รายงานการวิจัย

การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยริกเก็ตเซียในเลือดสุนัขชนิด *Ehrlichia canis* ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

Molecular detection of canine blood rickettsia *Ehrlichia canis*

คณะผู้วิจัย

นิจจารีย์ญา ศิริศรีโร Nijjareeya Sirisriro
พรปวีณ์ วงศ์กูล Pornpavee Wongkul
กันติชา แก้วกับเพชร Kanticha Krewkabpeth

คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากจากมหาวิทยาเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบวิจัยทุนรายได้ประจำปี พ.ศ. 2562

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยริกเก็ตเซียในเลือดสุนัขชนิด *Ehrlichia canis* ในสุนัขด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล” ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2562 ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2563 เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อก่อให้เกิดเทคนิคตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อที่สามารถตรวจได้รวดเร็วและแม่นยำ มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ให้บริการแก่เจ้าของสัตว์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสัตวแพทย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดการวิจัย ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีสมตามความตั้งใจ

นิจจารีย์ญา ศิริศรีโร

กันยายน 2563

การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยริกเก็ตเซียในเลือดสุนัข ชนิด *Ehrlichia canis* ในสุนัขด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

นิจจารีย์ญา ศิริศรีโร[1], พรปวีณ์ วงศ์กูล[2], และ กันติชา แก้วกับเพชร[2]

บทคัดย่อ

Ehrlichia canis เป็นริกเก็ตเซียที่เป็นสาเหตุของโรค Canine Ehrlichiosis หรือ Canine Monocytic Ehrlichiosis มักพบเชื้อในเม็ดเลือดขาว มีผลให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุนัขอ่อนแอ ติดเชื้อจุลชีพอื่นแทรกซ้อนได้ง่าย สุนัขที่ได้รับเชื้ออาจจะแสดงอาการรุนแรง ถึงตายได้ หรือไม่แสดงอาการ แต่เป็นตัวกักโรคไว้ การวินิจฉัยโรคจะขึ้นกับการตรวจพบเชื้อในเม็ดเลือดขาว ซึ่งมักจะมีระดับต่ำ ทำให้วินิจฉัยได้ยาก งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยการติดริกเก็ตเซียโดยมี *Ehrlichia canis* major immunodominant protein gp36 gene เป็นเป้าหมายใน PCR ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมามีความจำเพาะและ และมีความไวในการตรวจที่ระดับ 0.001 ng/µl ของดีเอ็นเอเป้าหมาย สามารถนำไปใช้ในการตรวจตัวอย่างเลือดทางคลินิกได้

คำสำคัญ: เออร์ริชิโอซิส เออร์ริเชีย เคนิส สุนัข การตรวจวินิจฉัย

---

[1]อาจารย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย จ.นครศรีธรรมราช

[2]นักวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย จ.นครศรีธรรมราช

Molecular detection of canine blood rickettsia *Ehrlichia canis*

Nijjareeya Sirisriro[1], Pornpavee Wongkul[1], and Kanticha Krewkabpeth[1]

Abstract

Ehrlichia canis is the main cause of Canine Ehrlichiosis or Canine Monocytic Ehrlichiosis, which infected in white blood cell. *Ehrlichia canis* infection diminishes canine immune system reflecting in weakness, secondary infection and death in severe cases. As a minute intracellular parasite, it is a problematic diagnosis in the conventional microscopic examination. To improve the efficiency of diagnostic technique is the objective of the research. The novel target of *Ehrlichia canis* major immunodominant protein gp36 gene for PCR detection was investigated. Sensitivity were revealed at 0.001 ng/µl of target DNA. There was no cross reactivity to *Anaplasma platys* or *Babesia canis* infected samples.

Keywords: Canine Ehrlichiosis, *Ehrlichia canis*, detection

[1]Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย	ช
บทนำ	1
1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
2. ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
วิธีการดำเนินการวิจัย	6
ผลการวิจัย และอภิปรายผล	9
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	16
บรรณานุกรม	18

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบ *Ehrlichia canis* genome	5
2	ไพร์เมอร์ที่ออกแบบสำหรับทดสอบเทคนิค PCR	11

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	*Ehrlichia canis* ในเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล	4
2	วงจรการเจริญของ *Ehrlichia canis* ในสุนัขและในเห็บ	4
3	จีโนมของ *Ehrlichia canis* (GenBank Assembly: GCA_000012565.1)	5
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Ehrlichia canis major immunodominant protein (gp36) gene	11
5	การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค PCR	12
6	การทดสอบความไวของเทคนิค PCR	13
7	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ Ehrlichia canis major immunodominant protein (gp36) gene	14
8	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *Ehrlichia canis* major immunodominant protein (gp36) gene	15

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

μl	=	Microliter
μM	=	Micromolar
BLAST	=	Basic Local Alignment Search Tool
bp	=	Base pair
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleic acid
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
kDa	=	Kilodalton
M	=	Molar
$MgCl_2$	=	Magnesium chloride
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimolar
NCR	=	Non-coding region
ng	=	nanogram
NS	=	Non-structural protein
nt	=	Nucleotide
OD	=	Optical density
RNA	=	Ribonucleic acid
SDS	=	Sodium Dodecyl Sulfate

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

Ehrlichia canis เป็นริกเก็ตเซียที่เป็นสาเหตุของโรค Ehrlichiosis มักพบเชื้อในเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte หรือ macrophage และ neutrophil มีเห็บเป็นพาหะในการนำเชื้อมาสู่สุนัข ในประเทศไทยเห็บที่เป็นพาหะคือ *Rhipicephalus sanguineus* หรือเห็บสีน้ำตาล ข้อสังเกตคือเห็บที่เป็นพาหะของปรสิตในเลือดได้หลายชนิด ดังนั้นจึงมีโอกาสพบการติดเชื้อหลายชนิดร่วมกันตามธรรมชาติเชื้อจึงมีความเป็นได้ (Aktas et al.,2017, Alvarado-Rybak et al.,2016, Jittapalapong et al., 2006) ริกเก็ตเซีย *Ehrlichia canis* ทำลายเม็ดเลือดขาว มีผลให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสุนัขอ่อนแอ ติดเชื้อจุลชีพอื่นแทรกซ้อนได้ง่าย สุนัขที่ได้รับเชื้ออาจจะแสดงอาการรุนแรง ถึงตายได้ หรือไม่แสดงอาการ แต่เป็นตัวกักโรคไว้ การวินิจฉัยโรคจะขึ้นกับการตรวจพบเชื้อในเม็ดเลือดขาว ซึ่งมักจะมีระดับต่ำ ทำให้วินิจฉัยได้ยาก ทั้งนี้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี thin blood smears นั้น ต้องอาศัยผู้ที่ชำนาญในการระบุรูปร่างของเชื้อ หรือในกรณีของการติดเชื้อในปริมาณน้อยอาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาใช้เพื่อเพิ่มความแม่นยำและรวดเร็วในการวินิจฉัยและรักษา (ดานัย 2553, Azmi et al.,2017)

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นการพัฒนาการตรวจหาริกเก็ตเซีย *Ehrlichia canis* ในเลือดสุนัขด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล มุ่งหวังการพัฒนาวิธีการวินิจฉัย เพื่อให้บริการกับประชาชนที่เข้ามาใช้บริการในโรงพยาบาลสัตว์ และคลินิกสัตวแพทย์ รวมทั้งยังเอื้อประโยชน์ให้กับสัตวแพทย์และนักเทคนิคการสัตวแพทย์ที่ทำงานด้านการวินิจฉัยโรคด้วย

2. ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ehrlichia canis เป็นสาเหตุของโรค Canine Ehrlichiosis หรือ Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) ในสุนัข เชื้อ Ehrlichia spp จัดเป็น alphaproteobacteria ใน Family Ehrichiaceae (Barbosa et al., 2017) โรค CME มีการติดต่อโดยอาศัยเห็บสีน้ำตาล (Rhipicephalus sanguineus) เช่นเดียวกับ Hepatozoon canis ซึ่งการถ่ายทอดเชื้อในเห็บเป็นแบบ transstadial transmission คือเห็บสามารถนำเชื้อได้ทุกระยะของการเจริญ ตั้งแต่ระยะตัวอ่อน (larva) ตัวกลางวัย (nymph) และตัวเต็มวัย (adult) แตไม่สามารถส่งผ่านแบบ transovarial

transmission ได้ (Movilla et al.,2017, Kaewmongkol et al.,2017) ภายหลังจากเชื้อ *E. canis* เข้าสู่ร่างกายสุนัขแล้วจะก่อให้เกิดอาการแตกต่างกันตามระยะการเจริญของเชื้อ ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้

1) ระยะเฉียบพลัน (acute) เป็นระยะฟักตัวอยู่ที่ 8-20 วัน เชื้อจะเข้าไปเพิ่มจำนวน ใน reticuloendothelial cells, lymphocyte และ monocyte ลักษณะของเชื้อที่พบใน monocyte จะมีอยู่ 3 รูปแบบ elementary body เชื้อจะมีขนาดประมาณ 0.5 ไมครอน ต่อมาจะมีการแบ่งตัวเพิ่มขนาดเป็น initial body จะมีขนาดใหญ่ขึ้น ประมาณ 1-2.5 ไมครอน และ morulae เชื้อจะมีขนาดใหญ่มากกว่า 4 ไมครอน เห็นได้ชัดเจน ในระยะนี้สุนัขจะเกิดภาวะ thrombocytopenia สุนัขจะมีไข้สูง ซึม เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย อาจจะมีจุดเลือดออกตามผิวหนัง อาจเกิดค subretinal hemorrhage และ retinal detachment นอกจากนี้สุนัขบางตัวอาจ จะมีเกิดความผิดปกติของระบบประสาทร่วมด้วยได้เช่น การเกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบหรือ เกิดเลือดออกที่เยื่อหุ้มสมอง (Parashar et al., 2016)

2) ระยะต่อมาเป็นระยะที่ *E. canis* เข้าสู่ไขกระดูก ระยะนี้การสร้างเม็ดเลือดจะถูกกด เกิดภาวะ pancytopenia ภูมิคุ้มกันจะอ่อนแอ ทำให้สุนัขติดเชื้อแทรกซ้อนและตายได้ง่าย

3) ระยะสุดท้าย เป็นระยะที่พบได้บ่อยในสุนัขที่เคยเป็นโรค และยังรักษาไม่หายขาด ยังมี *E. canis* อยู่ในไขกระดูก คือ ระยะไม่ปรากฏอาการทางคลินิก (subclinical) และระยะเรื้อรัง อาการที่พบได้ คือ เยื่อเมือกซีด น้ำหนักลด อ่อนเพลีย มักเป็น ๆ หาย ๆ รวมถึงการมีเลือดกำเดาออกรูจมูกข้างเดียว (unilateral epistaxis) (Kaewmongkol et al.,2017, Kottadamane et al.,2017)

สำหรับการวินิจฉัยโรค Hepatozoonosis และ Ehrlichiosis สามารถทำได้หลายวิธีร่วมกัน ดังนี้

1. การตรวจด้วยวิธี buffy coat smear ย้อมด้วยสี Wright’s giemsa หรือ Giemsa เพื่อตรวจหาเชื้อใน neutrophil และ monocyte วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ ผู้ตรวจต้องมีความชำนาญในการจำแนกชนิดเม็ดเลือดขาว และวิเคราะห์ลักษณะของเชื้อที่พบในเซลล์ (ปิยะนันท์ 2555)

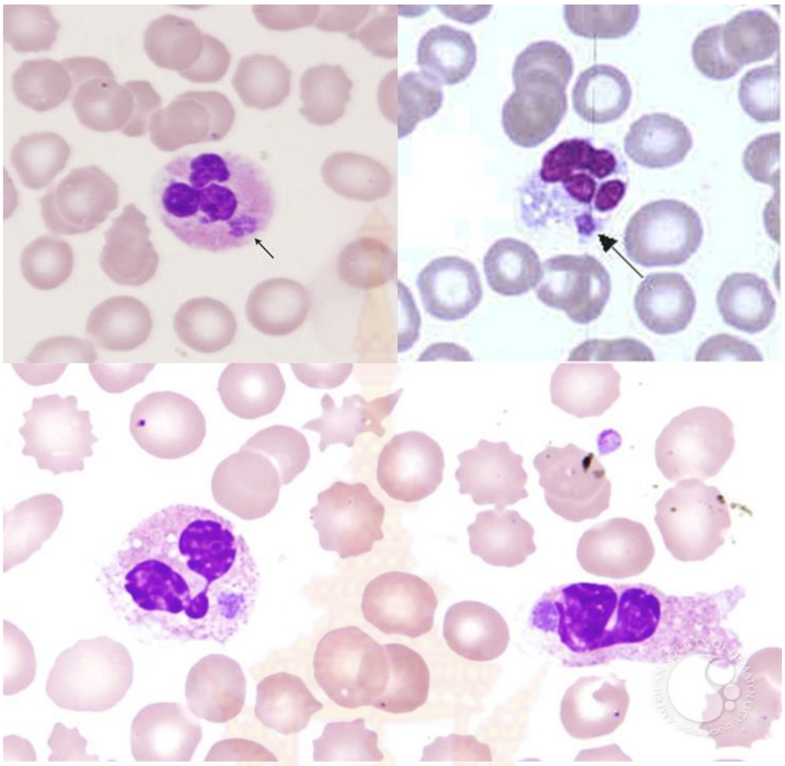
2. การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา วิธีนี้อาศัยหลักการจับกันของ antigen ของเชื้อ กับ antibody ของสุนัข ภายหลังจากที่เชื้อเข้าสู่ร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันจะสร้าง immunoglobulin

G ภายใน 10-14 วัน ซึ่งถ้าตรวจก่อน ผลที่ได้จะเป็น false negative ในขณะที่ภูมิคุ้มกันของสุนัขที่ได้รับเชื้อจะอยู่ได้นานถึง 6 เดือน หลังจากได้รับการรักษาแล้ว ในกรณีนี้การตรวจจะให้ผล false positive (ปิยะนันท์ 2555)

3. การตรวจด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล เช่น PCR, realtime PCR เป็นต้น เป็นวิธีที่ใช้หลักการการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ เป้าหมายของการตรวจคือยีนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ เช่น ใน *E. canis* มักจะใช้ 16S rRNA (Santos-Silva et al., 2017, Suh et al.,2017, Movilla et al.,2017) หรือ trp36 gene (Suh et al.,2017, Movilla et al.,2017) เป็นเป้าหมายในการตรวจ

3. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย/ โครงการวิจัย

พัฒนาวิธีการวินิจฉัย Ehrlichiosis ที่เกิดจากริกเก็ตเซีย *E. canis* ให้มีความจำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ในประเทศไทย

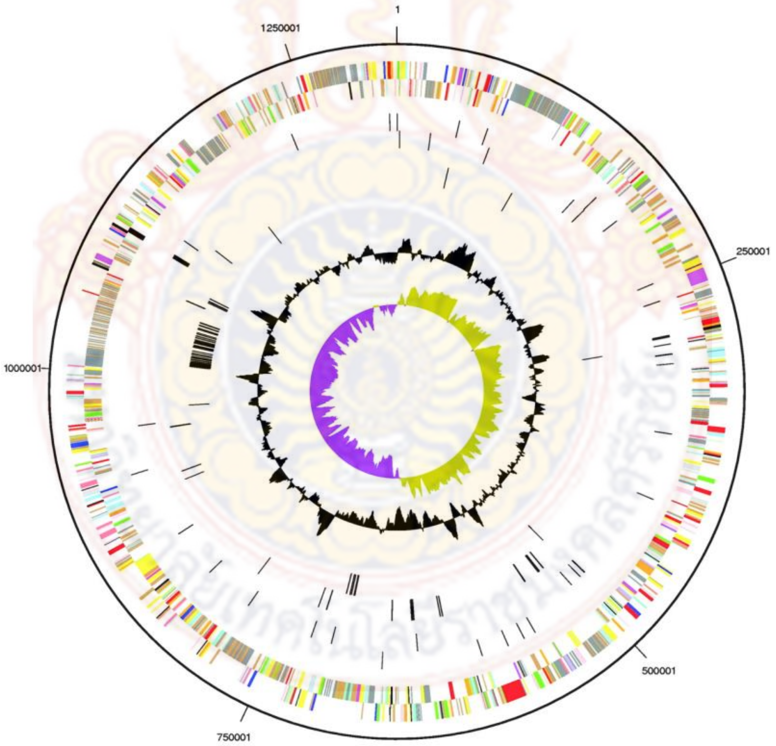


รูปที่ 1 *Ehrlichia canis* ในเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล (https://imagebank.hematology.org)

รูปที่ 2 วงจรการเจริญของ *Ehrlichia canis* ในสุนัขและในเห็บ (https://www.fecava.org)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบ *Ehrlichia canis* genome

Name/Gene ID	Description
Genes (total)	988
Genes (coding)	928
CDSs (with protein)	928
Genes (RNA)	42
rRNAs	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)



รูปที่ 3 จีโนมของ *Ehrlichia canis* (GenBank Assembly: GCA_000012565.1, Mavromatis, et al., 2006)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเลือดสุนัข

พื้นที่ในการศึกษาได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช ตรัง สุราษฎร์ธานี และกระบี่ สุนัขที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 152 ตัว มีอายุประมาณ 1 ปี - 10 ปี ไม่จำกัดเพศ ระยะเวลาเก็บตัวอย่างในปีพฤศจิกายน 2561 - เมษายน 2563 การเก็บตัวอย่างจะเก็บในหลอดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวชนิด Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณขาหน้าปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร โดยเลือดปริมาณ 200 µl จะนำไปสกัด DNA และเลือดที่เหลือนำไปตรวจด้วยวิธีแผ่นฟิล์มเลือดและย้อมสี เพื่อตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

2. การสกัดสารพันธุกรรม

การสกัดสารพันธุกรรมจากเลือดและเม็ดเลือดขาวจะใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Kit (ThermoFisher, USA) โดยขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจะปฏิบัติตามคู่มือของบริษัท หลังจากสกัดแล้วจะทำการวัดปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้จะทำการเก็บรักษาที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3. เทคนิค PCR

3.1 การออกแบบไพร์เมอร์สำหรับ PCR (PCR primer)

ในการออกแบบไพร์เมอร์ (forward และ backward primer) จะใช้โปรแกรม PrimerBlast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) โดยมีเป้าหมายคือ *Ehrlichia canis* isolate CM196 major immunodominant protein (gp36) gene (ACCESSION MF771085.1, Nambooppha et al., 2018) ในการออกแบบจะคัดเลือกไพร์เมอร์ 2 – 3 คู่มาใช้สำหรับทดสอบและประเมินกับกลุ่มควบคุมบวก จากนั้นเลือก 1 – 2 คู่เพื่อใช้ทดสอบกับตัวอย่างจริงต่อไป

3.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR

การทำ PCR จะใช้ชุดเอนไซม์และบัฟเฟอร์ TopTaq Master Mix Kit (Qiagen, USA) ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 µl ประกอบด้วย

Component	Volume/reaction	Final concentration
10x TopTaq PCR Buffer*	5 µl	1X
dNTP mix (10 mM of each)	1 µl	200 µM of each dNTP
Primer A	Variable	0.1–0.5 µM
Primer B	Variable	0.1–0.5 µM
TopTaq DNA Polymerase	0.25 µl	1.25 units/reaction
DNA Template DNA	Variable	50 ng/ reaction
RNase-free water Template	Add to 50 µl	

ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะมีรอบการทำงานดังนี้

Initial denaturation	3 min 94^{O}C
3 step cycling : 35 cycles	
Denaturation	30 sec 94^{O}C
Annealing	30 sec 61^{O}C
Extension	1 min 72^{O}C
Final extention	10 min 72^{O}C

ในการอ่านผล PCR จะนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไปทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิคการแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) ที่ 1.5% agarose gel ใน Tris-Boric acid-EDTA buffer (TBE) ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตด้วยการย้อม SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, USA) และส่องดูด้วยแสงสีฟ้า (Blue-light transilluminator)

3.3 การทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิค PCR

ในการทดสอบความสามารถของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาว่าสามารถตรวจหา *Ehrlichia canis* isolate CM196 major immunodominant protein (gp36) gene (ACCESSION MF771085.1, Nambooppha et al., 2018) ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำเพียงใด จะทำโดยการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นเชื้อในกระแสเลือดสุนัขที่มีรายงานในประเทศไทย ซึ่งได้แก่ *Anaplasma platys*, *Babesia canis* และน้ำกลั่น

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การพัฒนาเทคนิค PCR ที่มีความจำเพาะต่อยีน *Ehrlichia canis* major immunodominant protein (gp36) gene (ACCESSION MF771085.1, Nambooppha et al., 2018)

คณะผู้วิจัยได้ทำการออกแบบ คัดเลือกและหาความไวเชิงวิเคราะห์ของไพร์เมอร์สำหรับเทคนิค PCR ใหม่แทนการเลือกใช้ชุดไพร์เมอร์ที่ได้ตีพิมพ์แล้ว (Nambooppha et al., 2018) เนื่องจาก 1) ชุดไพร์เมอร์ไม่ได้มีเป้าหมายที่ *Ehrlichia canis* major immunodominant protein (gp36) gene 2) สถาวะของปฏิกิริยาและเอนไซม์ที่ใช้มีความแตกต่างกัน และ 3) ต้องการศึกษาความผันแปรทาง พันธุกรรมของเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของเทคนิคมีความเป็นจริงตามลักษณะของเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย ทางคณะผู้วิจัยได้ออกแบบไพร์เมอร์ใหม่จำนวน 5 คู่ (ตารางที่ 3) และได้ทำการทดสอบเพื่อคัดเลือกไพร์เมอร์ที่ได้ให้ผลมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด โดยไพร์เมอร์ที่ออกแบบมาใหม่มีเป้าหมายอยู่ที่ยีน *Ehrlichia canis* major immunodominant protein (gp36) gene ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 134-377 bp และ 358-800 bp

2. การทดสอบไพร์เมอร์และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจการติด *Ehrlichia canis*

ปฏิกิริยาจะถูกทดสอบที่ Annealing temperature แตกต่างกัน 3 อุณหภูมิ คือ 59 °C, 61 °C, และ 63 °C โดยจะทำปฏิกิริยา 35 รอบ เอนไซม์ที่ใช้คือ TopTaq Master Mix Kit (Qiagen, USA) พบว่าอุณหภูมิที่แตกต่างกันทั้ง 3 อุณหภูมิให้ผลการเกิดผลผลิตพีซีอาร์ไม่แตกต่างกัน น้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตเป็นไปตามที่คำนวน และลำดับนิวคลีโอไทด์มีความถูกต้องเมื่อเทียบกับ DNA ต้นแบบ จากการทดสอบเทคนิค PCR ได้คัดเลือกไพร์เมอร์ 2 คู่ คือ ECgb36_F134 กับ ECgb36_R377 และ ECgb36_F358 กับ ECgb36_R800 ไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่จะใช้ Annealing temperature ที่อุณหภูมิ 59 °C เหมือนกัน

3. การทดสอบความจำเพาะ (specificity test) ของเทคนิค PCR

การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ทำโดยการทดสอบกับตัวอย่าง DNA จากเลือดของสุนัขที่มีการตรวจพบเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่มีการระบาดในประเทศ

ไทย ได้แก่ *Anaplasma platys* และ *Babesia canis* ผลการทดสอบพบว่าไพร์เมอร์และสภาวะของ PCR ที่ใช้ให้ผลบวกเฉพาะ *E. canis* เท่านั้น โดยที่ไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่ คือ ECgb36_F134 กับ ECgb36_R377 และ ECgb36_F358 กับ ECgb36_R800 ให้ผลการทดสอบเหมือนกัน

4. การทดสอบความไว (sensitivity test) ของเทคนิค PCR

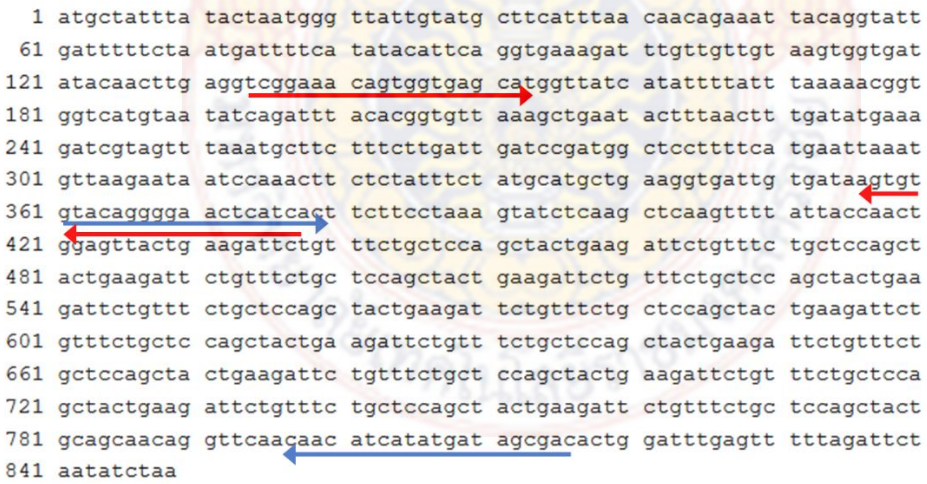
การทดสอบความไวของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ทำโดยการทดสอบกับตัวอย่าง DNA มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จากนั้นทำ 10-fold serial dilution ให้ได้ความเข้มข้น 100 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 0.1 ng/µl, 0.01 ng/µl, และ 0.001 ng/µl นำ DNA แต่ละความเข้มข้นมาใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในการทำ PCR เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สภาวะและไพร์เมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยีนเป้าหมายได้ ผลจากการทดสอบพบว่าค่าความไวสูงสุดของเทคนิค PCR อยู่ที่ 0.0001 ng/µl สำหรับ ECgb36_F134 กับ ECgb36_R377 และ 0.01 ng/µl ECgb36_F358 กับ ECgb36_R800

5. การทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิก (Evaluation of the assay)

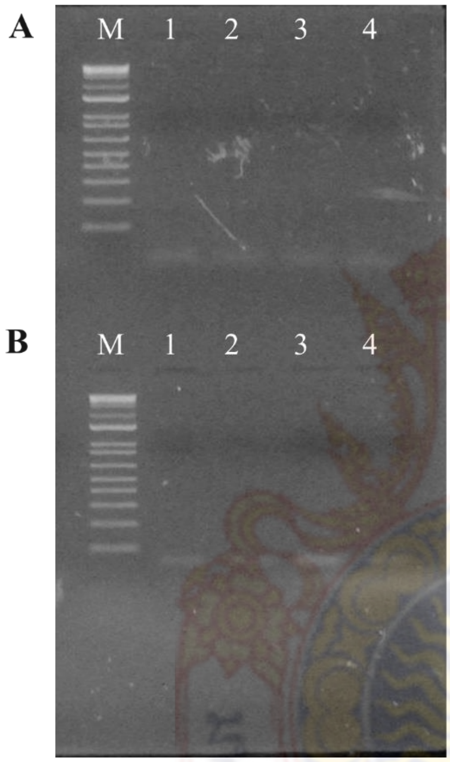
การทดสอบความน่าเชื่อถือของเทคนิค PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในโครงการนี้เพื่อใช้ในการตรวจการติดเชื้อ *E. canis* ในสุนัขทำได้โดยการทดสอบกับตัวอย่างเลือดของสุนัข 152 ตัวอย่าง พบว่ามี 48 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกเมื่อทำการทดสอบด้วยไพร์เมอร์ ECgb36_F134 กับ ECgb36_R377

ตารางที่ 2 ไพร์เมอร์ที่ออกแบบสำหรับทดสอบเทคนิค PCR

Primer	Sequence	Length (bp)	Tm (^{O}C)	GC (%)	Product Size (bp)
ECgb36_F129	TGAGGTCGGAAACAGTGGTG	20	59.89	55.0	
ECgb36_R378	TGATGAGTTCCCCTGTACACAC	22	63.0	50.0	250
ECgb36_F134	TCGGAAACAGTGGTGAGCAT	20	59.60	50.0	
ECgb36_R377	GATGAGTTCCCCTGTACACACT	22	59.43	50.0	244
ECgb36_F356	AGTGTGTACAGGGGAACTCA	20	57.90	60.0	
ECgb36_R801	TGTTGTTGAACCTGTTGCTGC	21	60.14	47.62	446
ECgb36_F136	GGAAACAGTGGTGAGCATGG	20	59.12	55.0	
ECgb36_R383	AGAAGTGATGAGTTCCCCTGT	21	58.37	47.62	248
ECgb36_F358	TGTGTACAGGGGAACTCATCAC	22	59.70	50.0	
ECgb36_R800	GTTGTTGAACCTGTTGCTGC	20	58.44	50.0	443



รูปที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Ehrlichia canis* major immunodominant protein (gp36) gene ลูกศรแสดงทิศทางและตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR



M : 100 bp DNA marker

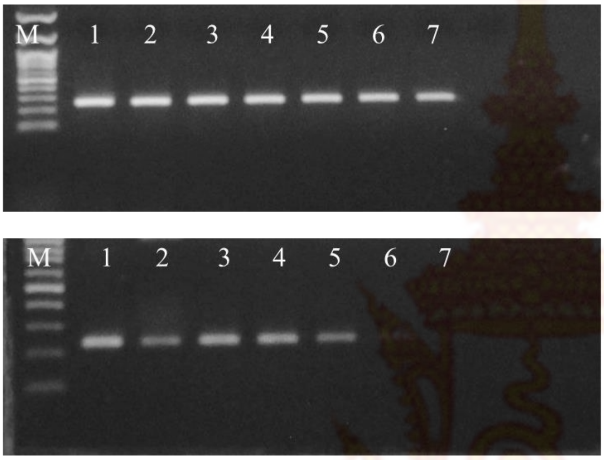
1 : Anaplasma infected sample 10 ng/ul

2 : Anaplasma infected sample 1 ng/ul

3 : Babesia infected sample 10 ng/ul

4 : Babesia infected sample 1 ng/ul

รูปที่ 5 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์จำนวน 2 คู่มาทดสอบ (A) ECgb36_F134 กับ ECgb36_R377 และ (B) ECgb36_F358 กับ ECgb36_R800



M : 100 bp DNA marker

1 : *E. canis* control DNA 100 ng/ul

2 : *E. canis* control DNA 10 ng/ul

3 : *E. canis* control DNA 1 ng/ul

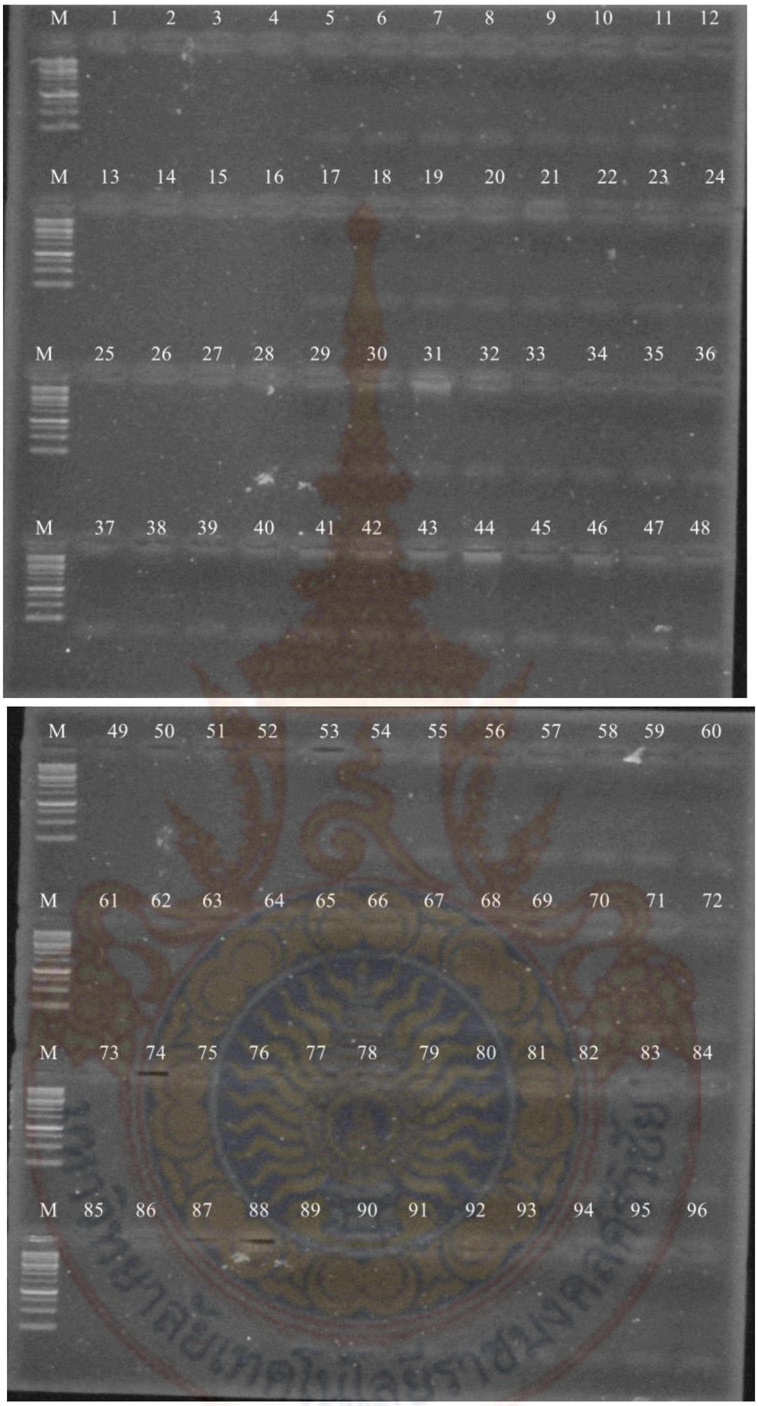
4 : *E. canis* control DNA 0.1 ng/ul

5 : *E. canis* control DNA 0.01 ng/ul

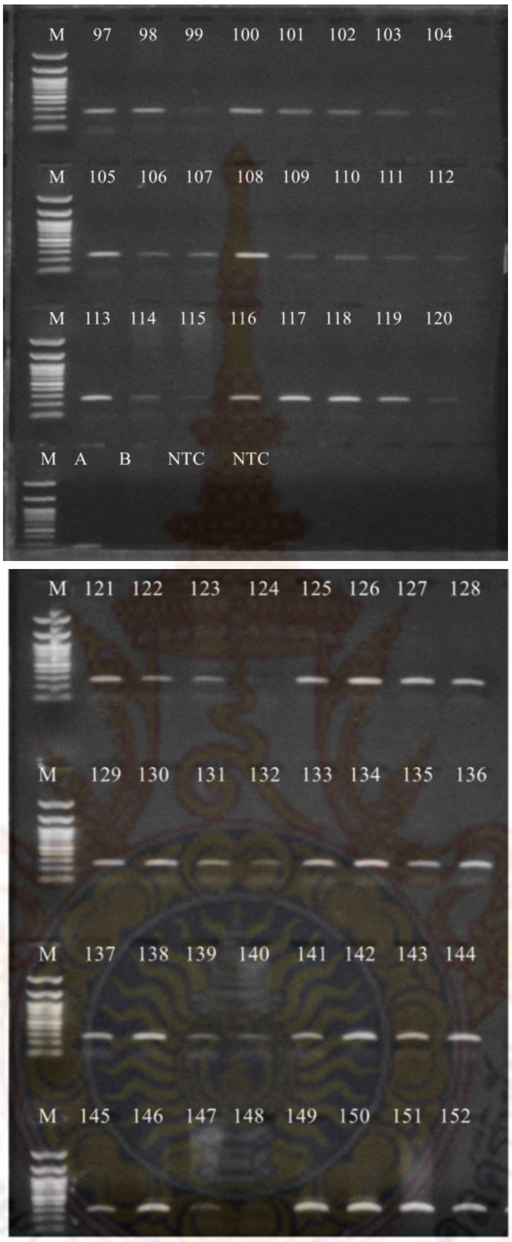
6 : *E. canis* control DNA 0.001 ng/ul

7 : *E. canis* control DNA 0.0001 ng/ul

รูปที่ 6 การทดสอบความไวของเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์จำนวน 2 คู่มาทดสอบ (A) ECgb36_F134 กับ ECgb36_R377 และ (B) ECgb36_F358 กับ ECgb36_R800



รูปที่ 7 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *Ehrlichia canis* major immunodominant protein (gp36) gene โดยใช้ไพร์เมอร์ ECgb36_F134 กับ ECgb36_R377 หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ A Anaplasma infected sample, B Babesia infected sample และ NTC non-template control



รูปที่ 8 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *Ehrlichia canis* major immunodominant protein (gp36) gene โดยใช้ไพร์เมอร์ ECgb36_F134 กับ ECgb36_R377 หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ A Anaplasma infected sample, B Babesia infected sample และ NTC non-template control

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยการติดริกเก็ตเซีย *Ehrlichia canis* ในเม็ดเลือดขาวสุนัขให้มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย เนื่องด้วยเชื้อมีขนาดเล็กมากและอาศัยอยู่ในเม็ดเลือดขาวทำให้การวินิจฉัยด้วยเทคนิคแผ่นฟิล์มเลือดและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ทำได้ยาก ต้องอาศัยประสบการณ์ความชำนาญของผู้ตรวจ นอกจากนี้มีรายงานการผันแปรทางพันธุกรรม การผันแปรทางแอนติเจนและการดื้อยาของเชื้อมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้การวินิจฉัยด้วย PCR โดยเลือกใช้ RNA gene เป็นเป้าหมายจะทำให้ได้ข้อมูลจำเพาะแค่ในด้านระบุตัวเชื้อ แต่ไม่สามารถให้ข้อมูลด้านอื่นๆ ได้ คณะผู้วิจัยจึงได้เลือก *Ehrlichia canis* major immunodominant protein (gp36) gene มาใช้เป็นยีนเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ

จากผลการทดสอบในเบื้องต้น *Ehrlichia canis* major immunodominant protein (gp36) gene สามารถนำไปใช้เป็นเป้าหมายในการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่างๆ เพื่อตรวจการติดเชื้อได้ รวมทั้งยังสามารถนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไปทำการวิเคราะห์ต่อในด้านการผันแปรทางพันธุกรรม และการผันแปรทางแอนติเจน เพราะยีนเป้าหมายนี้มีความสำคัญต่อการเป็นแอนติเจน และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อของสุนัข อย่างไรก็ตาม *Ehrlichia canis* major immunodominant protein (gp36) gene ที่เลือกมาใช้ มีความเหมาะสมที่จะเป็นเป้าหมายในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล แต่อาจจะไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาแอนติเจนด้วยการทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาเนื่องจากมีความผันแปรทางแอนติเจนสูง

1. ไพร์เมอร์และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจการติดปรสิต มีดังนี้

PCR : ทำ 35 รอบ โดยกำหนดสภาวะ Initial denaturation 3 min 94 ^{O}C, Denaturation 30 sec 94 ^{O}C, Annealing 30 sec 59 ^{O}C, Extension 1 min 72 ^{O}C, Final extention 10 min ^{O}C ไพร์เมอร์ที่เลือกใช้คือ ECgb36_F134 5’TCGGAAACAGTGGTGAGCAT3’ กับ ECgb36_R377 5’GATGAGTTCCCCTGTACACACT3’

2. ความจำเพาะของการตรวจการติดปรสิต

การตรวจการติดปรสิตด้วยเทคนิค PCR โดยมี *Ehrlichia canis* major immunodominant protein (gp36) gene เป็นยีนเป้าหมายมีความจำเพาะต่อการตรวจค่อนข้างสูง เนื่องจากไพร์เมอร์ทั้งสองคู่ ECgb36_F134 กับ ECgb36_R377 และ ECgb36_F358 กับ ECgb36_R800 ให้ผลลบต่อการทดสอบด้วยเชื้ออื่น ๆ ที่มีการระบาดอยู่ในสุนัขใน คือ *Anaplasma* spp. และ *Babesia* spp.

3. ความไวของการตรวจการติดเชื้อ

โดยทั่วไปค่าความไวในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายของเทคนิค PCR จะมีค่าประมาณ 0.1-100 ng/µl หรือ 10^2-10^6 copy/µl ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ ความสามารถในการจับกับเป้าหมายของไพร์เมอร์ ความยาวของผลผลิต PCR คุณภาพของ DNA เป็นต้น ผลจากการทดสอบพบว่าค่าความไวสูงสุดของเทคนิค PCR อยู่ที่ 0.0001 ng/µl สำหรับ ECgb36_F134 กับ ECgb36_R377 และ 0.01 ng/µl ECgb36_F358 กับ ECgb36_R800 ไพร์เมอร์ทั้งสองคู่สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยได้ แต่ไพร์เมอร์ ECgb36_F134 กับ ECgb36_R377 มีความไวในการตรวจมากกว่า

บรรณานุกรม

ดานัย พินอยู่วงษ์ การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิในเลือดในสัตว์เลี้ยง จากอดีตสู่ปัจจุบัน สัตวแพทย์มหานครสาร. 2553. 5(2): 49-61.

ปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์ Update Ehrlichiosis in dog วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์แห่งประเทศไทย 2555 24(4): 49-53

Alvarado-Rybak M, Solano-Gallego L, Millán J. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. Parasit Vectors. 2016 Oct 10;9(1):538.

Aktas M, Özübek S. Transstadial Transmission of Hepatozoon canis by Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in Field Conditions. J Med Entomol. 2017 Mar 7.

Azmi K, Al-Jawabreh A, Nasereddin A, Abdelkader A, Zaid T, Ereqat S, Sawalha SS, Baneth G, Abdeen Z. Detection and molecular identification of Hepatozoon canis and Babesia vogeli from domestic dogs in Palestine. Parasitology. 2017 Apr;144(5):613-621.

Barbosa A, Reiss A, Jackson B, Warren K, Paparini A, Gillespie G, Stokeld D, Irwin P, Ryan U. Prevalence, genetic diversity and potential clinical impact of blood-borne and enteric protozoan parasites in native mammals from northern Australia. Vet Parasitol. 2017 Apr 30;238:94-105.

Estrada-Peña A, Roura X, Sainz A, Miró G, Solano-Gallego L. Species of ticks and carried pathogens in owned dogs in Spain: Results of a one-year national survey. Ticks Tick Borne Dis. 2017 Feb 3. pii: S1877-959X(17)30047-X.

Jittapalapong S, Rungphisutthipongse O, Maruyama S, Schaefer JJ, Stich RW. Detection of Hepatozoon canis in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. Ann NY Acad Sci. 2006 Oct;1081:479-88.

Kaewmongkol G, Lukkana N, Yangtara S, Kaewmongkol S, Thengchaisri N, Sirinarumitr T, Jittapalapong S, Fenwick SG. Association of Ehrlichia canis,

Hemotropic Mycoplasma spp. and Anaplasma platys and severe anemia in dogs in Thailand. Vet Microbiol. 2017 Mar;201:195-200.

Kottadamane MR, Dhaliwal PS, Singla LD, Bansal BK, Uppal SK. Clinical and hematobiochemical response in canine monocytic ehrlichiosis seropositive dogs of Punjab. Vet World. 2017 Feb;10(2):255-261.

Masatani T, Hayashi K, Andoh M, Tateno M, Endo Y, Asada M, Kusakisako K,Tanaka T, Gokuden M, Hozumi N, Nakadohzono F, Matsuo T. Detection and molecular characterization of Babesia, Theileria, and Hepatozoon species in hard ticks collected from Kagoshima, the southern region in Japan. Ticks Tick Borne Dis.2017 Mar 27. pii: S1877-959X(17)30148-6.

Modrý D, Beck R, Hrazdilová K, Baneth G. A Review of Methods for Detection of Hepatozoon Infection in Carnivores and Arthropod Vectors. Vector Borne Zoonotic Dis. 2017 Jan;17(1):66-72.

Movilla R, Altet L, Serrano L, Tabar MD, Roura X. Molecular detection of vector-borne pathogens in blood and splenic samples from dogs with splenic disease. Parasit Vectors. 2017 Mar 13;10(1):131

Parashar R, Sudan V, Jaiswal AK, Srivastava A, Shanker D. Evaluation of clinical, biochemical and haematological markers in natural infection of canine monocytic ehrlichiosis. J Parasit Dis. 2016 Dec;40(4):1351-1354.

Santos-Silva MM, Melo P, Santos N, Antunes S, Duarte LR, Ferrolho J, Milhano N, Santos PT, Domingos A, Santos AS. PCR screening of tick-borne agents in sensitive conservation areas, Southeast Portugal. Mol Cell Probes. 2017 Feb;31:42-45

Suh GH, Ahn KS, Ahn JH, Kim HJ, Leutenegger C, Shin S. Serological and molecular prevalence of canine vector-borne diseases (CVBDs) in Korea. Parasit Vectors. 2017 Mar 16;10(1):146.