

การตรวจพบ *Sarcocystis* ในโค-กระบือ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2558

อาจอง อ่อนหวาน* เค้นพงษ์ สาซ้อง

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ต. ท่าพระ อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40260

*ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์/โทรสาร 043-261246 E-mail: rdulnar@hotmail.com

บทคัดย่อ

Sarcocystis เป็น protozoa จัดอยู่ใน Phylum Apicomplexa ที่ก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ พบมีรายงานทั่วโลก ในโค-กระบือพบ *Sarcocystis* ได้หลายชนิด โดยเฉพาะ *Sarcocystis cruzi* (*S. cruzi*) นั้นส่งผลกระทบต่อสุขภาพรุนแรงที่สุด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตรวจพบและจำแนกชนิด *Sarcocystis* ในโค-กระบือในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ระหว่างปี พ.ศ.2554 - 2558 โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ช่วงเดือนกันยายน-เดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 รวบรวมหัวใจโค-กระบือป่วยตาย ด้วยอาการผอม ซึม ไม่กินอาหาร ขาหลังกระเผลกอ่อนแรง ล้ม ประกอบด้วยหัวใจโคเนื้อ 17 ตัว กระบือ 1 ตัว เมื่อส่งตัวอย่างตรวจยังห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ผลตรวจพบเฉพาะ bradyzoites ของ *Sarcocystis* ด้วยวิธี impression smear และให้ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆเป็นลบ นำตัวอย่างดังกล่าวมาจำแนกชนิด *Sarcocystis* โดยใช้วิธีทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อวัดความหนาของผนัง sarcocyst ใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ตามลำดับ ผลหัวใจโคทุกตัวพบ *S. cruzi* และหัวใจกระบือพบ *S. levinei* การศึกษาส่วนที่ 2 รวบรวมข้อมูลย้อนหลังระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ.2554 - เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2558 ของโค-กระบือป่วยตายโดยไม่ทราบสาเหตุ ในจังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ที่ส่งตรวจห้องปฏิบัติการเช่นเดียวกับการศึกษาส่วนที่ 1 ซึ่งผลตรวจพบเฉพาะ bradyzoites ของ *Sarcocystis* ด้วยวิธี impression smear โดยไม่ได้จำแนกชนิดจำนวน 90 ตัว โดยมี 57 ตัวตามประวัติสัตว์ไม่ระบุอาการป่วย ส่วนอีก 33 ตัวระบุอาการป่วยซึ่งพบลักษณะผอมไม่กินอาหาร ซึม มีไข้ ขาหลังอ่อน ล้ม ท้องอืด ท้องเสีย หอบหายใจลำบาก น้ำลายไหล เมื่อชันสูตรซาก บางตัวไม่พบการผิดปกติ ส่วนตัวที่พบมีลักษณะหัวใจซีด มีจุดเลือดออก มีน้ำในถุงหุ้มหัวใจ ตับเหลืองซีด ไตซีด ปอดบวม ม้ามขยายใหญ่ สำหรับการศึกษานี้สามารถยืนยันได้ว่า *Sarcocystis* ที่ตรวจพบและจำแนกชนิดได้ในห้องปฏิบัติการเป็น *S. cruzi* ซึ่งเป็นชนิดที่ก่อความรุนแรงและมีผลกระทบต่อสุขภาพโค-กระบือเป็นอย่างมาก และผลการศึกษาในส่วนที่ 2 ทำให้ทราบการกระจายของ *Sarcocystis* ในพื้นที่ดังกล่าวซึ่งควรมีการศึกษาติดตามถึงความชุกของ *S. cruzi* ต่อไป

คำสำคัญ: โค กระบือ *Sarcocystis cruzi* ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน

บทนำ

Sarcocystis spp. เป็น protozoa จัดอยู่ใน Phylum Apicomplexa สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ พบมีรายงานทั่วโลก (Fayer et al., 2015) วงจรชีวิตของพยาธิกลุ่มนี้ต้องการโฮสต์กึ่งกลาง ซึ่งมักเป็นสัตว์กินพืช โดยติดโรคจากการกิน sporocyst หรือ oocyst ที่ปนออกมากับอุจจาระของโฮสต์สุดท้ายที่เป็นสัตว์กินเนื้อ ซึ่งติดโรคโดยการกิน cyst หรือ sarcocyst ที่อยู่ในกล้ามเนื้อของโฮสต์กึ่งกลาง (มานพ, 2540; Poulsen and Stenvold, 2014) โคเป็นโฮสต์กึ่งกลางของ *Sarcocystis cruzi* (*S. cruzi*) *S. hominis* และ *S. hirsuta* โดยมี สุนัข คน และแมว เป็นโฮสต์สุดท้ายของแต่ละชนิดตามลำดับ (อาคม, 2538; มานพ, 2540; Dubey, 1977; Soulsby, 1982; Bowman, 2009) ส่วนกระปือเป็นโฮสต์กึ่งกลางของ *S. cruzi* (Jehle et al., 2009; Xiang et al., 2011) *S. levinei* และ *S. fusiformis* (อาคม, 2538; มานพ, 2540) สุนัขเป็นโฮสต์สุดท้ายของ *S. cruzi* และ *S. levinei* แมวเป็นโฮสต์สุดท้ายของ *S. fusiformis* สำหรับ *S. hominis* และ *S. hirsuta* ในโค และ *S. fusiformis* ในกระปือ ไม่ก่อความรุนแรงในสัตว์ ส่วน *S. levinei* มีรายงานทำให้อ่อนแรง ผอม และโลหิตจางในลูกกระปือทดลอง (Jain et al., 1986) สำหรับโค-กระปือ *S. cruzi* ส่งผลกระทบต่อสุขภาพรุนแรงที่สุด โดยแสดงอาการเบื่ออาหาร ผอม น้ำหนักลด โลหิตจาง และทำให้ตายในลูกโคที่ทดลองติดเชื้อชนิดนี้ (อาคม, 2538; มานพ, 2540; Dubey, 1977; Soulsby, 1982) หรือทำให้ลูกกระปือมีไข้สูง ชีพเบื่ออาหาร ผอม นอน ขาไม่มีแรง และมีอาการโคมาตามมา (สุรีย และคณะ, 2527)

มีรายงานพบ *Sarcocystis* ในโค-กระปือทั่วโลก เช่นประเทศเยอรมัน (Odening et al., 1966) ออสเตรเลีย (Savini et al., 1992) ญี่ปุ่น (Ono and Ohsumi, 1999) จีน (Yang et al., 2001) เวียดนาม (Jehle et al., 2009) อาร์เจนตินา (More et al., 2011) และ สหรัฐอเมริกา (Bernel et al., 2015) เป็นต้น ส่วนในประเทศไทยมีรายงานอุบัติการณ์ของ *Sarcocystis* ในโค-กระปือ จากการสำรวจในหลอดอาหารของโค-กระปือ จากโรงฆ่าสัตว์ขององค์การอาหารสำเร็จรูป และโรงฆ่าสัตว์บริษัทสหสามัคคีค้าสัตว์ จำกัด เขตพระโขนง พบการติดพยาธิชนิดนี้ในอัตราที่สูงโดยในโคพบร้อยละ 0.61, 17.38 และ 99.39 ในกระปือพบร้อยละ 38.39, 36.49 และ 100 เมื่อตรวจโดยวิธี ดูด้วยตาเปล่า ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และโดยการย่อยเนื้อตัวอย่างตามลำดับ (มานพ และ ชงชัย, 2531) และรายงานความชุกของการติดเชื้อ *Sarcocystis* spp. ในกล้ามเนื้อหัวใจโค-กระปือในตลาด 4 แห่งในเขตอำเภอเมืองจังหวัดพิษณุโลก พบระยะ bradyzoite ร้อยละ 100 (แสงชัย และคณะ, 2550)

วิธีตรวจหา *Sarcocystis* นอกจากวิธี impression smear ตัวอย่างอวัยวะแล้วย้อมสี Giemsa (มานพ, 2556; National Institute of Animal Health, 1998) ยังมีอีกหลายวิธี เช่น การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) การตรวจทางซีรั่มวิทยา (serological test) โดยวิธี IFAT การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction) (More et al., 2008) เป็นต้น และสามารถแยกชนิด *Sarcocystis* spp. ได้โดยดูความหนาของผนัง sarcocyst จากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (Dubey, 1977; Eberhard, 2009; Bernel et al., 2015) การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (More et al., 2008) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA (DNA sequencing) (Bernel et al., 2015)

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน จังหวัดขอนแก่น (ศวพ.ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน) ได้รับตัวอย่างโค-กระบือ ที่ป่วยตายและเมื่อชันสูตรทางห้องปฏิบัติการแล้ว ยังไม่สามารถระบุสาเหตุได้ ซึ่งประวัติโดยรวมสัตว์จะผอม ขาไม่มีแรง ล้มนอน ลูกลำบาก หรือลูกไม่ขึ้น การวินิจฉัยส่วนใหญ่มองประเด็นไปที่การจัดการด้านอาหาร สัตว์ชนกระแทกหรือปีนขึ้นกัน ฟันคอกลั่นทำให้สัตว์ล้มลุกไม่ขึ้น และตายในเวลาต่อมา ซึ่งห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา ซิริมวิทยา ไวรัสวิทยา ได้ตรวจโรคที่อาจทำให้เกิดกลุ่มอาการดังกล่าว โดยผลการตรวจไม่พบสาเหตุที่ทำให้สัตว์ป่วยตาย แต่ประเด็นที่น่าสนใจคือมีการตรวจพบเฉพาะ *Sarcocystis* spp. จากการตรวจทางปรสิตรวิทยาด้วยวิธี impression smear ซึ่งยังไม่อาจสรุปได้ว่าโค-กระบือ ที่ป่วยตายมีสาเหตุมาจากการติดพยาธินี้ เนื่องจากที่ผ่านมายังมีความเข้าใจว่าพยาธินี้ไม่สามารถทำอันตรายร้ายแรงต่อโค-กระบือ อาจเพราะข้อมูลการก่อโรคในโค-กระบือมีน้อยมาก และในบางครั้งการผ่าชันสูตรซากไม่พบการผิดปกติเมื่อดูด้วยตาเปล่า (gross lesion) (สุริย์ และคณะ, 2527; More et al., 2008) อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาและรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับอุบัติการณ์การเกิดโรคในโค-กระบือ ที่ผลตรวจพบเฉพาะพยาธินี้ และที่สำคัญยังไม่เคยมีการจำแนกชนิดที่ก่อความรุนแรงให้เห็นเป็นเชิงประจักษ์ การชันสูตรจึงไม่ได้้นำการติดพยาธินี้มาประกอบการวินิจฉัยแยกโรค (differential diagnosis) เพื่อลดผลกระทบดังกล่าวและให้ได้มาซึ่งข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการวินิจฉัยโรค ตลอดจนแนวทางการควบคุมการป่วยตายในโค-กระบือจากการติดพยาธินี้ จึงจำเป็นต้องศึกษาข้อมูลย้อนหลัง และแยกชนิดของ *Sarcocystis* ในโค-กระบือเพื่อยืนยันว่าชนิดที่ตรวจพบในห้องปฏิบัติการเป็นชนิดที่ก่อความรุนแรงและมีอันตรายต่อโค-กระบือจริง

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษารั้งนี้เพื่อศึกษาการตรวจพบและแยกชนิด *Sarcocystis* ในโค-กระบือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ระหว่างปี พ.ศ.2554-2558

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาส่วนที่ 1

1.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

รวบรวมกรณีโค-กระบือป่วยตาย ในช่วงเดือนกันยายน – เดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 จากพื้นที่ในจังหวัดขอนแก่น เลย์ มุกดาหาร และมหาสารคาม พร้อมทั้งเก็บตัวอย่าง เช่น ซาก อวัยวะ เลือด ซิริม อุจจาระ ส่งตรวจยังห้องปฏิบัติการศวพ.ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ซึ่งผลตรวจพบเฉพาะ bradyzoites ของ *Sarcocystis* โดยวิธี impression smear อวัยวะหัวใจ (มานวิภา, 2556; National Institute of Animal Health, 1998) ซึ่งการตรวจทางแบคทีเรียวิทยา เพื่อเพาะแยกหาเชื้อไม่พบแบคทีเรียที่ก่อโรค ทางไวรัสวิทยา เพื่อตรวจหาโรค Bovine viral diarrhea (BVD) และ โรค Enzootic bovine leukosis (EBL) โดยใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ผลไม่พบโรคดังกล่าว ส่วนการตรวจทางซิริมวิทยาเพื่อหาระดับแอนติบอดีต่อโรค Melioidosis, Brucellosis, Bovine Tuberculosis, Paratuberculosis ผลไม่พบระดับแอนติบอดีต่อโรคเหล่านี้เช่นกัน

1.2 การตรวจหาและจำแนกชนิดของเชื้อ *Sarcocystis*

เก็บตัวอย่างอวัยวะหัวใจ ที่ตรวจพบ bradyzoites ของ *Sarcocystis* แบ่งเป็น 2 ส่วนส่วนที่ 1 เก็บรักษาใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน และส่วนที่ 2 เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ในการจำแนกชนิดของ *Sarcocystis* และยืนยันเชื้อต่อไป

1.2.1 จำแนกชนิดโดยการวัดขนาดของผนัง sarcocyst โดยตัวอย่างหัวใจส่วนที่เก็บรักษาใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน นำไปผ่านกระบวนการทางจุลพยาธิวิทยาแล้วย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลิน (Hematoxylin) และอีโอซิน (Eosin) (ศุภลักษณ์, 2537) จากนั้นตรวจทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อดูลักษณะและวัดขนาดความหนาของผนัง sarcocyst ด้วยกล้องจุลทรรศน์ส่องสว่างที่มี micrometer ที่ผ่านการตั้งค่าวัดขนาดโดย *S. cruzi*, *S. hominis* และ *S. hirsuta* จะมีความหนาของผนังประมาณ 0.5µm (Thin wall) 5.9 µm (Thick wall) และ 6 µm (Thick wall) ตามลำดับ (Dubey, 1977; Eberhard, 2009; Bernel et al., 2015) ผนังของ *S. cruzi* มีลักษณะ hair-like protrusion (Dubey, 1977; Guclu et al., 2004; Eberhard, 2009; Bernel et al., 2015) และความหนาแยกได้ชัดเจนจาก *S. hominis* และ *S. hirsuta* ที่มีความหนาของผนังใกล้เคียงกันซึ่งทั้งสองชนิดจะแยกจากกันโดยผนังของ *S. hominis* จะเป็นลักษณะ long and palisade-like protrusions ส่วนของ *S. hirsuta* จะเป็นลักษณะ tongue-like protrusions (More et al., 2011) สำหรับ *S. levinei* ในกระป๋องจะมีผนังหนา 4-7 µm และมีลักษณะ finger like projection protrusions (Arafa et al., 2003)

1.2.2 จำแนกชนิดโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยตัวอย่างหัวใจที่เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส นำไปสกัดสารพันธุกรรม (DNA) โดยใช้ชุดสกัด DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) ตามวิธีการของผู้ผลิต จากนั้นเพิ่มปริมาณ และตรวจหาสารพันธุกรรมโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสตามวิธีของ Chiesa et al. (2013) โดยใช้ Reverse primer คือ 5'-AACCCCTAATCCCCGTTA-3'

จำเพาะต่อเชื้อ	Forward primer
<i>S. cruzi</i>	5'-ATCAGATGAAAATCTACTACATGG-3'
<i>S. hominis</i>	5'-ACAGAACCAACACGCTC-3'
<i>S. hirsuta</i>	5'-CATTCGGTGATTATTGG-3'

นำ PCR product ของทุกตัวอย่างที่ให้ผลบวกไปยืนยันชนิดของเชื้อด้วยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์จาก PCR product (DNA sequencing) โดยนำ PCR product ปริมาตร 40 µL มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ GEL/PCR Purification kit (Favorgen Biotech Crop., Taiwan) แล้วทำ DNA sequencing reaction ทั้งสาย forward และ reverse โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. cruzi* (Chiesa et al., 2013) และใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Big Dye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit (Applied

Biosystems, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต จากนั้นทำให้ DNA sequencing product บริสุทธิ์อีกครั้ง โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research, USA) แล้วทำละลายด้วย Hi Di formamide ปริมาตร 15 µL จากนั้นนำเข้าเครื่องวิเคราะห์การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติยี่ห้อ ABI รุ่น 3130 (Applied Biosystems, USA) นำข้อมูลผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย forward และ reverse มาวิเคราะห์และทำการรวมข้อมูลทั้งสองสายเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม Bioedit เวอร์ชัน 7.1.11 (Hall, 1999) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรมของ NCBI GenBank database ด้วยโปรแกรม BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>) เพื่อยืนยันชนิดของ *Sarcocystis*

การศึกษาส่วนที่ 2

รวบรวมข้อมูลย้อนหลังโค-กระบือป่วยตาย ในจังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนที่ส่งตัวอย่างตรวจมายังห้องปฏิบัติการศพ.ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ.2554 – เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2558 จากกลุ่มระบาดวิทยา ศพ.ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ซึ่งให้ผลต่อการตรวจจากทุกห้องปฏิบัติการเช่นเดียวกันกับตัวอย่างในการศึกษาส่วนที่ 1 และให้ผลตรวจพบเฉพาะ *Sarcocystis* จากการตรวจทางปรสิตวิทยาโดยวิธีimpression smear เพื่อศึกษาข้อมูล จำนวน การระบาดในพื้นที่ กลุ่มอาการ ลักษณะรอยโรค และกลุ่มอายุ

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาส่วนที่ 1

จากการรวบรวมกรณีโค-กระบือป่วยตาย ซึ่งให้ผลการตรวจตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการศพ.ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ตามที่ระบุไว้ในการศึกษาส่วนที่ 1 พบเป็นโคเนื้อ 17 ตัว กระบือ 1 ตัว (ตารางที่ 1) โดยตัวอย่างดังกล่าวมาจากพื้นที่จังหวัดขอนแก่น เลย มหาสารคาม และมุกดาหาร พบในช่วงอายุ 2 ปี ถึง 15 ปี และพบมีกลุ่มอาการป่วยที่คล้ายกัน โดยทุกตัวไม่ตอบสนองต่อการรักษาตามอาการและการใช้ยาปฏิชีวนะ เมื่อชันสูตรซากโดยการสังเกตด้วยตาเปล่าพบรอยโรคที่ผิดปกติ (ตารางที่2) โดยที่มีบางตัวตรวจไม่พบรอยโรคที่ผิดปกติ

เมื่อนำตัวอย่างหัวใจ โคเนื้อ 17 ตัว และ กระบือ 1 ตัว ที่ตรวจพบ *Sarcocystis* ด้วยวิธี impression smear ไปจำแนกชนิดโดยวัดความหนาของผนัง sarcocyst ด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าตัวอย่างจากโคเนื้อทั้ง 17 ตัวอย่าง มีความหนาของผนังน้อยกว่า 1 µm โดยเฉลี่ยประมาณ 0.8 µm ซึ่งเป็นลักษณะของ Thin wall แทรกกระจายในกล้ามเนื้อหัวใจ (รูปที่2) แต่ตัวอย่างจากกระบือ (ตัวอย่างที่ 13) ตรวจไม่พบ sarcocyst (ตารางที่3) เมื่อจำแนกชนิด โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่าทั้ง 18 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer จำเพาะต่อ *S. cruzi* ประกอบด้วย forward primer 5'-ATCAGATGAAAATCTACTACATGG-3' และ reverse primer 5'-AACCTAATTCCCCGTTA-3' ให้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 284 bp (รูปที่ 1) โดยไม่พบผลบวกต่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ที่จำเพาะ

ต่อ *S. hirsuta* และ *S. hominis* (รูปที่ 1 และ ตารางที่ 3) และเมื่อนำ PCR product ที่จำเพาะต่อ *S. cruzi* ทั้ง 18 ตัวไปยืนยันสารพันธุกรรมโดยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรมของ NCBI GenBank database พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างจากโคเนื้อ 17 ตัวอย่าง มีความคล้ายคลึงสูงสุดกับเชื้อ *S. cruzi* (KT901167) ที่ 100% identity ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของกระบืออีก 1 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงสูงสุดกับเชื้อ *S. levinei* (KU247918) ที่ 100% identity

ผลการศึกษาส่วนที่ 2

ผลการศึกษาข้อมูลย้อนหลังระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 – เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2558 พบกรณีโค-กระบือป่วยตาย ซึ่งตรวจพบเฉพาะ *Sarcocystis* จากการตรวจทางปรสิตวิทยา มีจำนวน 90 ตัว ซึ่งตัวอย่างบางตัวอาจตรวจไม่ครบจากทุกห้องปฏิบัติการดังกล่าว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ชนิดตัวอย่างที่ส่งตรวจ ข้อมูลประวัติ และอาการของสัตว์แต่ละตัว สำหรับตัวอย่างที่ตรวจพบ *Sarcocystis* เป็นตัวอย่างที่ได้รับมาจากจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน จำแนกเป็น โคเนื้อ 69 ตัว กระบือ 13 ตัว โคนม 8 ตัว (ตารางที่ 4) และพบได้ทุกช่วงอายุ (1-2 ปี 2-3 ปี 3-5 ปี มากกว่า 5 ปี และไม่ทราบอายุ โดยพบ 12 ตัว 7 ตัว 19 ตัว 50 ตัว และ 2 ตัว ตามลำดับ) และสัตว์ 90 ตัวที่พบ *Sarcocystis* มี 57 ตัว ตามประวัติสัตว์มีระบุอาการป่วยส่วนอีก 33 ตัว มีข้อมูลประวัติอาการป่วย (ตารางที่ 5) โดยทุกตัวไม่ตอบสนองต่อการรักษาตามอาการและการใช้ยาปฏิชีวนะ และเมื่อชันสูตรซากพบลักษณะวิธีการ (ตารางที่ 6) ซึ่งโค-กระบือ 33 ตัวนี้ มีโคเนื้อ 3 ตัวอย่างที่มีประวัติการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาโดยพบผนังของ sarcocyst มีลักษณะ Thin wall (ผนังหนาน้อยกว่า 1 μm) ทั้ง 3 ตัวอย่าง

สรุปและวิจารณ์

จากการศึกษากรณีโค-กระบือป่วยตาย 18 ตัว ในการศึกษาส่วนที่ 1 โดยผลการตรวจด้วยวิธี impression smear อวัยวะหัวใจพบเฉพาะ bradyzoites ของ *Sarcocystis* ซึ่งเป็น bradyzoites ที่แตกออกมาจาก sarcocyst (รูปที่ 3) มีผลทำให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อตัวสัตว์ (อาคม, 2538; Mandour, 1969; Gajadhar and Marquardt, 1992; Vangeel et al., 2012) และเมื่อจำแนกชนิด *Sarcocystis* จากอวัยวะตัวอย่างหัวใจโคเนื้อ 17 ตัว พบเป็น *S. cruzi* ทั้งหมด เป็นการยืนยันว่าชนิดที่ตรวจพบในห้องปฏิบัติการเป็นชนิดที่ก่อความรุนแรงและมีอันตรายต่อโค-กระบือจริง และพบกระจายทั่วพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ซึ่งมีผลกระทบต่อสุขภาพโค-กระบือ โดยที่ผ่านมายังไม่พบการรายงานข้อมูล โค-กระบือ ป่วยตายแล้วตรวจพบเฉพาะ *Sarcocystis* ชนิด *S. cruzi* มาก่อน โดยกลุ่มอาการป่วยของโค-กระบือ ที่พบคือสัตว์มีน้ำหนักลดลง ผอมมาก ขาหลังกระเผลกอ่อนแรง ล้ม ไม่ลุกหรือลุกยากและมีอาการโคมาตามมา (รูปที่ 4, ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับอาการของลูกกระบือที่ทดลองให้กิน sporocysts ของ *S. cruzi* ตามการศึกษาของสุรีย์ และคณะ (2527) และสอดคล้องกับอาการของโคจากการติด *S. cruzi* ตามรายงานของ Dubey (1977) และ Garry (2008) สำหรับลักษณะรอยโรคในการศึกษาส่วนที่ 1 นี้ (ตารางที่ 2) มีลักษณะสอดคล้องกับ Dubey (1977) ที่การติด *S. cruzi* ในโคพบจุดเลือดออกที่ serosal membrane และปื้นเลือดออกที่หัวใจ สอดคล้องกับ Garry (2008) ในโคที่ติด *S. cruzi* พบลักษณะตับซีดเหลือง และจุดเลือดออกที่หัวใจ และ

สอดคล้องกับ Smith and George (2009) โคที่ติด *S. cruzi* พบของเหลวในช่องว่างของลำตัว ในขณะที่เดียวกันก็มีรายงานการติด *S. cruzi* ในโค (More et al., 2008; Nourani et al., 2010) และในกระปือ (สุรีย และคณะ, 2527) แล้วไม่พบรอยโรค ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่มีตัวอย่างบางตัวไม่พบรอยโรคที่ผิดปกติเช่นกัน

ส่วนตัวอย่างหัวใจกระปือ 1 ตัว ที่ผลตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยืนยันเป็นชนิด *S. levinei* (ตัวอย่างที่ 13) แต่จากการจำแนกชนิดโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ที่ใช้ primers จำเพาะต่อ *S. cruzi* (รูปที่1) พบแถบ DNA ที่ประมาณ 284 bp ซึ่งใกล้เคียงกับ *S. cruzi* มาก ทำให้ไม่สามารถจำแนกทั้งสองชนิดออกจากกันได้ด้วยการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เมื่อตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ระหว่าง primers ที่จำเพาะต่อ *S. cruzi* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S. levinei* ที่ตรวจพบในการศึกษานี้ เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S. levinei* (accession number KU247918) ในฐานข้อมูลพันธุกรรมของ NCBI GenBank database พบว่ามีความเหมือนกัน 100% จึงสรุปได้ว่า primers ที่จำเพาะต่อ *S. cruzi* ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ ไม่สามารถจำแนก *S. levinei* ออกจาก *S. cruzi* ได้ ควรศึกษาเพิ่มเติมตัวอย่างที่ผลบวกเป็น *S. levinei* โดยใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับเชื้อชนิดนี้โดยเฉพาะ นอกจากนี้การศึกษาตัวอย่างกระปือยังตรวจไม่พบ sarcocyst โดยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาอาจเนื่องจากการสุมัดชิ้นเนื้อในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างไม่ครอบคลุมในส่วนที่มี sarcocyst แทรกอยู่ ประกอบกับตัวอย่างกระปือมีเพียง 1 ตัว ซึ่งไม่มากพอจะใช้ศึกษาถึงแนวโน้มการพบชนิดของ *Sarcocystis* ในกระปือ และเมื่อดูลักษณะรอยโรคก็ไม่พบรอยโรคที่ผิดปกติต่างจากการศึกษาของ Jain et al. (1986) ที่ทดลองให้ลูกกระปือติด *S. levinei* แล้วพบลักษณะซากพอม ดับซิดเหลือง มีจุดเลือดออกที่หัวใจ ดังนั้นควรจะมีการรวบรวมตัวอย่างกระปือเพื่อศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากการศึกษาข้อมูลย้อนหลังจากกลุ่มระบาดวิทยา ศวพ.ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ในการศึกษาส่วนที่ 2 พบโค-กระปือ ป่วยตายตรวจพบเฉพาะ *Sarcocystis* ที่ไม่ได้จำแนกชนิด จำนวน 90 ตัว พบในทุกจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน แสดงว่ามีการกระจายของ *Sarcocystis* ทั่วไปในพื้นที่ โดยในโค-กระปือ 90 ตัวนี้ มี 57 ตัวตามประวัติสัตว์ไม่ระบุอาการป่วย ส่วนอีก 33 ตัวระบุอาการป่วยซึ่งพบลักษณะ ผอมไม่กินอาหาร ซึม มีไข้ ขาหลังอ่อน ล้ม ท้องอืด ท้องเสีย หอบหายใจลำบาก น้ำลายไหล และเมื่อชันสูตรซาก บางตัวไม่พบลักษณะวิการ ส่วนตัวที่พบมีลักษณะหัวใจซีด มีจุดเลือดออก มีน้ำในถุงหุ้มหัวใจ ดับเหลืองซีด ปอดบวม ม้ามขยายใหญ่ ไตซีด ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการวินิจฉัยแยกโรคจากการติดพยาธินี้

การศึกษารังนี้ปัจจัยที่ส่งผลต่อการติด *Sarcocystis* มีหลายประการ เช่น จำนวน sporocyst หรือ oocyst ของ *Sarcocystis* ที่สัตว์ได้รับเข้าไป ร่วมกับภาวะภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่ลดลง (สุรีย และคณะ, 2527; Garry, 2008; More et al., 2008; Smith and George, 2009) โดยการศึกษาทั้ง 2 ส่วนนี้ส่วนใหญ่ตรวจพบ *Sarcocystis* ในสัตว์ที่อายุ 5 ปีขึ้นไป (ตารางที่ 2 และตารางที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับ Arafa et al. (2003) ที่ศึกษากระปือติด *Sarcocystis* ในประเทศอียิปต์ พบกระปืออายุ 5 ปีขึ้นไปติด *Sarcocystis* 61.42% โดยที่อายุต่ำกว่า 2 ปี พบ 15% ประการต่อมาคือการไม่ทราบถึงชนิดของ *Sarcocystis* ที่ก่อความรุนแรงและมีการกระจายในพื้นที่ อีกทั้งการชันสูตรซากอาจไม่พบวิการผิดปกติเมื่อดูด้วยตาเปล่า (Gross lesion) (สุรีย และคณะ, 2527; More et al., 2008; Nourani et al., 2010) ซึ่งการศึกษาทั้ง 2 ส่วนมีตัวอย่างจำนวนหนึ่งที่ไม่

พบรอยโรค (ตารางที่ 2 และตารางที่ 6) และสำหรับตัวอย่างที่พบรอยโรคก็พบลักษณะเหมือนรอยโรคพื้นฐานทั่วไป ทำให้ประเด็นของการติดพยาธินี้ถูกมองข้ามและไม่ให้ความสำคัญเท่าที่ควร และประเด็นที่สำคัญมากคือผู้เลี้ยงไม่ทราบถึงผลกระทบของการเลี้ยงโค-กระบือ ปะปนร่วมกันกับสุนัข

สำหรับการควบคุมโรคนี้ แนวทางที่ควรนำมาปฏิบัติมากที่สุดคือการป้องกันและตัดวงจรของพยาธิ โดยการเลี้ยงโค-กระบือ ไม่ให้มีสุนัขเข้ามาคลุกคลี หรือไม่เลี้ยงบริเวณที่มีสุนัขขับถ่ายอุจจาระเพราะวงจรการติด *Sarcocystis* คือโค-กระบือ จะกิน sporocyst หรือ oocyst ที่ปนออกมาจากอุจจาระของสุนัขและพัฒนาจนเป็น sarcocyst แทรกตามกล้ามเนื้อหรืออวัยวะต่างๆ และสุนัขจะติดเชื้อมีพยาธิโดยการกินเนื้อโค-กระบือที่มี sarcocyst แทรกอยู่ และพัฒนาจนเป็น sporocyst หรือ oocyst แล้วขับออกมาทางอุจจาระ (Dubey, 1977) โดยแนวทางการรักษามีข้อแนะนำภายหลังสัตว์ติด *Sarcocystis* คือให้ amprolium ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 30 วัน (Smith and George, 2009) ซึ่งใช้ระยะเวลานานและไม่สะดวกในทางปฏิบัติ ที่สำคัญคือปัจจุบันห้องปฏิบัติการของ ศวพ.ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ยังไม่มีวิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจวินิจฉัยการติด *Sarcocystis* ขณะที่สัตว์ยังมีชีวิตอยู่ ทำให้ยากในการวินิจฉัยเพื่อทำการรักษาในขณะที่สัตว์ป่วย ซึ่งควรจะได้มีการศึกษาวิธีวินิจฉัยการติด *Sarcocystis* โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีทางชีววิทยาเพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับป้องกัน ควบคุม และรักษาโค-กระบือที่ติดพยาธินี้

สำหรับการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงการระบาดของ *Sarcocystis* ที่มีในพื้นที่ โดยที่ผ่านมามีพยาธินี้อาจถูกมองข้ามในส่วนที่สามารถทำให้โค-กระบือ ป่วยตายได้ ซึ่งควรมีการประชาสัมพันธ์ให้ผู้ที่เกี่ยวข้องทราบ และประสานกับเจ้าหน้าที่ในพื้นที่ให้ความรู้แก่เกษตรกรหรือผู้เลี้ยงโค-กระบือถึงอันตรายของ *Sarcocystis* และระมัดระวังการเลี้ยงโค-กระบือ ไม่ให้คลุกคลีร่วมกับสุนัขที่เป็นสาเหตุของการแพร่เชื้อต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.ทวีวัฒน์ ตีมะการ นายสัตวแพทย์ดิลก อ้วนพรมมา ที่กรุณาช่วยเหลือด้านข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล สัตวแพทย์รุ่งสุดา ผูกพัน ที่กรุณาช่วยเหลือแหล่งข้อมูลย้อนหลังการตรวจพยาธินี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการอิมมูโนวิทยา ชีวเคมี ปรสิตวิทยา แบคทีเรียวิทยา ไวรัสวิทยา และพยาธิวิทยา ของศวพ.ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนทุกท่าน ที่ร่วมตรวจวินิจฉัยโรคในส่วนที่เกี่ยวข้องในแต่ละห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- มานวิภา ผลภาค. 2556. คู่มือการชันสูตรโรคสัตว์ใหญ่เบื้องต้น สำหรับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการระดับพื้นที่. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน จังหวัดขอนแก่น กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 40-42.
- มานพ ม่วงใหญ่. 2540. วิทยาสัตวเซลล์เดียวทางสัตวแพทย์. หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 153-169.

- มานพ ม่วงใหญ่ และ ธงชัย เฉลิมชัยกิจ. 2531. *Sarcocystis* ในประเทศไทย I. อุบัติการณ์ของ *Sarcocystis* ในโคและกระบือ. เวชสารสัตวแพทย์. 18 (4): 319-328.
- ศุภลักษณ์ โรมนันตพันธ์. 2537. เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา. คู่มือปฏิบัติการทางฮิสโตเทคนิค. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 128 หน้า.
- สุรีย์ ธรรมศาสตร์ บุญมี สัญญะสุจจารี มนยา เอกทัต บำรุง ไม้สุพร และ ไวยพจน์ หิมารัตน์. 2527. การทดลองทำให้เกิดการเป็นโรคพยาธิเม็ดขาวสาร (*Sarcocystosis*) ในลูกกระบือ I. การศึกษาอาการและอาการของการเกิดโรค. รายงานผลการวิจัย การศึกษาปัญหาโรคพยาธิเม็ดขาวสารในลูกกระบือทดลอง. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 10-28.
- แสงชัย นทีวรนาท นกคณ จำรูญ เฉลิมชัย สกุลโชควัฒนา พรชัย หมีแหมว และ สุวิธญา แสงนาค. 2550. ความชุกของการติดเชื้อ *Sarcocystis* spp. ในกล้ามเนื้อหัวใจโคและกระบือในตลาด 4 แห่งในเขตอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่. 40 (2): 109-113.
- อาคม สังข์วรานนท์. 2538. โปรโตซัววิทยาทางสัตวแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์วีรชัย กรุงเทพฯ. หน้า 233-282.
- Arafa, M.I., Monib, M.M., Dyab, A.K. and Addel-Ghaffar, S.K.H. 2003. Studies on ocular *Sarcocystis* in buffaloes in Assiut Governorate. Ass. Univ. Bull. Environ. Res. 6 (1): 27-35.
- Bernel, R.C., Verma, S.K., Seaton, C.T., Sinnett, D., Ball, E., Dunams, D., Rosenthal, B.M. and Dubey, J.P. 2015. *Sarcocystis cruzi* infection in wood bison (*Bison bison athabasca*). Vet. Parasitol. 210: 102-105.
- Bowman, D.D. 2009. Protozoans. In: Georgis' Parasitology for Veterinarians. 9th ed., edited by J. Gower. Saunders Elsevier, China. p. 84-114.
- Chiesa, F., Muratore, E., Dalmaso, A. and Civera, T. 2013. A new molecular approach to assess the occurrence of *Sarcocystis* spp. in cattle and products there of preliminary data. Italian Journal of Food safety. 2 (3): 148-151.
- Dubey, J.P. 1977. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis* and Other Tissue Cyst-Forming Coccidia of Man and Animals. In: Parasitic Protozoa. Volume III. Edited by J.P. Kreier. Academic Press, New York, U.S.A. p. 101-237.
- Eberhard, M.L. 2009. Histopathologic Diagnosis. In: Georgis' Parasitology for Veterinarians. 9th ed., edited by J. Gower. Saunders Elsevier, China. p. 372-406.
- Fayer, R., Esposito, D.H. and Dubey, J.P. 2015. Human Infections with *Sarcocystis* Species. Clin. Microbiol. Rev. 28 (2): 295-311.

- Gajadhar, A.A. and Marquardt, W.C. 1992. Ultrastructural and Transmission Evidence of *Sarcocystis cruzi* Associated with Eosinophilic Myositis in Cattle. *Can. J. Vet. Res.* 56: 41-46.
- Garry, F. 2008. Miscellaneous Infectious Diseases. In: Rebhun's Diseases of Dairy Cattle. 2nd ed., edited by T. Merchant. Sanders Elsevier, China. p. 608-639.
- Guclu, F., Aldem_R, O.S. and Guler, L. 2004. Differential identification of cattle *Sarcocystis* spp. by random amplified Polymorphic DNA -Polymerase chain reaction (RAPD-PCR). *Revue Méd. Vét.* 155: 440-444.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Jain, A.K., Gupta, S.L., Singh R.P. and Mzhajan, S.K. 1986. Experimental *Sarcocystis levinei* infection in buffalo calves. *Vet. Parasitol.* 21: 51-53.
- Jehle, C., Dinkel, A., Sander, A., Morent, M., Roming, T., Luc, P.V., De, T.V., Thai, V.V. and Mackenstedt, U. 2009. Diagnosis of *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos Taurus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northern Vietnam. *Vet. Parasitol.* 166: 314-320.
- Mandour, A.M. 1969. Studies on the toxicity of *Sarcocystis*. *J. Med. Microbiol.* 2: 361-363
- More, G., Abrahamovich, P., Jurado, S., Bacigalupe, D., Marin, J.C., Rambeaud, M., Venturini, L. and Venturini, M.C. 2011. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Vet. Parasitol.* 177: 162-165.
- More, G., Basso, W., Bacigalupe, D., Venturini, M.C. and Venturini, L. 2008. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitol. Res.* 102: 671-675.
- National Institute of Animal Health. 1998. Standard Diagnostic Manual for Livestock Disease in Thailand. Department of Livestock Development, Bangkok. p. 72-75.
- Nourani, H., Matin, S., Nouri, A. and Azizi, H. 2010. Prevalence of thin-wall *Sarcocystis cruzi* and thick-walled *Sarcocystis hirsuta* or *Sarcocystis hominis* from cattle in Iran. *Trop. Anim. Health. Prod.* 42: 1225-1227
- Odening, K., Stolte, M. and Bockhardt, I. 1966. On the diagnostics of *Sarcocystis* in cattle: sarcocysts of a species unusual for *Bos Taurus* in a dwarf zebu. *Vet. Parasitol.* 66: 19-24.
- Ono, M. and Ohsumi, T. 1999. Prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in Japanese and imported beef (Lion: *Musculus longissimus*). *Parasitol. Int.* 48: 91-94.

- Poulsen, C. S. and Stensvold, C.R. 2014. Current Status of Epidemiology and Diagnosis of Human Sarcocystosis. J. Clini. Microbiol. 52 (10): 3524-3530.
- Savini, G., Dunsmore, J.D., Robertson, I.D. and Seneviratna, P. 1992. The epidemiology of *Sarcocystis* spp. in cattle of Western Australia. Epidemiol. Infect. 108: 107-113.
- Smith, M.O. and George, L.W. 2009. Diseases of the Nervous System. In: Large animal internal medicine. 4th ed., edited by T. Merchant and S. Stringer. Mosby Elsevier, United state. p. 972-1111.
- Soulsby, E.J.L. 1982. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7th ed. Bailliere Tindall, London. 809 p.
- Vangeel, L., Houf, K., Geldhof, P., Nollet, H., Vercruysse, J., Ducatelle, R. and Chiers, K. 2012. Intramuscular inoculation of cattle with *Sarcocystis* antigen results in focal eosinophilic myositis. Vet. Parasitol. 183: 224-230.
- Xiang, Z., He, Y., Zhao, H., Rosenthal, B. M., Dunams, D.B., Li, X., Zuo, Y., Feng, G., Cui, L. and Yang, Z. 2011. *Sarcocystis cruzi*: Comparative studies confirm natural infections of buffaloes. Exp. Parasitol. 127: 460-466.
- Yang, Z.Q., Yang, X.Z., Ding, B., Chen, X.W., Luo, J. and Zhang, Y.P. 2001. Identification. of *Sarcocystis hominis*-like (Protozoa: Sarcocystidae) cyst in water buffalo (*Bubalus bubalis*) based on 18S rRNA gene sequences. J.Parasitol. 87 (4): 934-937.

ตารางที่ 1 ตัวอย่างส่งตรวจห้องปฏิบัติการศพ.ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ในการศึกษาส่วนที่ 1

ตัวอย่าง	พื้นที่ที่ส่งตัวอย่าง	ชนิดสัตว์	ตัวอย่างส่งตรวจห้องปฏิบัติการ**							ผลการตรวจของห้องปฏิบัติการ
			แบคทีเรียวิทยา	ซีรัมวิทยา	ไวรัสวิทยา		ปรสิตวิทยา			
			(อวัยวะ*)	(ซีรัม)	(อวัยวะ*)	(เลือด)	(อุจจาระ)	(เลือด)	(Impression อวัยวะ*)	
1	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/	ทุกตัวอย่าง ตรวจพบเฉพาะ bradyzoites ของ <i>Sarcocystis</i> ด้วยวิธี impression smear อวัยวะหัวใจ โดย ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา	
2	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		
3	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		
4	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		
5	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		
6	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		
7	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		
8	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		
9	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		
10	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		
11	อ.ท่าลี่ จ.เลย	โคเนื้อ	/	X	/	X	X	X		/
12	อ.นาแห้ว จ.เลย	โคเนื้อ	/	X	/	X	X	X		/
13	อ.เมือง จ.มุกดาหาร	กระบือ	/	X	/	X	X	X		/
14	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		/
15	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		/
16	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		/
17	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	โคเนื้อ	/	/	/	/	/	/		/
18	อ.บ้านไผ่ จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	/	X	/	X	X	X		/

หมายเหตุ : / = มีตัวอย่าง ; X= ไม่มีตัวอย่าง ; **แบคทีเรียวิทยา =เพาะหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ; **ไวรัสวิทยา= ตรวจหาโรค Bovine viral diarrhea และ โรค Enzootic bovine leukosis โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ;

**ซีรัมวิทยา=ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อโรค Melioidosis, Brucellosis, Bovine Tuberculosis, Paratuberculosis; **ปรสิตวิทยา=ตรวจอุจจาระหาไข่พยาธิ ตรวจเลือด และ impression smear อวัยวะ หัวใจ หายใจในเลือด ;

*อวัยวะ=หัวใจ ตับ ปอด ม้าม ไต

ตารางที่ 2 สรุปประวัติข้อมูลโค-กระบือ ในการศึกษาส่วนที่ 1

ตัว อย่าง	พื้นที่ที่ส่งตัวอย่าง	ชนิด สัตว์	อายุ (ปี)	กลุ่มอาการจากใบประวัติ	สรุปลักษณะรอยโรคจากการสังเกตด้วยตาเปล่า **								การรักษา
					หัวใจ	ตับ	ปอด	ม้าม	ไต	สมอง	ลำไส้	ช่องอก	
1	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	13	ล้ม ขาแบะ ท้องเสีย	Pet. he.	Yell.	Pne.	NRL	Pale	NRL	-	-	ทุกตัวไม่ ตอบสนอง ต่อการ รักษาตาม อาการและ การฉายา ปฏิกิริยา
2	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	15	พอมมาก	Pet. he	P.M.	Pne.	Cong.	Pale	-	-	-	
3	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	2	พอม ซีด ล้ม ลูกไม่ได้ ขาหลังไม่มีแรง	Hydro.p.	NRL	Pne.	Cong.	-	-	Enter.	Hydro.T.	
4	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	16	พอม ไม่มีแรง ล้มนอน ลูกไม่ได้	Hydro.p.	Pale	Pne.	Cong.	Pale	-	-	-	
5	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	9	พอมมาก ล้ม ลูกไม่ได้ ทรงตัวไม่ได้ ไม่กินอาหาร	NRL	Enl.	Emp.	Cong.	Cong.	-	-	-	
6	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	4	ท้องอืด ไม่กินอาหาร ทายใจลำบาก	Pet. he.	Enl.	Pne.	Sple.	Pale	-	-	-	
7	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	10	พอม ล้มนอน ลูกไม่ได้	Pet. he.	Enl.	Pne.	Sple.	Pale	Cong.	Reddish	-	
8	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	10	พอมลงเรื่อยๆ ล้มนอน ลูกไม่ได้	-	-	Pne.	-	-	-	-	-	
9	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	10	พอมอ่อนแอ เดินไม่มีแรง ล้มนอน ลูกลำบาก	-	NRL	Pne.	NRL	NRL	-	-	-	
10	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	10	พอมมาก	Pet. he.	Pale	Pne.	-	Pale	-	Enter.	Hydro.T.	
11	อ.ท่าลี่ จ.เลย	โคเนื้อ	4	พอม ป่วย ซึม	Pale	Pale	Pale	Sple.	Pale	-	-	-	
12	อ.นาแห้ว จ.เลย	โคเนื้อ	5	ไม่แจ้งประวัติ	Pale	NRL	Pne.	NRL	NRL	-	-	-	
13	อ.เมือง จ.มุกดาหาร	กระบือ	4	ซูบพอม	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	-	-	-	
14	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	โคเนื้อ	7	พอม	Cong.	Cong.	Pne.	Cong.	Cong.	-	NRL	-	
15	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	โคเนื้อ	8	พอม แท้งลูก ล้ม ไม่ลุก	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	-	-	-	
16	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	โคเนื้อ	4	ล้มนอน ทายใจลำบาก มีน้ำมูก ไข้สูง	-	-	Pne.	Sple.	-	-	-	-	
17	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	โคเนื้อ	4	ล้มนอน ลูกยาก มีไข้ น้ำมูก	NRL	Yell.	Pne.	NRL	Yell.	-	NRL	-	
18	อ.บ้านไผ่ จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	3	ซึม ไม่กินอาหาร	NRL	NRL	NRL	NRL	-	-	NRL	-	

หมายเหตุ: **รอยโรค: Pet. he.= petechial hemorrhage, Hydro.p.= hydropericardium, Cong.= Congestion, Yell.= yellowish, P.M.= post mortem change, Enl.=

enlargement, Pne.= pneumonia, Emp.= emphysema, Sple.= splenomegaly, Enter.= enteritis, Hydro.T.= hydrothorax, NRL= no remarkable lesion; - = ไม่มีรายงานรอยโรค

ตารางที่ 3 ผลการจำแนกชนิด *Sarcocystis* จากตัวอย่างอวัยวะหัวใจโค-กระบือ ในการศึกษาส่วนที่ 1

ตัวอย่าง	พื้นที่ที่ส่งตัวอย่าง	ชนิดสัตว์	ลักษณะผนัง Sarcocyst ที่พบ	PCR result			ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล ของ GenBank
				specific primers (<i>S. cruzi</i>)	specific primers (<i>S. hirsuta</i>)	specific primers (<i>S. hominis</i>)	
1	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
2	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
3	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
4	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
5	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
6	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
7	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
8	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
9	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
10	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
11	อ.ท่าลี่ จ.เลย	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
12	อ.นาแห้ว จ.เลย	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
13	อ.เมือง จ.มุกดาหาร	กระบือ	ไม่พบ Sarcocyst	+	-	-	<i>S. levinei</i>
14	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
15	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
16	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
17	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>
18	อ.บ้านไผ่ จ.ขอนแก่น	โคเนื้อ	Thin wall ^A	+	-	-	<i>S. cruzi</i>

หมายเหตุ : A = ผนังเฉลี่ยบางน้อยกว่า 1 ไมครอน; + = พบสารพันธุกรรมเป้าหมาย; - = ไม่พบสารพันธุกรรมเป้าหมาย

ตารางที่ 4 ชนิดสัตว์ที่ตรวจพบ Sarcocystis ในการศึกษาส่วนที่ 2

	หนองคาย	อุดรธานี	ขอนแก่น	มหาสารคาม	ร้อยเอ็ด	กาฬสินธุ์	สกลนคร	นครพนม	มุกดาหาร	เลย	หนองบัวลำภู	รวม
โคเนื้อ	1	10	12	19	1	4	14	1	1	4	2	69
โคนม	-	1	-	-	-	-	7	-	-	-	-	8
กระบือ	-	3	-	1	-	-	2	-	-	7	-	13
รวม	1	14	12	20	1	4	23	1	1	11	2	90

หมายเหตุ: - = ไม่มีตัวอย่าง

ตารางที่ 5 กลุ่มอาการป่วยของโค-กระบือ 33 ตัว ที่มีข้อมูลประวัติ ในการศึกษาส่วนที่ 2

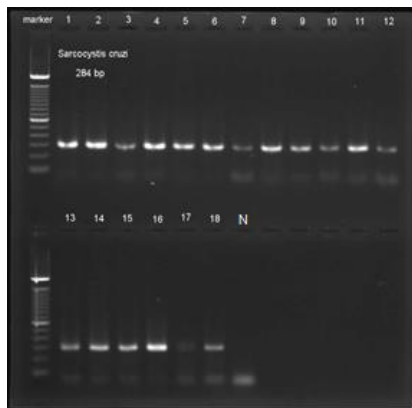
ชนิดสัตว์	จำนวน (ตัว)	ผอม	ไม่กินอาหาร	ขาหลัง เกร็งกระตุก	ขาอ่อน ล้มนอนลุกไม่ขึ้น	มีไข้ ซึม	ท้องอืด	ท้องเสีย	หอบ หายใจลำบาก	น้ำลายไหล	การรักษา
โคเนื้อ	27	15			13	5	3	4	1	1	ทุกตัวไม่ตอบสนอง
โคนม	1	-			-	1	-	-	-	-	ต่อการรักษาตาม
กระบือ	5	2			3	-	2	1	3	1	อาการและการใช้
รวม	33 (100%)	17 (51.51%)			16 (48.48%)	6(18.18%)	5 (15.15%)	5 (15.15%)	4 (12.12%)	2 (6.00%)	ยาปฏิชีวนะ

หมายเหตุ: - = ไม่มีรายงานอาการป่วย

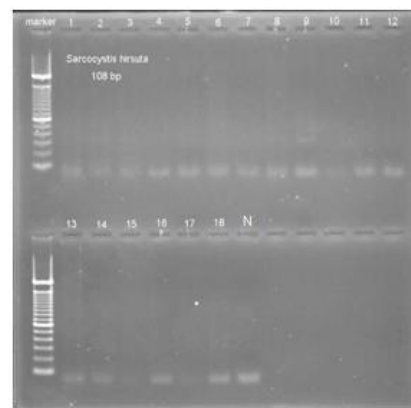
ตารางที่ 6 สรุปลักษณะรอยโรคจากการสังเกตด้วยตาเปล่าของโค-กระบือ 33 ตัว จากตารางที่ 5 ในการศึกษาส่วนที่ 2

ชนิดสัตว์	จำนวน (ตัว)	จำนวน (ตัว) ที่พบลักษณะรอยโรคเมื่อมองด้วยตาเปล่า														ผนัง Sarcocyst* (Thin wall)	
		หัวใจ			ตับ				ปอด			ม้าม			ไต		ไม่พบ รอยโรค
		Hydro.p *	Pale	Pet. he. *	Enl. *	Pale	Yell. *	Cong. *	Emp. *	Pne. *	Cong. *	Sple. *	Cong. *	Pet. he. *	Pale		
โคเนื้อ	27	2	2	2	1	4	3	1	1	5	2	4	3	-	4	10	3
โคนม	1	-	-	-	1	1	-	-	1	2	-	1	-	1	-	-	
กระบือ	5	1	-	-	1	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	3	
รวม	33	3	2	3	3	5	4	1	2	8	2	6	3	1	4	13	3

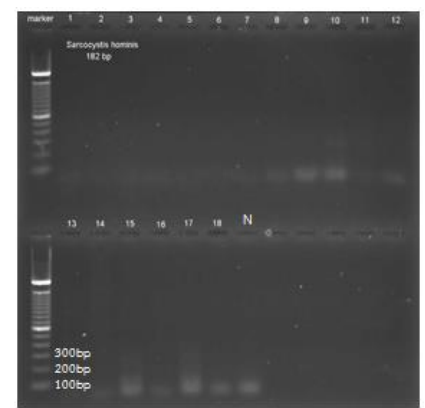
หมายเหตุ: * Hydro.p.= hydropericardium , Pet. he.= petechial hemorrhage, Cong.= Congestion, Yell.= yellowish, Enl.= enlargement, Pne.= pneumonia, Emp.=emphysema, Sple.= splenomegaly, - = ไม่มีรายงานรอยโรค; **โค-กระบือ 33 ตัว มีข้อมูลประวัติการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อดูผนัง sarcocyst เพียง 3 ตัวอย่าง พบมีลักษณะThin wall (ผนังหนาน้อยกว่า 1 µm) ทั้ง 3 ตัวอย่าง



specific primers ของ *S. cruzi*



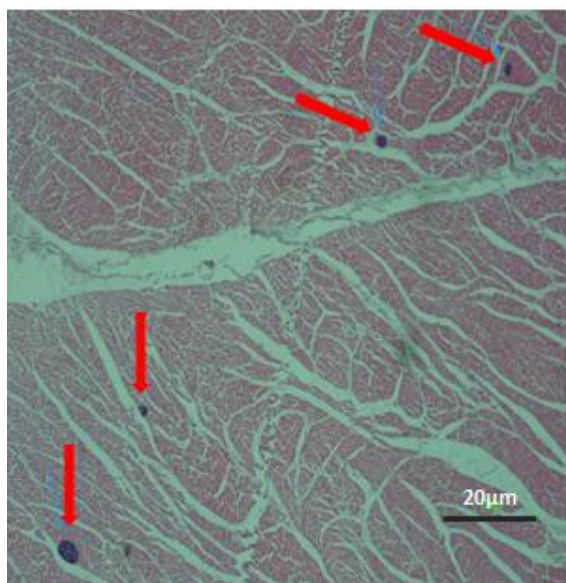
specific primers ของ *S. hirsuta*



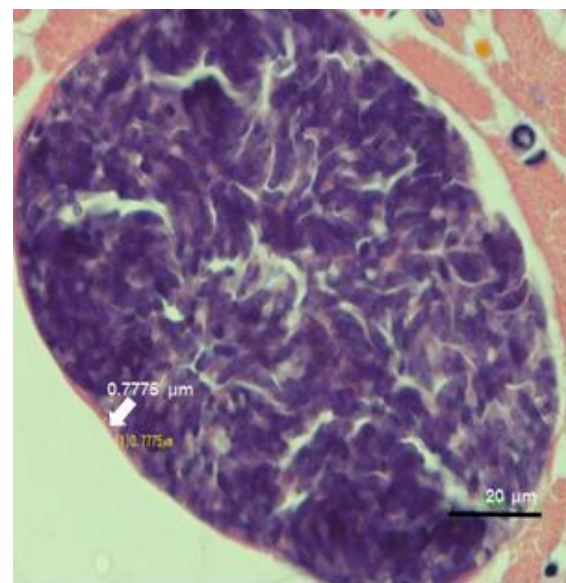
specific primers ของ *S. hominis*

[หมายเลข 13 = ตัวอย่างกระป๋อง ; หมายเลข 1-12, 14-18 = ตัวอย่างโคเนื้อ; N=negative control]

รูปที่ 1 ผลการแยกชนิด *Sarcocystis* ที่พบในอวัยวะหัวใจโค-กระบือ 18 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Chiesa et al., 2013) ในการศึกษาส่วนที่ 1

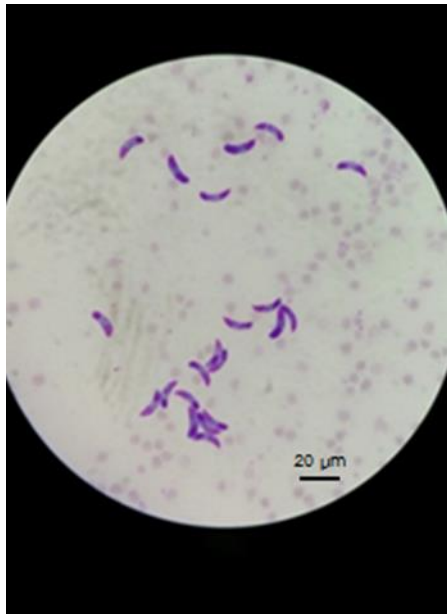


Sarcocystis cyst แทรกกระจายในกล้ามเนื้อหัวใจ (ลูกศรชี้)

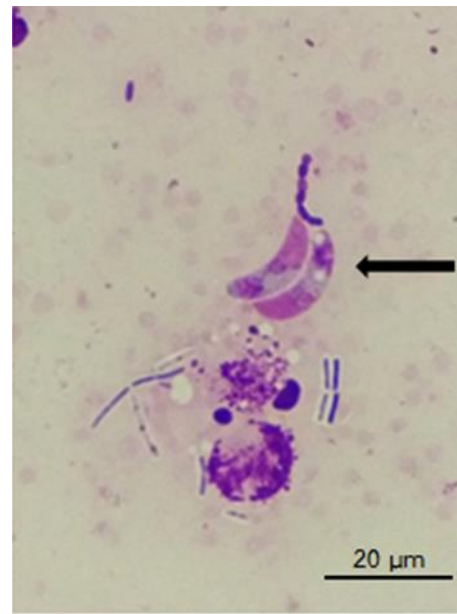


ขนาดผนัง *Sarcocystis* น้อยกว่า 1 ไมครอน (Thin wall)

รูปที่ 2 ลักษณะ *Sarcocystis* ทางจุลพยาธิวิทยาจากตัวอย่างหัวใจโคเนื้อ ในการศึกษาส่วนที่ 1



กำลังขยาย 1000 เท่า



ภาพ zoom 3 เท่า จากกำลังขยาย 1000 เท่า (ลูกศรชี้)

รูปที่ 3 Impression smear จากตัวอย่างกล้ามเนื้อหัวใจโคเนื้อ พบ bradyzoites ที่แตกออกมาจาก cyst ของ *Sarcocystis* ในการศึกษาส่วนที่ 1



A



A



B



B

รูปที่ 4 ลักษณะโคเนื้อ 2 ตัว ที่พบ *Sarcocystis cruzi* ในการศึกษาส่วนที่ 1 (A: โคตัวที่ 1 ; B: โคตัวที่ 2)

Detection of *Sarcocystis* infection in cattle and buffaloes in Upper Northeastern Thailand during 2011-2015

Ard-ong Onwan* Denpong Sakhong

Veterinary Research and Development Center Upper Northeastern Region, Mueang, Khon Kaen, 40260

*Corresponding author: Tel./Fax 043-261246 E-mail: rdulnar@hotmail.com

Abstract

Sarcocystis, a protozoa in the Phylum Apicomplexa, can cause illness in humans and animals reported worldwide. There are many *Sarcocystis* species that are able to infect cattle and buffaloes, and *S. cruzi* is the most virulent species. The objective of this study was to detect and identify *Sarcocystis* species in cardiac muscle tissues from cattle and buffaloes raised in upper northeastern Thailand during 2011-2015. The study was divided into two parts. In part 1, during September 2015 to December 2015, cardiac muscle tissues collected from cattle and buffalo carcasses with history of depression, anorexia, hind leg lameness and falling were sent to the Veterinary Research and Development Center (upper northeastern Region) laboratory. The laboratory results were positive only with *Sarcocystis* bradyzoites detected by impression smear method in 17 beef cattle and 1 buffalo. The positive samples were further analyzed for *Sarcocystis* species identification by measurement of sarcocyst wall thickness through histopathological technique as well as by polymerase chain reaction with DNA sequencing. The results revealed that *S. cruzi* and *S. levinei* were detected in the cattle and buffalo, respectively. In part 2 of the study, a retrospective study was performed in cattle and buffalo cases submitted during January 2011 - August 2015, which were positive with *Sarcocystis* bradyzoites by impression smear and no underlying causes of deaths were determined. From total 90 animals, 57 of them had no history data available. Clinical signs found in the rest (33 animals) were anorexia, wasting, fever, hind leg lameness and falling, bloat, diarrhea, dyspnea and salivation. Some animals showed gross lesion at necropsy including petechial hemorrhage and pale heart, hydropericardium, pneumonia, pale and yellowish liver, pale kidney and splenomegaly. This study confirmed that *Sarcocystis* found in cardiac muscle tissues from cattle in our laboratory was *S. cruzi*, which is highly virulent affecting on cattle and buffalo health. Moreover, the results in part 2 of this study suggested the distribution of *Sarcocystis* in northeastern Thailand. The prevalence of *S. cruzi* in this area should be further investigated.

Keywords: Buffalo, Cattle, *Sarcocystis cruzi*, Upper Northeastern Region