser, A., Francey, T. and Neiger, R. 2014. Plasma and Urine Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin (NGAL) in dogs with acute kidney injury or chronic kidney disease. *J. Vet. Intern Med.* 1-6.

บทความวิจัย

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

การศึกษาการตรวจภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำต่อโรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปอีไลซ่าชนิดต่างๆ ในสุกรขุน

ศักดิ์ชัย เรือนเพชร[1,#] ทรรศนีย์ บุณยทรรศนีย์[1] และ ทิพวัลย์ จันทะฟอง[1]

[1]ภาควิชาภูมิคุ้มกันและไวรัสวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร หนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ในการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำต่อโรค Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) ภายหลังได้รับวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์ยุโรปหรืออเมริกาเหนือในลูกสุกรที่มีระดับภูมิคุ้มกันจากแม่ในระดับสูงโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ที่ใช้ตรวจรวมสายพันธุ์จากชุดตรวจ IDEXX PRRS X3 Ab Test (IDEXX®) เปรียบเทียบกับชุดตรวจแยกสายพันธุ์ระหว่าง LSIVet™ Porcine PRRS/EU-Serum (LSI-EU) ซึ่งใช้ตรวจสายพันธุ์ยุโรป และ LSIVet™ Porcine PRRS/US-Serum (LSI-US) ซึ่งใช้ตรวจสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ผลการศึกษาพบว่าระดับภูมิคุ้มกันในกลุ่มสุกรที่ได้รับวัคซีนสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีแนวโน้มคงตัวภายหลังได้รับวัคซีนในช่วง 6 สัปดาห์แรกและระดับภูมิคุ้มกันอยู่ในระดับสูงจนถึงน้ำหนักที่พร้อมส่งโรงฆ่า ในขณะที่สุกรกลุ่มที่ได้รับสายพันธุ์ยุโรปมีระดับภูมิคุ้มกันลดลงในช่วง 4 สัปดาห์แรกหลังได้รับวัคซีนและเพิ่มสูงขึ้นจนถึงน้ำหนักที่พร้อมส่งโรงฆ่า ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่า วัคซีนสายพันธุ์อเมริกาเหนือมีแนวโน้มในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าสายพันธุ์ยุโรปในสภาวะที่สุกรมีภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่, ตลอดจนช่วงระยะเวลาในการตอบสนองในการสร้างภูมิคุ้มกันใช้เวลาที่สั้นกว่า และระดับภูมิคุ้มกันที่คงที่ในระดับสูงจนถึงน้ำหนักที่ส่งโรงงฆ่า นอกจากนั้น การศึกษาครั้งนี้ได้ แสดงถึงความสัมพันธ์ของชุดตรวจสำเร็จรูปชนิด ELISA ที่ใช้แยกสายพันธุ์อเมริกาเหนือกับยุโรปเปรียบเทียบกับชนิดที่ไม่แยกสายพันธุ์ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ Kappa (K) มีค่าเท่ากับ 0.9097 และค่าสหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) มีเท่ากับ 0.513 ซึ่งบ่งชี้ว่าชุดตรวจทั้งสองประเภทมีความสัมพันธ์กันในระดับสูงและปานกลางตามลำดับ ซึ่งสามารถใช้ทดแทนกันได้

คำสำคัญ: วัคซีนเชื้อเป็น Porcine reproductive and respiratory syndrome สายพันธุ์อเมริกาเหนือ สายพันธุ์ยุโรป ชุดตรวจสำเร็จรูป enzyme-linked immunosorbent assay

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(2): 91-102.

E-mail address: rsakchai@hotmail.com

Longitudinal Study on Antibodies Detection against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Vaccinated Fattening Pigs by Various Enzyme-linked Immunosorbent Assay Test Kits

Sakchai Ruenphet[1*], Darsaniya Punyadarsaniya[1], and Tippawan Jantafong[1]

[1]Immunology and Virology Department, Faculty of Veterinary Medicine,
Mahanakorn University of Technology. 140 Cheum-Sampan Rd., Nong Chock, Bangkok 10530 Thailand

Abstract: This experiment aims to compare the efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine using North America and European genotypes attenuated vaccines including determine the correlation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit tests for antibody detection using LSIVet™ Porcine PRRS/EU-Serum (LSI-EU; LSI, France), LSIVet™ Porcine PRRS/US-Serum (LSI-US; LSI, France) and IDEXX PRRS X3 Ab Test (IDEXX®, USA). The antibody level of North America strain vaccinated group was rather steady during the first 6-weeks-post vaccination then increasing and steady until slaughtering. For European strain vaccinated group, was decrease up to 4 weeks post vaccination then increasing and steady until slaughtering. These data suggest that North American genotype vaccinated group have a tendency better than European genotype vaccinated group in term maintain the maternal immunity after vaccination, onset duration of antibody increasing and maintain high level of immunity until slaughtering. In addition, present study was compared the correlation between 2 groups of commercial ELISA test kits for PRRS antibody detection such as IDEXX that detects both NA and EU genotypes, and LSI's test kits that were developed to detect specifically either antibodies NA or EU strains of PRRS viruses. The correlation between LSI-EU and LSI-US compared with IDEXX, was showed in Kappa (**K**) value as 0.9097, interpreted as almost perfect agreement. And the degree of linear association between both LSIs and IDEXX were use a correlation coefficient as 0.513 ($p \leq 0.01$), indicated that both ELISA test kit was moderate correlation. The explanation for these results that both types of LSIVet™ ELISA test kit for PRRS antibody detection could be tested as same as IDEXX.

Keywords: Porcine reproductive and respiratory syndrome attenuated vaccine, North American strain, European strain, Enzyme-linked immunosorbent assay

[#]Corresponding author
E-mail address: rsakchai@hotmail.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(2): 91-102.

Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is caused by the PRRS virus (PRRSV), belong to genus *Arterivirus* in the family *Arteriviridae* in the order *Nidovirales* (Amonsin *et al.,* 2009; Cavanagh 1997). PRRS was first reported in North Carolina, the United States in 1987 (Keffaber, 1989). The causative agent was first isolated and was designated as VR-2332 (Collins *et al*., 1992). In Europe, the causative agent was first identified in 1990, the Netherlands and designated as Lelystad (Wensvoort *et al.*, 1991). PRRSV was classified by genetic, antigenic, and pathogenic differences into two distinct genotypes consisting of type 1 or European (EU) type and type 2 or North American (NA) type (Meng, 2000). To date, both types are circulating in swine population worldwide. In Thailand, PRRSV infection in swine herds has been reported as early as 1989 from the retrospective serological survey (Damrongwatanapokin *et al.*, 1996). NA type was first isolated in 1996 in Thailand after that EU type was found in Thai swine herds resulting in co-existence of both genotypes in Thai swine population (Damrongwatanapokin *et al.*, 1996; Thanawongnuwech *et al.*, 2004). Therefore, PRRS has become one of the most common diseases causing reproductive failure in gilts and sows population in Thailand (Oraveerakul *et al.*, 1995).

Surveillance and monitoring in pig farms are very important to understand the stage at which infection starts and at which PRRS becomes active. Several serological tests are available for PRRS diagnosis such as the immunofluorescent antibody test (IFA), the immunoperoxidase monolayer assay (IPMA), the serum neutralization (SN) test, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Alstine *et al*., 1993; Cho *et al*., 1996; Cho *et al*., 1993; Jusa *et al*., 1996; Matteu *et al*., 2006; Takikawa *et al*., 1997; Wellenberg, 2006; Yoon *et al*., 1992; Yoon *et al*., 1994).

The vaccination is the main approach for control and eradication of PRRSV infection in swine herds since no specific treatment and no antiviral drug are available for curing and control of PRRS. PRRS vaccines have been shown to be highly effective under experimental conditions (Gorcyca *et al*., 1995; Hesse *et al*., 1996a,b). However, several researchers reported that sometimes been less effective especially in the field (Mengeling *et al*., 1997; Zimmerman *et al*., 1997; Hurd *et al*., 2001). Although there is as yet no clear explanation for this difference, it is generally assumed that the two major variables are the relative virulence of strains to which vaccinated pigs are subsequently exposed and the degree of antigenic relatedness between vaccine and field

strains.

The objective of present study is comparison the efficiency between porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) attenuated live vaccine using NA and EUgenotypes, and to determinethe correlation of antibody detection against PRRS with ELISA kit tests using LSIVet™ Porcine PRRS/EU-Serum (LSI-EU), LSIVet™ Porcine PRRS/US-Serum (LSI-US) which both kits could be used to identify the PRRS genotypes either European (EU) or North American (NA), and IDEXX PRRS X3 Ab Test (IDEXX, USA) which could detect both PRRS genotypes.

Materials and methods

Thirty-two 2-weeks-old fattening piglets from a commercial pig farm, were equally allocated into 3 groups. All piglet was collected serum and vaccinated with North America strain attenuated vaccine (Ingelvac® PRRS™ MLV; Boehringer-Ingelheim Vetmedica Inc., St. Josept, Missouri, USA) or European strain attenuated vaccine (Porcilis® PRRS; Intervet Inc, The Netherlands) .) for the first and second group, respectively and another group as unvaccinated group. After that, each piglet was collected serum at 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 and 20 week after vaccination.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) antibody detection, was carried out using commercially kit of IDEXX PRRS X3 Ab test (IDEXX®, USA), LSIVet™ Porcine PRRS/EU-Serum (LSI-EU; LSI, France) and LSIVet™Porcine PRRS/US-Serum (LSI-US; LSI, France). The assay's procedure was followed the manufacture's instructions. LSI-EU and LSI-US were calculated based on the absorbance, named IRPC (relative index × 100) of sample with a cut off $>$ 20 determining seropositivity. For IDEXX, each sample was judged according to the sample-to-positive (S/P) ratio (based on the absorbance) with the S/P threshold values $>$ 0.4 (Ruenphet *et al*., 2014).

The strength of the agreement between the both types (IDEXX and LSI-EU or LSI-US) of ELISA test kits was determined by Kappa (**K**) according to Smith (Smith, 1995). Explanation of Kappa value is a chance-corrected measure of agreement between pairs of observers. It reflects the degree of agreement for a particular physical finding. In addition, statistic method involves correlation analysis where a correlation coefficient is reported representing the degree of linear association between 2 variables.

Interpretation of kappa was obtained and defined that less than 0 as less than chance agreement, 0.01–0.20 as slight agreement, 0.21– 0.40 as Fair agreement, 0.41–0.60 as moderate agreement, 0.61–0.80

as substantial agreement and 0.81–0.99 as almost perfect agreement, respectively. (Viera and Garrett, 2005).

In addition, statistic method involves correlation analysis where a correlation coefficient is reported representing the degree of linear association between 2 variables. Interpretation of correlation coefficient was obtained and defined that less than or equal 0.35 as low or weak correlation, 0.36-0.67 as moderate correlation, 0.68-0.89 as high correlation and more than 9.00 as very high correlation, respectively (Taylor, 1990).

Results

Fig. 1 showed the average S/P ratio graph of ELISA value in each group that was determined by IDEXX test kit. All of piglets before vaccinated, were showed the S/P ratio as above 0.4. After vaccination, S/P ratio in unvaccinated group, was decrease to base line at 6-weeks-post vaccination. However, NA strain vaccinated group was rather steady during the first 6-weeks-post vaccination then increasing and steady until slaughtering. Finally, EU strain vaccinated group, was decrease up to 4-weeks post vaccination then increasing and steady until slaughtering.

Table 1 shown, the kappa value (**K**) of LSI-US and LSI-EU was compared with IDEXX as 0.9097 in all groups, while the unvaccinated group, NA and EU vaccinated group as 0.8338, 0.9362 and 0.9356, respectively.

In addition, the correlation coefficient between both LSI and IDEXX ELISA test kit were use a correlation coefficient as 0.513 ($p \leq 0.01$) (Fig. 2).

Discussion

Generally, live attenuated commercial PRRSV vaccines have been available for prevention and controlling of PRRS problems. The present study was showed maternal immunity status in piglets before vaccination and immune response after PRRS vaccination including monitoring until sent to slaughterhouse using commercial ELISA test kit. Sows of piglets in present study, were vaccinated with PRRS vaccine twice a year and the antibody level of all piglets before vaccination at 2-weeks age was showed S/P ratio as >0.4 indicated that maternal immunity still maintained up to 6-weeks age especially in unvaccinated group. However, 4 of 8 piglets in unvaccinated group, was showed the clinical signs of acute PRRS-like symptoms such as loss of appetite, lethargy, obvious failure to thrive, labored or rapid breathing and respiratory distress during 4 to 8 week age. In addition, the antibody titer from all survived piglets was increasing until reaching slaughtering weight. This data

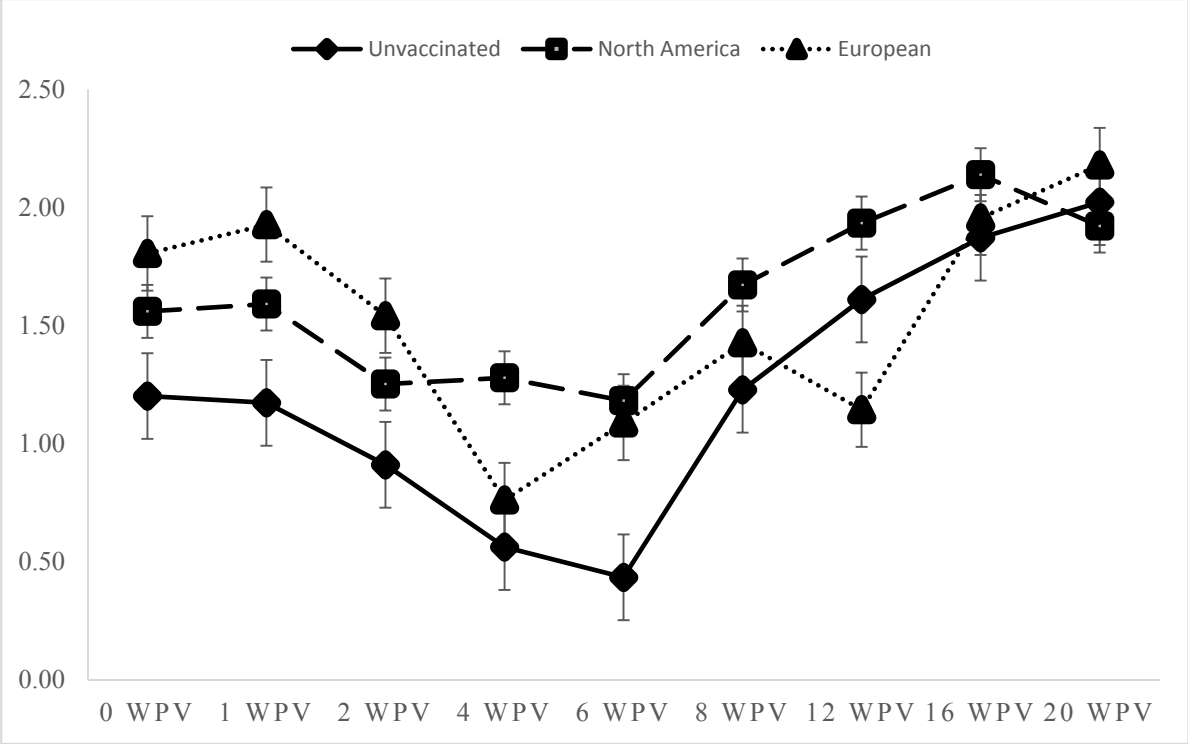


Fig. 1 Graph was presented the mean and standard deviation of S/P ratio before and after vaccination by North America or European strain of live attenuated PRRS vaccine using IDEXX ELISA test kit.

Table 1 Correlation between LSIVet™ Porcine PRRS/EU-Serum (LSI-EU) and LSIVet™ Porcine PRRS/US-Serum (LSI-US) compared with IDEXX PRRS X3 Ab Test (IDEXX)

		Control group		US Vaccinated group		EU Vaccinated group		All group	
		LSI US&EU		LSI US&EU		LSI US&EU		LSI US&EU	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
IDEXX	Positive	38	10	66	6	65	5	169	21
	Negative	1	131	0	144	1	145	2	420
Kappa (**K**)		0.8338		0.9362		0.9356		0.9097	

suggested that these piglets might be infected with PRRSV which still circulated in the farm and infected in unvaccinated piglets during low level of antibody titer. Torrison *et al*. (1996) described PRRS virus shedding and spread between vaccinated pigs and non-vaccinated contact control. In this case might be caused virus from vaccinated group might be transmitted and infeted to unvaccinated group, that related with Botner *et al.* (1997) who descripted that some of the herds have experienced acute PRRS-like symptoms, and the NA genotype of PRRS vaccine has been isolated from fetuses or stillborn piglets.

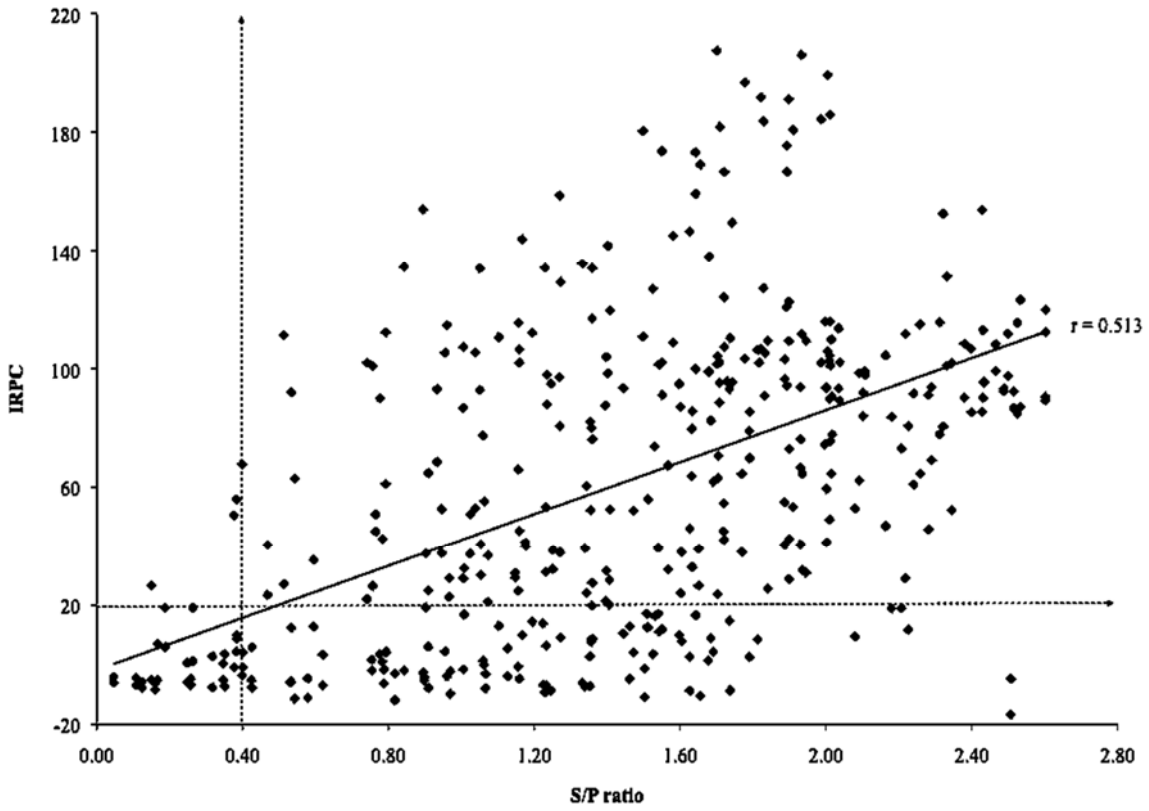


Fig. 2 Correlation graph between LSIVet™ Porcine PRRS/EU-Serum (LSI-EU) and LSIVet™ Porcine PRRS/US-Serum (LSI-US) compared with IDEXX PRRS X3 Ab Test (IDEXX)

Nucleotide sequence data of PRRSV isolates showed that they originated from the vaccine strain.

The antibody level of the pigs in both vaccinated groups was rather decreasing after early vaccination (2 to 6 weeks post vaccination), after 8-weeks post vaccination the antibody level became increasing and steady until reaching slaughtering weight. Our results suggest that pigs in NA genotype vaccinated group have a tendency better than EU genotype vaccinated group, in term of maintaining the immunity after vaccination and onset duration of antibody increasing.

Generally, modified live attenuated PRRS vaccination is an effective way of inducing immunity and protecting herds from losses associated with infections by highly virulent strains of PRRSV (Benson *et al.*, 2000; Gorcyca *et al*., 1995). However, inactivated PRRS vaccines appear to have relatively low efficacy, but are associated with safety concerns (Botner *et al*., 1997; Nielsen *et al*., 2001). Several researchers reported that modified live vaccine (MLV) are contradictory reports on vaccine efficacy, with low efficacy assumed to be due to restricted cross protection between the genotypes and even

between strains that belong to a given genotype (Beilage, 1998; Labarque *et al*., 2003; Meng, 2000; Schagemann *et al*., 1999; van Woensel *et al*., 1998). However, when producers and veterinarians choose to use MLV vaccines, they should consider the potential risk of reversion to virulence.

In addition, present study was compared the correlation between 2 groups of commercial ELISA test kits for PRRS antibody detection such as IDEXX that detects both NA and EU genotypes, and LSI's test kits that were developed to detect specifically either antibodies NA or EU strains of PRRS viruses which the Kappa (**K**) value indicated that the degree of agreement as almost perfect agreement. The explanation for this result, could be used LSIs as same as IDEXX ELISA test kit. In addition, the degree of linear association between both LSIs and IDEXX ELISA test kit, were use a correlation coefficient as 0.513 ($p \leq 0.01$), indicated that both ELISA test kit was moderate correlation. The Kappa coefficient in present study, was showed the highly consistency reliability between LSIs and IDEXX test kit. It might be demonstrated that LSIs test kit had an accurate result compared to those from IDEXX test kit. However, correlation coefficient was showed the moderately validity between LSIs and IDEXX test kits. It might be indicated that LSIs test kit can be used to detect antibody of PRRS as well as IDEXX test kit.

In conclusion, both genotypes PRRS vaccines could be used for vaccination in commercial piglets, in term of maintaining the immunity after vaccination, onset duration of antibody increasing and maintaining high level of immunity until slaughtering. In addition, both types of LSIVet^{TM} ELISA test kit for PRRS antibody detection could be tested as same as IDEXX.

Acknowledgements

The authors would like to thank Watcharin Soijit, Watcharee Soijit, Maneekarn Chanda, Potjamarn Suwanwanitch and Wiranrat Chaijindarat for blood collection. We also thank Witthaya farm, Ratchaburee province, Thailand, for animal experiment, as well as Dr. Dany Shoham, Bar Ilan University, Israel, for the grammatical review of the manuscript. Funds for present study were provided by Committee of Asia Project, CJVM (Consortium of Japanese Veterinary Medicinal Products Manufacturers) and Mahanakorn University of Technology (MUT), Thailand.

References

Amonsin, A., Kedkovid, R., Puranaveja, S., Wongyanin, P., Suradhat, S. and Thanawongnuwech, R. 2009. Comparative analysis of complete

nucleotide sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in Thailand (US and EU genotypes). *J. Virol.* 6: 143.

Alstine, W.G.V., Stevenson, G.W. and Kannitz, C.L. 1993. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Swine Health Prod*. 1: 24-28.

Beilage, E.G. 1998. Investigations on the use and efficacy of the vaccine Ingelvac® PRRS MLV in controlling the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Prakt. Tierarzt.* 79: 62-69.

Benson, J.E., Yaeger, M.J. and Lager, K.M. 2000. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) exposure dose on fetal infection in vaccinated and nonvaccinated swine. *Swine Health Product.* 8: 155–160.

Botner, A., Strandbygaard, B., Sorensen, K.J., Have, P., Madsen, K.G., Madsen, E.S. and Alexandersen, S. 1997. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet. Record.* 141: 497-499.

Cavanagh, D. 1997. Nidovirales: a new oreder comparising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.*, 42: 629-633.

Cho, S.J., Deregt, D. and Joo, H.S. 1996. An ELISA for porcine reproductive and respiratory syndrome: production of antigen of high quality. *Can. J. Vet. Res.* 60: 89-93.

Cho, S.H., Freese, W.R., Yoon, I.J., Trigo, A.V. and Joo, H.S. 1993. Seroprevalence of indirect fluorescent antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in selected swine herds. *J. Vet. Diag. Invest.* 5: 259-260.

Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest*. 2: 117–126.

Damrongwatanapokin, S., Arsayuth, K., Kongkrong, C., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. andTantaswasdi, U. 1996. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. *J. Thai. Vet. Med. Assoc.* 47: 19-30.

Gorcyca, D., Spronk, G., Morrison, R. and Polson, D. 1995. Field evaluation of a new MLV PRRS virus vaccine: applications for PRRS prevention and control in swine herds, Proceedings of the 26th Annual Meeting of the American Association of Swine

Practitioners, Omaha, Nebr. American Society of Swine Veterinarians, Perry, Iowa. pp. 401-411.

Gorcyca, D., Schlesinger, K., Chladek, D., Behan, W., Polson, D., Roof, M. and Doitchenoff, D. 1995. RespPRRS: a new tool for the prevention and control of PRRS in pigs. In: Proceedings of the 26th Annual Meeting of American Association of Swine Practitioners, Omaha, NE, USA, pp. 1–22.

Hesse, R.A., Couture, L.P., Lau, M.L., Dimmick, S.K. and Ellsworth, S.R. 1996a. Efficacy of Prime Pac PRRS in controlling PRRS reproductive disease: homologous challenge. Proceedings of the 27th Annual Meeting of American Association of Swine Practitioners, Quebec City, Que., Canada, pp. 103–105.

Hesse, R.A., Couture, L.P., Lau, M.L., Wunder, K.K. and Wasmoen, T.L. 1996b. Efficacy of Prime Pac PRRS in controlling PRRS reproductive disease: heterologous challenge. In: Proceedings of the 27th Annual Meeting of American Association of Swine Practitioners, Quebec City, Que., Canada, pp. 107–110.

Hurd, H.S., Bush, E.J., Losinger, W., Corso, B., Zimmerman, J.J., Wills, R., Swenson, S., Pyburn, D., Yeske, P. and Burkgren, T. 2001. Outbreaks of porcine reproductive failure: report on a collaborative field investigation. *J. Swine Health Prod*. 9: 103–108.

Jusa, E.R., Inaba, Y., Kouno, M., Hirose, O., Shibata, I., Kubota, M. and Yasuhara, H. 1996. Slow-reacting and complement-requiring neutralizing antibody in swine infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J. Vet. Med. Sci.* 58: 749-753.

Keffaber, K.K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.* 1: 1-19.

Labarque, G., Van Gucht, S., Van Reeth, K., Nauwynck, H. and Pensaert, M. 2003. Respiratory tract protection upon challenge of pigs vaccinated with attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *Vet. Microbiol.* 95: 187-197.

Matteu, E., Pijoan, C., Coll, A., Casal, J. and Martin, M. 2006. Comparison of three ELISAs for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Rec.* 159: 717-718.

Meng, X.J. 2000. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet. Microbiol.* 74: 309-329.

Mengeling, W.L., Lager, K.L., Vorwald, A.C., Wesley, R.D. and Clouser, D.F. 1997. An update of research at the National

Animal Disease Center on current field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. In: Proceedings of the Allen D. Leman Swine Conference, Minneapolis, MN, USA, pp. 138–145.

Nielsen, H. S., Oleksiewicz, M.B., Forsberg, R., Stadejek, T., Botner, A. and Storgaard, T. 2001.Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J. Gen.Virol.* 82: 1263-1272.

Oraveerakul, K., Punarriwatana, D., Leuengyosluechakul, S., Tantasuparuk, W. and Kunavongrit, A. 1995. The seroprevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus among swine breeding farms in the central and north-eastern part of Thailand. *Thai J. Vet. Med.* 25: 233-240.

Ruenphet, S., Mitchaothai, J., Punyadarsaniya, D., Kumpolngam, P., Takahashi, K., Tsuchiya, A., Yanaka, T., Yoshida, M. and Takehara, K. 2014. Correlation of ELISA test kits for Porcine Reproductive and respiratory syndrome (PRRS) antibody detection using sera from unvaccinated pig farms in Thailand. *J. Mahanakorn Vet. Med.* 9(2): 159-171.

Schagemann, G., Ohlinger. V., Kump, A.W.S., Heggemann, R., Pesch, S. and Bischoff, C. 1999. Herd vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) - studies regarding the safety of application of Ingelvac PRRS MLV in pregnant sows. *Prakt. Tierarzt.* 80: 778.

Smith, R.D. 1995. Veterinary clinical epidemiology: a problem-oriented approach, 2nd ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. pp. 149-150.

Takikawa, N., Kobayashi, S., Ide, S., Yamane, Y., Yanaka, Y., Higashihara, M. and Yamagishi, H. 1997. Early serodiagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs by detection of slow-reacting and complement requiring neutralizing antibody. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 31-34.

Taylor, R. 1990. Interpretation of the correlation coefficient: A basic review. *J. Diag. Med. Sono.* 1: 35-39.

Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A. and Damrong-watanapokin, S. 2004. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet. Microbiol.* 101: 9- 21.

Torrison, J.L., Knoll, M. and Wiseman, B. 1996. Evidence of pig-to-pig transmission of a modified live vaccine, p. 89-91. In Proceedings of the 27th Annual Meeting of the American Association of Swine

Practitioners, Nashville, Tenn. American Society of Swine Veterinarians, Perry, Iowa.

van Woensel, P.A.M., Liefkens, K. and Demaret, S. 1998. Effect on viraemia of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild type strains of the virus. *Vet. Rec.* 142: 510-512.

Viera, A.J. and Garrett, J.M. 2005. Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic. *Fam. Med.* 37(5): 360-363.

Wellenberg, G.J. 2006. Review: diagnostic methods for detection of Comparison of three ELISAs for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infections. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 131(16): 556-572.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M.A., terLaak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., Den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuijsen, J.M., Moonen,P.L.J.M., Zeststra, T., de Boer, E.A., Tibben, H.J., de Jong, M.F., van Veld, P., Groenland, G.J.R., van Gennep, J.A., Voets, M., Verheijden, J.H.M. and Bramskamp, J. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Quarter.* 13: 121–130.

Yoon, I.J., Joo, H.S., Christainson, W.T., Kim, H.S., Collins, J.E., Morrison, R.B. and Dial, G.D. 1992. An indirect fluorescent antibody test for detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diag. Invest.* 4: 144-147.

Yoon, I.J., Joo, H.S., Goyal, S.M. and Molitor,.TW. 1994. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diag. Invest.* 6: 289-299.

Zimmerman, J., Epperson, W., Wills, R.W. and McKean, J.D. 1997. Results of the recent survey of the membership of the AASP for outbreaks of sow abortion and mortality. *Swine Health Prod*. 5(2): 74-75.

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

เทคนิคการฟอกเลือดสุนัขที่มีภาวะยูรีเมียเฉียบพลันและภาวะแทรกซ้อน

คาริน วิชชุกิจ[1] ปิยวรรณ ธนะเพิ่ม[1] และเฉลิมพล เล็กเจริญสุข[2,#]

[1]โรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[2]ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ: สุนัขพันธุ์ผสมอายุ 8 ปี น้ำหนัก 20 กิโลกรัม มีภาวะโลหิตจาง หายใจลำบากเนื่องมาจากภาวะปอดบวม และภาวะยูรีเมีย (ค่า Blood Urea Nitrogen; BUN = 250 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่า creatinine = 18.4 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) ไม่พบปัสสาวะมา 3 วัน พิจารณาการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม ณ หน่วยโรคระบบทางเดินปัสสาวะ โรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ทำการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียมเป็นจำนวน 3 ครั้ง โดยกำหนดอัตราการนำเลือดมากรอง 5มล./กก./นาที 5 มล./กก./นาที และ 6 มล./กก./นาที ตามลำดับ กำหนดอัตราการไหลของน้ำยาฟอกเลือดผ่านตัวกรองคงที่ 500 มม./นาที กำหนดค่ากรองน้ำส่วนเกิน 1.2 ลิตร, 0.4 ลิตร และ 0.7 ลิตร ตามลำดับ กำหนดระยะเวลาในการฟอกเลือด 90 นาที 90 นาที และ 150 นาทีตามลำดับ ผลของการรักษาพบว่าอัตราการลดลงของยูเรียระหว่างการฟอกเลือดแต่ละครั้ง เท่ากับ 0.47 0.45 และ 0.52 ตามลำดับ สัตว์ป่วยใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการรักษาภายในโรงพยาบาลสัตว์เป็นเวลา 14 วัน สุนัขสามารถกลับบ้านและใช้ชีวิตประจำวันได้ โดยอยู่ในภาวะไตวายระยะที่ 3 (ค่า BUN = 37 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่า creatinine = 3.2 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) สุนัขมีชีวิตอยู่นาน 120 วัน ในรายงานสัตว์ป่วยนี้ได้กล่าวถึงรายละเอียดขั้นตอนการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม

คำสำคัญ: ภาวะไตวาย ภาวะยูรีเมีย การฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(2): 103-113.

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

Technique of Hemodialysis in Acute Uremia Dog with Complications

Karin Vichukit[1], Piyawan Thanaperm[1], and Chalermpol Lekcharoensuk[2,#]

[1]Kasetsart University Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University
[2]Department of Companion Animal Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

Abstract: An 8 year-old, 20 kg, mixed breed dog presented with anemic condition, respiratory distress condition and severe uremia (BUN = 250 mg/dL, creatinine = 18.4 mg/dL) including anuria for 3 days. Hemodialysis treatments were performed 3 times at Hemodialysis unit, Kasetsart University Veterinary Teaching Hospital (KUVTH). The dialysis machine setting values including blood flow rate was set at 5 ml/kg/min, 5 ml/kg/min and 6 ml/kg/min, respectively. The dialysate flow rate was set at 500 ml/min in every session. The time was set at 90 minutes, 90 minutes and 150 minutes in each session, respectively. The urea reduction ratios were 0.48, 0.45 and 0.52, respectively. At the end of the treatment, the patient's azotemia level was on stage III of chronic renal disease (BUN = 37 mg/dL, creatinine = 3.17 mg/dL) with normal clinical signs. The time of hospital stay was 14 days. The patient could spend her life almost normally at home and lived 120 days. This case report had described details in the procedure of hemodialysis.

Keywords: Renal failure, Acute uremia, Hemodialysis

[#]Corresponding author
E-mail address: fvetcpl@ku.ac.th

J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(2): 103-113.

Introduction

Hemodialysis is an advanced extracorporeal renal replacement therapy for uremic patients. This procedure can remove uremic toxins, correct fluid and electrolyte imbalance, and restore acid-base balance (Elliott, 2000). Importantly, hemodialysis can extend the life of uremic patients so that veterinarian has time to resolve the cause of acute uremia as well as renal functions begin to recover. Recovery of adequate renal function usually occurs within 2-4 weeks from the starting of dialysis (Sykes *et al.*, 2011). However, hemodialysis is costly and difficult to predict the outcome. The patients usually are applied with hemodialysis at the late

stage of disease, when medical management has failed. Renal replacement therapy is indicated in dogs with inadequate urine output that are developing volume overload, hyperkalemia, blood urea nitrogen (BUN) >80 mg/dL, or signs of uremia that are not responsive to medical management (Sykes *et al.*, 2011). Although usefulness of hemodialysis is obvious, technique of the procedure are crucial.

The hemodialysis system is based on three components: blood, membrane and dialysate (Ronco and Clark, 2001). Blood flow rate, dialysate flow rate and dialyzer efficiency including time of dialysis in each session are factors which effect the urea clearance. All these factor values are set by the physician who understands complications and all details about their patients. However, rapid removal of urea during hemodialysis results in rapidly reduction in serum osmolality. This can induce water to move into the cells and subsequent cerebral edema (Tuchman *et al.*, 2013). Therefore, the process of machine set up is crucial for hemodialysis efficiency.

The aims of this study was to provide technical information especially how to select the central venous catheter and outcome of intermittent hemodialysis in our practice nowadays.

Materials and Methods

Case history

An 8 year-old, 20 kg, intact, female mixed breed dog was referred to Kasetsart Veterinary Teaching Hospital (KUVTH) for progressive azotemia and acute anuria. Two weeks previously, the dog had been examined by a referring veterinarian because of vomiting and diarrhea. She was an indoor dog with no prior medical history. There was no other toxin exposure and dog was up-to-date on vaccinations. On initial presentation, results of the physical examination were depression, edema at ventral area of the body, mild dyspnea, anuria, body condition score 3.5/5, pink mucous membrane, dehydration <5 %, subnormal temperature (97°F), normal heart sound, heart rate 140 beats/min, moist lung sound and 94% SpO_2. The complete blood count and serum biochemistry were revealed in Table 1 and Table 2, respectively. The urine by cystocentesis revealed specific gravity at that time 1.015, protein +3, red blood cells >20 cells/hpf, white blood cells >20 cells/hpf and bacteria +3. The parvovirus test kit was also performed and shown a negative result. Abdominal ultrasound examination revealed thickening and brightening in both renal cortices. The acute renal failure (ARF) was suspected. The diagnosis was based on a short duration of signs, the significant

Table 1 Results of complete blood count analyses from the dog with anuric acute renal failure during hospitalization and after discharged

Parameter	Reference interval	Days								
		1	3	5	6	8	12	14	21	46
Hematocrit	35-55 %	24.3	21	24.7	24.2	25.4	24.4	25	34	38.5
Plasma protein	6-7.5 gm%	8.6	6.6	6.6	7	7.4	7	7.6	7	7
WBC	6000-17000 $\times 10^3$ /cumm	6.79	9.43	8.2	6.73	10.8	13	NA	7.19	6.63
Platelets	200-500 $\times 10^3$/µl	420	302	267	261	256	299	NA	367	58.8

NA = not applicable

Table 2 Results of serum biochemistry analyses in a dog with anuric acute renal failure during hospitalization and after discharged

Blood chemistry	**Reference interval**	**Day 0**	**Day 3**		**Day 6**		**Day 8**		**Day 13**	**Day 20 (Follow-up)**	**Day 46 Thrombocytopenia before progressed azotemia**
			Before HD	After HD	Before HD	After HD	Before HD	After HD			
BUN	10-26 mg%	250	238	124	156	86	109	52	106	37	71
Creatinine	0.5-1.3 mg%	18.42	19.06	11.83	13.95	8.42	10.15	5.71	4.19	3.17	3.97
Phosphorus	2.5-5.0 mg%	NA	24.9	13.5	19.3	10.5	18.6	9.5	16.4	8.5	10.6
Albumin	2.3-3.2 gm%	2.8	2.1	2.8	2.3	2.5	2.4	2.8	3	2.9	2.4
APTT	10.8-18.4 second	NA	19.2	NA	18.4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PT	3.5-7.5 second	NA	5.8	NA	6.9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TT	11.3-28.1 second	NA	28.1	NA	21.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA = not applicable, BUN = blood urea nitrogen, HD = Hemodialysis, APTT/PT/TT from coagulation laboratory at KUVTH

azotemia and the inappropriate urine concentration. The patient subsequently was admitted to the hospital and referred to the urologic clinic, KUVTH that day. Upon admission, the patient was given intravenous fluid for correcting dehydration. The bacterial infection was controlled by using metronidazole (15 mg/kg IV, q12h) and enrofloxacin (10 mg/kg SC, q24h). The dog was induced diuresis by using furosemide (2 mg/kg IV, q8h). The urine output following diuresis induced by furosamide was 0.8 ml/kg/hr. The hemodialysis was planned to start due to fluid retention.

Evaluation and preparation of patient before hemodialysis session

The intermittent hemodialysis (HD) was planned due to the progressive azotemia and documented anuria on day 3, 6 and 8. All the vital signs and blood profile including PT (prothrombin time), APTT (activated partial thromboplastin time), TT (thrombin time), CBC (complete blood count), blood chemistry and body weight of the patient were completely examined before every session. First session, the patient had serious complications, including anemia (HCT=21%), respiratory distress due to pneumonitis or pulmonary edema (Figure 1) and prolonged APTT. These complications can lead to hypotension, hypoxemia and bleeding during the dialysis session. Therefore, in the first session the fresh whole blood and oxygen supplement were prepared to support the patient. Moreover, body weight of the patient was recorded and considered before and after in every session. The information of body weight was useful for estimating the water retention and also for setting the ultrafiltration volume which was important for removing water from the patient.

Central venous catheterization (CVCs)

The temporary intravenous double lumen catheter for hemodialysis was made from polyurethane (Joline®). The size of the catheter was selected based on the size of patient. The outer diameter of catheter was 11 Fr (3.67 mm.). The length of the catheter was selected based on the landmark. The landmark was defined as the distance between the half part of the neck and the third rib. This distance measurement was used to determine the length of the catheter. When the catheter was placed on the jugular vein at the half of the neck, the tip of catheter should be at the anterior of the heart of the patient. The 15 cm length catheter was selected for this case. After preparation of the catheter by flushing the heparinized saline into the lumen, anesthesia was induced with diazepam (0.5 mg/kg IV, bolus) and propofol (2 mg/kg IV, bolus). The patient was on right lateral position where the landmark was clearly visible and aseptic. The

method for direct insertion into the jugular veins was used by the modified Seldinger technique (Seldinger, 1953). The tip of catheter was showed in Figure 1. The patient underwent hemodialysis on her right jugular vein immediately after the dialysis prescription was completely set.

Hemodialysis procedure

The hemodialysis procedure included dialysis machine (Fresinius 4008B), pediatric blood line set (Kawasumi), and dialyser (Nipro hiflux 90E). In the first session of dialysis, hrthe fresh 100 cc. of fresh whole blood was used to prime the circuit. Moreover, patient was given heparin, the anticoagulant for preventing the clot in the circuit. The anticoagulant was started with loading dose of undiluted heparin 50 units/kg by injected into the bloodline 5 minutes before initiating the dialysis. The maintenance dose of heparin was calculated for a total of 1.5-hour dialysis at the dose of 50 unit/kg/hr (Cowgill and Francey, 2012) and diluted with normal saline (1:10) then injected into the circuit every 10 minutes. The blood flow rate was set at 3 ml/kg/min initially in the first 30 minutes for every session until the vital signs were stable. Then, the rate was increased to 5 ml/kg/min. Time of dialysis was set at 90 minutes in the first and second session and 150 minutes in the third session depended on the patient tolerance while receiving the dialysis. Therefore, vital sign monitoring is very important. Ultrafiltration volume in each session were set at 1.2L, 0.4L and 0.7L, respectively.

Results

There were no hypotension and other complications happened during each session. Moreover, the blood flow was very smooth during the first and second session. There was no sign of occlusion by the thrombi. However, there was mechanical disruption by thrombi at the beginning of the third session. The heparinized saline was used to release the occlusion of thrombus in the catheter until the lumen was clear enough to continue the dialysis. The urea reduction ratio were 0.44, 0.47 and 0.52 in each session, respectively (Table 3). The urine output was monitored every day as shown in Table 4. The patient was discharged from the hospital on day 14 with urine output 2.15 ml/kg/hr. Moreover, the dog began to be thrombocytopenia (platelets 58.8 $\times 10^3$/µl) at day 46 and died on day 120.

Discussion

In our study, this acute uremic renal failure dog was dialysed 3 times during 14 day-hospitalization. According to the end of the dialysis, the patient's azotemia level was on stage III of chronic renal disease (CKD) (IRIS,

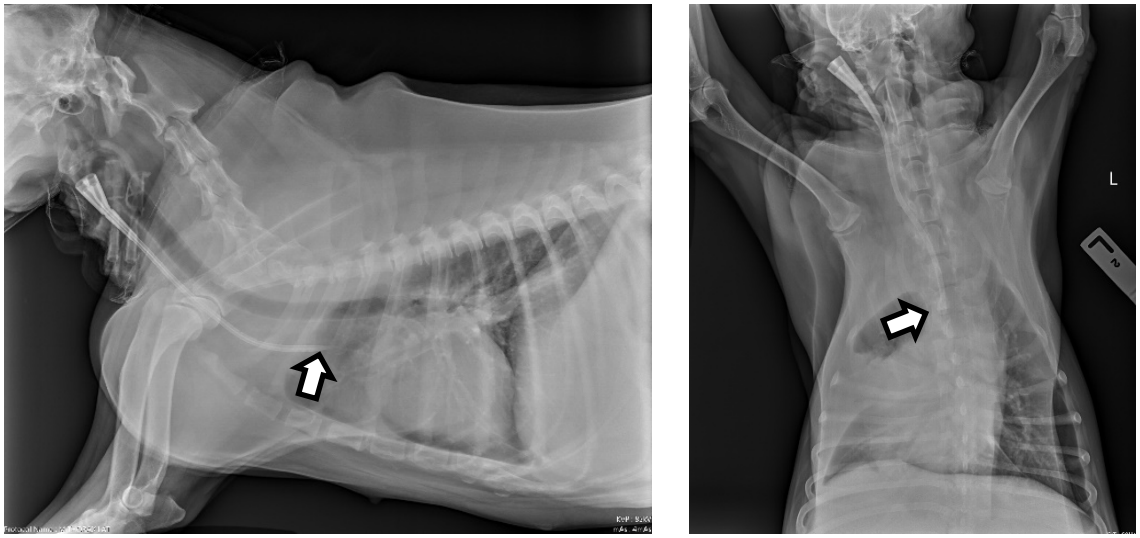


Figure1 Thoracic radiography showing abnormality opacity at right middle lung lobe on day 8 and showing position of the tip of jugular catheter.

Table 3 The records of hemodialysis components in each session

Dialysis No.	Time (minutes)	Qb (ml/kg/ minutes)	Qd (ml/minutes)	URR	Dialyser (surface area; m^2)
1	90	5	500	0.48	0.9
2	90	5	500	0.45	0.5
3	150	6	500	0.52	0.5

Qb = Blood flow rate, Qd = Dialysate flow rate, URR = Urea reduction ratio; (Pre-dialysis BUN-Post-dialysis BUN) / Pre-dialysis BUN

Table 4 The records of urine output during hospitalization.

Urine output	Days												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ml/kg/hr	0	0.8	0.1	0.2	0.68	0.93	1.03	0.85	1.57	2.06	1.93	2.28	2.15

2016) with normal clinical signs. The patient could spend her life almost normally at home. The survival time after discharged from KUVTH was 120 days. The results from the previous study of 93 dogs and 42 cats with acute kidney injury treated with intermittent hemodialysis revealed the median duration of hospitalization were 9 days (range 1 to 45 days) in dogs and 8 days (range 1 to 23 days) in cats. The median number of treatments were 4 times (range 1 to 52 treatments) in dogs and 3 times (range 1 to 34 treatments)

in cats. The median survival time after hospital discharge was 9 days (95% CI=0 to 55 days) for dogs and 7 days (95% CI=0 to 835 days) for cats (Eatroff *et al.*, 2012).

The diagnosis of acute phase of chronic renal failure in this case was based on acute and rapid progression of the clinical signs including vomiting, diarrhea, anuria and severe azotemia. The diagnosis could not be concluded due to lack of previous medical history of the patient. However, the cause from bacterial infection could not be confirmed because urine culture was not performed on the first day.

The cause of death in this case was unknown. However, the patient had shown sign of normocytic normochromic anemia which might be resistant to erythropoietin administration, and progressed thrombocytopenia in 2 weeks before azotemia (Table 2). The presumptive cause of anemia and thrombocytopenia in this case might be Ehrlichiosis. The study of 19 dogs with chronic ehrlichiosis exhibited bicytopenia or pancytopenia, bone marrow hypoplasia, seroreactivity to Ehrlichia canis (E. canis) antigens, and no history of drug or radiation exposure, anorexia, depression, severe bleeding tendencies, hypoalbuminemia, and increased serum alanine aminotransferase activity were hallmarks of the disease (Mylonakis *et al.*, 2004). Nonetheless, no evidence of laboratory result was confirmed except non-regenerative anemia and thrombocytopenia. The bone marrow biopsy should be performed to rule out other causes of bone marrow disease.

For the complications of prolonged APTT, it might be caused by the condition of uremic crisis, pneumonitis or enteritis which might lead to DIC (Disseminated intravascular coagulation). However, only APTT test alone can has abnormalities due to unrelated disease or artifact (Donahue and Otto, 2005). In human, the study of 39 patients treated with hemodialysis without heparinization found that the treatment of patients 2 out of 3 were aborted before appropriate time due to the blood clot in the bloodlines and dialyser. Although, heparin is cleared with a half-life of 60 to 90 minutes in the bloodstream and can effect APTT as well as ACT (Activated coagulation time) (Cook, 2010). In this case, the lowest dose of heparin used in the circuit of hemodialysis was selected due to prolong APTT. The monitoring of blood loss including hematocrit, plasma protein and platelet count were repeated before and after each session. The clotting factor test was done 2 times and only before hemodialysis started due to the high cost of test. The study in human, described the monitoring of

coagulation parameters in hemodialysis patients might help in determining the risk of development of bleeding complications and increased morbidity rate (Khalid and Zafar, 2015). Therefore, clotting factor test might be used as a guide for management of the patient during and after the dialysis.

According to the component of hemodialysis such as blood flow rate, dialysate flow and ultrafiltration in each session was depended mainly on the clinical signs of the patient. In this case, there were three clinical considerations influencing the hemodialysis prescription. For anemia condition at the beginning, the dog was given stored whole blood 100 ml. to prime the circuit during the first hemodialysis. The advantages for priming the circuit with blood or other volume-expanding fluid are minimizing hypotension and hypovolemia (Cowgill and Francey, 2012). For respiratory distress condition, the dog was given the oxygen supplementation by a collar method before and during the session. Due to severe uremia (BUN 100-250 mg/dL), the dog was set shorter timing of dialysis in the first and second dialysis session and then fixed dialysate flow at 500 ml/min and set slow blood flow rate for minimizing the risk of dialysis disequilibrium. The previous study recommendation for an appropriate blood flow rate should be 1.5 to 2.0 ml/kg/min for initial treatment if the BUN concentration is between 150 and 300 mg/dL. The rate could be increased cautiously to 5 ml/kg/min in third and subsequent treatment (Cowgill, 2011). The dog was closely monitoring for the vital signs including body temperature, blood pressure, SpO_2, heart rate, mucous membrane color and neurologic complications. There were no abnormal complications during the dialysis session.

In conclusion, this case would provide the useful information for veterinarians and specialists to know the benefit of hemodialysis including how to prepare and prevent the complications. The application of hemodialysis can be applied for acute uremic crisis of chronic renal disease and other indications. The prognosis for recovery from renal failure in dogs depends on the etiology, extent of renal damage, co-morbid diseases, and presence of multiple organ system involvement. Moreover, the hemodialysis is an alternative or chance of increased survival for dogs nowadays in Thailand.

Acknowledgement

The authors are thankful for patient's information support from the critical care unit, KUVTH and technical assistance for hemodialysis procedure from Division of Pediatric Nephrology, Department of Pediatrics, Phramongkutklao hospital.

References

Cook, B.W. 2010. Anticoagulation Management. Seminars in Interventional Radiology. 27(4): 360-36.

Cowgill, L.D. 2011. Urea Kinetics and Intermittent Dialysis Prescription in Small Animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 41(1): 193-225.

Cowgill, L.D. and T. Francey. 2012. Hemodialysis and Extracorporeal Blood Purification, p 680-713. In S. P. Dibartola, eds. Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice. Elsevier Saunders.

Donahue, S.M. and C.M. Otto. 2005. Thromboelastography: A Tool for Measuring Hypercoagulability, Hypocoagulability, and Fibrinolysis. *J Vet Emerg Crit Care*. 15(1): 9-16.

Eatroff, A.E., C.E. Langston, S. Chalhoub, K. Poeppel and E. Mitelberg. 2012. Long-Term Outcome of Cats and Dogs with Acute Kidney Injury Treated with Intermittent Hemodialysis: 135 Cases (1997-2010). *J Am Vet Med Assoc*. 241(11): 1471-1478.

Elliott, D.A. 2000. Hemodialysis. *Clin Tech Small Anim Pract*. 15(3): 136-148.

International Renal Interest Society. 2016. (cited 6 September). IRIS annual broad meeting 2016. Available from: http://www.iris-kidney.com/pdf/staging-of-ckd.pdf#page=6

John, Z.M., M.K. George and B.G. Lucien. 1968. Renal Failure and Infection. *Medicine*. 47(1): 1-32.

Khalid, A. and L. Zafar. 2015. Effect of Haemodialysis on Mean Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time in Patients of End Stage Renal Disease. *J Rawal Med Coll* (JRMC). 19(3): 247-249.

Mylonakis, M.E., A.F. Koutinas, E.B. Breitschwerdt, B.C. Hegarty, C.D. Billinis, L.S. Leontides and V.S. Kontos. 2004. Chronic Canine Ehrlichiosis (Ehrlichia Canis): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. *J Am Anim Hosp Assoc*. 40(3): 174-184.

Ronco, C. and W. Clark. 2001. Factors Affecting Hemodialysis and Peritoneal Dialysis Efficiency. *Semin Dial*. 14(4): 257-262.

Seldinger, S.I. 1953. Catheter Replacement of the Needle in Percutaneous Arteriography: a New Technique. *Acta radiol.* 39(5): 368-376.

Sykes, J.E., K. Hartmann, K.F. Lunn, G.E. Moore, R.A. Stoddard and R.E. Goldstein. 2011. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *J Vet Intern Med*. 25(1): 1-13.

Tuchman, S., Z.P. Khademian and K. Mistry. 2013. Dialysis Disequilibrium Syndrome Occurring During Continuous Renal Replacement Therapy. *Clin Kidney J*. 6(5): 526-529.

Vaden, S.L., J. Levine and E.B. Breitschwerdt. 1997. A Retrospective Case-Control of Acute Renal Failure in 99 Dogs. *J Vet Intern Med*. 11(2): 58-64.

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

ภาวะตีบแคบเหนือลิ้นหัวใจพัลโมนิกและโรคลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบแต่กำเนิดในลูกสุนัขพันธุ์เฟรนช์ บูลด็อก

ธนวัน มังคละพฤกษ์[1,#] และวรุต ชินประหัษฐ์[2]

[1]ภาควิชาคลินิกสำหรับสัตว์เลี้ยงขนาดเล็กและรังสีวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร หนองจอก กทม. 10530

บทคัดย่อ: สุนัขพันธุ์เฟรนช์ บูลด็อก เพศเมีย อายุ 2.5 เดือน เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็กคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร เนื่องจากพบชีพจรที่ตำแหน่งหลอดเลือดดำจูกูลาร์ ผลการตรวจร่างกายพบเสียงฟู่ (murmur) ระดับ 4 จาก 6 ระดับ ที่บริเวณตำแหน่งฐานหัวใจด้านซ้าย ภาพถ่ายรังสีช่องอกท่านอนตะแคงขวาพบหัวใจมีขนาดปกติ ส่วนภาพนอนหงายพบหัวใจด้านขวาขนาดใหญ่กว่าปกติเล็กน้อย การตรวจหัวใจด้วยคลื่นเสียงสะท้อนความถี่สูงพบหัวใจห้องล่างขวาโตแบบผนังหนา ลิ้นหัวใจพัลโมนารีตีบและลิ้นหัวใจไตรคัสปิดรั่วเล็กน้อย การตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจพบคลื่นเอสลึก จากการตรวจครั้งแรกระดับความรุนแรงของโรคลิ้นหัวใจพัลโมนารีตีบแต่กำเนิดอยู่ในช่วงเล็กน้อยถึงปานกลาง ประกอบกับสุนัขไม่มีอาการทางคลินิก จึงแนะนำให้ทำการติดตามผลทุก 6 เดือน ตรวจติดตามผลสุนัขอีกครั้งเมื่ออายุ 1 ปี จากการตรวจหัวใจด้วยคลื่นเสียงสะท้อนความถี่สูงพบระดับความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น ทั้งนี้สุนัขได้รับการวินิจฉัยเพิ่มเติมด้วยเครื่องตรวจวินิจฉัยโรคเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (computer tomography) ณ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อดูตำแหน่งหลอดเลือดแดงโคโรนารี ทั้งนี้จากผลการตรวจไม่พบการโอบรัดของหลอดเลือดโคโรนารีที่บริเวณลิ้นหัวใจพัลโมนิก แต่พบภาวะตีบแคบเหนือลิ้นหัวใจพัลโมนิกร่วมกับโรคลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบ ภายหลังจากการวินิจฉัยทั้งหมดจึงได้มีการวางแผนการรักษาโดยการทำบอลลูนขยายลิ้นหัวใจ (balloon valvuloplasty) ให้แก่สุนัขต่อไป

คำสำคัญ: เฟรนช์บูลด็อก เสียงฟู่หัวใจ ลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบ การทำบอลลูนขยายลิ้นหัวใจ โรคหัวใจแต่กำเนิด

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ
สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(2): 115-124.
E-mail address: tong_tanawan@hotmail.com

Congenital Supravalvular and Valvular Pulmonic Stenosis in French Bulldog

Tanawan Mangklabruks[1,#], and Warut Chinprahat[2]

[1]Clinic for Small Domestic Animal and Radiology, Faculty of Veterinary Medicine,
Mahanakorn University of Technology, Nong Chok, Bangkok, Thailand 10530

Abstract: A 2.5-month-old female French Bulldog presented at Small Animal Hospital Faculty of Veterinary Medicine Mahanakorn University of Technology because jugular pulsation was detected. On physical examination, a systolic murmur 4/6 heard best over the left heart base. Right lateral thoracic radiography showed normal heart size while ventrodorsal view demonstrated the right heart enlargement. Echocardiography revealed the right ventricular wall hypertrophy, pulmonic valve stenosis, and mild tricuspid regurgitation. Electrocardiogram was normal sinus rhythm with deep S wave. From the first visit, the severity of pulmonic stenosis was mild to moderate degree since there was no clinical sign, the veterinarian recommended to monitor every 6 months. The second visit was at the dog was about 1 year of age. The echocardiogram showed the increasing severity of pulmonic stenosis. The dog was further diagnosis by Computer Tomography (CT) scan at Small Animal Teaching Hospital Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, in order to examine the aberrant coronary arteries. The CT scan results did not find aberrant coronaries; however, supravalvular pulmonic stenosis was detected concurrent with valvular pulmonic stenosis. The further treatment with balloon valvuloplasty was suggested.

Keywords: French bulldog, Murmurs, Pulmonic valve stenosis, Balloon valvuloplasty, Congenital heart disease

[#]Corresponding author
E-mail address: tong_tanawan@hotmail.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(2): 115-124.

บทนำ

Pulmonic stenosis (PS) คือ การตีบแคบของลิ้นหัวใจพัลโมนิก (pulmonic valve) ที่กั้นระหว่างหัวใจห้องล่างขวาและหลอดเลือดแดงที่เข้าสู่ปอด ซึ่งเป็นความผิดปกติแต่กำเนิดที่สามารถพบได้ในสุนัขพันธุ์เล็กรวมทั้งพันธุ์บูลด็อกและบ็อกเซอร์ (Israël, 2005) โดยมีสาเหตุมาจากการเจริญผิดปกติของลิ้นหัวใจหรือลิ้นหัวใจเกิดการหนาตัวมากกว่า

ปกติ นอกจากนี้ในสุนัขพันธุ์บูลด็อกและบ็อกเซอร์ ภาวะ PS นั้นอาจเกิดจากความผิดปกติของหลอดเลือดแดงโคโรนารี (coronary arteries) เจริญผิดปกติจนมาโอบรัดบริเวณ right ventricular outflow tract (Buchanan, 2001) ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้มีผลต่อการบีบเลือดออกจากหัวใจห้องล่างขวาที่ต้องทำงานมากขึ้นเพื่อให้ชนะ systolic pressure overload จนทำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างขวาหนาตัวขึ้น (right ventricular hypertrophy) บางกรณีอาจส่งผลให้เกิดหัวใจห้องขวาขยายใหญ่ผิดปกติ จนทำให้ลิ้นไตรคัสปิดปิดได้ไม่สนิท (tricuspid insufficiency) สุดท้ายแล้วเกิดภาวะหัวใจห้องขวาล้มเหลวตามมา (right-sided congestive heart failure) (Strickland, 2008) อาการและความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับความต่างของความดันระหว่างภายในหัวใจห้องล่างขวาและหลอดเลือดแดงที่เข้าสู่ปอด (Bussadori *et al.,* 2000) สุนัขที่เกิดโรคลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบแต่กำเนิด บางครั้งไม่แสดงอาการ หรือแสดงอาการหัวใจห้องขวาล้มเหลว เช่น อ่อนเพลีย เหนื่อยง่าย เป็นลม (syncope) ไอ หายใจลำบาก ท้องบวมโต (abdominal enlargement) และการขยายใหญ่ของหลอดเลือดดำจูกูลาร์ (jugular vein distension) (Ware, 2007)

วัตถุประสงค์ของการทำรายงานสัตว์ป่วยในครั้งนี้ เพื่อรายงานอาการและผลทางคลินิก ตลอดจนการวินิจฉัยและแผนการรักษาโรคลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบแต่กำเนิดในลูกสุนัขพันธุ์เฟรนช์ บูลด็อก

ประวัติสัตว์ป่วย

สุนัขพันธุ์เฟรนช์ บูลด็อก เพศเมีย ไม่ได้ทำหมัน อายุ 2.5 เดือน น้ำหนัก 3.1 กิโลกรัม เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร เนื่องจากเจ้าของสัตว์ป่วยสังเกตเห็นชีพจรที่ตำแหน่งหลอดเลือดดำจูกูลาร์ (jugular pulsation) จากการตรวจร่างกายพบคะแนนร่างกายของสัตว์อยู่ที่ 3 จาก 5 คะแนน พบอุณหภูมิ 100 องศาฟาเรนไฮต์ เยื่อเมือกสีชมพู capillary refilling time น้อยกว่า 2 วินาที ไม่พบภาวะขาดน้ำ อัตราการเต้นของหัวใจเท่ากับอัตราการเต้นของชีพจร 180 ครั้ง/นาที และพบเสียงฟู่ในช่วงจังหวะการบีบตัวของหัวใจระดับ 4 จาก 6 (systolic murmur grade 4/6) ที่บริเวณตำแหน่งฐานหัวใจด้านซ้าย (left heart base) อัตราการหายใจ 40 ครั้ง/นาที เสียงปอดปกติแต่ไม่พบชีพจรที่ตำแหน่งหลอดเลือดดำจูกูลาร์ จากการซักประวัติเพิ่มเติมไม่พบอาการไอหรือภาวะเหนื่อยหอบง่ายและไม่เคยมีประวัติป่วยหรือประวัติการรักษาโรคมาก่อน

ผลการตรวจวินิจฉัย

การถ่ายภาพรังสีช่องอก (thoracic radiography) จากภาพถ่ายรังสีช่องอกในท่านอนตะแคงขวา (right lateral view) ได้ทำการวัดขนาดของหัวใจ โดยวัดจากมาตราส่วนกระดูกสันหลัง (vertebral heart score; VHS) มีขนาดเท่ากับ 13 vertebrae ปกติในสายพันธุ์บูลด็อกจะมีขนาด 8.5-12.7±1.7 vertebrae (Gugjoo *et al*., 2013) ซึ่งขนาดของหัวใจที่วัดได้นั้นมีขนาดปกติ แต่ไม่สามารถวัดส่วนหน้าของหัวใจ (cranial waist) ได้อย่างชัดเจนจากการบดบังของขาหน้า (ภาพที่ 1) ส่วนภาพถ่ายรังสีช่องอกในท่านอนหงาย (ventro - dorsal view) พบความกว้างของหัวใจมีขนาดมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ของความกว้างของช่องอกจึงสันนิษฐานว่าหัวใจมีขนาดใหญ่กว่าปกติโดยเฉพาะหัวใจห้องขวา แต่จากการถ่ายภาพรังสีช่องอกนั้นสุนัขอยู่ในช่วง

หายใจออก จึงทำให้ภาพที่ได้มีขนาดช่องอกเล็กกว่าปกติ (ภาพที่ 2) จึงสรุปได้ว่าไม่พบภาวะหัวใจโตจากภาพถ่ายรังสีช่องอกในวันแรกที่สุนัขเข้ารับการตรวจ



ภาพที่ 1 แสดงภายถ่ายรังสีช่องอกในท่านอนตะแคงขวา เมื่อสัตว์ป่วยมีอายุ 2.5 เดือน (right lateral view) VHS = 13 vertebrae, increase lung opacity at the cranial lung lobe. Noted, the front legs were not extended properly

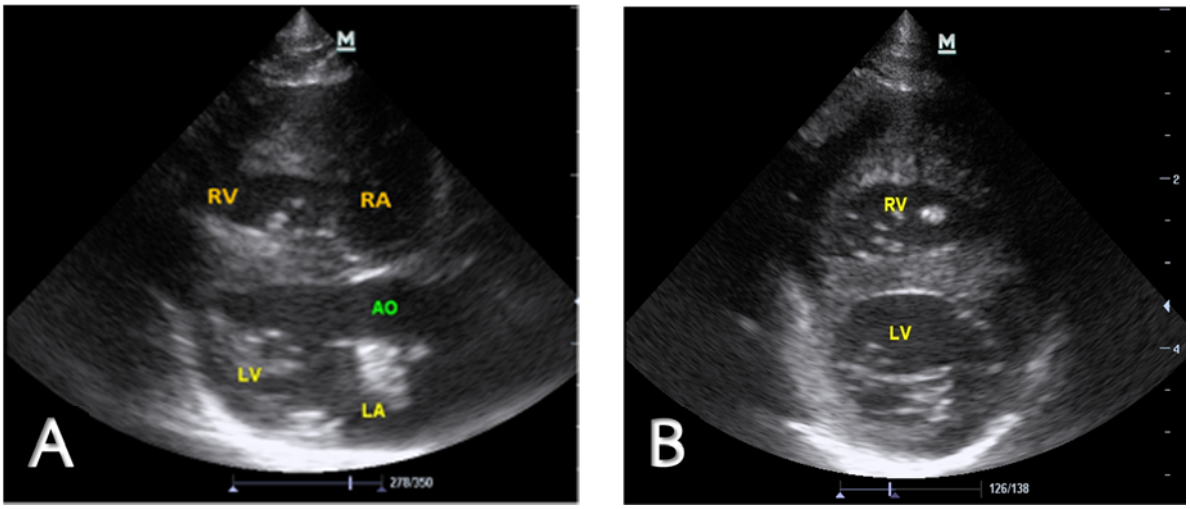


ภาพที่ 2 แสดงภาพถ่ายรังสีช่องอกในท่านอนหงาย เมื่อสัตว์ป่วยมาอายุ 2.5 เดือน (ventro - dorsal view) thymus was seen, and the cardiac silhouette was around 70% of the thoracic width. Noted, exhalation phase

การตรวจหัวใจด้วยคลื่นเสียงสะท้อนความถี่สูง (echocardiography) ในท่า right parasternal ในมุมของ long axis at the left ventricular outflow tract ไม่พบลิ้นหัวใจเอออร์ติกตีบ (aortic stenosis) เนื่องจากไม่พบเส้นใยไฟโบรบลาสต์ที่ตำแหน่งเส้นเลือดแดงเอออร์ต้า (aorta) (ภาพที่ 3 รูป A) หัวใจห้องล่างขวาโตแบบผนังหนา (right ventricular hypertrophy) ทั้งนี้โดยปกติหัวใจห้องล่างขวาควรมีขนาดไม่เกิน 1 ใน 3 ของความกว้างหัวใจทั้งหมด และพบผนังกั้นหัวใจห้องล่าง (interventricular septum) มีลักษณะแบนลง (ภาพที่ 3 รูป A และ B) ซึ่งบ่งชี้ถึงความดันของหัวใจในห้องล่างขวาว่ามีค่าใกล้เคียงกับหัวใจห้องล่างซ้าย และจาก m-mode echocardiogram มีค่า fractional shortening อยู่ในระดับปกติ (ตารางที่ 1)

นอกจากนี้ในมุม right parasternal long axis at the level of pulmonic valve พบบริเวณลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบแคบ (pulmonic stenosis) และพบ mosaic color flow ระหว่าง right ventricular outflow tract (ภาพที่ 4A) พบการรั่วของลิ้นหัวใจไตรคัสปิดเล็กน้อย (tricuspid regurgitation) (ภาพที่ 4B)

เมื่อตรวจด้วยวิธี continuous wave Doppler echocardiogram เพื่อทำการคำนวณความต่างความดันโดยใช้สมการ $\Delta P = 4(Vmax)^2$ ซึ่งค่า Vmax คือค่าความเร็วเลือดสูงสุดที่ไหลผ่านลิ้นหัวใจพัลโมนิก ค่า Vmax ที่ได้มีค่ามากกว่า 2.81 เมตรต่อวินาที แต่เนื่องจากไม่พบยอดของคลื่น ทำให้ค่า peak gradient มีมากกว่า 31.58 มิลลิเมตรปรอท ซึ่งบ่งบอกภาวะ PS มีความรุนแรงอยู่ในระดับเล็กน้อยถึงปานกลาง (เล็กน้อย 20-49 mmHg, ปานกลาง 50-80 มิลลิเมตรปรอท และรุนแรง มากกว่า 80 มิลลิเมตรปรอท) (Bussadori *et al.,* 2000)



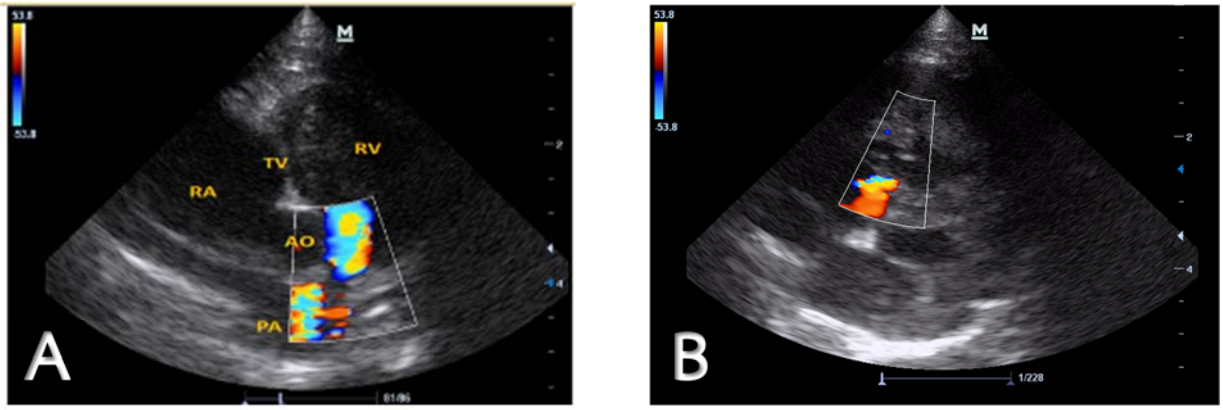
ภาพที่ 3 (รูป A) รูป echocardiogram เมื่อสุนัขมีอายุ 2.5 เดือน ท่า right parasternal left ventricular outflow tract view ไม่พบลิ้นหัวใจเอออร์ติกตีบและพบหัวใจห้องล่างขวามีขนาดใหญ่แบบผนังหนา (right ventricular hypertrophy) (รูปB) right parasternal short axis (papillary level) พบหัวใจห้องล่างขวาโตแบบผนังหนา (right ventricular wall hypertrophy) (RV = right ventricle, RA = right atrium, AO = aorta, LV = left ventricle, LA = left atrium)

ตารางที่ 1 แสดงค่าการตรวจหัวใจด้วยคลื่นเสียงสะท้อนความถี่สูงด้วยวิธี m-mode และค่าปกติในขณะที่สุนัขมีอายุ 2.5 เดือน

	ผลการตรวจ (mm)	Reference* (mm)
IVSd	6.6	5.6 – 7.4
LVIDd	20.1	10.7 – 22.5
LVPWd	5.5	4.4 – 6.0
IVSs	8.7	8.4 – 10.5
LVIDs	10.4	4.0 - 14.3
LVPWs	10.4	7.5 – 9.4
FS(Teich)	48.3%	35 - 45%

*ค่า reference ค่าอ้างอิงตามน้ำหนักตัวตาม Boon (2002)

IVSd = interventricular septum (disastole), LVIDd = left ventricular inner dimension (diastole), LVPWd = left ventricular posterior wall (diastole), IVSs = interventricular septum (systole), LVIDd = left ventricular inner dimension (systole), LVPWd = left ventricular posterior wall (systole), FS = Fractional shortening, mm = millimeter



ภาพที่ 4 (รูป A, B) รูป Doppler color **echocardiogram เมื่อสัตว์ป่วยอายุ 2.5 เดือน** ท่า right parasternal short axis (pulmonary artery level) พบลิ้นหัวใจพัลโมนารีตีบ (pulmonic stenosis) และพบ mosaic color ระหว่างหัวใจห้องล่างขวาและหลอดเลือดแดงพัลโมนารี รูป 4B พบภาวะ mild tricuspid regurgitation (RV = right ventricle, RA = right atrium, AO = aorta, PA = pulmonary artery, TV = tricuspid valve)

ผลการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (Electrocardiogram) พบลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจปกติ (normal sinus rhythm) แต่มี deep s waves ซึ่งบ่งบอกหัวใจห้องล่างขวาโต

เนื่องจากความรุนแรง PS ยังไม่ถึงระดับรุนแรง ประกอบกับสุนัขไม่มีอาการทางคลินิก เบื้องต้นสัตวแพทย์จึงรอดูอาการของสุนัขในระยะแรกก่อน อีกทั้งสุนัขอายุน้อยและมีขนาดตัวค่อนข้างเล็ก จึงทำให้การตรวจพบการโอบรัดของหลอดเลือดโคโรนารีที่บริเวณลิ้นหัวใจพัลโมนารีทำได้ยากมากขึ้นจึงแนะนำให้เจ้าของสัตว์ป่วยสังเกตอาการและทำการติดตามผลทุก 6 เดือน

สุนัขมาตรวจติดตามผลอีกครั้งเมื่ออายุประมาณ 1 ปี สุนัขเริ่มแสดงอาการทางคลินิกคืออาการไม่ทนต่อการออกกำลังกาย ผลการตรวจหัวใจด้วยคลื่นเสียงสะท้อนความถี่สูงพบระดับความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น จากเมื่อตอนอายุสามเดือนมีความเร็วเลือดสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 2.2 เมตรต่อวินาที และเมื่อขณะอายุหนึ่งปีมีความเร็วสูงสุดที่หลอดเลือดพัลโมนารีอาเทอรี อยู่ที่ 7 เมตรต่อวินาที ซึ่งเมื่อประเมินค่าความดันของหัวใจห้องขวาอยู่ที่ 204 มิลลิเมตรปรอท (ภาพที่ 5) ซึ่งจัดอยู่ในระดับรุนแรง ทั้งนี้สุนัขได้รับการวินิจฉัยเพิ่มเติมด้วยเครื่องตรวจวินิจฉัยโรค



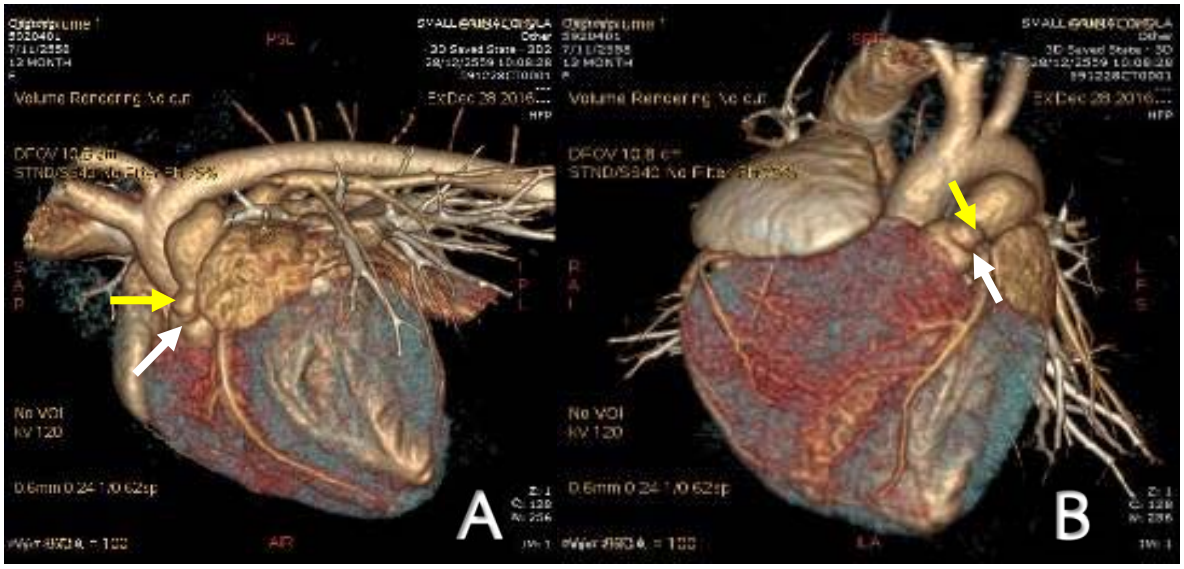
ภาพที่ 5 แสดงส่วนของ Vmax หรือความเร็วของเลือดที่ไหลผ่านลิ้นหัวใจพัลโมนิก ด้วนวิธี continuous wave Doppler echocardiogram ของสุนัขเมื่อมีอายุ 1 ปี พบ Vmax มีค่า 7 เมตรต่อวินาที

เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (computer tomography) ณ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อตรวจวินิจฉัยการโอบรัดของหลอดเลือดโคโรนารีที่บริเวณลิ้นหัวใจพัลโมนารี และวางแผนการรักษาโดยการทำบอลลูนขยายลิ้นพัลโมนิก ให้แก่สุนัขต่อไป

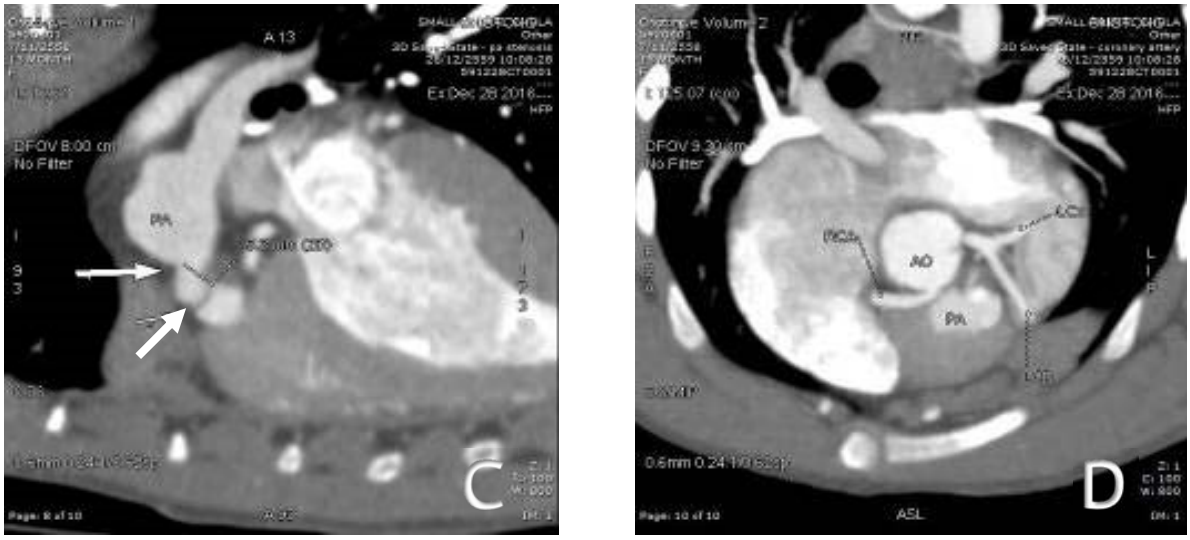
การตรวจวินิจฉัยด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (computer tomography) เนื่องจากโรคลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบแต่กำเนิดจำเป็นต้องได้รับการวินิจฉัยด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (computer tomography) ทางโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร จึงส่งตัวสัตว์ป่วยเพื่อเข้ารับการวินิจฉัยเพิ่มเติม ณ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผลการวินิจฉัยด้วยเครื่องวินิจฉัยโรคเอกซเรย์คอมพิวเตอร์พบการตีบแคบของลิ้นหัวใจพัลโมนิกร่วมกับการหนาตัวของลิ้นหัวใจพัลโมนิก นอกจากนี้ยังพบการตีบแคบเหนือลิ้นหัวใจพัลโมนิก (supravalvular stenosis) โดยมีระยะห่างระหว่างลิ้นหัวใจพัลโมนิกกับลิ้นหัวใจที่อยู่เหนือลิ้นหัวใจพัลโมนิกอยู่ที่ 0.5 เซนติเมตร ความกว้างของหลอดเลือดพัลโมนารีอยู่ที่ 1.1 เซนติเมตร และส่วนที่แคบที่สุดของลิ้นหัวใจที่อยู่เหนือลิ้นหัวใจพัลโมนิกอยู่ที่ 0.4 เซนติเมตร เนื่องจากขนาดช่องว่างหัวใจห้องล่างขวาเล็กลง จึงทำให้หลอดเลือดพัลโมนารีขยายตัว นอกจากนี้ยังส่งผลทำให้หัวใจห้องบนขวาขยายใหญ่และหัวใจห้องล่างขวาเกิดการหนาตัวขึ้น แต่ไม่พบความผิดปกติของหลอดเลือดแดงโคโรนารี (ภาพที่ 7.1-7.2 รูป A-D) จึงแนะนำให้เจ้าของสุนัขทำการตรวจค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีโลหิตก่อนรักษา ผลการตรวจค่าโลหิตวิยาและชีวเคมีโลหิต มีค่าเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดอยู่ในเกณฑ์ปกติ ส่วนค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่า 56 % ซึ่งสูงกว่าค่าอ้างอิง ค่าชีวเคมีของเลือดได้แก่ ALT มีค่า 159 U/L (ค่าปกติอยู่ที่ 5-50 U/L) และค่าครีเอทีนีนมีค่า 1.9 mg/dL (ค่าปกติอยู่ที่ 0.4-1.5 mg/dL) ส่วนรูปร่างลักษณะของเม็ดเลือดปกติและตรวจไม่พบพยาธิในเม็ดเลือด ด้วยการทำบอลลูน (balloon valvuloplasty) เพื่อรักษาโรคลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบต่อไป

สรุปและวิจารณ์

โรคลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบเป็นโรคหัวใจที่เป็นแต่กำเนิด สามารถเป็นได้ที่ลิ้นหัวใจ ใต้ลิ้นหัวใจ และเหนือลิ้นหัวใจ ในสายพันธุ์บูลด็อกการตีบแคบที่บริเวณลิ้นหัวใจ อาจเกี่ยวกับการเจริญของหลอดเลือดแดงโคโรนารีที่ผิดปกติ (aberrant coronary arteries) การตีบแคบในส่วนของลิ้นหัวใจพัลโมนิกเป็นแบบที่สามารถพบได้มากที่สุด แบ่งตามพยาธิสภาพได้เป็นชนิดเอ (type A) เป็นชนิดที่ลิ้นหัวใจพัลโมนิกเชื่อมรวมกัน หรือมีบางส่วนเชื่อมติดกัน เป็นผลทำให้ลิ้นหัวใจพัลโมนิกเปิดได้ไม่เต็มที่ แต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดแดงพัลโมนารีอาเทอรีปกติ และชนิดบี (type B) เป็นชนิดที่รูเปิดของหลอดเลือดแดงพัลโมนารีตีบแคบเป็นผลทำให้ลิ้นหัวใจพัลโมนิกเจริญไม่เต็มที่ (Israël, 2005) การวินิจฉัยโรคสามารถทำได้ร่วมกันจากการถ่ายรังสีช่องอกและโดยเครื่องตรวจหัวใจด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (echocardiography) ส่วนระดับความรุนแรงของ PS สามารถตรวจประเมินด้วยวิธี Doppler echocardiogram เพื่อดูความเร็วของเลือดสูงสุดที่ไหลผ่านลิ้นหัวใจพัลโมนิก และนำมาประมาณค่าความดันของหัวใจห้องล่างขวา ซึ่งค่าปกติควรมีค่าต่ำกว่า 30 มิลลิเมตรปรอท ความรุนแรงของโรค PS



ภาพที่ 7.1 (รูป A, B) แสดงผลการตรวจวินิจฉัยด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (computer tomography) ลูกศรสีเหลืองชี้จุดตีบบริเวณเหนือลิ้นหัวใจ (suprapulmonic stenosis) และลูกศรสีขาวชี้จุดตีบที่บริเวณลิ้นหัวใจพัลโมนิก (pulmonic stenosis)



ภาพที่ 7.2 (รูป C, D) แสดงผลการตรวจวินิจฉัยด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (computer tomography) ภาพที่ 7.2 C ลูกศรใหญ่ชี้จุดตีบบริเวณเหนือลิ้นหัวใจ (supravalvular stenosis) และลูกศรเล็กชี้จุดตีบที่บริเวณลิ้นหัวใจพัลโมนิก (pulmonic stenosis) ถึงมีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร ภาพที่ 7.2 D ภาพการตรวจเช็คการเจริญผิดปกติของหลอดเลือดแดงโคโลนารี ซึ่งไม่พบความผิดปกติ แขนงของ LCD เจริญอย่างปกติโดยไม่มีการโอบรัดบริเวณหลอดเลือดแดงพัลโมนารี LCD = left coronary artery, RCA = right coronary artery, AO = aorta, PA = pulmonary artery, LCx = left circumflex artery

แบ่งออกเป็น รุนแรงน้อย (ความดันอยู่ที่น้อยกว่า 50 มิลลิเมตรปรอท) รุนแรงปานกลาง (ค่าความดันอยู่ที่ 50-80 มิลลิเมตรปรอท) และรุนแรงมาก (ค่าความดันอยู่ที่มากกว่า 80 มิลลิเมตรปรอท) ซึ่งโดยปกติการรักษานั้นทำเมื่อสุนัขมี PS อยู่ในระดับรุนแรงมาก โดยใช้วิธีบอลลูนลิ้นหัวใจส่วนที่ตีบแคบ (balloon valvulopasty)

การตรวจด้วยเครื่องตรวจวินิจฉัยโรคเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ เป็นอีกเครื่องมือที่ควรทำเมื่อพวกภาวะ PS ทำเพื่อดูการวางตัวของหลอดเลือดแดงโคโรนารีในสุนัขสายพันธุ์หน้าสั้นอาจพบความผิดปกติที่หลอดแดงโคโรนารี หรือเรียกว่า anomalous coronary arterial circulations ซึ่งหากทำบอลลูนเพื่อขยายลิ้นหัวใจที่ตีบแคบ อาจส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อการฉีกขาดของหลอดเลือด และทำให้สัตว์ตายได้ (Scansen, 2015) สุนัขสายพันธุ์ English bulldog ที่เป็นโรคลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบมักรักษาได้อย่างยุ่งยาก เพราะมีความเป็นไปได้ที่จะพบภาวะเส้นเลือดแดงโคโรนารีเบี่ยงมาด้านซ้าย (aberrant left coronary artery) ซึ่งในสุนัขที่มีความบกพร่องแบบนี้เส้นเลือดแดงโคโรนารีจะพาดผ่านช่องทางไหลเวียนเลือดของหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular outflow tract) และทำให้เสี่ยงต่อการฉีกขาดระหว่างการขยายลิ้นหัวใจ การเสียชีวิตอย่างกะทันหันเนื่องจากการแตกของหลอดเลือดแดงโคโรนารี ในระหว่างการทำบอลลูน (MacPhail, 2013) การศึกษาย้อนหลังในสุนัขที่เป็นโรคลิ้นหัวใจโมนิกตีบและมีการรักษาด้วยบอลลูนแล้ว จำนวน 30 ตัว พบว่า 94% ของสุนัขที่เป็น PS type A ยังมีชีวิตอยู่และยังไม่แสดงอาการทางคลินิกใดๆ ภายหลังจากการรักษาด้วยบอลลูนแล้วเป็นเวลาหนึ่งปี ส่วนสุนัขที่เป็น PS type B มี 66.6% ยังคงมีชีวิตรอดหลังจากรักษาด้วยบอลลูนและมี 50% ที่อาการทางคลินิกหายไปหลังจากการรักษาเป็นเวลาหนึ่งปี (Bussadori *et al.,* 2001) การศึกษาการทำบอลลูนในสุนัขที่มีภาวะลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบทั้งหมด 40 ตัว พบว่ามีสุนัขจำนวน 2 ตัวที่ไม่สำเร็จ โดยที่สุนัขตัวแรกตายในระหว่างการรักษาเนื่องจากเกิดการทะลุของหลอดเลือดพัลโมนารีอาเทอรี และตัวที่ 2 ไม่สามารถแก้ไขการตีบได้ ดังนั้นอัตราการสำเร็จอยู่ที่ 95% (38/40) สุนัขสามารถกลับมาเป็นโรคลิ้นหัวใจพัลโมนิกตีบหลังทำบอลลูนได้ โดยมีระยะเวลาเฉลี่ยอยู่ที่ 5 เดือนครึ่ง (Sunahara *et al.*, 2014)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานสัตว์ป่วยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจาก ผศ.สพ.ญ.ดร. สิริลักษณ์ สุรเชษฐพงษ์ และ สพ.ญ.นาฏทิวา ไชยวรวิทย์สกุล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในด้านการตรวจวินิจฉัยโรคหัวใจโดยเทคนิคขั้นสูงอีกทั้งคำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำรายงานสัตว์ป่วยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Buchanan, J.W. 2001. Pathogenesis of Single Right Coronary Artery and Pulmonic Stenosis in English. *J. Vet. Intern Med*. 15(4): 417.

Bussadori, C., Amberger, C., Bobinnec, G.L and Lombard, C.W. 2000. Guidelines for the echocardiographic studies of suspected subaortic and pulmonic stenosis. *J. Vet. Cardiol.* 2(2): 15-22.

Bussadori, C., DeMadron, E., Santilli, R.A. and Borgarelli, M. 2001. Balloon Valvuloplasty in 30 Dogs with Pulmonic Stenosis Effect of Valve Morphology and Annular Size on Initial and 1-Year Outcome. *J. Vet. Intern Med.* 15: 553-558.

Davies Veterinary Specialists. 2010 (cited 16 January 2018). My dog has been diagnosed with Pulmonic Stenosis. Available from: http://vetspecialists.co.uk/factsheets/Cardiology/pulmonic_stenosis.html

Gugjoo, M.B., Hoque, M., Saxena, A.C., Zama, M.M.S. and Amarpal. 2013. Vertebral Scale System to Measure Heart Size in Dogs in Thoracic Radiographs. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 1(1): 1-4.

Israël, N.C. 2005. Congenital heart disease in dogs. *UK Vet.* 10(8): 1-6.

Boon, J.A., 2011. Veterinary echocardiography. 2nded. Iowa State University Press publishing. Arnes, AI, United States. 632 p.

MacPhail, C.M. 2013. Surgery of the Cardiovascular System. In Small Animal Surgery, 4eds. Pulmonic Stenosis, 876-879. Riverport Lane: Mosby and Elsevier Inc.,

Scansen, B.A. 2015. Pulmonary Valve Stenosis. In Veterinary Image-Guided Interventions. Anomalous Coronary Arterial Circulations, 584. Oxford: John Wiley&Son Inc.

Sunahara, H., Fujii, Y., Sugimoto, K. and Aoki, T. 2014. Restenosis after balloon valvuloplasty in dogs with congenital pulmonary stenosis. *Intern J. Appl. Res. Vet. Med.* 12(2): 174-179.

Strickland, K.N. 2008. Congenital Heart Disease. In Manual of Canine and Feline Cardiology, 4eds. Congenital Heart Disease, 227-231. Westline Industrial Drive: Elsevier Inc.

Ware, W.A. 2007. Congenital Cardiovascular Disease. In Cardiovascular Disease in Small Animal Medicine. Pulmonic Stenosis, 234-237. London: Manson Publishing Ltd.

บทความวิชาการ

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

โรคมัยโครสปอริดิโอซิส: โรคติดเชื้ออุบัติใหม่และโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในคนและในสัตว์

จิตรบรรจง ทุมพงษ์[1,#]

[1]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร 140 ถ.เชื่อมสัมพันธ์ หนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530

บทคัดย่อ: โรคมัยโครสปอริดิโอซิสเป็นโรคติดเชื้ออุบัติใหม่และเป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อโรคได้ทั้งในคนและในสัตว์ มีสาเหตุจากเชื้อมัยโครสปอรา ซึ่งเป็นปรสิตที่ต้องอาศัยอยู่ภายในเซลล์ของโฮสต์และถูกจัดจำแนกใหม่ จากเดิมเป็นเชื้อโปรโตซัวเปลี่ยนเป็นเชื้อรา โดยเชื้อมัยโครสปอราที่พบก่อโรคได้บ่อยมากที่สุดในคนที่เป็นผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ได้แก่ เชื้อ *Enterocytozoon bieneusi* และ *Encephalitozoon intestinalis* แต่เชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถแยกได้จากสัตว์หลายชนิดในหลายพื้นที่ทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทยด้วย บทความปริทัศน์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ความรู้เกี่ยวกับโรคมัยโครสปอริดิโอซิสในคนและในสัตว์ ทั้งในด้านการติดต่อ การวินิจฉัยและการรักษาโรค

คำสำคัญ: โรคมัยโครสปอริดิโอซิส เชื้อมัยโครสปอรา โรคติดเชื้ออุบัติใหม่ โรคติดเชื้อฉวยโอกาส

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(2): 125-136.

E-mail address: jitbanjo@yahoo.com

Microsporidiosis: An Emerging and Opportunistic Disease in Humans and Animals

Jitbanjong Toompong[1,#]

[1]Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, 140 Cheumsamphan Road, Nong Chok, Bangkok 10530 Thailand

Abstract: Microsporidiosis is an emerging and opportunistic disease in human and a wide range of animals. The disease is caused by Microsporidia, the obligate intracellular parasite which were reclassified from protozoa to fungi. *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis*are the most common species cause disease in immunocompromised individuals; however, they were identified in many animals from various areas including Thailand. This review article provides concept knowledge of the disease in humans and animals, the disease transmission, diagnosis and treatment.

Keywords: Microsporidiosis, Microsporidia, Emerging disease, Opportunistic disease

[#]Corresponding author

E-mail address: jitbanjo@yahoo.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(2): 125-136.

บทนำ

Microsporidiosis เป็นโรคที่เกิดจาก Microspora ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่เป็น obligate intracellular eukaryotes ซึ่งจะมีสปอร์ (spore) เป็นเชื้อระยะติดต่อโดยสปอร์จะมีขนาดเล็กเพียง 1-4 ไมครอน การติดต่อของโรคมักเกิดจากการได้รับ spore โดยการกินเข้าไปหรือหายใจหรือผ่านทางรก Microspora เคยถูกจัดว่าเป็นโปรโตซัว แต่ในปัจจุบันมีหลักฐานทางพันธุกรรมที่ยืนยันได้ว่ามันมีความใกล้เคียงกับเชื้อรามากกว่า Microspora จัดว่าเป็นเชื้อโรคฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) เนื่องจากมีโอกาสพบได้มากกว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายอวัยวะ เด็กเล็ก นักท่องเที่ยว ผู้ที่สวมใส่คอนแทคเลนส์ และผู้สูงอายุ (Annane and Attouchi, 2010) นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานการพบโรคในสัตว์อีกหลายชนิด เช่น สุนัข แมว สุกร โค ม้า กระต่าย แพะ ลา ไก่ นก

มีข้อถกเถียงเกี่ยวกับความสามารถในการก่อโรคของ Microspora เนื่องจากหลายรายงานพบว่าการติดเชื้อไม่ก่อให้เกิดโรคหรืออาการที่พบไม่สัมพันธ์กับการติดเชื้อ แต่ก็มีรายงานที่ทดลองและยืนยันการก่อโรคในสัตว์ Mathis *et al*. (2005) รายงานการก่อโรคของ *Encephalitozoon cuniculi* ในหนูทดลอง โดยในช่วงแรกของการติดเชื้อ พบอาการท้องมานอย่างอ่อนๆ หลังจากนั้นอาการจะหายไป สัตว์ไม่แสดงอาการผิดปกติ แต่นานๆ ครั้งจะพบอาการอัมพาต (paralysis) หรือหัวเอียง (torticollis หรือ head tilt) บ้างเป็นครั้งคราว Wichro *et al*. (2005)

รายงานอาการท้องเสียอย่างฉับพลันในนักท่องเที่ยวที่ติดเชื้อ ซึ่งอาการดังกล่าวจะหายไปเองแม้ไม่ได้รับการรักษา Kakrania *et al*. (2006) รายงานอาการ keratoconjunctivits ที่เกิดจากโรค microsporidiosis ในผู้ป่วยที่เพิ่งผ่าตัดกระจกตา

ปัจจุบันมีรายงานการก่อโรคของ Microspora จำนวน 14 species ในคน ชนิดที่สำคัญ ได้แก่ *Enterocytozoon bieneusi* และ *Encephalitozoon intestinalis* ซึ่งพบได้ตามธรรมดามากที่สุดในคนทั่วโลก *Encephalitozoon cuniculi* ซึ่งพบการก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดโดยเฉพาะกระต่าย สุนัขบ้าน สุนัขจิ้งจอกที่เลี้ยงในฟาร์ม รวมทั้งในคน และ *Encephalitozoon hellem* ซึ่งก็สามารถก่อโรคในคนได้เช่นกันแต่พบได้น้อยกว่า *E. bieneusi* และ *E. intestinalis* อาการของโรค microsporidiosis ที่พบในคนนั้นจะแปรผันตามชนิดของเชื้อและสภาวะภูมิคุ้มกันของโฮสต์ มักพบการป่วยด้วยเชื้อนี้ได้บ่อยในคนที่ติดเชื้อ HIV โดยจะทำให้มีอาการท้องเสียเรื้อรัง และพบว่าเชื้ออาจก่อให้เกิดอาการท้องเสียแบบเฉียบพลันได้ในคนปกติ ซึ่งอาการท้องเสียดังกล่าวมักหายได้เองแม้ไม่ได้รับการรักษา (ตารางที่ 1)

เชื้อ *Enterocytozoon bieneusi*

การติดเชื้อในคน

E. bineusi มีรายงานพบการก่อโรคครั้งแรกในปี 1985 เชื้อเป็นสาเหตุของอาการท้องเสียเรื้อรังในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ถึง 30-70% ของจำนวนผู้ป่วย โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มี CD_4 T cell น้อยกว่า 100 เซลล์ต่อเลือด 1 มม^3 ลักษณะอุจจาระของผู้ที่ติดเชื้อจะเหลวเป็นน้ำ ไม่มีเลือดหรือมูกปน แต่ก็มีรายงานของโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำที่ไม่ได้ติดเชื้อ HIV ด้วยเช่นกัน เช่นในผู้ป่วยที่เปลี่ยนหรือปลูกถ่ายอวัยวะ นอกจากนั้นยังมีรายงานการเกิดโรคในคนปกติและ

ตารางที่ 1 Microsporidial species ที่สำคัญที่ก่อโรคในคน (ดัดแปลงจาก Mathis *et al*., 2005)

ชนิด	จำนวนผู้ติดเชื้อ		ตำแหน่งที่ติดเชื้อ	ชนิดของโฮสต์
	ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำลง	คนที่มีภูมิคุ้มกันปกติ		
Enterocytozoon bieneusi	>1,000	<20	ลำไส้ ทางเดินน้ำดี ระบบทางเดินหายใจ	สัตว์มีกระดูกสันหลัง
Encephalitozoon hellem	<50	3	ตา ระบบทางเดินหายใจ ระบบปัสสาวะ ติดเชื้อทั่วทุกระบบ	สัตว์ปีก
Encephalitozoon intestinalis	<200	2	ลำไส้ ทางเดินน้ำดี ระบบทางเดินหายใจ กระดูก ผิวหนัง ติดเชื้อทั่วทุกระบบ	สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
Encephalitozoon cuniculi	<20	-	ติดเชื้อทั่วทุกระบบ ตา ระบบทางเดินหายใจ ระบบปัสสาวะ ตับ เยื่อบุช่องท้อง สมอง	สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

คนที่สุขภาพแข็งแรงดี และพบเป็นสาเหตุของ traveler's diarrhea อีกด้วย โดยสาเหตุหลักของการติดเชื้อ *E. bieneusi* เกิดจากการกินสปอร์เข้าไป แล้วสปอร์จะเข้าสู่เซลล์ enterocytes ของ duodenum และ jejunum ทำให้เกิด duodenitis และยังเคยมีรายงานว่าเชื้อเป็นสาเหตุของ cholangitis, cholecystitis และ sinusitis เนื่องจากการสำลัก intestinal content เข้าไป มีรายงานความชุกของโรค 3.9-20 % (Sulaiman *et al*., 2003, Wumba *et al*., 2012, Anane *et al*., 2011)

ในประเทศไทยยังมีรายงานของโรค microsporidiosis ไม่มากนัก Wanachiwanawin *et al*. (1998) รายงานความชุกของโรค 33.3% จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV 66 คน Viriyavejakul *et al*. (2009) รายงานความชุกของโรคสูงถึง 81.2% จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV 64 คน Mori *et al*. (2013b) รายงานความชุกของโรคในเด็กที่อยู่ในพื้นที่ชนบทในภาคตะวันตกของไทย 3.8% และในภาคเหนือ 2.9%

Watson *et al*. (1996) รายงานว่าการสัมผัสน้ำ เช่น การว่ายน้ำในแม่น้ำ การดื่มน้ำประปาโดยไม่ได้ผ่านการกรอง การใช้เครื่องปรับอากาศ และการสัมผัสใกล้ชิดคลุกคลีกับผู้ป่วยติดเชื้อ HIV เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดโรค microsporidiosis และ Hutin *et al*. (1998) รายงานว่าการว่ายน้ำในสระว่ายน้ำ การรักร่วมเพศ และการมี CD_4 T cell ต่ำกว่าระดับ 100 เซลล์ต่อ มม^3 เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดโรค Dascomb *et al*. (2000) รายงานว่าคนที่มีอาชีพที่ต้องเกี่ยวข้องกับน้ำ เช่น สัมผัสอ่างน้ำร้อน หรือสปา เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดโรคได้ด้วยเช่นกัน

การติดเชื้อในสัตว์

มีรายงานการตรวจพบเชื้อในสัตว์ครั้งแรกในปี 1996 จากอุจจาระของสุกร แล้วในปีต่อมาก็มีรายงานพบเชื้อในสัตว์ชนิดอื่น Breitenmoser *et al*. (1999) รายงานความชุกของโรค 35% ซึ่งตรวจด้วยวิธี PCR ในสุกร 109 ตัวจาก 22 ฟาร์ม ในประเทศสวิสเซอร์แลนด์ โดยอัตราการเกิดโรคจะสูงมากในกลุ่มลูกสุกรหย่านม อุจจาระของสุกรที่ติดเชื้อ 3 ตัว ซึ่งไม่แสดงอาการป่วย ได้นำมาตรวจหาสปอร์ของเชื้อ *E. bieneusi* ด้วยวิธี PCR สัปดาห์ละ 1 ครั้ง พบว่ามีสปอร์ของเชื้อถูกขับออกมาในอุจจาระของสุกร 67% ของจำนวนตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด ดังนั้นเชื้อ *E. bieneusi* จึงน่าจะเป็นปรสิตที่พบได้ตามปกติในสุกรที่ไม่ได้แสดงอาการป่วยใดๆ Buckholt *et al*. (2002) รายงานยืนยันการติดเชื้อ *E. bieneusi* ในสุกรสูงถึง 32% นอกจากนั้นมีหลายรายงานที่พบการติดเชื้อในลูกโค และสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น แมว สุนัข แพะ ลามะ บีเวอร์ สุนัขจิ้งจอก แรคคูน ไก่ นกพิราบ ลิง เป็นต้น

Leelayoova *et al*. (2009) รายงานว่า genotype ของเชื้อ *E. bieneusi* ที่พบในฟาร์มสุกรในภาคกลางของประเทศไทยเป็นชนิด O, E และ H ในขณะที่ genotype ที่พบในคนในพื้นที่เดียวกันเป็นชนิด A ซึ่งแสดงว่าไม่มีการติดต่อของ *E. bieneusi* ระหว่างคนและสัตว์ในพื้นที่ดังกล่าว Mori *et al*. (2013a) รายงานการพบ genotype A ของเชื้อ *E. bieneusi* ใน 25 ตัวอย่างจากตัวอย่างอุจจาระแมวทั้งหมด 80 ตัวอย่างซึ่งเก็บมาจากวัดในภาคกลางของประเทศไทย Prasertbun *et al*. (2017) รายงานชนิดของ genotype ที่พบในคนและสุกรในพื้นที่เดียวกันของภาคตะวันตกและภาคกลางของไทยว่ามีความคล้ายกัน แม้ว่ายังไม่มีหลักฐานแน่ชัดว่า genotype ที่พบในคนส่วนมากเป็น genotype ใดและสัตว์ชนิดใดมีความสำคัญในการเป็นรังโรค แต่มีการศึกษาที่แสดงว่าบาง genotype ของเชื้อ *E. bieneusi* ที่พบในสัตว์สามารถติดต่อสู่คนได้ (ตารางที่ 2)

เชื้อ *Encephalitozoon intestinalis*

การติดเชื้อในคน

เชื้อ *E. intestinalis* (ชื่อเดิม *Septata intestinalis*) เป็น microsporidia ที่พบก่อโรคในคนมากเป็นอันดับ 2 รองจาก *E. bieneusi* โดยมีรายงานความชุก 0.4-7.3 % ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV (Wumba *et al*., 2012, Saigal *et al*., 2013) วิธีการติดต่อของเชื้อนั้นยังไม่ทราบแน่ชัดเนื่องจากเชื้อสามารถก่อโรคได้หลายระบบ เช่น ระบบทางเดินอาหาร ระบบหายใจ ตา เป็นต้น แต่เนื่องจากสปอร์ของเชื้อถูกขับออกมาทางอุจจาระด้วย ดังนั้นการติดต่อของโรคอาจเกิดจากการกินสปอร์ที่ปนเปื้อนในอุจจาระเข้าไป หรือหายใจเอาสปอร์เข้าไป หรือการติดต่อจากแหล่งน้ำ แล้วสปอร์จะเข้าสู่ภายในเซลล์ epithelium ของลำไส้เล็กหรือระบบทางเดินหายใจ จะส่งผลให้เกิดอาการท้องเสีย เรื้อรังและน้ำหนักลดในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดต่อของโรคจาก trauma หรือการสัมผัสโดยตรงที่ตาในคน และมีรายงานการติดต่อของโรคผ่านทางรกในสัตว์ฟันแทะ สุนัข และลิง อีกด้วย แต่ยังไม่มีรายงานการติดต่อของโรคผ่านทางรกในคน

การติดเชื้อในสัตว์

Bornay-Llinares *et al*. (1998) รายงานการตรวจพบเชื้อ *E. intestinalis* ในตัวอย่างอุจจาระของแพะ สุกร โค สุนัขและลา 6 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 8 ตัวอย่างด้วยวิธี PCR (75%) Graczyk *et al*. (2002) ตรวจหาเชื้อ *E. intestinalis* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

ตารางที่ 2 แสดง genotype ของเชื้อ *E. bieneusi* ที่พบในคนหรือสัตว์ (ดัดแปลงจาก Rinder, 2004; Santin and Fayer, 2011)

Genotype (ชื่อพ้อง)	โฮสต์	พื้นที่ที่พบ
D	คน	ไทย อังกฤษ ไนเจอร์ เวียดนาม
	สุกร	สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น
	โค	สหรัฐอเมริกา
CAF1 (PEbE)	คน	ไนเจอร์
	สุกร	เกาหลี
EbpC (E, WL13, Peru4, WL17)	คน	ไทย
	สุกร	เยอรมนี
Type IV (K, Peru2, BEB5, BEB5-var, CMITS1, PtEBIII)	คน	อูกันดา ฝรั่งเศส
	โค	เกาหลี
	แมว	เยอรมนี
O	คน	ไทย
	สุกร	ไทย
PigEBITS7	คน	ไทย
	สุกร	สหรัฐอเมริกา
Peru6 (PtEB1, PtEB VII)	นก	โปรตุเกส

ปล่อยและในคนที่อาศัยอยู่บริเวณรอบๆ ในประเทศอูกันดา

ดังนั้นยังจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมว่าเชื้อ *E. intestinalis* นั้นสามารถพบได้ในสัตว์เลี้ยงหลายๆ ชนิดหรือไม่ และมีความสำคัญในทางระบาดวิทยาที่จะแพร่โรคมาสู่คนได้หรือไม่

เชื้อ Encephalitozoon cuniculi

การติดเชื้อในคน

Pan *et al*. (2015) รายงานความชุกของการติดเชื้อ *E. cuniculi* 9.76% ในคนที่สุขภาพแข็งแรงดีจากประเทศจีน นอกจากนี้มีรายงานการก่อโรคของเชื้อ *E. cuniculi* ในคนทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ HIV อยู่หลายรายงานซึ่งส่วนมากตำแหน่งที่มักพบเชื้อและเกิดโรคได้แก่ ไต ทางเดินหายใจ ปอด ตา และสมอง (ตารางที่ 3)

การติดเชื้อในสัตว์

มีรายงานการก่อโรคของเชื้อ *E. cuniculi* จำนวนมากมายในกระต่าย สัตว์กินเนื้อ ลิง ม้า แต่โฮสต์หลักนั้นเป็นที่รู้กันดี คือ กระต่าย

กระต่าย แม้ว่าส่วนมากการติดเชื้อ *E. cuniculi* ในกระต่ายมักเป็นแบบเรื้อรังหรือไม่แสดงอาการป่วย แต่ก็พบรายงานการเกิดโรค encephalitozoonosis ในกระต่ายทั่วโลก เนื่องจากรอยโรคที่พบมักเกิดขึ้นในระบบประสาทส่วนกลาง ไต และตา อาการของกระต่ายจึงมันเกี่ยวข้องกับระบบประสาท ไตวาย หรือ phacoclastic uveitis โดยอาจพบอาการอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างร่วมกันก็ได้ อาการทางประสาทที่พบได้บ่อยที่สุดได้แก่ vestibular disease ซึ่งมักมีอาการหัวเอียง (head tilt) และเดินตัวเซ (ataxia) (Jass *et al*., 2008)

ในกระต่ายพบว่า horizontal transmission โดยการกินสปอร์ของเชื้อเข้าไปสามารถเกิดขึ้นได้เป็นประจำ แต่ก็มีรายงานการติดเชื้อโดย intrauterine ด้วยเหมือนกัน Cox *et al*. (1979) ได้ทดลองให้กระต่ายได้รับเชื้อเข้าไปโดยการกิน แล้วพบว่าเกิดการขับสปอร์ออกมาทางปัสสาวะอย่างสม่ำเสมอนาน 38-63 วันหลังจากได้รับเชื้อ และหลังจากนั้นจะมีการขับเชื้อออกมาบ้างบางช่วงแต่จะมีปริมาณที่ต่ำลง ดังนั้นสัตว์ที่ติดเชื้อ *E. cuniculi* จึงจัดได้ว่ามีบทบาทสำคัญในทางระบาดวิทยาของโรคเนื่องจากสปอร์ของเชื้อ *E. cuniculi* มีความทนทานในสิ่งแวดล้อมมากและสามารถอยู่ได้นานหลายเดือน

สัตว์กินเนื้อ โรค canine encphalitozoonosis มักทำให้สุนัขแสดงอาการ encephalitis-nephritis syndrome ซึ่งอาจสับสนกับ canine distemper ได้ ส่วนในแมวมีรายงานการเกิดโรคน้อยมาก

ในสุนัขและสุนัขจิ้งจอกนั้น โรค encphalitozoonosis สามารถติดต่อได้ทั้งโดย horizontal และ vertical transmission เช่นกัน สุนัขและสุนัขจิ้งจอกที่ติดเชื้อโดยการกินสปอร์ โดยจะแสดงอาการแบบปานกลางและสัตว์ที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังก็เป็นแหล่งแพร่โรคที่ดี

ลิง มีรายงานการติดเชื้อและการแพร่กระจายของโรคใน stillborn และ squirrel monkeys ที่อายุน้อยซึ่งทำให้เกิดอัตราการป่วยสูงและสัตว์มีอาการสมองอักเสบ (encephalitis) รุนแรงด้วยในสหรัฐอเมริกา

จากคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันและเทคนิคทางอณูชีววิทยาพบว่าเชื้อ *E. cuniclui* อาจแบ่งได้เป็น 3 strain คือ Strain I = rabbit strain; Strain II = mouse strain; Strain III = dog strain (Kunzel and Joachim, 2010) ซึ่งมีรายงานพบเชื้อ strain II (mouse strain) ในสัตว์ฟันแทะและฟาร์มเลี้ยงสุนัข

ตารางที่ 3 ตัวอย่างรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *E. cuniculi* ที่ได้รับการยืนยันแล้ว (ดัดแปลงจาก Mathis *et al*., 2005)

ประเทศที่พบโรค	อาการ	ตำแหน่งของอวัยวะหรือชนิดของตัวอย่างที่พบเชื้อ	สายพันธุ์ที่พบ	ปีที่รายงาน
อังกฤษ	ปวดท้อง เบื่ออาหาร มีไข้ คลื่นไส้ อาเจียน ไอ ไตวาย	ไต ปัสสาวะ	III	1994
สหรัฐอเมริกา	มีไข้ ไอ อาเจียน นอนไม่หลับ คัดจมูก ตาแห้ง มองเห็นภาพไม่ชัด	ปัสสาวะ เสมหะ	III	1995
สวิสเซอร์แลนด์	ปวดศีรษะ การมองเห็นผิดปกติ คลื่นไส้ อาเจียน	น้ำไขสันหลัง อุจจาระ ปัสสาวะ เสมหะ	I	1997
สวิสเซอร์แลนด์	ไม่มีอาการ	ปัสสาวะ	I	1997
เม็กซิโก	ปอดอักเสบ หูอักเสบ	ปัสสาวะ เสมหะ อุจจาระ	III	1997
สวิสเซอร์แลนด์	เยื่อบุตาอักเสบ โพรงจมูกอักเสบ ชัก	ปัสสาวะ	I	1997
อิตาลี	โพรงจมูกอักเสบ กระจกตาและเยื่อบุตาอักเสบ	เนื้อเยื่อในช่องจมูก	I	1998
สเปน	มีไข้ ปวดท้อง ท้องเสีย	อุจจาระ ปัสสาวะ เสมหะ	III	2001
สหรัฐอเมริกา	หายใจลำบาก	ชิ้นเนื้อจากปอด	III	2004

จิ้งจอกสีน้ำเงิน ส่วนรายงานการพบเชื้อในกระต่ายตามธรรมชาติทั้งหมดเป็นเชื้อ strain I และรายงานการพบเชื้อในสุนัขทั้งหมดก็เป็นเชื้อ strain III อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า *E. cuniculi* strain II และ III สามารถติดต่อไปยังกระต่ายได้ และ *E. cuniculi* ที่แยกได้จากคนสามารถติดต่อไปยังกระต่ายได้เช่นกัน ส่วนในคนมีรายงานการติดเชื้อ 2 strains โดยติดเชื้อ strain I พบในยุโรป ส่วน strain III พบในอเมริกาและยุโรป (Mathis *et al*., 1997)

เชื้อ *Encephalitozoon hellem*

การติดเชื้อในคน

ส่วน *E. hellem* ถูกพบในปี 1990 โดยพบเป็นสาเหตุของ keratoconjunctivitis ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV นอกจากนั้นยังพบเชื้อนี้เป็นปรสิตได้ในระบบทางเดินหายใจ ระบบปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ของผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันลดลง (Weber *et al*., 1992) ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่มีการติดเชื้อ *E.hellem* แบบกระจายทั่วร่างกายนั้นมีรายงานการพบสปอร์จาก

เสมหะ สิ่งคัดหลั่งจากจมูก และปัสสาวะ (Weber *et al*., 1993)

การติดเชื้อในสัตว์

มีรายงานการพบเชื้อ *E. hellem* หลายรายงานในสัตว์ปีก เช่น budgerigar chicks, eclectus parrots, Horned puffin chicks, lovebirds (Pulparampil *et al*., 1998, Snowden K., *et al*., 2000) วิธีการถ่ายทอดเชื้อ *E. hellem* ในสัตว์ปีกนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากการที่พบสปอร์ของเชื้อที่ไตและลำไส้ของสัตว์ปีกจึงอาจเป็นไปได้ว่าสปอร์จะถูกขับออกมาพร้อมอุจจาระของสัตว์ปีก

Microsporidia อื่นๆ

มี microsporidia อีกหลายชนิดที่พบว่าอาจเป็นสาเหตุก่อโรคในคนบ้างนานๆ ครั้ง โดยทำให้เกิดอาการ ติดเชื้อที่ตา, myopathies, ติดเชื้อที่ลำไส้ หรือติดเชื้อแบบแพร่กระจาย เช่น *Vittaforma corneae*, *Pleistophora ronneafiei*, *Trachipleistophora hominis*, *Trachipleistophora anthropophthera*, *Brachiola algerae*, *Brachiola connori*, *Brachiola vesicularum*, *Nosema ocularum*, *Microsporidium ceylonensis*, *Microsporidium africanum*

ระบาดวิทยา

จากการทดลองของ Waller (1979) รายงานว่าสปอร์ของเชื้อ *E. cuniculi* ยังคงสามารถติดต่อเข้าสู่โฮสต์ได้แม้จะอยู่ในที่อุณหภูมิ 4°C นาน 98 วัน Shadduck and Polley (1978) พบว่าการใส่เชื้อ *E. cuniculi* ในน้ำกลั่นหรือการ freezing and thawing ไม่สามารถทำลายสปอร์ของ *E. cuniculi* ได้ Li *et al*. (2003) ทดลองนำเชื้อ *E. intestinalis* และ *E. hellem* ใส่ลงในน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 10-30°C นานเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน เชื้อก็ยังสามารถที่จะติดต่อเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ จากการทดลองเหล่านี้ พอสรุปได้ว่า microsporidia สามารถอยู่รอดได้ในน้ำจืด น้ำเค็ม หรือในที่แห้ง ดังนั้นจึงเพิ่มโอกาสเสี่ยงที่โฮสต์จะติดเชื้อได้มากขึ้น

การติดต่อ

1. vertical transmission

ยังไม่เคยมีรายงานการติดต่อแบบ vertical transmission ของโรคเกิดขึ้นในคน แต่มีรายงานในสัตว์ฟันแทะ กระต่าย สัตว์กินเนื้อและ non-human primates (Snowden *et al*., 1998)

2. horizontal transmission

การพบเชื้อ microsporidia อยู่ในระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหารของโฮสต์ และการพบสปอร์ถูกขับออกมาในปัสสาวะและอุจจาระของโฮสต์ บ่งชี้ว่าการได้รับเชื้อจากโฮสต์อาจเกิดขึ้นได้จาก การปนเปื้อนของอุจจาระที่มีสปอร์เข้าไปทางปาก การหายใจเอาสปอร์เข้าไป และการกินอาหารหรือน้ำที่มีสปอร์ปนเปื้อน

3. zoonotic transmission

McInnes and Stewart (1991) รายงานพบการเกิด zoonotic transmission ของโรค microsporidiosis ในเด็กที่สัมผัสกับลูกสุนัขที่ติดเชื้อ *E. cuniculi*

การตรวจวินิจฉัย

1. การตรวจหาเชื้อ microsporidia โดยตรง

ส่วนมากนิยมตรวจหาเชื้อในอุจจาระ แต่ก็สามารถตรวจจากปัสสาวะ เนื้อเยื่อลำไส้ ของเหลวจากหลอดลม น้ำไขสันหลัง เยื่อบุตา หรือเสมหะได้ สี

ที่นิยมใช้ในการย้อมตรวจมากที่สุดได้แก่ Weber's trichromic stain และ fluorochrome stain ซึ่งจะไปจับกับไคตินของสปอร์

ข้อจำกัดของวิธีการตรวจแบบนี้ คือสปอร์ของเชื้อมีขนาดเล็กและไม่มีคุณสมบัติเฉพาะที่พบได้จากการย้อมสี ทำให้การตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์นั้นทำได้ยาก นอกจากนั้นการขับ spore ของเชื้อมักเกิดขึ้นแบบเป็นช่วงเวลาที่ไม่แน่นอน จึงควรต้องเก็บตัวอย่างซ้ำหลายๆ ครั้ง ซ้ำวิธีนี้ยังไม่สามารถใช้จำแนก species ของเชื้อได้

2. การตรวจด้วย Transmission electron microscopy (TEM) ช่วยยืนยันการตรวจวินิจฉัยและจำแนก species ของเชื้อได้ ใช้ตรวจได้ทั้งในเนื้อเยื่อของเหลว และอุจจาระ

3. การตรวจด้วย PCR สามารถใช้จำแนก species ของเชื้อได้

4. การตรวจโดยวิธี Indirect immunofluorescence ซึ่งใช้ monoclonal antibody ในการตรวจและพบว่าได้ผลดี

การป้องกัน

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV หรือผู้ป่วยที่ผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะ ถือว่าเป็นผู้ที่มีโอกาสที่จะติดเชื้อแล้วแสดงอาการป่วย ควรดื่มน้ำสะอาดจากขวดหรือน้ำต้มสุก หมั่นล้างมือ ควรบริโภคเนื้อสัตว์ที่ปรุงสุก ล้างผักสดผลไม้ให้สะอาดก่อนบริโภค และควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสคลุกคลีกับสัตว์ที่สงสัยว่าอาจติดเชื้อ microsporidia

การรักษา

ปัจจุบันยาที่ใช้รักษา microsporidiosis ได้ผลดี คือ albendazole และ fumagillin โดย albendazole ใช้รักษา encephalitozoonosis ได้ผลดีทั้งในคนและในสัตว์ แต่ให้ผลไม่ดีสำหรับเชื้อ *E. bieneusi* สำหรับ fumagillin ให้ผลดีเมื่อใช้แบบ topical รักษาอาการกระจกตาและเยื่อบุตาอักเสบที่เกิดจากเชื้อ *Encephalitozoon* spp. แต่เมื่อใช้แบบ systemic จะค่อนข้างเป็นพิษและมีผลข้างเคียงมาก

References

Anane, S. and Attouchi, H. 2010. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 34(8-9): 450-464.

Anane, S., Kaouech, E., Belhadj, S., Abdelmalek, R., Ammari, L., Ben Othman, T., Bejaoui, M., Ben Chaabane, T., Kallel, K. and Chaker, E. 2011. Identification of *Enterocytozoon bieneusi* by PCR in stools of Tunisian immunocompromised patients. *Pathol. Biol (Paris).* 59(4): 234-239.

Bornay-Llinares, F.J., da Silva, A.J., Moura, H., Schwartz, D.A., Visvesvara, G.S., Pieniazek, N.J., Cruz-López, A., Hernández-Jaúregui, P., Guerrero, J. and Enriquez, F.J. 1998. Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *J. Infect. Dis.* 178(3): 820-826.

Breitenmoser, A.C., Mathis, A., Bürgi, E., Weber, R. and Deplazes, P. 1999. High

prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. *Parasitology.* 118 (Pt 5): 447-453.

Buckholt, M.A., Lee, J.H. and Tzipori, S. 2002. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5): 2595-2599.

Cox, J.C., Hamilton, R.C. and Attwood, H.D. 1979. An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *J. Protozool*. 26(2): 260-265.

Dascomb, K., Frazer, T., Clark, R.A., Kissinger, P. and Didier, E. 2000. Microsporidiosis and HIV. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 24(3): 290-292.

Graczyk, T.K., Bosco-Nizeyi, J., da Silva, A.J., Moura, I.N., Pieniazek, N.J., Cranfield, M.R. and Lindquist, H.D. 2002. A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. *Parasitol Res.* 88(10): 926-931.

Hutin, Y.J., Sombardier, M.N., Liguory, O., Sarfati, C., Derouin, F., Modaï, J. and Molina, J.M. 1998. Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *J. Infect. Dis.* 178(3): 904-907.

Jass, A., Matiasek, K., Henke, J., Küchenhoff, H., Hartmann, K. and Fischer, A. 2008. Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected encephalito-zoonosis. *Vet. Rec*. 162(19): 618-622.

Kakrania, R., Joseph, J., Vaddavalli, P.K., Gangopadhyay, N. and Sharma, S. 2006. Microsporidia keratoconjunctivitis in a corneal graft. Eye (Lond). 20(11): 1314-1315.

Künzel, F. and Joachim, A. 2010. Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitol. Res*. 106(2):299-309.

Leelayoova, S., Piyaraj, P., Subrungruang, I., Pagornrat, W., Naaglor, T., Phumklan, S., Taamasri, P., Suwanasri, J. and Mungthin, M. 2009. Genotypic characterization of Enterocytozoon bieneusi in specimens from pigs and humans in a pig farm community in Central Thailand. *J. Clin. Microbiol*. 47(5): 1572-1574.

Li, X., Palmer, R., Trout, J.M. and Fayer R. 2003. Infectivity of microsporidia spores storedin water at environmental temperatures. *J. Parasitol*. 89(1):185-188.

Mathis, A., Weber, R. and Deplazes, P. 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(3): 423-445.

Mathis, A., Michel, M., Kuster, H., Müller, C., Weber, R. and Deplazes, P. 1997. Two Encephalitozoon cuniculi strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitol.* 114 (Pt 1):29-35.

McInnes, E.F. and Stewart, C.G. 1991. The pathology of subclinical infection of Encephalitozoon cuniculi in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 62(2):51-4.

Mori, H., Mahittikorn, A., Thammasonthijarern, N., Chaisiri, K., Rojekittikhun, W. and Sukthana, Y. 2013a. Presence of zoonotic Enterocytozoon bieneusi in cats in a temple in central Thailand. *Vet. Parasitol.* 197(3-4): 696-701.

Mori, H., Mahittikorn, A., Watthanakulpanich, D., Komalamisra, C. and Sukthana, Y. 2013b. Zoonotic potential of Enterocytozoon bieneusi among children in rural communities in Thailand. *Parasite*. 20:14.

Pan, Y., Wang, S., Liu, X., Li, R., Sun, Y. and Gadahi, J.A. 2015. Seroprevalence of Encephalitozoon cuniculi in Humans and Rabbits in China. *Iran. J. Parasitol.* 10(2): 290-295.

Prasertbun, R., Mori, H., Pintong, A.R,, Sanyanusin, S., Popruk, S., Komalamisra, C., Changbunjong, T., Buddhirongawatr, R., Sukthana, Y. and Mahittikorn, A. 2017. Zoonotic potential of Enterocytozoon genotypes in humans and pigs in Thailand. *Vet. Parasitol*. 233:73-79.

Pulparampil, N., Graham, D., Phalen, D. and Snowden, K. 1998. Encephalitozoon hellem in two eclectus parrots (Eclectus roratus): identification from archival tissues. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45(6): 651-655.

Rinder, H. 2004. Transmission of microsporidia to humans: Water-borne, food-borne, air-borne, zoonotic, or anthroponotic? *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health*. 35 (Suppl1): 54-57

Saigal, K., Sharma, A., Sehgal, R., Sharma, P., Malla, N. and Khurana, S. 2013. Intestinal microsporidiosis in India: a two year study. *Parasitol. Int.* 62(1): 53-56.

Santín, M. and Fayer, R. 2011. Microsporidiosis: Enterocytozoon bieneusi in domesticated and wild animals. *Res. Vet. Sci*. 90(3): 363-371

Shadduck, J.A. and Polley, M.B. 1978. Some factors influencing the in vitro infectivity and replication of Encephalitozoon cuniculi. *J. Protozool.* 25(4): 491-496.

Snowden, K.F., Logan, K. and Phalen, D.N. 2000. Isolation and characterization of an avian isolate of Encephalitozoon hellem. *Parasitol.* 121 (Pt 1): 9-14.

Snowden, K.F., Didier, E.S., Orenstein, J.M. and Shadduck, J.A. 1998. Animal models of human microsporidial infections. *Lab. Anim. Sci.* 48(6): 589-592.

Sulaiman, I.M., Bern, C., Gilman, R., Cama, V., Kawai, V., Vargas, D., Ticona, E., Vivar, A. and Xiao, L. 2003. A molecular biologic study of Enterocytozoon bieneusi in HIV-infected patients in Lima, Peru. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50 Suppl: 591-596.

Viriyavejakul, P., Nintasen, R., Punsawad, C., Chaisri, U., Punpoowong, B. and Riganti, M. 2009. High prevalence of Microsporidium infection in HIV-infected patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 40(2): 223-228.

Waller, T. 1979. Sensitivity of Encephalitozoon cuniculi to various temperatures, disinfectants and drugs. *Lab. Anim.* 13(3): 227-230.

Wanachiwanawin, D., Manatsathit, S., Lertlaituan, P., Thakerngpol, K. and Suwanagool, P. 1998. Intestinal microsporidiosis in HIV infected patients with chronic diarrhea in Thailand. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health*. 29(4): 767-771.

Watson, D. R. A., Asmuth, D. and Wanke, C.A. 1996. Environmental risk factors for acquisition of microsporidia in HIV-infected persons. In Proceedings of the 34th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, New Orleans, La., p. 67. Infectious Diseases Society of America, New Orleans, La.

Weber, R., Kuster, H., Visvesvara, G.S., Bryan, R.T., Schwartz, D.A. and Lüthy, R. 1993. Disseminated microsporidiosis due to Encephalitozoon hellem: pulmonary colonization, microhematuria, and mild conjunctivitis in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 17(3): 415-419.

Wichro, E., Hoelzl, D., Krause, R., Bertha, G., Reinthaler, F. and Wenisch, C. 2005. Microsporidiosis in travel-associated chronic diarrhea in immune-competent patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 73(2): 285-287.

Wumba, R., Longo-Mbenza, B., Menotti, J., Mandina, M., Kintoki, F., Situakibanza, N.H., Kakicha, M.K., Zanga, J., Mbanzulu-Makola, K., Nseka, T., Mukendi, J.P., Kendjo, E., Sala, J. and Thellier, M. 2012. Epidemiology, clinical, immune, and molecular profiles of microsporidiosis and cryptosporidiosis among HIV/AIDS patients. *Int. J. Gen. Med*. 5: 603-611.

JMVM
JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

ISSN: 1905-7571