

เปรียบเทียบวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) กับวิธี ตรวจเลือดป้ายสไลด์แบบบาง (Stained thin smear) ในการตรวจหาเชื้อปรสิต ในเลือดโค

ปริญญพร เพระดีสกุล* อางอง อ่อนหวาน สาทิส ผลภาค อุษา นาคสกุล

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40260

* ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 0-4326-2050 โทรสาร 0-4326-1246 E-mail : parinyaphorn.p@dld.go.th

บทคัดย่อ

การติดเชื้อปรสิตในเลือดโคในประเทศไทยได้รับการตรวจวินิจฉัยพื้นฐานโดยวิธีตรวจเลือดป้ายสไลด์แบบบาง (Stained thin smear) ซึ่งเป็นวิธีแบบมาตรฐานดั้งเดิม ซึ่งยากต่อการจำแนกชนิดเชื้อในสัตว์ที่มีการติดเชื้อมาก การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อเปรียบเทียบวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) กับวิธีตรวจเลือดป้ายสไลด์แบบบาง (Stained thin smear) โดยทำการตรวจตัวอย่างเลือดโคในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น ทั้งที่สัตว์แสดงอาการและไม่แสดงอาการ จำนวน 100 ตัวอย่าง พบว่าระดับความสอดคล้องระหว่างวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) กับวิธีตรวจเลือดป้ายสไลด์แบบบาง (Stained thin smear) โดยใช้ค่า Kappa (K) ที่ความเชื่อมั่น 95% ผลการทดสอบพบว่า *Anaplasma* spp. และ *Babesia bigemina* มีความสอดคล้องในระดับพอใช้ คือ 21.9% (15/49) และ 31.1% (1/5) ตามลำดับ *Theileria* spp. มีความสอดคล้องในระดับดี คือ 75.7% (29/40) ส่วน *Babesia bovis* และ *Trypanosoma evansi* และ ความสอดคล้องในระดับดีมาก คือ 100% (1/1) ซึ่งเชื่อกันว่ามีตัวอย่างที่พบจำนวนน้อย ทั้งนี้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) สามารถช่วยในการยืนยันชนิดของปรสิตเลือดโค

คำสำคัญ : เปรียบเทียบ ปรสิตในเลือดโค วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส วิธีตรวจเลือดป้ายสไลด์แบบบาง

ค่า kappa (K) ที่ความเชื่อมั่น 95%

บทนำ

โคเป็นปศุสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยในปัจจุบัน มีการส่งเสริมการเลี้ยงกันอย่างกว้างขวางทั้งโคเนื้อและโคนม ซึ่งในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นพื้นที่ที่มีการเลี้ยงโคเนื้อเป็นอันดับหนึ่งประมาณร้อยละ 50 และโคนมเลี้ยงเป็นอันดับ 2 ของประเทศไทย หรือประมาณร้อยละ 25 ของปริมาณการเลี้ยงโคทั่วประเทศ (กองแผนงาน กรมปศุสัตว์, 2556) ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมอย่างยิ่งต่อการเกิดโรคทางปรสิต ส่งผลต่อสุขภาพโคให้สัตว์เกิดการเจ็บป่วย ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ การก่อโรคของปรสิตเกิดได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น ดูดเลือด แยกอาหาร ทำลายอวัยวะภายใน และเนื้อเยื่อภายในร่างกาย เป็นผลให้สัตว์ซูบผอม น้ำนมลดลง อ่อนแอ แ่่งลูก และตายได้ในที่สุด (มานวิภา และคณะ, 2538 ; วีรพล, 2553) ปัญหาการติดเชื้อปรสิตในเลือดมีทุกๆ ปี จากการเฝ้าระวังและติดตามพบปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ของการติดเชื้อได้แก่ สภาวะเครียดต่างๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงฤดูกาล โคสาวท้อง แม่โคในระยะหลังคลอดใหม่ ช่วงรีดนมที่แม่โคให้ปริมาณนมที่สูง การเคลื่อนย้ายสัตว์มายังพื้นที่เลี้ยงใหม่ หรือในช่วงที่พบปริมาณพาหะนำโรคได้แก่ตัวเห็บและแมลงดูดเลือดชุกชุม เป็นต้น และปรสิตที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน มีดังนี้ *Anaplasma marginale* ก่อให้เกิดโรค Anaplasmosis มีเห็บและแมลงดูดเลือดเป็นพาหะ โคที่ติดเชื้อมีอาการเฉียบพลัน คือ โลหิตจาง อ่อนเพลีย ไข้ ท้องผูก ดีซ่าน เกิดอาการขาดน้ำ ชี้น หายใจลำบาก และแ่่งลูก (Ristic, 1977) ส่วน *Theileria* spp. ก่อให้เกิดโรค Theileriosis มีเห็บเป็นพาหะ สัตว์ที่ติดเชื้อมีอาการเบื่ออาหาร อ่อนเพลีย มีไข้ และในโคนมผลิตน้ำนมลดลง (CFSPH, 2009) ส่วน *Babesia bigemina* และ *B. bovis* ก่อให้เกิดโรค Babesiosis มีเห็บ *Rhipicephalus* spp. เป็นพาหะ โคที่ติดเชื้อ *B. bigemina* พบการติดเชื้อมากกว่าในเม็ดเลือดแดงซึ่งมักจะเกิน 10-30% ที่จะทำให้สัตว์แสดงอาการป่วย มีไข้ ปัสสาวะสีเข้ม และโลหิตจาง (OIE, 2012b) ต่างจากโคที่ติดเชื้อ *B. bovis* จะมีอาการไข้สูง ขาอ่อนแรง เบื่ออาหาร ชัก และมีอาการทางประสาท โลหิตจาง และปัสสาวะสีเข้ม การติดเชื้อมากกว่านี้แม้ว่าร้อยละของเชื้อที่พบในเม็ดเลือดแดงจะไม่สูง (<1%) ก็ทำให้สัตว์แสดงอาการป่วยและตายได้ ต่างจากการ และ *Trypanosoma evansi* ก่อโรค Trypanosomosis มีแมลงดูดเลือดหลายชนิด เช่น เหลือบ (*Tabanus* spp.) เป็นพาหะ สัตว์ที่ติดเชื้อมีอาการตัวแข็งหลังแข็ง มีไข้ เจ็บขา ผอมเรื้อรัง ขาบวม น้ำ น้มนมลด มีอาการทางประสาท และแ่่งลูก (มานวิภา และสาทิส, 2556)

การตรวจหาปรสิตในเลือดโคโดยเทคนิคการย้อมสีเลือดป้ายสไลด์แบบบาง (Stained thin smear) เป็นวิธีพื้นฐานหรือวิธีดั้งเดิมที่นิยมใช้ในการตรวจหาปรสิตในเลือด มีค่าใช้จ่ายน้อย แต่ผู้ตรวจวินิจฉัยต้องเป็นผู้ที่มีประสบการณ์และมีทักษะเป็นอย่างดี (Bishop and Adams, 1973) ส่วนใหญ่ตรวจพบเมื่อสัตว์แสดงอาการป่วยแล้ว (Noaman and Shayan, 2010; OIE, 2012b) ส่วนการตรวจหาปรสิตในเลือดโดยวิธีทางชีวโมเลกุล มีความไว ความจำเพาะสูง สามารถวินิจฉัยได้รวดเร็ว (โกสุม และคณะ, 2541) นอกจากนี้ยังช่วยในการจำแนกชนิดเชื้อในสัตว์ที่มีการติดเชื้อในระดับต่ำ ซึ่งเป็นพาหะนำโรคแฝงอยู่ในฝูงที่บางครั้งอาจตรวจพบเชื้อได้ยากด้วยวิธีพื้นฐานหรือวิธีดั้งเดิม เพื่อใช้ประกอบการประเมินสถานะการติดเชื้อภายในฝูงสัตว์และเฝ้าระวังโรคอย่างเหมาะสมต่อไป

ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความสอดคล้องของวิธีทดสอบระหว่างวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) กับวิธีตรวจเลือดป้ายสไลด์แบบบาง ในการตรวจหาเชื้อปรสิตในเลือดโค และเพื่อเป็นแนวทางในการนำเสนอเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสมาใช้เป็นวิธีการสนับสนุนในการตรวจหาเชื้อปรสิตในเลือดโคในงานประจำของห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภูมิภาค

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดโคในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น จำนวน 100 ตัวอย่าง โดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณโคนหาง (coccygeal vein) ใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว (EDTA) แบ่งส่วนหนึ่งมาตรวจหาเชื้อปรสิตในเลือดด้วยวิธี Stained thin smear ส่วนเลือดที่เหลือนำมาใส่หลอดเก็บรักษาไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทดสอบด้วยวิธี PCR

การตรวจหาเชื้อปรสิตในเลือดโคโดยวิธี Stained thin smear

ใช้ hematocrit capillary tube ดูดเลือดขึ้นมาและหยดลงบนกระจกสไลด์ ใช้กระจกสไลด์อีกแผ่นวางบนหยดเลือดและดันกระจกสไลด์ไปด้านหลังด้วยความเร็วคงที่และสม่ำเสมอ ให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ บนกระจกสไลด์ ทำให้เลือดแห้งอย่างรวดเร็วโดยโบกไปมาในอากาศหรือเป่าด้วยพัดลม นำไปแช่ใน absolute methanol นาน 5 นาที จากนั้นนำขึ้นตากให้แห้งในอากาศ หรือใช้พัดลมเป่าให้แห้ง นำไปย้อมด้วยสี Giemsa 10% นาน 30 - 40 นาที ล้างสี Giemsa ด้วยน้ำสะอาดจนหมด ยกตากให้แห้ง นำไปตรวจหาเชื้อปรสิตในเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ส่องสว่างด้วยขนาดเลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า ตามวิธีที่ระบุใน OIE (2012a)

การตรวจหาเชื้อปรสิตในเลือดโคโดยวิธี PCR

การสกัดตัวอย่าง

สกัดสารพันธุกรรมของเชื้อปรสิตจากตัวอย่างเลือดโคทั้ง 100 ตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างเลือด 300 ไมโครลิตร สกัดด้วยชุดสกัด Geneaid™ DNA Isolation Kit (Geneaid, Taiwan) และปฏิบัติตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำ

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อปรสิตในเลือด 5 ชนิด ได้แก่ *Anaplasma* spp., *Theileria* spp., *B. bigemina*, *B. bovis* และ *T. evansi* จากตัวอย่างเลือดโคทั้ง 100 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ ดังตารางที่ 1 และใช้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเป็น 15 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่อง Thermal cycler (GeneAmp®)

เชื้อ *Anaplasma* spp. มีส่วนประกอบดังนี้ dNTP mix 200 μ M (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) $MgCl_2$ 1.5 mM (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) iTaq DNA polymerase 0.4 U (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) forward และ reverse primer 0.33 μ M และใช้ DNA template 1 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรม pre-denature ที่ 95 °C นาน 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denaturation ที่ 94 °C นาน 1 นาที annealing ที่ 60 °C นาน 1 นาที และ extension ที่ 72 °C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ Final extension ที่ 72 °C นาน 3 นาที

เชื้อ *Theileria* spp. มีส่วนประกอบดังนี้ dNTP mix 200 μ M (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) $MgCl_2$ 1.5 mM (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) iTaq DNA polymerase 0.4 U (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) forward และ reverse primer 0.33 μ M และใช้ DNA template 1 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรม pre-denature ที่ 95 °C นาน 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denaturation ที่ 95 °C นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ annealing ที่ 49 °C นาน 1 นาที และ extension ที่ 72 °C นาน 2 นาที จำนวน 40 รอบ Final extension ที่ 72 °C นาน 10 นาที

เชื้อ *B. bigemina* มีส่วนประกอบดังนี้ dNTP mix 200 μ M (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) $MgCl_2$ 1.5 mM (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) iTaq DNA polymerase 0.4 U (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) forward และ reverse primer 0.2 μ M และใช้ DNA template 1 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรม pre-denature ที่ 95 °C นาน 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denaturation ที่ 95 °C นาน 1 นาที annealing ที่ 61 °C นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72 °C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ Final extension ที่ 72 °C นาน 7 นาที

เชื้อ *B. bovis* มีส่วนประกอบดังนี้ dNTP mix 200 μ M (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) $MgCl_2$ 1.5 mM (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) iTaq DNA polymerase 0.4 U (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) forward และ reverse primer 0.67 μ M และใช้ DNA template 1 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรม pre-denature ที่ 95 °C นาน 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denaturation ที่ 94 °C นาน 45 วินาที annealing ที่ 55 °C นาน 45 วินาที และ extension ที่ 73 °C นาน 45 วินาที จำนวน 35 รอบ Final extension ที่ 73 °C นาน 7 นาที

เชื้อ *T. evansi* มีส่วนประกอบดังนี้ dNTP mix 200 μ M (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) $MgCl_2$ 1.5 mM (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) iTaq DNA polymerase 0.4 U (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) forward และ reverse primer 0.33 μ M และใช้ DNA template 1 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรม pre-denature ที่ 95 °C นาน 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denaturation ที่ 95 °C นาน 45 วินาที annealing ที่ 59 °C นาน 45 วินาที และ extension ที่ 72 °C นาน 45 วินาที จำนวน 30 รอบ Final extension ที่ 72 °C นาน 10 นาที

การตรวจหา PCR product

นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจหาแถบ DNA ของเชื้อแต่ละชนิดด้วยวิธี electrophoresis โดยผ่าน agarose gel 1.5 % ใช้กระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำไปย้อมสีแผ่นเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที และส่องดูผลด้วยเครื่อง UV transilluminator

ตารางที่ 1 ชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในเชื้อปรสิตแต่ละชนิด

ชนิดเชื้อ	ชื่อไพรเมอร์	สายพันธุกรรม	ขนาด DNA	
			เป้าหมาย (bp)	เอกสารอ้างอิง
<i>Anaplasma</i> spp.	Am3	5'-GTGGCAGACGGGTGAGTAATG-3'	815-830	Figuerola et al. (1993)
	Am4	5'-CATGTCAAGAAGTGGTAAGGT-3'		
<i>Theileria</i> spp.	989	5'-AGTTTCTGACCTATCAG-3'	1098	d'Oliveira et al. (1995)
	990	5'-TTGCCTTAACTTCCTTG-3'		
<i>B. bigemina</i>	Bg3	5'-TAGTTGTATTTTCAGCCTCGCG-3'	689	Lanham and Godfrey (1980)
	Bg4	5'-AACATCCAAGCAGCTAGTTAG-3'		
<i>B. bovis</i>	Bb1	5'-TTTGGTATTTGTCTTGGTCAT-3'	446	Chansiri and Bagnara (1995)
	Bb2	5'-ACCACTGTAGTCAAACCTCACC-3'		
<i>T. evansi</i>	TR3	5'-GCGCGGATTCTTTGCAGACGA-3'	257	Chansiri et al. (2002)
	TR4	5'-TGCAGACACTGGAATGTTACT-3'		

การตรวจหาลำดับสารพันธุกรรม (sequencing)

ส่งตัวอย่าง PCR product ที่ให้ผลบวกจากวิธี PCR ต่อเชื้อปรสิตทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ กรณีพบตัวอย่างที่เป็นบวกในแต่ละชนิดเชื่อน้อยกว่า 5 ตัวอย่าง ทำการส่งตรวจหาลำดับสารพันธุกรรมทั้งหมด และกรณีพบตัวอย่างที่เป็นบวกในแต่ละชนิดเชื่อน้อยกว่า 5 ตัวอย่าง ทำการสุ่มตัวอย่าง จำนวน 5 ตัวอย่าง ส่งให้กับบริษัท Solgent ประเทศเกาหลี เพื่อตรวจหาลำดับสารพันธุกรรม

นำข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่ได้ ทำการ BLAST เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรมกับเชื้ออ้างอิงในฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

หาร้อยละผลบวกจากแต่ละวิธี จำนวนโคที่ติดเชื้อมีแต่ละชนิด และหาค่าความสอดคล้องของทั้งสองวิธี ด้วยสถิติ Cohen's kappa ที่ความเชื่อมั่น 95% (Landis and Koch, 1977; Noaman, 2014) มีเกณฑ์ตัดสินดังนี้

ค่าสถิติ Kappa	เกณฑ์ตัดสิน
<0.00 (<0.00%)	ไม่มีความสอดคล้องกัน (Poor)
0.00 – 0.20 (0 -20%)	น้อย (Slight)
0.21 – 0.40 (21-40%)	พอใช้ (Fair)
0.41 – 0.60 (41-60%)	ปานกลาง (Moderate)
0.61 – 0.80 (61-80%)	ดี (Substantial)
0.81 – 1.00 (81-100%)	ดีมาก (Almost Perfect)

ผล

จากตัวอย่างเลือดโคทั้งหมด 100 ตัวอย่าง ตรวจหาเชื้อปรสิตโดยวิธี PCR และวิธี Stained thin smear เพื่อศึกษาความสอดคล้องของทั้งสองวิธีโดยใช้สถิติค่า kappa (K) ที่ความเชื่อมั่น 95% ให้ผลดังนี้ เชื้อ *Anaplasma* spp. ให้ผลสอดคล้องกันในระดับพอใช้ คือ 21.9% (15/49) โดยให้ผลบวกตรงกัน จำนวน 15 ตัวอย่าง (ตัวอย่างหมายเลข 28-30, 33, 39, 42, 48, 59, 61, 62, 73, 77, 90, 92 และ 100) จากตัวอย่างที่พบเชื้อรวมกันทั้งสองวิธีจำนวน 49 ตัวอย่าง และวิธี PCR พบ PCR product อยู่ระหว่างขนาด 815-830 เบส ทำการสุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR จำนวน 5 ตัวอย่าง (ตัวอย่างหมายเลข 28, 42, 48, 50 และ 100) นำไปหาลำดับสารพันธุกรรมและนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรมใน GenBank พบว่าตัวอย่างหมายเลข 28, 42, 48, และ 100 ทั้ง 4 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่มีความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับเชื้อ *A. marginale* ที่พบในประเทศยูกันดา (KU686794.1) ที่ 99% identity โดยค่า E-value = 0.0 และตัวอย่างหมายเลข 50 เชื้อมีความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับเชื้อ *Anaplasma* spp. ที่พบในประเทศจีน (KM246797.1) ที่ 99% identity โดยค่า E-value = 0.0 เชื้อ *Theileria* spp. ให้ผลสอดคล้องกันในระดับดี คือ 75.7% (29/40) โดยให้ผลบวกตรงกัน จำนวน 29 ตัวอย่าง (ตัวอย่างหมายเลข 17, 25, 28, 40, 51, 52, 54, 55, 57-59, 60-65, 67, 69, 70, 86-90, 94, 95, 97 และ 100) และวิธี PCR พบ PCR product ขนาด 1098 เบส ทำการสุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR จำนวน 5 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างหมายเลข 25, 35, 59, 93 และ 100 นำไปหาลำดับสายพันธุกรรมและนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรมใน GenBank พบว่าตัวอย่างหมายเลข 25 เชื้อมีความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับเชื้อ *T. annulata* ที่พบในประเทศอินเดีย (KT736499.1) ที่ 99% identity โดยค่า E-value = 0.0 ตัวอย่างหมายเลข 35 เชื้อมีความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับเชื้อ *T. buffeli* ที่พบในประเทศจีน (IIM538197.1) ที่ 99% identity โดยค่า E-value = 0.0 และตัวอย่างหมายเลข 59, 93 และ 100 เชื้อทั้ง 3 ตัวอย่าง มีความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับเชื้อ *Theileria* spp. ที่พบในประเทศไทย (AB000270.1) ที่ 99% identity โดยค่า E-value = 0.0 เชื้อ *B. bigemina* ให้ผลสอดคล้องกันในระดับพอใช้ คือ 31.1% (1/5) โดยให้ผลบวกตรงกัน จำนวน 1 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างหมายเลข 28 จากตัวอย่างที่พบเชื้อรวมกันทั้งสองวิธีจำนวน 5 ตัวอย่าง และวิธี PCR พบ PCR product ขนาด 689 เบส นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR จำนวน 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่างหมายเลข 9, 28 และ 93) หาลำดับสารพันธุกรรมและนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรมใน GenBank พบว่าตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่มีความ

คล้ายคลึงสูงสุดกับเชื้อ *B. bigemina* ที่พบในประเทศจีน (JX495402.1) ที่ 99% identity โดยค่า E-value = 0.0 เชื้อ *B. bovis* ให้ผลสอดคล้องกันในระดับดีมาก 100% (1/1) โดยให้ผลบวกตรงกัน 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างหมายเลข 93) และวิธี PCR พบ PCR product ขนาด 446 เบส เมื่อนำผลของลำดับสายพันธุกรรมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรมใน GenBank พบว่าเชื้อมีความคล้ายคลึงสูงสุดกับเชื้อ *B. bovis* ที่พบในประเทศสหรัฐอเมริกา (XM_001611441.1) ที่ 98% identity โดยค่า E-value = 0.0 เชื้อ *T. evansi* ให้ผลสอดคล้องกันในระดับดีมาก 100% (1/1) โดยให้ผลบวกตรงกัน 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างหมายเลข 9) และวิธี PCR พบ PCR product ขนาด 257 เบส เมื่อนำผลของลำดับสายพันธุกรรมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรมใน GenBank พบว่าเชื้อมีความคล้ายคลึงสูงสุดกับเชื้อ *T. evansi* ที่พบในม้าจากประเทศอินเดีย (JQ030878.1) ที่ 99% identity โดยค่า E-value = $9e-10^3$

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ผลบวก และความสอดคล้องของวิธี PCR และวิธี Stained thin smear โดยใช้สถิติ Cohen's kappa (n=100)

36

ชนิดของเชื้อปรสิต	ได้ผลบวกอย่างเดียว โดยวิธี		ได้ผลบวกทั้งสองวิธี	รวมจำนวนตัวอย่าง (ตัวอย่าง)	ระดับความสอดคล้อง
	Stained thin smear	PCR			
<i>Anaplasma</i> spp.	18	16	15	49	พอใช้ (21.9%)
<i>Theileria</i> spp.	3	8	29	40	ดี (75.7%)
<i>B. bigemina</i>	2	2	1	5	พอใช้ (31.1%)
<i>B. bovis</i>	-	-	1	1	ดีมาก (100%)
<i>T. evansi</i>	-	-	1	1	ดีมาก (100%)

ตารางที่ 3 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุดของเชื้อแต่ละชนิดเมื่อนำ PCR product จากการทำ BLAST โดยนำ sequence ที่ได้เปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิงในฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank

ชนิดเชื้อที่ตรวจพบ	หมายเลขตัวอย่าง	Accession number*	Nucleotide identity	E-value
<i>Anaplasma</i> spp.	No.28	KU686794.1	99%	0.0
	No.42	KU686794.1	99%	0.0
	No.48	KU686794.1	99%	0.0
	No.50	KM246797.1	99%	0.0
	No.100	KU686794.1	99%	0.0
<i>Theileria</i> spp.	No.25	KT736499.1	99%	0.0
	No.35	HM538197.1	99%	0.0
	No.59	AB000270.1	99%	0.0
	No.93	AB000270.1	99%	0.0
	No.100	AB000270.1	99%	0.0
<i>B. bigemina</i>	No.09	JX495402.1	99%	0.0
	No.28	JX495402.1	99%	0.0
	No.93	JX495402.1	99%	0.0
<i>B. bovis</i>	No.93	XM_001611441.1	98%	0.0
<i>T. evansi</i>	No.09	JQ030878.1	99%	9e-10 ³

หมายเหตุ * เป็น accession number ของเชื้ออ้างอิงในฐานข้อมูล GenBank ที่นำมาเปรียบเทียบกับตัวอย่างนั้นๆ

วิจารณ์และสรุป

การตรวจหาเชื้อปรสิตในตัวอย่างเลือดโค จำนวน 100 ตัวอย่าง โดยวิธี PCR เทียบกับวิธี Stained thin smear ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานดั้งเดิม โดยใช้สถิติค่า Cohen's kappa ในการทดสอบเพื่อให้ทราบความสอดคล้อง และความสามารถในการตรวจพบเชื้อปรสิตในเลือดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน

ในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อ *Anaplasma* spp. ให้ผลสอดคล้องในระดับพอใช้ (21.9%, 15/49) สอดคล้องกับรายงานของ Noaman and Shayan (2010) ในการเปรียบเทียบกับวิธี Stained thin smear ให้ผลสอดคล้องในระดับพอใช้ (29%) จากการตรวจสไลด์ 50 fields และในรายงานเดียวกันนี้พบว่าการตรวจสไลด์เพิ่มขึ้นเป็น 100 fields พบความสอดคล้องในระดับดี (64%) นอกจากนี้การนำเทคนิคที่สูงขึ้นโดยวิธี nested PCR มาใช้ในการหาเชื้อมีผลสอดคล้องเพิ่มขึ้นอยู่ในระดับปานกลาง (41 %) (Amorim et al., 2014) ในส่วนของเชื้อ *Anaplasma* spp. โปรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้อาจมี

ความสามารถในการจับสารพันธุกรรมเป้าหมายได้มากกว่าหนึ่งตำแหน่ง โดยในการศึกษารังนี้พบสารพันธุกรรมเป้าหมายที่ 815-830 เบส ซึ่งต่างจากรายงานของ Tananyutthawongse et al. (1999) ซึ่งใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันกับการศึกษารังนี้นั้นรายงานพบว่าพบสารพันธุกรรมเป้าหมายที่ 160 เบส หรืออาจเป็นไปได้ว่าเชื้อที่พบในการศึกษารังนี้เป็นเชื้อต่างสเตรนจากเชื้อที่พบในการศึกษานี้จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การเลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น เป็นต้น

การตรวจพบเชื้อ *Theileria* spp. ในการศึกษารังนี้พบว่าความสอดคล้องกันอยู่ในระดับดี (75.7 %, 29/40) โดยตรวจพบเชื้อดังกล่าวของทั้งสองวิธีมีความใกล้เคียงกันและไปในทิศทางเดียวกัน แตกต่างจากรายงานของ Noaman (2014) ที่ได้ศึกษาหาความสอดคล้องของการติดเชื้อ *Theileria* spp. ในโคที่เป็นพาหะด้วยวิธีทั้งสอง พบว่าทั้งสองวิธีไม่มีความสอดคล้องกัน (no level of agreement) ทั้งนี้เนื่องจากสัตว์มีการติดเชื้อในกระแสเลือด (parasitemia) ต่ำหรือเป็นพาหะจึงตรวจพบได้ยากด้วยวิธี Stained thin smear (El-Ashker et al., 2015) ทั้งนี้สามารถนำวิธี PCR มาช่วยในการยืนยันผลจากการพบเชื้อ และในรายงานส่วนใหญ่พบเชื้อ *Theileria* spp. โดยวิธี PCR มากกว่าวิธี Stained thin smear (Khattak et al., 2012; Chauhan et al., 2015; Noaman, 2014)

การตรวจหาเชื้อ *B. bigemina* ในการศึกษารังนี้พบว่าวิธี Stained thin smear ให้ผลเท่ากับวิธี PCR แต่ให้ผลตรงกันของทั้งสองวิธีเพียง 1 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกันอยู่ในระดับพอใช้ (31.1 %, 1/5) โดยเชื่อดังกล่าวสามารถตรวจพบได้ง่ายด้วยวิธี Stained thin smear ในกรณีที่สัตว์ติดเชื้อแบบแสดงอาการและสามารถทำได้อย่างรวดเร็ว (Bishop and Adams, 1973) ทั้งนี้กรณีที่ต้องตรวจหาเชื้อในทางระบาดวิทยาและสัตว์ที่เป็นพาหะจำเป็นต้องใช้วิธีที่มีความไวมากขึ้น (Liu et al., 2014; Oliveira-Sequeira et al., 2005) จากรายงานพบว่าวิธี PCR มีโอกาสพบเชื้อมากกว่าวิธี Stained thin smear (Liu et al., 2014; Shams et al., 2013; Sharma et al., 2013)

การตรวจพบเชื้อ *B. bovis* ให้ความสอดคล้องระดับดีมาก (100%, 1/1) จากรายงานของ Amorim และคณะ (2014) ได้ศึกษาความสอดคล้องของทั้งสองวิธี ซึ่งผลของความสอดคล้องอยู่ในระดับปานกลาง (48%) ซึ่งการศึกษารังนี้เป็นการศึกษาตรวจพบเชื้อทั้งสองวิธีตรงกันเพียง 1 ตัวอย่าง และรายงานการพบเชื่อนี้ส่วนใหญ่พบด้วยวิธี PCR มากกว่าวิธี Stained thin smear (Liu et al., 2014; Shams et al., 2013; จักรินและคณะ, 2551) เช่นเดียวกัน โดยเชื่อดังกล่าวตรวจพบได้ยากโดยวิธีพื้นฐานในสัตว์ที่มีการติดเชื้อในระดับต่ำๆ หรือเป็นพาหะนำโรค (Fahriman et al., 1992) แต่เมื่อสัตว์มีปริมาณเชื้อมากขึ้น สัตว์จะแสดงอาการทางประสาท เนื่องจากเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่จะไปอุดตันเส้นเลือดในสมอง (กล่าวขวัญ และคณะ, 2548) จึงจำเป็นต้องมีวิธีที่มีความไวสูงเพื่อตรวจหาเชื้อในปริมาณต่ำๆ ได้ และสามารถรักษาสัตว์ได้ทันการณ์ (Oliveira-Sequeira et al., 2005)

การตรวจหาเชื้อ *T. evansi* ให้ผลความสอดคล้องกันทั้งสองวิธีในระดับดีมาก (100%, 1/1) ซึ่งต่างจากรายงานของ Bal et al. (2014) ที่ได้ศึกษาหาความสอดคล้องของทั้งสองวิธีเช่นเดียวกัน ผลของความสอดคล้องกันอยู่ในระดับน้อย (15.8%) โดยพบเชื่อดังกล่าวด้วยวิธี PCR 46.5% (47/101) และวิธี Stained thin smear 6.9% (7/101) การศึกษารังนี้ตรวจพบเชื้อทั้งสองวิธีตรงกันเพียง 1 ตัวอย่าง ซึ่งมีจำนวน

ตัวอย่างทดสอบที่น้อยเมื่อเทียบกับผลการศึกษาของ Bal et al., 2014 และในรายงานส่วนใหญ่พบว่า การตรวจหาเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี PCR จะมีโอกาสพบเชื้อชนิดนี้ได้มากกว่าวิธี Stained thin smear (Radwan and Madawy, 2010; Sharma et al., 2013) ทั้งนี้วิธี Stained thin smear เป็นวิธีพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ซึ่งมีข้อจำกัดคือในสัตว์ที่ติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ อาจมีโอกาสดูไม่พบเชื้อ (My et al., 2000) และวิธี PCR เป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจพบเชื้อสูงกว่าวิธีอื่นๆ อย่างไรก็ตามความถูกต้องของการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม (มานวิกา และสาทิส, 2556)

สำหรับการตรวจหาเชื้อ *T. evansi* และเชื้อ *B. bovis* ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องระดับดีมาก (100%) แต่เป็นผลจากการคำนวณจากการตรวจพบเชื้อทั้งสองวิธีตรงกันเพียง 1 ตัวอย่าง ทำให้การประเมินความสอดคล้องในการศึกษาครั้งนี้มีข้อจำกัด ควรศึกษาเพิ่มเติมต่อไปโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น

การศึกษานี้พบว่าความสอดคล้องของวิธี PCR และ วิธี Stained thin smear ในการตรวจหาเชื้อปรสิตในเลือดมีทั้งที่สอดคล้องกันในระดับสูงและต่ำแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของเชื้อปรสิตในเลือด ทั้งนี้ในการเลือกใช้วิธีใดวิธีหนึ่งควรศึกษาทั้งข้อดีและข้อจำกัดของแต่ละวิธี โดยวิธี PCR มีข้อดีคือมีความไวสูงสามารถตรวจพบเชื้อปริมาณน้อยๆ ได้ เพราะเป็นการศึกษาในระดับดีเอ็นเอ (DNA) สามารถตรวจวินิจฉัยได้รวดเร็ว (โกสุม และคณะ, 2541) ผู้ทดสอบไม่จำเป็นต้องมีประสบการณ์ในการจำแนกเชื้อแต่ละชนิด ส่วนข้อจำกัดและข้อควรระวังคือ วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่มีความไวสูงจึงสามารถเกิดผลบวกเทียม (false positive) อันเป็นผลจากการปนเปื้อน PCR product ได้ (วีระพงศ์, 2538) ต้องคำนึงถึงการเลือกและการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (มานวิกา และสาทิส, 2556) และมีค่าใช้จ่ายในการตรวจค่อนข้างสูง ส่วนวิธี Stained thin smear มีข้อดีคือ มีค่าใช้จ่ายน้อย รวดเร็ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทันที ส่วนข้อจำกัดและข้อควรระวังคือ ผู้ตรวจวินิจฉัยต้องเป็นผู้ที่มีประสบการณ์และมีทักษะเป็นอย่างดี (Bishop and Adams, 1973) มีเทคนิคการเตรียมตัวอย่างและการย้อมสีที่ดี (จักริน และคณะ, 2551) ตรวจพบเมื่อสัตว์มีปริมาณเชื้อมากๆ (Noaman and Shayan, 2010) อย่างไรก็ตามวิธี Stained thin smear ยังคงเป็นวิธีมาตรฐานและใช้ในห้องปฏิบัติการทางปรสิตวิทยาทั่วไป เนื่องจากราคาถูก สะดวก รวดเร็ว และได้ศึกษา morphology ของเชื้อ แต่ผู้ทำการทดสอบควรมีทักษะและความชำนาญในการทดสอบ ในขณะที่วิธี PCR ซึ่งมีราคาแพง ควรทำในกรณียืนยันผล งานวิจัย หรือเลือกทดสอบในฟาร์มที่พบการติดเชื้อในปริมาณน้อย และต้องการทราบสถานะสัตว์ที่ติดเชื้อของสัตว์ในฝูงที่มีการติดเชื้อ เพื่อให้มีการควบคุมและป้องกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนการศึกษาในครั้งนี้จำนวนตัวอย่างที่พบเชือนั้นยังมีจำนวนน้อยควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.ณชัย ศราธพันธุ์ และน.สพ.บพิตร ปุยะติ ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูล สารพันธุกรรม สพ.ญ.ศศิวิมล อยู่เอนม ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านวิชาการ สพ.ญ.มานวิกา ผลภาค น.สพ.ปฏิพร ฐาปนกุลศักดิ์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนทุกท่านที่มีส่วนร่วมและสนับสนุนให้งานนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

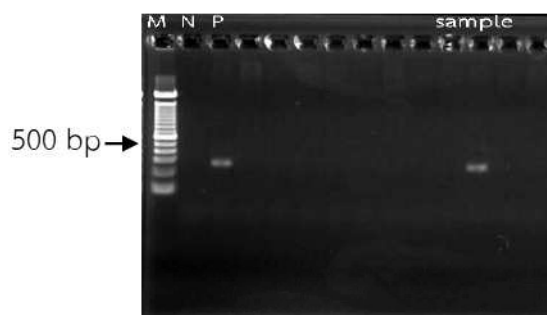
เอกสารอ้างอิง

- กล่าวขวัญ ศรีสุข นพพร ศรารักษ์ และโกสม จันทศิริ. 2548. การตรวจหาเชื้อ *Babesia bovis* ในเลือดโค โดยเทคนิคพีซีอาร์-อีไลซา. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 10 (1-2): 49-57.
- กองแผนงาน กรมปศุสัตว์. 2556. “ตารางข้อมูลพื้นฐาน (ดัชนีความร้อนขึ้น สภาพภูมิประเทศ จำนวนประชากร) เขต1-9 และกรุงเทพมหานคร”. [Online]. Available : http://planning.dld.go.th/th/index.php?option=com_content&view=article&id=646:section-39&catid=116:section-39&Itemid=152. [4 เมษายน 2557]
- โกสม จันทศิริ จันทรา ตันยพธวงศ์ กล่าวขวัญ แสงสมบัติ วาสนา สุขุมศิริชาติ วัลยา อุทัยแสง และ นพพร ศรารักษ์. 2541. การตรวจสอบดีเอ็นเอของพยาธิในเลือดด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบผสม. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. ระหว่างวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2541: หน้า 1-10.
- จักริน ศรีวิโรทัย มนต์ชัย ดวงจินดา วิโรจน์ ภัทรจินดา ยุพิน ผาสุข อนันตชัย ชัยยศวิทยากุล และยวงยศ จินดาทะจักร. 2551. การตรวจหาโรคไข้หัดโดยใช้วิธี PCR ในโคนมพันธุ์ TMZ. วารสารวิจัย มข. 13 (1): 55 – 62.
- มานวิกา ผลภาค วินัย จะแรมรัมย์ และวัลลภา วราอัศวปติ. 2538. สภาวะโรคพยาธิในโคนมภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 5 (2): 1-9.
- มานวิกา ผลภาค และสาทิศ ผลภาค. 2556. “การติดเชื้ *Trypanosoma evansi* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย.” วารสารสถาบันสุขภาพแห่งชาติ (Thai-NIAH eJournal). 8 (2) : 32 – 55. [Online]. Available : <http://www.dld.go.th/niah>. [10 มกราคม 2557]
- วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2538. บทที่ 6 PCR and other amplification techniques : วิทยาการสมัยใหม่ที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 1-11.
- วีรพล ทวีพันธ์. 2553. โรคปรสิตที่สำคัญในโคนม. การจัดการสุขภาพและผลผลิตฟาร์มโคนม. หจก.ขอนแก่นการพิมพ์. หน้า 67-82.
- Amorim, L.S., Wenceslau, A.A., Carvalho, F.S., Carneiro, P.L.S. and Albuquerque, G.R. 2014. Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 23 (3): 328-336.
- Bal, M.S., Sharma, A., Ashuma, Batth, B.K., Kaur, P. and Singla, L.D. 2014. Detection and management of latent infection of *Trypanosoma evansi* in a cattle herd. Indian. J. Anim. Res. 48 (1): 31-37.
- Bishop, J.P. and Adams, L.G. 1973. Combination thin and thick blood films for the detection of *Babesia* parasitemia. Am. J. Vet. Res. 34 (9): 1213 – 1214.

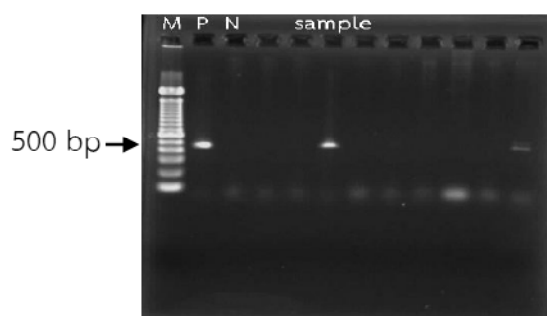
- Chansiri, K. and Bagnara, A.S. 1995. The structural gene for carbamoyl phosphate synthetase from the protozoan parasite *Babesia bovis*. *Mol. Biochem Parasitol.* 74 (2): 239-243.
- Chansiri, K., Khuchareontaworn, S. and Sarataphan, N. 2002. PCR-ELISA for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in animals and vector. *Mol. Cell Probes.* 16 (3): 173-177.
- Chauhan, H.C., Patel, B.K., Bhagat, A.G., Patel, M.V., Patel, S.I., Raval, S.H., Panchasara, H.H., Shrimali, M.D., Patel, A.C. and Chandel, B.S. 2015. “Comparison of molecular and microscopic technique for detection of *Theileria annulata* from the field cases of cattle”. *Veterinary World.* 8 (11): 1370-1374. [Online]. Available: <http://www.veterinaryworld.org/Vol.8/November-2015/17.pdf>. Accessed October 3, 2016.
- d'Oliveira, C., Weide, M., Habela, M.A., Jacquet, P. and Jongejan, F. 1995. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33 (10) : 2665 – 2669.
- El-Ashker, M., Hotzel, H., Gwida, M., El-Beskawy, M., Silaghi, C. and Tomaso, H. 2015. Molecular biological identification of *Babesia*, *Theileria*, and *Anaplasma* species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray. *Vet. Parasitol.* 207 (3-4): 329–334.
- Fahrimal, Y., Goff, W.L. and Jasmer, D.P. 1992. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *J. Clin. Microbiol.* 30 (6): 1374-1379.
- Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S. and Buenning, G.M. 1993. Multiplex polymerase chain reaction based assay for detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.* 50 (1-2): 69-81.
- Khattak, R.M., Rabib, M., Khan, Z., Ishaq, M., Hameed, H., Taqddus, A., Faryal, M., Durrani, S., Gillani, Q.U.A., Allahyar, R., Shaikh, R.S., Khan, M.A., Ali, M. and Iqbal, F. 2012. A comparison of two different techniques for the detection of blood parasite, *Theileria annulata*, in cattle from two districts in Khyber Pukhtoon Khwa Province (Pakistan). *Parasite.* 19 (1): 91–95.
- Landis, J.R. and Koch, G.G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33: 159-174.

- Liu, J., Guan, G., Liu, A., Li, Y., Yin, H. and Luo, J. 2014. A PCR method targeting internal transcribed spacers: the simultaneous detection of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle. *Acta Parasitologica*. 59 (1): 132–138.
- My, L.N., Holland, W.G., Jam, P.T., Thonh, N.G. and Hoan, D.H. 2000. Comparative study of techniques for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in buffaloes. *J. Veterinar. Sci. Technolo.* 7: 6-14.
- Noaman, V. 2014. Comparison of molecular and microscopic technique for detection of *Theileria* spp. in carrier cattle. *J. Parasite Dis.* 38 (1): 64-67.
- Noaman, V. and Shayan, P. 2010. Comparison of Microscopy and PCR-RFLP for detection of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. *Iran J. Microbiol.* 2 (2): 89–94.
- OIE. 2012a. “Chapter 2.1.17. *Trypanosoma evansi* infections (surra).” In: Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. 7thed. Office International des Epizooties, France. p.314-328. [Online]. Available: <http://www.oie.int/doc/ged/D12008.PDF>. Accessed January 20, 2016.
- OIE. 2012b. “Chapter 2.4.2. Bovine Babesiosis.” In: Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. 7thed. Office International des Epizooties, France. p.1-15. [Online]. Available: <http://www.oie.int/doc/ged/D12008.PDF>. Accessed January 20, 2016.
- Oliveira-Sequeira, T.C., Oliveira, M.C., Araujo, J.P.Jr. and Amarante, A.F. 2005. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int. J. Parasitol.* 35 (1): 105–111.
- Radwan, M.E.I. and Madawy, R.E. 2010. Diagnosis and Epidemiological Studies of Bovine Trypanosomiasis in Kaliobia Governorate. *J. Am. Sci.* 6 (11): 894-898.
- Ristic, M. 1977. Bovine Anaplasmosis. In: Parasitic Protozoa. Vol.4. Babesia, Theileria, Myxosporida, Microsporida, Bartonellaceae, Anaplasmataceae, Ehrlichia, and Pneumocystis, edited by Krieier, J.P. Academic press Inc. New York. U.S.A. p. 235-249.
- Shams, S., Ayaz, S., Ali, I., Khan, S., Gul, I., Gul, N. and Khan, S.N. 2013. Sensitivity and Specificity of PCR & Microscopy in detection of Babesiosis in domesticated cattle of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Int. J. Adv. Res. Technol.* 2 (5): 37-41.
- Sharma, A., Singla, L.D., Tuli, A., Kaur, P., Batth, B.K., Javed, M. and Juyal, P.D. 2013. Molecular Prevalence of *Babesia bigemina* and *Trypanosoma evansi* in Dairy Animals from Punjab, India, by Duplex PCR: A Step Forward to the Detection and Management of Concurrent Latent Infections. *Biomed. Res. Int.* 2013: 1-8.

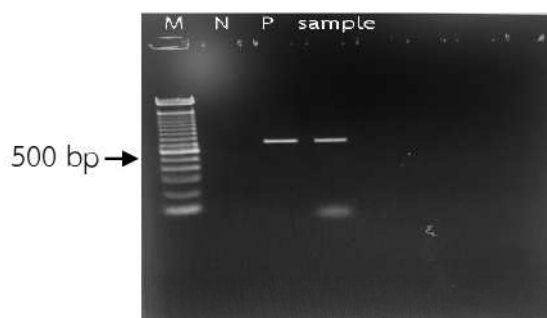
- Tananyutthawongese, C., Saengsombut, K., Sukhumsirichat, W., Uthaisang, W., Sarataphan, N. and Chansiri, K. 1999. Detection of Bovine Hemoparasite Infection Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Science Asia*. 25: 85-90.
- The Center for Food Security & Public Health (CFSPH). 2009. "Theileriosis." Iowa State University. p.1-4. [Online]. Available: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/theileriosis_theileria_parva_and_theileria_annulata.pdf. Accessed September 3, 2014.



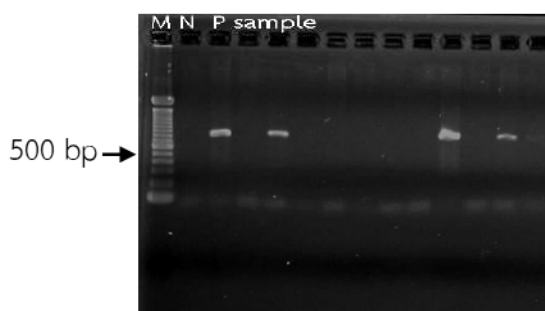
รูปที่ 1 ภาพ Gel electrophoresis การตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี PCR โดย M คือ marker ขนาด 100 bp, N คือ negative control, P คือ positive control และ sample คือ ตัวอย่างที่ให้ผลบวก



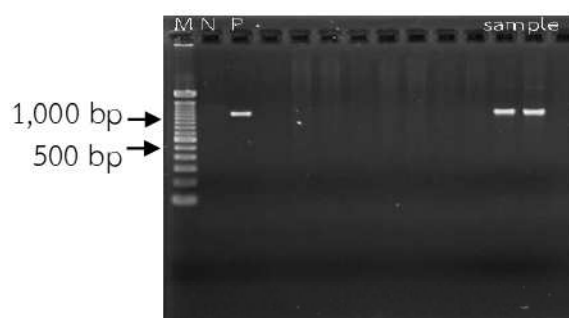
รูปที่ 2 ภาพ Gel electrophoresis การตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. bovis* ด้วยวิธี PCR โดย M คือ marker ขนาด 100 bp, N คือ negative control, P คือ positive control และ sample คือ ตัวอย่างที่ให้ผลบวก



รูปที่ 3 ภาพ Gel electrophoresis การตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. bigemina* ด้วยวิธี PCR โดย M คือ marker ขนาด 100 bp, N คือ negative control, P คือ positive control และ sample คือ ตัวอย่างที่ให้ผลบวก



รูปที่ 4 ภาพ Gel electrophoresis การตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Anaplasma* spp. ด้วยวิธี PCR โดย M คือ marker ขนาด 100 bp, N คือ negative control, P คือ positive control และ sample คือ ตัวอย่างที่ให้ผลบวก



รูปที่ 5 ภาพ Gel electrophoresis การตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Theileria* spp. ด้วยวิธี PCR โดย M คือ marker ขนาด 100 bp, N คือ negative control, P คือ positive control และ sample คือ ตัวอย่างที่ให้ผลบวก

Comparison of polymerase chain reaction (PCR) and stained thin blood smear techniques for detection of blood parasite in cattle

Parinyaphorn Phrodeesakun* Ard-ong Onwan Satis Pholpark Usa Naksakul

Veterinary Research and Development Center (Upper Northeastern region), Thapra, Muang, KhonKaen 40260

* Corresponding author Tel : 0-4326-2050 Fax : 0-4326-1246 E-mail : parinyaphorn.p@dld.go.th

Abstract

Blood parasites infection in cattle in Thailand is normally diagnosed with traditional stained thin smear techniques. This is not applicable for identification of the carrier or low parasitemia animals. The aim of this study was to compare conventional thin blood Giemsa staining method with the PCR technique in the detection of blood parasites in cattle. In this study, examinations were performed on 100 blood samples from cattle in KhonKaen with and without clinical signs. The degree of agreement between PCR and microscopic test was determined by Kappa (K) values with 95 % confidence intervals. Our results showed that *Anaplasma* spp. and *Babesia bigemina* identifying are at moderate level of agreement 21.9 % (15/49) and 31.1% (1/5) respectively. *Theileria* spp. identifying showed good level of agreement 75.7% (29/40). *Babesia bovis* and *Trypanosoma evansi* identifying showed excellent level of agreement 100 % (1/1) regards to few sample obtained. Therefore, molecular methods such as PCR can be used as a confirmed method for identifying those blood parasites in cattle.

Keywords: comparison , blood parasites in cattle, polymerase chain reaction (PCR) , stained thin smear, kappa values