รายงานการวิจัย

การพัฒนาวิธีตรวจโรคไข้เห็บในโค โดยใช้ species-specific primer

Molecular detection of Babesiosis by using species-specific primer sets

คณะผู้วิจัย

นิจจารีย์ญา ศิริศรีโร	Nijjareeya Sirisriro
นิรมล ทองเต็ม	Niramon Thongtham
มันตา ภูมิเกษมศักดิ์	Munta Phumikasemsak

คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากจากมหาวิทยาเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบวิจัยทุนรายได้ประจำปี พ.ศ. 2562

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “การพัฒนาวิธีตรวจโรคไข้เห็บในโค โดยใช้ species-specific primer ” ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2562 ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2563 เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อก่อให้เกิดเทคนิคตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อที่สามารถตรวจได้รวดเร็วและแม่นยำ มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ให้บริการแก่เจ้าของสัตว์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสัตวแพทย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดการวิจัย ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีสมตามความตั้งใจ

นิจจารีย์ญา ศิริศรีโร

พฤษภาคม 2563

การพัฒนาวิธีตรวจโรคไข้เห็บในโค โดยใช้ species-specific primer

นิจจารีย์ญา ศิริศรีโร[1], นิรมล ทองเต็ม[1], และ มันตา ภูมิเกษมศักดิ์[1]

บทคัดย่อ

โรคไข้เห็บในโคและกระบือมีสาเหตุจากโปรโตซัวในเม็ดเลือดแดงชนิด บาบีเซีย โบวิส และ บาบีเซีย ไบเจมินา สัตว์ที่ติดปรสิตจะมีร่างกายอ่อนแอ มีไข้ โลหิตจาง และปัสสาวะเป็นสีน้ำตาลแดง โดยอาการที่แสดงออกขึ้นกับระดับของปรสิตที่มีในกระแสเลือด โปรโตซัวทั้งสองชนิดนี้ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจและเป็นปัญหาสำคัญในการจัดการฟาร์ม งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยการติดปรสิตโดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด ผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่ายีน *B. bovis* MSA-1 และ *B. bigemina* RAP-1c สามารถใช้เป็นเป้าหมายใน PCR โดยยีนเป้าหมายทั้งสองสามารถให้ผลการตรวจที่มีความจำเพาะและสามารถจำแนกชนิดของปรสิตได้ และมีความไวในการตรวจที่ระดับ 1 pg/µl ของดีเอ็นเอเป้าหมาย

คำสำคัญ: โรคไข้เห็บโค บาบีเซีย โบวิส บาบีเซีย ไบเจมินา การตรวจวินิจฉัย

[1]อาจารย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย จ.นครศรีธรรมราช

Molecular detection of Babesiosis by using species-specific primer

Nijjareeya Sirisriro[1], Niramon Thongtham[1], and Munta Phumikasemsak[1]

Abstract

Bovine Babesiosis in cattle caused *Babesia bovis* and *B. bigemina* infection, is characterized by weakness, fever, anemia, and hemoglobinuria depending on parasitemia. The infection caused economic loss and farm management problems. The objective of this project was focused on the development of species-specific detections of Bovine Babesiosis by PCR. The results revealed that PCR targeting *B. bovis* MSA-1 and *B. bigemina* RAP-1c provided high specificity against two different species and no cross detection to other blood parasites. For sensitivity test, the results showed PCR of both targets can detect the target at 1 pg/µl

Keywords: Bovine Babesiosis, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina,* 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	2
3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	4
วิธีการดำเนินการวิจัย	7
ผลการวิจัย และอภิปรายผล	10
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	18
บรรณานุกรม	20

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพร์เมอร์ที่ออกแบบสำหรับทดสอบเทคนิค PCR	13

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	วงจรชีวิตของโปรโตซัว Babesia ในโคและเห็บ	5
2	รูปร่างและลักษณะของ *Babesia* spp ในเม็ดเลือดแดงโค	6
3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *B. bovis* MSA-1 gene	12
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *B. bigemina* RAP-1c	12
5	การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค PCR ต่อ *B. bovis* MSA-1 gene (A) และ *B. bigemina* RAP-1c (B)	14
6	การทดสอบความไวของเทคนิค PCR ต่อ *B. bovis* MSA-1 gene (A) และ *B. bigemina* RAP-1c (B)	15
7	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *B. bovis* MSA-1 gene	16
8	การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *B. bigemina* RAP-1c gene	17

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
NTL	=	Non-template control
ng	=	nanogram
NS	=	Non-structural protein
nt	=	Nucleotide
OD	=	Optical density
RNA	=	Ribonucleic acid
SDS	=	Sodium Dodecyl Sulfate

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ภาคใต้ของประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น มีอุณหภูมิและความชื้นในอากาศเหมาะกับการเจริญของเห็บ *Boophilus microplus* ซึ่งเป็นพาหะนำโรคไข้เห็บโค หรือโรคปัสสาวะแดง ที่มีการระบาดก่อความเสียหายทั้งด้านปศุสัตว์การเลี้ยงโคเนื้อโคนม ส่งผลกระทบต่อเกษตรกร และด้านเศรษฐกิจของภาคใต้ซึ่งมีการเลี้ยงโคกระจายอยู่ทั่วทุกพื้นที่ตามรายงานของกลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติกรมปศุสัตว์

โรคไข้เห็บในโคและกระบือเกิดจากเชื้อโปรโตซัว ชนิดบาบีเซีย ซึ่งเป็นปรสิตในเม็ดเลือดแดง เชื้อที่สำคัญในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ *Babesia bigemina* และ *Babesia bovis* จากรายงานทางระบาดวิทยา มีการระบาดของเชื้อบาบีเซียในประเทศไทยอย่างต่อเนื่องในทุกภาคของประเทศไทย โคและกระบือได้รับเชื้อนี้จากการถูกกัดโดยเห็บที่มีเชื้ออยู่ จากนั้นเชื้อที่เข้าสู่ร่างกายจะเข้าไปเจริญเป็นปรสิตในเม็ดเลือดแดง มีการเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายไปยังเม็ดเลือดแดงเซลล์อื่น ๆ ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ถูกทำลาย เป็นผลให้สัตว์มีภาวะโลหิตจาง ผลผลิตลดต่ำลง ในรายที่รุนแรง เม็ดเลือดแดงจะถูกทำลายเป็นจำนวนมาก โคและกระบือจะถ่ายปัสสาวะสีน้ำตาลและตายได้ โดยเฉพาะโคที่มาจากต่างประเทศ หรือเลือดผสมสายพันธุ์ต่างประเทศสูงจะมีความทนต่อเชื้อบาบีเซียในไทยได้น้อยกว่าโคพื้นเมือง เป็นเหตุให้อัตราการป่วยและล้มตายสูง ทำให้เกษตรกรเสียเงินค่ารักษาค่าลงทุนและเสียรายได้ที่ควรจะได้จากผลผลิตเป็นจำนวนมาก

ในปัจจุบันการวินิจฉัยโรคไข้เห็บในโคยังใช้วิธีการย้อมสีแผ่นฟิลม์เลือดบาง (thin blood smear) และตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งใช้เวลา ต้องอาศัยประสบการณ์ความชำนาญของผู้ตรวจเป็นหลัก และจำเป็นต้องมีการตรวจซ้ำเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการตรวจ เพื่อให้การวินิจฉัยโรคมีความแม่นยำมากขึ้น โดยเฉพาะในรายที่มีเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ หรือมีอาการแต่ตรวจไม่พบเชื้อ ซึ่งเป็นตัวกักโรคที่สำคัญ จึงได้มีนำเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาและชีวโมเลกุลเข้ามาช่วย เช่น immunochromatographic test (ICT) strips (Guswanto et al., 2017), และ Nested-PCR (Mungunklang et al.,2014) เป็นต้น ซึ่งทำให้การวินิจฉัยทำได้รวดเร็วและแม่นยำขึ้น แต่ยังต้องใช้เครื่องมือราคาแพง หรือสั่งซื้อชุดตรวจจากต่างประเทศ ไม่สะดวกต่อการทำงานในฟาร์มปศุสัตว์ หรือ

ในภาคสนาม โดยเฉพาะพื้นที่ภาคใต้ ที่การส่งตัวอย่างเลือดไปตรวจในห้องปฏิบัติการ จำเป็นต้องใช้เวลา และการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดที่ดี ทำให้ไม่สะดวกในการปฏิบัติงานภาคสนาม

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจการติดปรสิต *B. bovis* และ *B. bigemina* โดยใช้ species-specific primer เข้ามาช่วยให้การวินิจฉัยโรคไข้เห็บ และการให้บริการตรวจกับเกษตรกรมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเน้นคุณสมบัติ สะดวก แม่นยำ และลดการพึ่งพาชุดตรวจโรคจากต่างประเทศ และเป็นการพัฒนาปศุสัตว์เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและนำไปสู่การการพึ่งพาตนเองของผู้เลี้ยงโคไทย

2. ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไข้เห็บโค

Bovine Babesiosis มีชื่อที่เรียกกันในประเทศไทยคือ ไข้เห็บโค หรือโรคปัสสาวะแดง และยังมีชื่อเรียกอื่น ๆ อีก ได้แก่ Tick Fever, Cattle Fever, Texas Fever, Piroplasmosis, และ Red water สาเหตุของโรคนี้เกิดจากเชื้อโปรโตซัวใน genus Babesia, family Babesiidae, order Piroplasmida โดยในชีพจักรของเชื้อต้องการโฮสต์ 2 ชนิด ได้แก่ โฮสต์ตัวกลางหรือสัตว์รังโรค คือ โคกระบือ และโฮสต์จำเพาะ คือ เห็บ โดยเฉพาะ *Boophilus microplus* โดยที่เชื้อจะมีระยะเป็นปรสิตในเม็ดเลือดแดงโค เรียกว่า trophozoite และมีการเจริญแบบไม่อาศัยเพศโดย trophozoite จะเจริญแบ่งตัวได้เป็น merozoite อีกหลายเซลล์ภายในเม็ดเลือดแดง เป็นผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก โคกระบือที่มีเชื้ออยู่ก็อาจเกิดภาวะโลหิตจาง (anemia) นอกจากนี้เชื้อยังมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เมื่อเห็บที่เป็นโฮสต์จำเพาะมาดูดเลือดโคที่มีเชื้ออยู่ เซลล์สืบพันธุ์ของเชื้อก็จะเข้าสู่การเจริญแบบอาศัยเพศที่ผนังกระเพาะอาหารของเห็บ เรียกว่า sporogonic cycle ได้เป็น ookinete ที่มี sporozoite เจริญอยู่ภายใน เมื่อผนัง ookinete แตกออก sporozoite จะถูกปล่อยออกมาไปยังต่อมน้ำลายเห็บ sporozoite ก็จะเข้าสู่โคกระบือได้เมื่อเห็บมาดูดเลือดสัตว์ นอกจากนี้ sporozoite ยังสามารถถ่ายทอดผ่านทางไข่เห็บ (transovarian transmission) ไปยังเห็บรุ่นลูกหลานต่อไปได้ trophozoite และ merozoite ในเม็ดเลือดแดงเป็นระยะที่สำคัญในการก่อโรคในสัตว์ และในการวินิจฉัย (Bock et al., 2004, Garner et al., 2003, Kahn et al., 2006)

ตามรายงานมีการระบาดของเชื้อบาบีเซียในหลายประเทศทั่วโลก เชื้อที่พบมากในโคกระบือมีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิด คือ *Babesia bovis*, *B. bigemina* และ B. *divergens* นอกจากนี้ยังมีเชื้อชนิด

อื่น ๆ ที่พบได้อีก ได้แก่ *B. major*, *B. ovata*, *B. occultans* และ *B. jakimovi* (Allsopp et al., 2006) ในประเทศเขตร้อน รวมทั้งประเทศไทย เชื้อที่มีการรายงานบ่อยที่สุดคือ *B bovis*, และ *B. bigemina* (Cao et al., 2012, Jirapattharasate et al., 2016) ส่วน *B. divergens* พบการติดเชื้อมากในประเทศเขตอบอุ่น โดยเฉพาะในแถบยุโรป และอเมริกาเหนือ นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ *B. divergens* ในสัตว์ป่า และในคน นับได้ว่า เชื้อ Babesia เป็น Zoonotic parasite ที่ก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ (Zintl et al., 2003, Schmid et al., 2008)

2.2 การตรวจวินิจฉัย Babesia ในเลือดโค

การวินิจฉัยโรคมีส่วนสำคัญในการรักษาและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ โดยเฉพาะในพื้นที่ภูมิอากาศร้อนชื้น ซึ่งมีอุณหภูมิและความชื้นในอากาศเหมาะกับเจริญของเห็บซึ่งเป็นโฮสต์จำเพาะของเชื้อ และเชื้อก็สามารถถ่ายทอดผ่านจากเห็บรุ่นหนึ่งสู่อีกรุ่นหนึ่งได้อย่างง่ายดาย ทาง transovarian transmission (Cantu et al.,2007) การวินิจฉัยในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลัก ได้แก่

1) การวินิจฉัยโดยอาศัยตัวเชื้อ หรือสารพันธุกรรมของเชื้อ เช่น thin หรือ thick blood smear, DNA probes, polymerase chain reaction (PCR) (Nagano et al., 2013, Simking et al.,2013), Reverse Line Blot hybridization (RLB), Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) และ Nested-PCR (Simking, et al.,2013; Yang et al.,2016)

2) การวินิจฉัยโดยอาศัย Antigen-Antibody reaction เช่น Indirect fluorescent antibody test (IFAT), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Tattiyapong et al.,2014), Immunochromatography test (Guswanto et al., 2017)

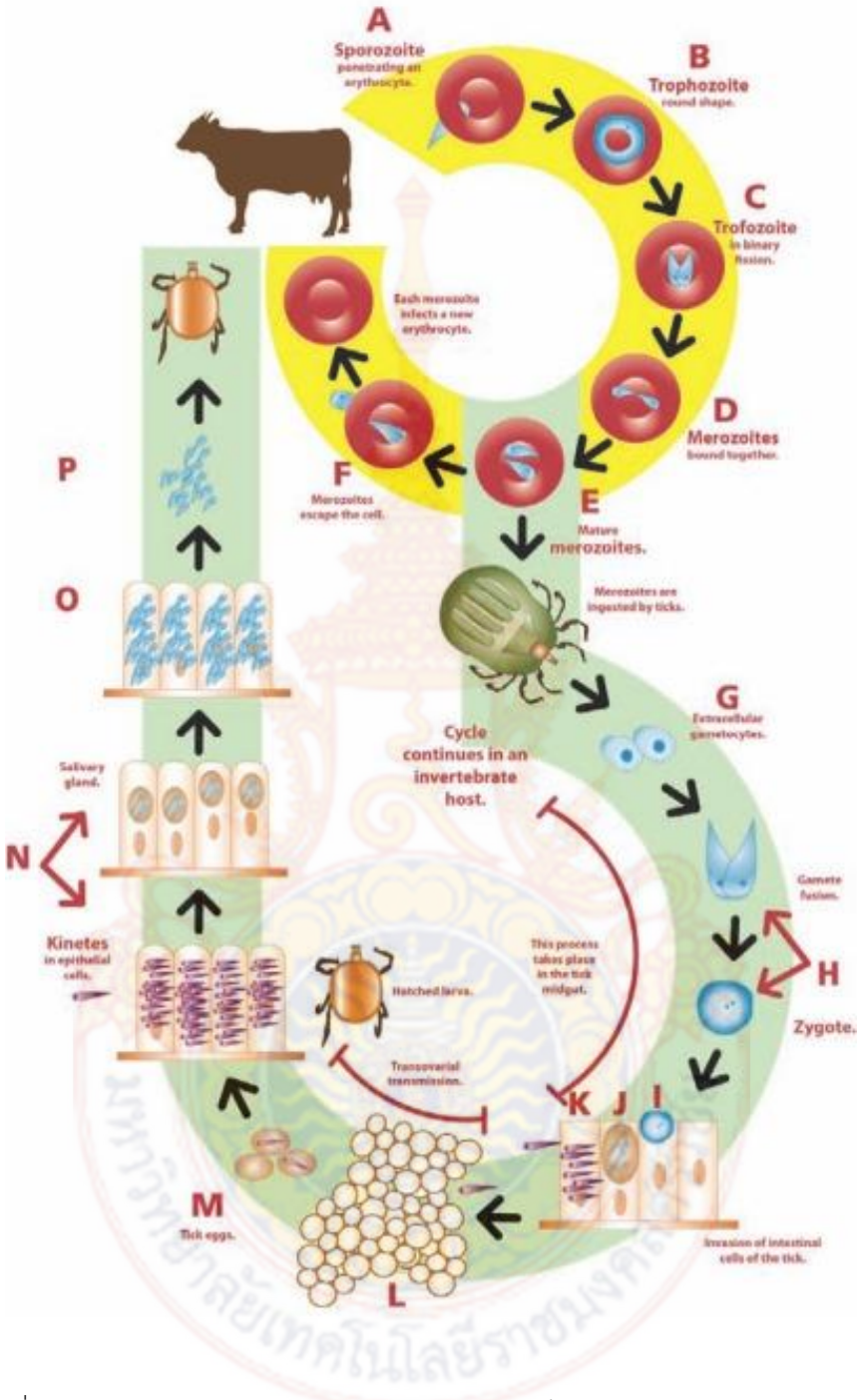
2.3 การระบาดของ Babesia ในโคในประเทศไทย

ในประเทศไทยมีการรายงานสำรวจพบปรสิต Babesia ในเลือดโคในหลายจังหวัดทั่วประเทศ ในปี 2556 พชรธรและคณะ ตรวจพบ *B. bigemina* ในโคนมทั่วประเทศร้อยละ 10.2 ช่วงอายุโคนมที่พบอัตราการติดเชื้อมากที่สุดอยู่ในช่วงอายุน้อยกว่า 1 ปีพบร้อยละ 16.6 มีการติดเชื้อในระดับฝูงที่ร้อยละ 32.2 และภาคกลางพบการติดเชื้อในโคนมมากที่สุดที่ร้อยละ 13.9 ในภาคเหนือพบการระบาดของ *B. bovis* ในโคในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่และลำปาง ร้อยละ 9.5, 3.7 และ 25.5

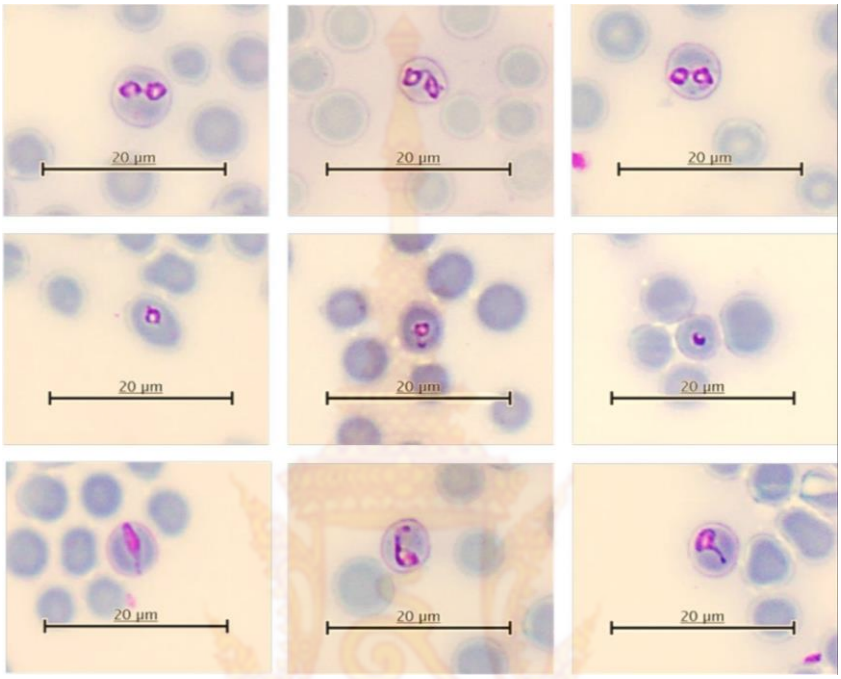
ตามลำดับ ส่วนการระบาดของ *B. bigemina* ร้อยละ 15.8, 12.9 และ 39.2 ตามลำดับ (Cao et al., 2012) ต่อมามีรายงานการระบาดในโคเนื้อในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ *B. bovis* ร้อยละ 5.5 และ *B. bigemina* ร้อยละ 13.1 (Jirapattharasate et al., 2016) จะเห็นได้ว่ามีการระบาดของ *B. bovis* และ *B. bigemina* ในทุกภาคของประเทศอย่างต่อเนื่อง รวมถึงการแพร่กระจายเชื้อจากการเคลื่อนย้ายโคมีชีวิตไปยังต่างพื้นที่ดังที่มีรายงานโคเนื้อมีชีวิตจากไทยที่ส่งออกไปยังประเทศเวียดนามว่ามีการติดเชื้อ *B. bovis* และ *B. bigemina* (Sivakumar et al., 2018)

3. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย/ โครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาการตรวจโรคไข้เห็บในโคเป็นการพัฒนาเทคนิคสำหรับตรวจเชื้อในตัวอย่างทางคลินิก



รูปที่ 1 วงจรชีวิตของโปรโตซัว Babesia ในโคและเห็บ (Mosqueda et al., 2012)



รูปที่ 2 รูปร่างและลักษณะของ *Babesia* spp ในเม็ดเลือดแดงโค (Sivakumar, et al., 2018)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเลือดโค

การสำรวจเริ่มเดือนตุลาคม 2561 ถึงกันยายน 2562 โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดของโค จำนวน 150 ตัว ไม่พิจารณาสายพันธุ์ กำหนดอายุ 1 ปี ถึง 10 ปี ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำที่โคนหาง ปริมาณ 3 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มเบอร์ 18 ยาว 1 นิ้ว และหลอดฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร เก็บเลือดใส่ในหลอดเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA)

2. การสกัดสารพันธุกรรม

เลือดปริมาณ 200 ไมโครลิตร นำไปสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Kit (ThermoFisher, USA) ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจะปฏิบัติตามคู่มือของบริษัท หลังจากสกัดแล้วจะทำการวัดปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้จะทำการเก็บรักษาที่ -20^{O}C จนกว่าจะนำมาใช้

3 การตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิคแผ่นฟิล์มเลือดบาง (Thin blood smear)

ตัวอย่างที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการจะถูกนำไปตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค Thin blood smear โดยใช้เลือด 10 ไมโครลิตร ป้ายบนกระจกสไลด์ ทำซ้ำ 3 แผ่น แล้วย้อมสี Giemsa stain จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40x และ 100x เพื่อตรวจหาเชื้อโปรโตซัวในเลือด (Simking et al., 2013) ตัวอย่างเลือดที่ตรวจไม่พบด้วยเทคนิคแผ่นฟิล์มเลือดบางจะนำไปทำ PCR

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/) โดยมีเป้าหมายคือยีน *Babesia bovis* MSA-1 gene for merozoite surface antigen-1, complete cds, isolate: Th-CR386 (ACCESSION AB763997.1, Saltarelli et al., 1990) และ *Babesia bigemina* putative rhoptry protein RAP-1c gene (AY146987.1, Nagano et al., 2013, Tattiyapong et al., 2016) ในการ

ออกแบบจะคัดเลือกไพร์เมอร์ 2 – 3 คู่มาใช้สำหรับทดสอบและประเมินกับกลุ่มควบคุมบวก จากนั้นเลือก 1 – 2 คู่เพื่อใช้ทดสอบกับตัวอย่างจริงต่อไป

3.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR

การทำ PCR จะใช้ชุดเอนไซม์และบัฟเฟอร์ TopTaq Master Mix Kit (Qiagen, USA) ซึ่งมีส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา 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% agarose gel ใน Tris-Boric acid-EDTA buffer (TBE) ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตด้วยการย้อม SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, USA) และส่องดูด้วยแสงสีฟ้า (Blue-light transilluminator)

3.3 การทดสอบหาสภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค PCR

ปฏิกิริยาจะถูกทดสอบที่แตกต่างกัน 5 อุณหภูมิ คือ 59 °C, 61 °C, และ 63 °C และตรวจวัดการเกิดผลผลิตด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

3.4 การทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิค PCR

ในการทดสอบความสามารถของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาว่าสามารถตรวจหา *B. bovis* และ *B. bigemina* ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำเพียงใด จะทำโดยการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นเชื้อในกระแสเลือดโคที่มีรายงานในประเทศไทย ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย Anaplasma 16s ribosomal RNA gene, โปรโตซัว Theileria 18s ribosomal RNA gene และน้ำกลั่น

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การพัฒนาเทคนิค PCR ที่มีความจำเพาะต่อ *B. bovis* และ *B. bigemina*

คณะผู้วิจัยได้ทำการออกแบบ คัดเลือกและหาความไวเชิงวิเคราะห์ของไพร์เมอร์สำหรับเทคนิค PCR ใหม่แทนการเลือกใช้ชุดไพร์เมอร์ที่ได้ตีพิมพ์แล้ว (Jirapattharasate et al., 2016, Sivakumar et al., 2018) เนื่องจาก 1) ชุดไพร์เมอร์ไม่ได้มีเป้าหมายที่ยีน *B. bovis* MSA-1 และ *B. bigemina* RAP-1c 2) สภาวะของปฏิกิริยาและเอนไซม์ที่ใช้มีความแตกต่างกัน และ 3) ลำดับของนิวคลีไทด์ของ *B. bovis* MSA-1 และ *B. bigemina* RAP-1c สายพันธุ์ในประเทศไทยมีความแตกต่างจากที่เคยรายงานในประเทศต่าง ๆ ทำให้ความจำเพาะแตกต่างจากที่ได้รายงานไป ดังนั้นเพื่อให้ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของเทคนิคมีความเป็นจริงตามลักษณะของเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย ทางคณะผู้วิจัยได้ออกแบบไพร์เมอร์ใหม่สำหรับ *B. bovis* MSA-1 (AB763997.1) และ *B. bigemina* RAP-1c (AY146987.1) จำนวนยีนละ 5 คู่ (ตารางที่ 1) และได้ทำการทดสอบเพื่อคัดเลือกไพร์เมอร์ที่ได้ให้ผลมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด โดยไพร์เมอร์ที่ออกแบบมาใหม่มีเป้าหมายอยู่ที่ยีน *B. bovis* MSA-1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 509-818 bp และ *B. bigemina* RAP-1c มีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1042-1418 bp

2. การทดสอบไพร์เมอร์และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจการติด *B. bovis* และ *B. bigemina*

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 สำหรับ *B. bovis* MSA-1 จะใช้ Annealing temperature ที่อุณหภูมิ 61 °C และใช้ไพร์เมอร์ BBMSA1_F509 CGGGGGAACACGTTGTTGACG และ BBMSA1_R818 GCAGGTCCTTGCGGGGATGT ส่วน *B. bigemina* RAP-1c จะใช้ Annealing temperature ที่อุณหภูมิ 61 °C และใช้ไพร์เมอร์ BGRAP-1c_F1042 GGCAACATCCGCTTCAA CACGG และ BGRAP-1c_R1418 TTACGCTTCCTCTTGGCAGGCA

3. การทดสอบความจำเพาะ (specificity test) ของเทคนิค PCR

การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ทำโดยการทดสอบกับตัวอย่าง DNA จากเลือดของโคที่มีการตรวจพบเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่มีการระบาดในประเทศไทย ได้แก่ *Anaplasma* spp และ *Theileria* spp ผลการทดสอบพบว่าไพร์เมอร์และสภาวะของ PCR ที่ใช้ให้ผลบวกเฉพาะ *B. bovis* และ *B. bigemina* เท่านั้น

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, 100 pg/µl, 10 pg/µl, และ 1 pg/µl นำ DNA แต่ละความเข้มข้นมาใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในการทำ PCR เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สภาวะและไพร์เมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยีนเป้าหมายได้ ผลจากการทดสอบพบว่าค่าความไวสูงสุดของเทคนิค PCR อยู่ที่ 1 pg/µl ทั้ง *B. bovis* และ *B. bigemina*

5. การทดสอบกับตัวอย่างทางคลินิก (Evaluation of the assay)

การทดสอบความน่าเชื่อถือของเทคนิค PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในโครงการนี้เพื่อใช้ในการตรวจการติดเชื้อ *B. bovis* และ *B. bigemina* ในโค ทำได้โดยการทดสอบกับตัวอย่างเลือดของโคที่ทำการเจาะตรวจเลือด และตรวจไม่พบปรสิตในเลือดด้วยเทคนิคแผ่นฟิล์มเลือดบางจำนวน 150 ตัวอย่าง พบว่ามี 2 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ *B. bovis* และ 4 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ *B. bigemina*

รูปที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *B. bovis* MSA-1 gene (merozoite surface antigen-1 gene, AB763997.1) ลูกศรแสดงทิศทางและตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR และมีความยาวของ pcr product ที่ 309 bp

รูปที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *B. bigemina* RAP-1c (putative rhoptry protein gene, AY146987.1) ลูกศรแสดงทิศทางและตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR และมีความยาวของ pcr product ที่ 376 bp

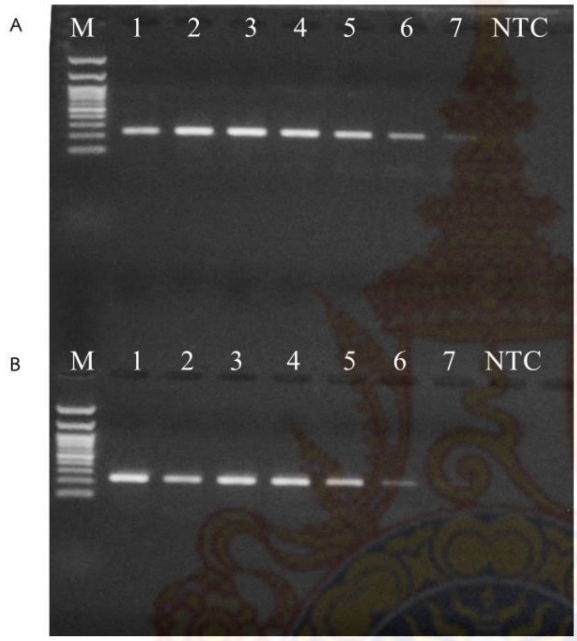
ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์ที่ออกแบบสำหรับทดสอบเทคนิค PCR

Primer	Sequence	Length (bp)	Tm (^{O}C)	GC (%)	Product Size (bp)
BBMSA1_F989	CCGAGCCTGTCGAGGAAAAT	20	60.11	55.0	
BBMSA1_R1414	GCTTCCTCTTGGCAGGCAAT	20	60.97	55.00	426
BBMSA1_F451	TGGATGCGTTTCAAGAGGGG	20	60.32	55.00	
BBMSA1_R1407	CTTGGCAGGCAATTCGTCA	19	58.74	52.63	957
BBMSA1_F509	CGGGGGAACACGTTGTTGACG	21	62.9	60.0	
BBMSA1_R818	GCAGGTCCTTGCGGGGATGT	20	63.1	50.0	309
BBMSA1_F153	CGGTGCTGTTGGAAGTTTCG	20	60.04	55.00	
BBMSA1_R748	CTTCGGTGCTCTCACTTCGT	20	60.04	55.00	596
BBMSA1_F730	CGAAGTGAGAGCACCGAAGT	20	60.04	55.00	
BBMSA1_R930	AGTAGCCACAGTCAATCCGC	20	60.11	55.00	201
BGRAP-1c_F841	GTCACCACTCTCGTGGACAA	20	59.61	55.00	
BGRAP-1c_R1407	CTTGGCAGGCAATTCGTCA	19	58.74	52.63	567
BGRAP-1c_F1303	ACGGAAATGGACGAAGAGCA	20	59.68	50.00	
BGRAP-1c_R1505	GGGAACCTGATGCGGCTA	18	59.09	61.11	203
BGRAP-1c_F684	AAGGGCGTTGAGGAACATCG	20	60.67	55.00	
BGRAP-1c_R1413	CTTCCTCTTGGCAGGCAAT	19	57.72	52.63	730
BGRAP-1c_F821	ACCGTTTCTCCTCGATGGTC	20	59.47	55.00	
BGRAP-1c_R1356	CAAATCCTGCGTGCCTTTAG	20	57.45	50.00	536
BGRAP-1c_F1042	GGCAACATCCGCTTCAACACGG	22	63.0	50.0	
BGRAP-1c_R1418	TTACGCTTCCTCTTGGCAGGCA	22	62.8	50.0	376

M : 1 Kb DNA marker
1 : Anaplasma infected sample 10 ng/ul
2 : Anaplasma infected sample 1 ng/ul
3 : Theileria infected sample 10 ng/ul
4 : Theileria infected sample 1 ng/ul
5 : *B. bigemina* infected sample 10 ng/ul
6 : *B. bigemina* infected sample 1 ng/ul
NTC : non-template control

M : 1 Kb DNA marker
1 : Anaplasma infected sample 10 ng/ul
2 : Anaplasma infected sample 1 ng/ul
3 : Theileria infected sample 10 ng/ul
4 : Theileria infected sample 1 ng/ul
5 : *B. bovis* infected sample 10 ng/ul
6 : *B. bovis* infected sample 1 ng/ul
NTC : non-template control

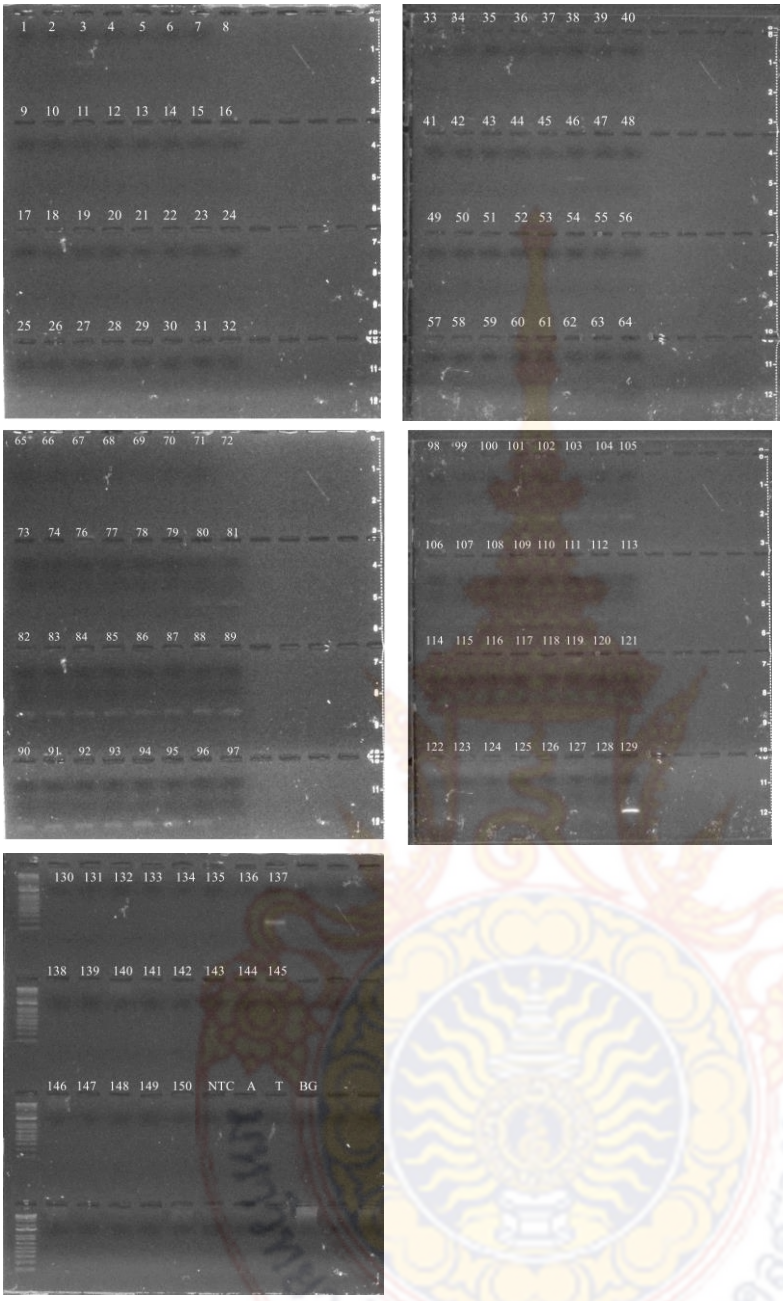
รูปที่ 5 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค PCR ต่อ *B. bovis* MSA-1 gene (A) และ *B. bigemina* RAP-1c (B)



M : 1 Kb DNA marker
1 : *B. bovis* control DNA 100 ng/ul
2 : *B. bovis* control DNA 10 ng/ul
3 : *B. bovis* control DNA 1 ng/ul
4 : *B. bovis* control DNA 100 pg/ul
5 : *B. bovis* control DNA 10 pg/ul
6 : *B. bovis* control DNA 1 pg/ul
7 : *B. bovis* control DNA 0.1 pg/ul
NTC : non-template control

M : 1 Kb DNA marker
1 : *B. bigemina* control DNA 100 ng/ul
2 : *B. bigemina* control DNA 10 ng/ul
3 : *B. bigemina* control DNA 1 ng/ul
4 : *B. bigemina* control DNA 100 pg/ul
5 : *B. bigemina* control DNA 10 pg/ul
6 : *B. bigemina* control DNA 1 pg/ul
7 : *B. bigemina* control DNA 0.1 pg/ul
NTC : non-template control

รูปที่ 6 การทดสอบความไวของเทคนิค PCR ต่อ *B. bovis* MSA-1 gene (A) และ *B. bigemina* RAP-1c (B)



รูปที่ 7 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *B. bovis* MSA-1 gene หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ A Anaplasma infected sample, T Theileria infected sample, BG *B. bigemina* infected sample และ NTC non-template control

รูปที่ 8 การทดสอบตัวอย่างทางคลินิกด้วย PCR ต่อ *B. bigemina* RAP-1c gene หมายเลขระบุลำดับตัวอย่างที่ทดสอบ A Anaplasma infected sample, T Theileria infected sample, และ NTC non-template control

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยการติดปรสิตในเม็ดเลือดแดงชนิด *B. bovis* และ *B. bigemina* ในโคให้มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ปรสิตในประเทศไทยและสามารถใช้จำแนกชนิดของปรสิตได้ เนื่องด้วยปรสิตทั้งสองชนิดมีความใกล้เคียงกันมากด้วยรูปร่างลักษณะ จึงทำให้การวินิจฉัยด้วยเทคนิคแผ่นฟิล์มเลือดไม่สามารถจำแนกชนิดได้ นอกจากนี้ปรสิตทั้งสองชนิดมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมาก การวินิจฉัยด้วย PCR โดยเลือกใช้ RNA gene เป็นเป้าหมายอาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการจำแนกชนิดปรสิตได้ คณะผู้วิจัยได้เลือก *B. bovis* MSA-1 gene และ *B. bigemina* RAP-1c gene มาใช้เป็นยีนเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจและจำแนกชนิด เพราะปรสิตทั้งสองมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของสองยีนนี้แตกต่างกัน เมื่อนำมาใช้เป็นเป้าหมายในการตรวจวินิจฉัยจะทำให้การตรวจมีความจำเพาะ สามารถตรวจการติดปรสิตและจำแนกชนิดได้แม่นยำ นอกจากนี้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนทั้งสองยังสามารถนำไปใช้ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมและความผันแปรทางแอนติเจนได้ด้วย จากผลการทดสอบในเบื้องต้นของยีนทั้งสองสามารถนำไปใช้เป็นเป้าหมายในการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่นๆ เพื่อนำมาใช้ตรวจการติดปรสิตต่อไปได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามเทคนิคการตรวจวินิจฉัยที่ได้พัฒนาขึ้นมาสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาจาก genomic DNA ของปรสิตได้ แต่ไม่สามารถนำไปตรวจหาจาก cDNA หรือ RNA ของปรสิตได้

1. ไพร์เมอร์และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจการติดปรสิต มีดังนี้

PCR : ทำ 35 รอบ โดยกำหนดสภาวะ Initial denaturation 3 min 94^{O}C, Denaturation 30 sec 94 ^{O}C, Annealing 30 sec 61 ^{O}C, Extension 1 min 72 ^{O}C, Final extention 10 min ^{O}C

ไพร์เมอร์ สำหรับ *B. bovis* จะใช้ BBMSA1_F509 CGGGGGAACACGTTGTTGACG และ BBMSA1_R818 GCAGGTCCTTGCGGGGATGT ส่วน *B. bigemina* จะใช้ไพร์เมอร์ BGRAP-1c_F1042 GGCAACATCCGCTTCAA CACGG และ BGRAP-1c_R1418 TTACGCTTCC TC

2. ความจำเพาะของการตรวจการติดปรสิต

การตรวจการติดปรสิตด้วยเทคนิค PCR โดยมี *B. bovis* MSA-1 และ *B. bigemina* RAP-1c เป็นยีนเป้าหมายมีความจำเพาะต่อการตรวจค่อนข้างสูง เนื่องจากให้ผลลบต่อการทดสอบด้วยเชื้ออื่น ๆ ที่มีการระบาดอยู่ในโคในพื้นที่เดียวกันคือ *Anaplasma* spp. และ *Theileria* 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 ในการพัฒนาเทคนิค PCR ตรวจการติด *B. bovis* และ *B. bigemina* ในโค ได้ค่าความไวของเทคนิคที่ 1 pg/µl นับว่าเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง สามารถนำไปใช้ให้บริการแก่เกษตรกรเจ้าของสัตว์ได้

บรรณานุกรม

พชรธร สิมกิ่ง สินสมุทร แซ่โง้ว นงนุช ภิญโญภานุวัฒน์ วิษณุวัฒน์ ฉิมน้อย พิพัฒน์ อรุณวิภาส สถาพร จิตตปาลพงศ์ การตรวจหาเชื้อ Babesia bigemina ในโคนมในประเทศไทยโดยใช้ยีน rap 1 alpha การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51: สาขาสัตวแพทยศาสตร์ ก.พ. 2556 หน้า 47-57

Allsopp MT, Allsopp BA. Molecular sequence evidence for the reclassification of some Babesia species. Ann N Y Acad Sci. 2006;1081:509-17.

Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W. Babesiosis of cattle. Parasitology. 2004;129 Suppl:S247-69.

Cantu A, Ortega-S JA, Mosqueda J, Garcia-Vazquez Z, Henke SE, George JE. Immunologic and molecular identification of Babesia bovis and Babesia bigemina in free-ranging whitetailed deer in northern Mexico. J Wildl Dis. 2007;43:504-7

Cao S, Aboge GO, Terkawi MA, Yu L, Kamyingkird K, Luo Y, Li Y, Goo YK, Yamagishi J, Nishikawa Y, Yokoyama N, Suzuki H, Igarashi I, Maeda R, Inpankaew T, Jittapalapong S, Xuan X. Molecular detection and identification of Babesia bovis and Babesia bigemina in cattle in northern Thailand. Parasitol Res. 2012;111(3):1259-66

Fu S, Qu G, Guo S, Ma L, Zhang N, Zhang S, Gao S, Shen Z. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. Appl Biochem Biotechnol. 2011;163(7):845-50.

Garner G, Saville P, Fediaevsky A. Manual for the recognition of exotic diseases of livestock: A reference guide for animal health staff [online]. Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]; 2003. Bovine babesiosis. Available at:http://www.spc.int/rahs/.

Guswanto A, Allamanda P, Mariamah ES, Munkjargal T, Tuvshintulga B, Takemae H, Sivakumar T, AbouLaila M, Terkawi MA, Ichikawa-Seki M, Nishikawa Y, Yokoyama N,Igarashi I. Evaluation of immunochromatographic test (ICT) strips for the

serological detection of Babesia bovis and Babesia bigemina infection in cattle from Western Java, Indonesia. Vet Parasitol. 2017;239:76-79.

Jayawardena S, Cheung CY, Barr I, Chan KH, Chen H, Guan Y, Peiris JS, Poon LL. Loop-mediated isothermal amplification for influenza A (H5N1) virus. Emerg Infect Dis. 2007;13(6):899-901

Jirapattharasate C, Adjou Moumouni PF, Cao S, Iguchi A, Liu M, Wang G, Zhou M, Vudriko P, Changbunjong T, Sungpradit S, Ratanakorn P, Moonarmart W, Sedwisai P, Weluwanarak T, Wongsawang W, Suzuki H, Xuan X. Molecular epidemiology of bovine Babesia spp. and Theileria orientalis parasites in beef
cattle from northern and northeastern Thailand. Parasitol Int. 2016 Feb;65(1):62-9.

Kahn CM, Line S, editors. The Merck veterinary manual [online]. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co; 2006. Bovine babesiosis. Available at: http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/10402.htm.

Liu A, Guan G, Du P, Gou H, Liu Z, Liu J, Ma M, Yang J, Li Y, Niu Q, Ren Q, Bai Q, Yin H, Luo J. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese
Babesia bovis and B. bigemina. Parasitol Int. 2012;61(4):658-63.

Mosqueda J, Olvera-Ramirez A, Aguilar-Tipacamu G, Canto G J Current advances in detection and treatment of babesiosis. Curr Med Chem. 2012;19(10):1504-18.

Nagano D, Sivakumar T, De De Macedo AC, Inpankaew T, Alhassan A, Igarashi I, Yokoyama N. The genetic diversity of merozoite surface antigen 1 (MSA-1) among Babesia bovis detected from cattle populations in Thailand, Brazil and Ghana. J Vet Med Sci. 2013;75(11):1463-70.

Schmid N, Deplazes P, Hoby S, Ryser-Degiorgis MP, Edelhofer R, Mathis A. Babesia divergens-like organisms from freeranging chamois (Rupicapra r. rupicapra) and

roe deer (Capreolus c. capreolus) are distinct from B. divergens of cattle origin - an epidemiological and molecular genetic investigation. Vet Parasitol. 2008;154:14-20.

Simking P, Saengow S, Bangphoomi K, Sarataphan N, Wongnarkpet S, Inpankaew T, Jittapalapong S, Munkhjargal T, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I. The molecular prevalence and MSA-2b gene-based genetic diversity of Babesia bovis in dairy cattle in Thailand. Vet Parasitol. 2013 8;197(3-4):642-8.

Tattiyapong M, Sivakumar T, Takemae H, Simking P, Jittapalapong S, Igarashi I,Yokoyama N. Genetic diversity and antigenicity variation of Babesia bovis merozoite surface antigen-1 (MSA-1) in Thailand. Infect Genet Evol. 2016;41:255-61.

Yang Y, Li Q, Wang S, Chen X, Du A. Rapid and sensitive detection of Babesia bovis and Babesia bigemina by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. Vet Parasitol. 2016;219:71-6.

Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS. Babesia divergens, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clin Microbiol Rev. 2003;16:622-36.