

การตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Babesia caballi* ที่พบในเลือดม้าในประเทศไทย

ศศิวิมล อยู่เอนม* มัญชรี ทัตติยพงศ์ สุภาวรรณ งามจิตต์เอื้อ มณฑกานต์ วงศ์ภากร

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

*ผู้รับผิดชอบ โทร 02-579-8908 ถึง 14 ต่อ 323 โทรสาร 02-579-8919 E-mail: y_sasiwimon@yahoo.com

บทคัดย่อ

โรคไพโรพลาสโมซิสเป็นโรคติดต่อจากเห็บที่สำคัญโรคหนึ่งในม้าซึ่งก่อให้เกิดความบั่นทอนต่อสุขภาพโดยรวมและก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ มีเชื้อโปรโตซัวที่เป็นสาเหตุ 2 ชนิดคือ *Babesia caballi* และ *Theileria equi* การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อก่อโรคไพโรพลาสโมซิสในม้าโดยรวบรวมตัวอย่างเลือดม้าที่ส่งมายังกลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ในช่วงเดือนมกราคม – มีนาคม 2557 รวมทั้งหมด 84 ตัวอย่าง เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคโดยวิธีเลือดป้ายสไลด์ย้อมสีและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง แล้วยืนยันผลโดยวิธีทางชีวโมเลกุล ผลพบเชื้อที่มีลักษณะคล้ายโปรโตซัวในเม็ดเลือดแดงในเลือดป้ายสไลด์จำนวน 39 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างเลือดทั้ง 39 ตัวอย่างนี้ไปตรวจด้วย nested Polymerase chain reaction (nested PCR) 2 ปฏิกริยา ซึ่งจำเพาะกับ *B. caballi* และ *T. equi* พบผลบวกต่อเชื้อ *B. caballi* จำนวน 6 ตัวอย่าง และจากการนำข้อมูลสารพันธุกรรมไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรมใน GenBank และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนที่พบกับยีนที่พบในต่างประเทศ พบว่าสารพันธุกรรมที่ได้จากการหาลำดับเบสของเชื้อที่พบทั้งหมดถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่เคยมีการรายงานในประเทศมองโกเลีย เปอโตริโก และเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ USDA และห้องปฏิบัติการในประเทศญี่ปุ่น การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อที่มาจากต่างประเทศทั่วโลก สามารถใช้เป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคและช่วยในการดำเนินงานควบคุมและป้องกันโรคต่อไปได้

คำสำคัญ : โรคไพโรพลาสโมซิสในม้า บาบีเซีย ไทเลอเรีย ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

บทนำ

โรคไพโรพลาสโมซิสในม้า (equine piroplasmosis) เป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งในม้าที่ก่อให้เกิดความบั่นทอนต่อสุขภาพม้าโดยรวมและมีผลกระทบทางเศรษฐกิจ (Battsetseg et al., 2001) เกิดจากการติดเชื้อโปรโตซัวในเม็ดเลือดแดงคือ *Babesia caballi* และ *Theileria equi* ในเชิงสัณฐานวิทยานั้น ระยะเวลา merozoite ของ *B. caballi* มีรูปร่างเป็นหยดน้ำ (pyriform shape) มีขนาดประมาณ 2-5 μm x 1-1.5 μm และมักพบอยู่เป็นคู่ที่มีปลายด้านท้ายติดกันในเม็ดเลือดแดง ระยะเวลา merozoite ของ *T. equi* นั้นก็จะมีรูปร่างคล้ายคลึงกันแต่จะมีขนาดเล็กกว่าคือราว 1.5 μm และมักพบจำนวน 4 อันในเม็ดเลือดแดง ส่วนระยะ trophozoite ของทั้งสองเชื้อจะมีรูปร่างค่อนข้างหลากหลายได้แก่ วงกลม วงรี รูปไข่และมีขนาดราว 1.5-3 μm (de Waal, 1992) การติดเชื้อมักพบในสัตว์ตระกูลม้าทั้งหมดคือ ม้า ลา ล่อ และม้าลาย โดยมีพาหะนำโรคคือเห็บแข็ง (Ixodid ticks) ในสกุล *Hyalomma* spp. *Rhipicephalus* spp. และ *Dermacentor* spp. ทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งแบบที่ก่อให้เกิดอาการและไม่เกิดอาการทางคลินิก ซึ่งอาการทางคลินิคนั้นค่อนข้างมีความหลากหลายได้แก่ ไข้สูง (มากกว่า 104°F) อ่อนแรง เบื่ออาหาร น้ำหนักลดและบวมที่อวัยวะส่วนปลาย อาจพบจุดเลือดออกที่เยื่อเมือกต่างๆ โดยเฉพาะที่เปลือกตาที่สาม พบลักษณะดีซ่าน และบางกรณีพบอาการประสาทเช่นกล้ามเนื้ออ่อนแรง และชักร่วมด้วย (Wise et al., 2013) ทางพยาธิวิทยาพบว่าใน *T. equi* มักทำให้เกิดการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงอย่างเด่นชัดจนทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง พบค่า packed cell volume (PCV) ต่ำประมาณ 20% หรืออาจต่ำถึง 10% ได้ในกรณีการติดเชื้อเฉียบพลัน ส่วนใน *B. caballi* พบว่ามักเกิดการจับตัวกันเป็นก้อนของกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ ทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดขนาดเล็กอุดตัน (microvascular occlusion) หรือกรณีรุนแรงอาจทำให้เกิดการล้มเหลวของอวัยวะเนื่องจากภาวะ disseminated intravascular coagulation (DIC) โรคไพโรพลาสโมซิสอาจก่ออันตรายถึงแก่ชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของลูกม้าแรกเกิดและม้าโตเต็มวัยที่เพิ่งได้รับเชื้อเป็นจำนวนมากในครั้งแรก โดยอัตราการตายอยู่ที่ประมาณ 5-10% หรืออาจสูงถึง 50% หากเป็นกรณีที่ม้าโตเต็มวัยถูกส่งเข้าไปยังพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อ (endemic area) (Rothschild, 2013)

การตรวจวินิจฉัยโรคอาศัยการตรวจเลือดป้ายสไลด์และย้อมสีด้วย 5-10% Giemsa ทางอิมมูโนวินิจฉัยมีการใช้ complement fixation test (CFT) และ competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (cELISA) ซึ่งวิธีหลังนี้เป็นวิธีที่ทางองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) แนะนำให้ใช้และถูกใช้ในการตรวจคัดกรองม้าก่อนการเข้าประเทศสหรัฐอเมริกาในปัจจุบัน (Rothschild, 2013) ม้าที่อาศัยในเขตที่มีการระบาดของโรคอาจพบลักษณะของการมีภูมิคุ้มกันตลอดชีวิตภายหลังการติดเชื้อ *T. equi* (life-long immunity) ส่วนการติดเชื้อ *B. caballi* อาจพบภูมิคุ้มกันต่อเนื่องหลังการติดเชื้อได้เป็นระยะเวลาหลายปีก่อนที่เชื้อในกระแสเลือดจะหายไปเองตามธรรมชาติ (self-limiting) แต่ในบางกรณีก็อาจพบระดับแอนติบอดีตลอดชีวิตได้เช่นกัน (Wise et al., 2013)

ด้านระบาดวิทยาของเชื้อพบว่าพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคประกอบด้วยทวีปอเมริกากลางและใต้ แอฟริกา เอเชีย ยุโรปตอนใต้และประเทศแถบตะวันออกกลาง (WAHID, 2014) โดยในประเทศไทยมีการรายงานระดับแอนติบอดีในซีรัมม้าที่มีต่อเชื้อ *T. equi* และ *B. caballi* โดยเทคนิค CFT ซึ่งตรวจโดยห้องปฏิบัติการของ USDA (Tantaswasdi et al., 1998)

การวินิจฉัยโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลคือ polymerase chain reaction (PCR) ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในประเทศที่มีการระบาดของโรคไฟโรพลาสโมซิส เช่น มองโกเลีย (Battsetseg et al., 2001; Battsetseg et al., 2002a; Sloboda et al., 2011; Munkhjargal et al., 2013) เวเนซุเอลา (Rosales et al., 2013) จอร์แดน (Qablan et al., 2012) และแอฟริกาใต้ (Motlong et al., 2008) รวมถึงประเทศที่มีการเฝ้าระวังการเกิดโรคอย่างเข้มงวดอย่างสหรัฐอเมริกา (Hall et al., 2013) เนื่องจาก PCR เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง สามารถนำผลการตรวจมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อที่มาจากต่างพื้นที่ทั่วโลก เพื่อเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคและดำเนินการควบคุมและป้องกันต่อไปได้

การศึกษานี้เป็นการตรวจพบเชื้อ *B. caballi* และ *T. equi* สารพันธุกรรมของเชื้อในเลือดม้า และทำการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของเชื้อที่พบดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างเลือดและการตรวจโดยวิธีเลือดป้ายสไลด์

รวบรวมตัวอย่างเลือดม้าคณะแพศ พันธุ์และอายุที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยาเพื่อชันสูตรโรคในช่วงเดือนมกราคม – มีนาคม 2557 รวมจำนวน 84 ตัวอย่าง ทำการตรวจหาเชื้อโปรโตซัวในเลือดโดยวิธีฟิล์มเลือดป้ายสไลด์และย้อมด้วยสี 5% Giemsa และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง หลังจากนั้นตัวอย่างเลือดที่พบลักษณะของเชื้อโปรโตซัวในเม็ดเลือดแดงจะถูกดำเนินการสกัดสารพันธุกรรมต่อไป

การสกัดและเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

สารพันธุกรรมถูกสกัดจากตัวอย่างเลือดปริมาณ 300 ไมโครลิตร ด้วยชุดสกัด Geneaid™ DNA Isolation Kit (Geneaid, Taiwan) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำ และดำเนินการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี nested Polymerase chain reaction (nested PCR) ที่จำเพาะต่อยีน 48-KDa antigen (BC48) ของเชื้อ *B. caballi* และยีน equi merozoite antigen 1 (EMA-1) ของเชื้อ *T. equi* ตามวิธีที่ Battsetseg et al. (2001) เคยรายงาน โดยมีการปรับเปลี่ยนรายละเอียดบางส่วน คือ ใช้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเป็น 15 ไมโครลิตร โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยา nested PCR คือ $MgCl_2$ 15 μM (QIAGEN, Hilden, Germany) dNTP mix 2 mM (QIAGEN, Hilden, Germany) HotStarTaq DNA polymerase 2.5U (QIAGEN, Hilden, Germany) forward และ reverse primer 1 μM (ตารางที่ 1) โดยใส่สารสกัดพันธุกรรมปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา โดยตั้งโปรแกรม (Px2Thermal Cycler, Thermo scientific, USA) ดังนี้ initial activation ที่ 95°C นาน 15 นาที ตามด้วย 40 รอบของ denaturation ที่

94°C นาน 1 นาที annealing ที่ 56°C นาน 2 นาที extension ที่ 72°C นาน 2 นาที และ final extension ที่ 72°C นาน 5 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยา nested PCR ด้วย gel electrophoresis (1.5% agarose gel) แล้วย้อมด้วย ethidium bromide ดูภายใต้แสง UV เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder (Biolabs, England)

ตารางที่ 1. แสดง primer set ที่ใช้ในการทดสอบ

ชนิด		primers	ลำดับเบส
<i>B. caballi</i>	1 st PCR	BC48F1	5'-ACGAATTCCC ACAACAGCCGTGTT-3'
		BC48R3	5'-ACGAATTCGTA AAGCGTGGCCATG-3'
	2 nd PCR	BC48F11	5'-GGGCGACGTGACTAAGACCTTATT-3'
		BC48R31	5'-GTTCTCAATGTCAGTAGCATCCGC-3'
<i>T. equi</i>	1 st PCR	EMA5	5'-TCGACTTCCAGTTGGAGTCC-3'
		EMA6	5'-AGCTCGACCCACTTATCAC-3'
	2 nd PCR	EMA7	5'-ATTGACCACG TCACCATCGA-3'
		EMA8	5'-GTCCTTCTTGAGAACGAGGT-3'

การหาลำดับเบสและวิเคราะห์ Phylogenetic analysis

จากผลผลิตของปฏิกิริยา nested PCR ที่ได้ผลเป็นบวก สารพันธุกรรมเป้าหมาย (target DNA) จะถูกสกัดจากเจลที่ผ่านการทำ gel electrophoresis (1.5% agarose gel) สกัดโดยใช้ QIAquick Gel extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) นำสารพันธุกรรมที่ได้มาเข้าสู่กระบวนการการหาลำดับเบสโดยใช้ Big Dye® determinator V.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, USA) และนำไปหาข้อมูลลำดับเบสโดยเครื่อง 3730x/ Analyzer (Applied Biosystem, USA)

ข้อมูลของสารพันธุกรรมที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรมใน GenBank และ ทำ Phylogenetic analysis โดยวิเคราะห์ข้อมูลสารพันธุกรรมดังกล่าวร่วมกับยีนที่ได้มาจาก GenBank (ตารางที่ 2) โดยเทคนิค Maximum Likelihood (ML) ที่ใช้ Kimura2-parameter model และเพิ่มความถูกต้องแม่นยำโดยใช้ Bootstrap test เป็นจำนวน 1000 ซ้ำด้วยโปรแกรม MEGA ver.6.06 สุดท้ายนำรหัสสารพันธุกรรมมาแปลรหัสเป็นรหัสกรดอะมิโนโดยโปรแกรม EMBOSS Transeq และ EMBOSS NEEDLE และหาความคล้ายคลึงกัน (similarity) ของสายเปปไทด์ที่ได้จากแต่ละตัวอย่าง

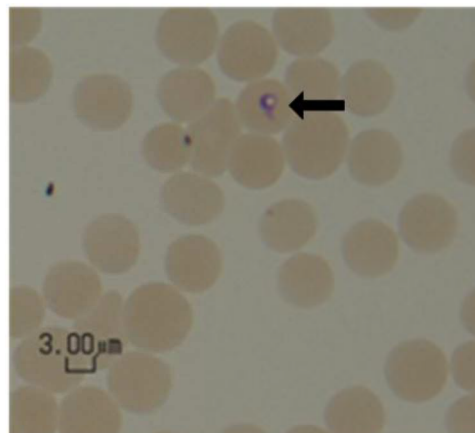
ตารางที่ 2. รหัส accession number ของสายพันธุกรรมใน GenBank ที่ใช้ในการทำ Phylogenetic analysis

ชนิด	Accession Number	แหล่งที่พบ
<i>B. caballi</i>	AB703050.1	มองโกเลีย
	AF092736.1	In vitro, USDA
	AB017700.1	In vitro, ญี่ปุ่น
	AB703062.1	มองโกเลีย
	AB731210.1	มองโกเลีย
	EU669865.1	เปโตรไตรโก
	GQ871778.1	แอฟริกาใต้
	KF0598878.1	อิสราเอล
	GQ871779.1	แอฟริกาใต้
<i>B. bigemima</i>	GQ871780.1	แอฟริกาใต้
	M60878.1	ละตินอเมริกา
<i>B. bovis</i>	FJ588012.1	บราซิล
<i>B. orientalis</i>	JX993940.2	จีน
<i>B. divergens</i>	HQ538429.1	ฝรั่งเศส
<i>B. canis</i>	M91168.1	ออสเตรเลีย

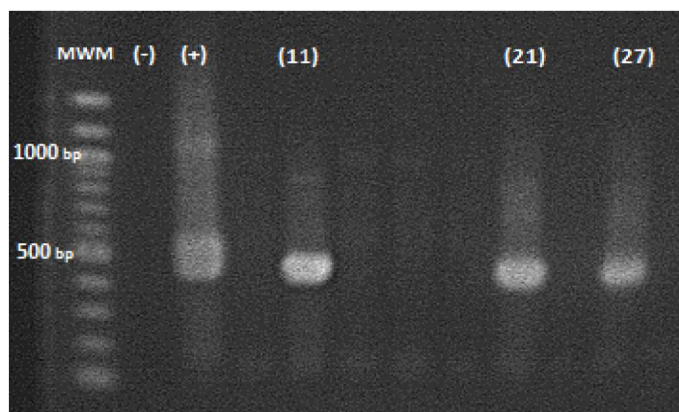
ผล

จากตัวอย่างเลือดม้าทั้งหมด 84 ตัวอย่าง พบเชื้อที่มีลักษณะคล้ายกับเชื้อโปรโตซัวในเม็ดเลือดแดงรวม 39 ตัวอย่าง โดยวิธีเลือดป้ายสไลด์ย้อมสี (รูปที่ 1) จากนั้นนำตัวอย่างเลือดทั้ง 39 ตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติมโดยวิธี nested PCR ผลพบว่า ตัวอย่างเลือดม้าหมายเลข 11, 21, 27, 45, 79 และ 83 พบสารพันธุกรรมเป้าหมายที่ 450 เบส แสดงว่าให้ผลบวกต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *B. caballi* (รูปที่ 2) และไม่พบตัวอย่างใดๆ ให้ผลบวกต่อวิธี nested PCR ต่อเชื้อ *T. equi* เมื่อนำผลของลำดับสายพันธุกรรมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรมใน GenBank พบว่าเชื้อที่พบมีความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับเชื้อ *B. caballi* ที่พบในประเทศมองโกเลีย (AB703050.1) ที่ 98% identity โดยมีค่า E-value = 0.0 ผลการวิเคราะห์ทาง Phylogenetic analysis ในการศึกษาพบว่าสารพันธุกรรมของยีน BC48 จากเชื้อ *B. caballi* ทั้งหมดนั้นจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่พบในประเทศมองโกเลีย เปโตรไตรโก และเชื้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของ USDA และในห้องปฏิบัติการของประเทศญี่ปุ่น โดยมีค่าความน่าเชื่อถือ (Bootstrap value) ที่ระดับ 100% ซึ่งความแตกต่างอย่างชัดเจนจากเชื้อที่พบในประเทศแอฟริกาใต้และอิสราเอลที่ความน่าเชื่อถือระดับ 97% (รูปที่3) นอกจากนี้ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการ

แปลงรหัสพันธุกรรมของยีน BC48 ที่สกัดได้จากทั้ง 6 ตัวอย่างก็พบว่ามีค่าคล้ายคลึงกัน (% similarity) ระหว่างตัวอย่างสูง คือ อยู่ในช่วง 97.4 - 99.3% (ตารางที่ 3)



รูปที่ 1 เชื้อโปรโตซัวในเม็ดเลือดแดงที่พบจากตัวอย่างเลือดปัสสาวะไลต์ย้อมสี Giemsa ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (ลูกศรชี้)



รูปที่ 2 ภาพ Gel electrophoresis ของการตรวจ nested PCR ต่อเชื้อ *B. caballi*

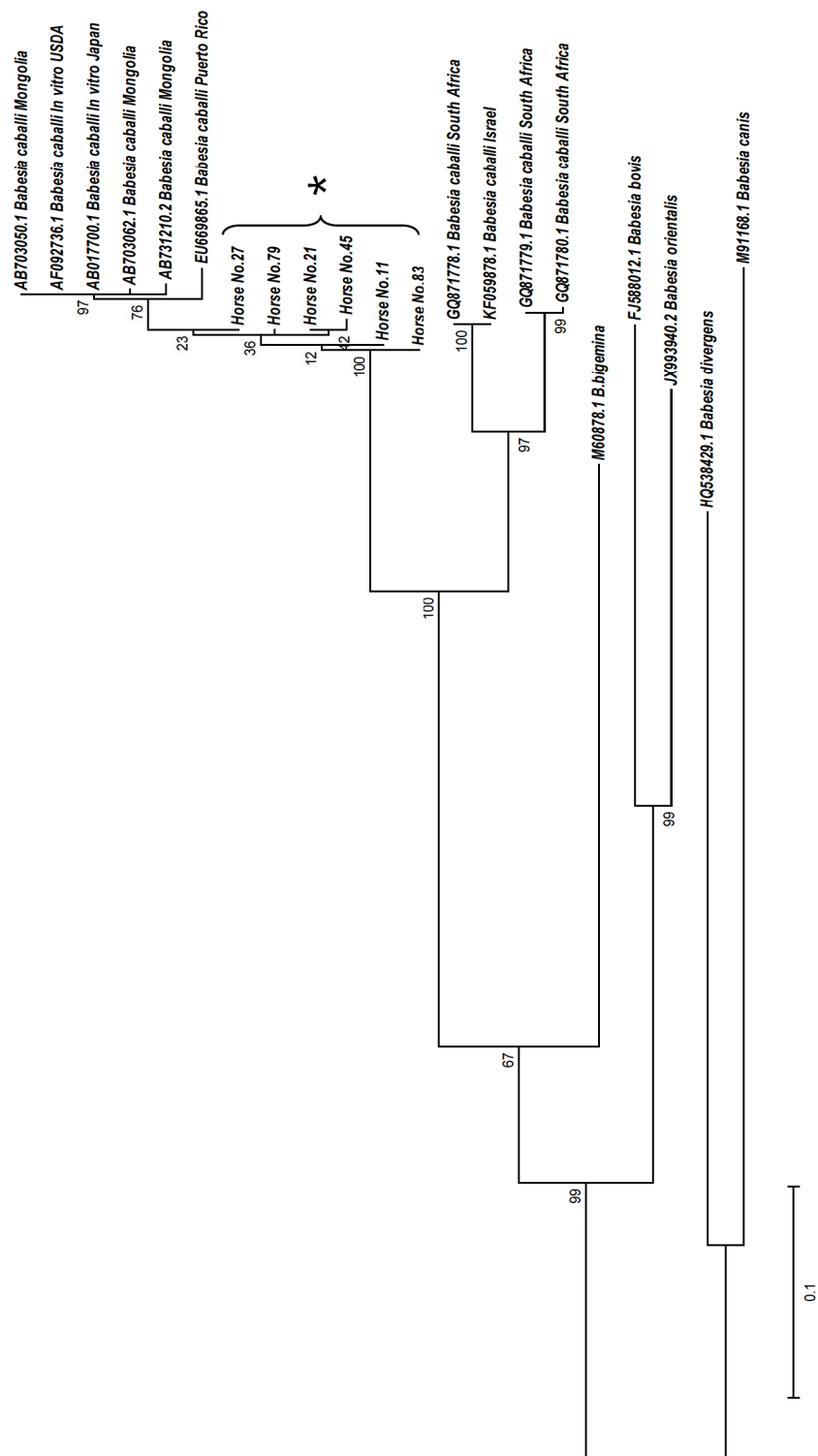
ในภาพแสดงขนาดของยีนเป้าหมาย (target gene) ที่ขนาด 450 เบสแพร์

MWM : Molecular weight marker ขนาด 100 เบสแพร์

(-) : Negative control

(+) : Positive control

(11), (21), และ (27) : หมายเลขตัวค่างเลือดม้าที่ให้ผลบวก



รูปที่ 3. ผลวิเคราะห์ทาง Phylogenetic analysis โดยใช้เทคนิค Maximum Likelihood (ML) ที่ใช้ Kimura 2-parameter model และเพิ่มความถูกต้องแม่นยำ โดยใช้ Bootstrap test เป็นจำนวน 1000 ซึ่งด้วยโปรแกรม MEGA ver.6.06 (Tamura et al., 2013)

ตารางที่ 3. Pair-wise comparison ระหว่างลำดับกรดอะมิโนจากตัวอย่างเชื้อ *B. caballi* จากการศึกษาครั้งนี้ โดยโปรแกรม EMBOSS Transeq และ EMBOSS NEEDLE (Rice et al., 2000) และหาความคล้ายคลึงกัน (similarity) ของสาย เปปไทด์

Isolate	Horse No.27	Horse No.79	Horse No.21	Horse No.45	Horse No.11	Horse No.83
Horse No.27	100	98.7	98.7	98.7	97.4	98
Horse No.79		100	98.7	98.7	97.4	98
Horse No.21			100	100	97.4	98
Horse No.45				100	97.4	98
Horse No.11					100	99.3
Horse No.83						100

วิจารณ์และสรุปผล

การพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. caballi* ในรายงานนี้เป็นการยืนยันข้อสันนิษฐานของรายงานอื่นเกี่ยวกับลักษณะการกระจายตัวของเชื้อก่อโรคไฟโรพลาสโมซิสในม้า ว่าน่าจะสามารถพบได้ทั่วไปในประเทศในเขตร้อนชื้น และกึ่งร้อนชื้น แม้ว่าจะไม่มีการรายงานการพบเชื่อดังกล่าวส่งไปยังองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศก็ตาม (Wise et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีความสอดคล้องบางประการกับรายงานการสำรวจโรคในม้าทั่วประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2540-2541 ที่มีจุดประสงค์ในการเตรียมความพร้อมในการเป็นเจ้าภาพเอเชียนเกมส์ของประเทศไทยในปลายปี พ.ศ. 2541 โดยในครั้งนั้นพบว่าจากตัวอย่างซีรัมม้าที่ทำการทดสอบทั้งหมด 400 ตัวอย่างที่นำมาตรวจหาระดับแอนติบอดีที่มีต่อเชื้อสาเหตุของโรคไฟโรพลาสโมซิสด้วยวิธี CFT มีจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *T. equi* และ *B. caballi* ทั้งสิ้น 62 และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ (Tantaswasdi et al., 1998) แสดงให้เห็นว่าในประเทศไทยน่าจะมีการระบาดของเชื่อดังกล่าวมาก่อนหน้านี้เพียงแต่จำนวนรายงานทางวิชาการเกี่ยวกับเรื่องนี้ค่อนข้างมีปริมาณจำกัด เหตุผลสนับสนุน ในการพบเชื้อ *B. caballi* อีกประการหนึ่งคือ รายงานการพบเห็บ สกุนต์ *Dermacentor* spp. และ *Rhipicephalus* spp. (หรือเดิมสกุล *Boophilus* spp.) ซึ่งเป็นพาหะสำคัญของเชื้อ *B. caballi* (Rothschild, 2013) ในหลายพื้นที่ของประเทศไทย (Gould et al., 1973) โดยเฉพาะในเขตรอยต่อชายแดนไทย-พม่า (Parola et al., 2003) ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในสัตว์ป่า (Kollars et al., 2001; Grassman et al., 2004) และในมนุษย์ (Jean-Paul et al., 2009) ข้อสังเกตคือเห็บที่เป็นพาหะของทั้ง *B. caballi* และ *T. equi* เป็นเห็บในสกุลเดียวกัน (Battsetseg et al., 2001) ดังนั้นโอกาสพบการติดเชื้อร่วมตามธรรมชาติของทั้งสองเชื้อจึงมีความเป็นไปได้ นอกจากนี้ยังไม่ควรมองข้ามการติดเชื้อด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน และลักษณะการถ่ายเลือดที่ไม่เหมาะสมอีกด้วย (Wise et al., 2013)

ด้วยสาเหตุที่การรายงานการพบเชื้อสาเหตุของโรคไฟโรพลาสโมซิสในประเทศไทยนั้นมีปริมาณจำกัดที่ได้กล่าวมาแล้ว รายงานฉบับนี้จึงน่าจะเป็นรายงานแรกสำหรับการพบเชื้อและสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. caballi* ในประเทศไทย การใช้ปฏิกิริยา nested PCR เพื่อการตรวจหาเชื้อ *B. caballi* ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าให้ผลดีต่อการตรวจหาเชื้อในหลายๆทวีป ได้แก่ เอเชีย (Battsetseg et al., 2002a) อเมริกาใต้ (Battsetseg et al., 2002b) และแอฟริกา (Motlong et al., 2008) โดยปฏิกิริยา nested PCR ของเชื้อ *B. caballi* ดังกล่าวนี้นี้เป็นการเพิ่มจำนวนของยีน BC48 ซึ่งเป็นยีนต้นแบบของ 48 K-Da Rhoptry protein ที่ทำหน้าที่ในการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของ *B. caballi* โปรตีนชนิดนี้อยู่ใน merozoite ซึ่งมีประโยชน์สำหรับงานอิมมูโนวินิจฉัย และพบว่ายีน BC48 นี้ยังเป็นส่วนอนุรักษ์ (conserved region) ของเชื้อ *B. caballi* ที่พบในพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก (Ikadai et al., 1999) โดยในรายงานนี้พบว่าเชื้อ *B. caballi* ที่พบในประเทศไทยนี้มีลักษณะของสายพันธุกรรมบนยีน BC48 ใกล้เคียงกับเชื้อที่พบในประเทศมองโกเลีย และในห้องปฏิบัติการของ USDA ซึ่งเป็นการจัดกลุ่มที่มีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาทาง phylogenetic ก่อนหน้านี้ (Munkhjargal et al., 2013) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบผลบวกต่อปฏิกิริยา nested PCR ดังกล่าวเพียง 6 ตัวอย่างจาก 39 ตัวอย่างที่พบลักษณะของเชื้อโปรโตซัวในเม็ดเลือดแดงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ผลการตรวจที่ขัดแย้งกันนี้อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ โดยในเชิงเทคนิคนั้น PCR เป็นวิธีที่มีรายงานว่ามีความไวสูง สามารถตรวจเชื้อที่มีปริมาณน้อยมากในตัวอย่างได้ แต่ในกรณีนี้อาจพบว่าไม่ได้ให้ผลความไวตรงตามที่รายงานนั้นกล่าว เนื่องจากมีปัจจัยการวินิจฉัยมาเกี่ยวข้องหลายส่วนได้แก่ ความแตกต่างของสารประกอบปฏิกิริยา PCR และเครื่องมือที่ใช้ ตลอดจนความสม่ำเสมอของเชื้อที่ตรวจในตัวอย่าง จึงเป็นการยากที่จะทำ Inter-laboratory validation สำหรับเทคนิค PCR เพื่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุของโรคไฟโรพลาสโมซิสในม้า (Wise et al., 2013) อีกประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจคือ Tantaswasdi และคณะ (1998) ได้รายงานว่าพบความชุกทางซีรัมวิทยาของเชื้อ *T. equi* มากกว่า *B. caballi* เมื่อพิจารณาร่วมกับรายงานต่างๆ ที่มักจะระบุว่า การติดเชื้อ *T. equi* เป็นการติดเชื้อระยะยาวหรืออาจถึงตลอดชีวิต (Rothschild, 2013; Hall et al., 2013) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบผลบวกต่อปฏิกิริยา nested PCR ของเชื้อ *T. equi* จึงอาจเป็นไปได้ว่า ในกรณีของการติดเชื้อเรื้อรังเกิดการสะสมเชื้อในอวัยวะต่างๆ เช่น ม้าม ระบบประสาทส่วนกลาง ไชกระดูก และเส้นเลือดฝอย อาจทำให้ตัวอย่างเลือดที่เก็บมาไม่มีตัวเชื้อหรือมีเชื้อในปริมาณต่ำมากได้ (Wise et al., 2013)

การศึกษานี้เป็นการให้ข้อมูลของลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. caballi* และและความสัมพันธ์ของยีน BC48 ระหว่างเชื้อที่พบในประเทศไทยและต่างประเทศ นอกจากนี้เพื่อเป็นการต่อยอดองค์ความรู้เกี่ยวกับโรค ไฟโรพลาสโมซิสในม้า ในอนาคตอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมรวมถึงด้านระบาดวิทยา และสกุลเห็บที่เป็นพาหะของเชื้อก่อโรคไฟโรพลาสโมซิสในม้าในประเทศไทย และการศึกษาลักษณะของสารพันธุกรรมชนิดอื่นของเชื้อซึ่งยังเป็นเรื่องที่ท้าทายอีกมาก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Naoaki Yokoyama, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างสารพันธุกรรมของเชื้อควบคุมบวก *B. caballi* และ *T. equi*

เอกสารอ้างอิง

- Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Claveria, F., Byambaa, B., Battur, B., Boldbaatar, D., Batsukh, Z., Khaliunaa, T., Battsetseg, G., Igarashi, I., Nagasawa, H. and Fujisaki, K. 2002a. Detection of equine *Babesia* spp. gene fragments in *Dermacentor nuttalli* Olenov 1929 infesting mongolian horses, and their amplification in egg and larval progenies. J. Vet. Med. Sci. 64(8): 727-730.
- Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Claveria, F. G., Inoue, N., Alhassan, A., Kanno, T., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T. and Fujisaki, K. 2002b. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. Vet. Parasitol. 107(4): 351-357.
- Battsetseg, B., Xuan, X., Ikadai, H., Bautista, J. L., Byambaa, B., Boldbaatar, D., Battur, B., Battsetseg, G., Batsukh, Z., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T. and Fujisaki, K. 2001. Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in *Dermacentor nuttalli* adult ticks. Int. J. Parasitol. 31(4): 384-386.
- de Waal, D.T. 1992. Equine piroplasmosis: a review. Br. Vet. J. 148(1): 6-14.
- Gould, D.J., Top, F., H, Marshall, J.T., Muangman, D., Tanskul, P. and Weaver, R.E. 1973. "Survey of Tick-borne Viruses in Thailand." [Online] Available: <http://www.afirms.org/weblib/eapr/1973/APR73p053-054.pdf>. Accessed March 6, 2014.
- Grassman, L.I., Jr., Sarataphan, N., Tewes, M.E., Silvy, N.J. and Nakanakrat, T. 2004. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing wild carnivores in Phu Khieo Wildlife Sanctuary, Thailand. J. Parasitol. 90(3): 657-659.
- Hall, C.M., Busch, J.D., Scoles, G.A., Palma-Cagle, K.A., Ueti, M.W., Kappmeyer, L.S. and Wagner, D.M. 2013. Genetic characterization of *Theileria equi* infecting horses in North America: evidence for a limited source of U.S. introductions. Parasit. Vectors. 6: 35.

- Ikadai, H., Xuan, X., Igarashi, I., Tanaka, S., Kanemaru, T., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N. and Mikami, T. 1999. Cloning and expression of a 48-kilodalton *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 37(11): 3475-3480.
- Jean-Paul, C., Demoraes, F., Souris, M., Kittayapong, P. and Gonzalez, J.P. 2009. Spatial Distribution of Ticks in Thailand: A Discussion Basis for Tick-borne Virus Spread Assessment. International Journal of Geoinformatics. 5(1): 57-62.
- Kollars, T.M., Jr., Tippayachai, B. and Bodhidatta, D. 2001. Short report: Thai tick typhus, *Rickettsia honei*, and a unique rickettsia detected in *Ixodes granulatus* (Ixodidae: Acari) from Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65(5): 535-537.
- Motlong, M.Y., Thekiso, O.M., Alhassan, A., Bakheit, M., Motheo, M.P., Masangane, F.E., Thibedi, M.L., Inoue, N., Igarashi, I., Sugimoto, C. and Mbatia, P.A. 2008. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horses belonging to resource-poor farmers in the north-eastern Free State Province, South Africa. Onderstepoort. J. Vet. Res. 75(2): 141-146.
- Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Nyamjargal, T., Aboulaila, M., Purevtseren, B., Bayarsaikhan, D., Byambaa, B., Terkawi, M.A., Yokoyama, N. and Igarashi, I. 2013. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. Infect. Genet. Evol. 16: 178-185.
- Parola, P., Cornet, J.P., Sanogo, Y.O., Miller, R.S., Thien, H.V., Gonzalez, J.P., Raoult, D., Telford, I.S. and Wongsrichanalai, C. 2003. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. J. Clin. Microbiol. 41(4): 1600-1608.
- Qablan, M.A., Sloboda, M., Jirku, M., Obornik, M., Dwairi, S., Amr, Z.S., Horin, P., Lukes, J. and Modry, D. 2012. Quest for the piroplasms in camels: identification of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Jordanian dromedaries by PCR. Vet. Parasitol. 186(3-4): 456-460.
- Rosales, R., Rangel-Rivas, A., Escalona, A., Jordan, L.S., Gonzatti, M.I., Aso, P.M., Perrone, T., Silva-Iturriza, A. and Mijares, A. 2013. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR. Vet. Parasitol. 196(1-2): 37-43.
- Rothschild, C.M. 2013. Equine Piroplasmosis. J. Equine Vet. Sci. 33: 497-508.

- Sloboda, M., Jirku, M., Lukesova, D., Qablan, M., Batsukh, Z., Fiala, I., Horin, P., Modry, D. and Lukes, J. 2011. A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in North-Eastern Mongolia. *Vet. Parasitol.* 179(1-3): 246-249.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Tantaswasdi, U., Punyahotra, R., Wongkasemjit, S. and Indrakamhang, P. 1998. A Serological Survey of Equine Infectious Diseases in Thailand. *Thai J. Vet. Med.* 28(4): 51-58.
- Wise, L.N., Kappmeyer, L.S., Mealey, R.H. and Knowles, D.P. 2013. Review of equine piroplasmosis. *J. Vet. Intern. Med.* 27(6): 1334-1346.
- World Animal Health Information Database (WAHID). "Equine Piroplasmosis." [Online] Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/EQUINE_PRIOPALSMOSIS_FINAL.pdf. Accessed May 20, 2014.

Molecular evidence of *Babesia caballi* in horses in Thailand

Sasiwimon Yoo-eam* Muncharee Tattiyapong Supawan Ngamjiteue
Montakan Vongpakorn

National Institute of Animal Health, KasetKlang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900.

*Corresponding author: Tel. 025798908 ext. 323 Fax. 025798919 E-mail: y_sasiwimon@yahoo.com

Abstract

Equine piroplasmosis is an important tick-borne disease of horses that debilitates their general health status and possibly causes economic impact. This study aims to determine *Babesia caballi* and *Theileria equi*, the causative agents of the disease. Collection of 84 horse blood samples, submitted to Parasitology section, National Institute of Animal Health, in the period of January through March 2014. The blood samples were examined by stained thin smear under light microscope and molecular technique. From blood smear, the results revealed that protozoal-like organisms were found in 39 samples which led to further investigation with nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR) both specific for *B. caballi* and *T. equi* detection. As a result, target DNA from nested PCR of *B. caballi* positive for 6 samples were successfully amplified. The discrepancy between the results are discussed, phylogenetic analysis shows that the isolates from this study are classified into the same group with those reported from Mongolia, Puerto Rico and the in vitro isolate from USDA and Japanese laboratories. Analysis of the genetic diversity of the agent originated from different locations worldwide will be beneficial for the outbreak monitoring and preventive schemes.

Keywords: Equine piroplasmosis, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, nested PCR