การตรวจหาการติดเชื้อ *Ehrlichia canis* ในสุนัขจรจัดในจังหวัดมหาสารคามโดยเทคนิคทางโมเลกุล
Molecular detection of *Ehrlichia canis* infection in stray dogs in Mahasarakham Province

ศิริอร เพ็ชรน้อย[1], อนาวิล ปะกิระตัง[1], ณัฐกานต์ อ้วนมะโฮง[1], เกียรติศักดิ์ พิมพ์จ่อง[2], สุภาวดี ปิระเต[3,*]
Siri-on Petchnoi[1], Anawin Pakiratang[1], Natthakan Uanmahong[1], Kiattisak Pimpjong[2], Supawadee Piratae[3,*]

บทคัดย่อ
การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดชนิด *Ehrlichia canis* เป็นสาเหตุที่ทำให้สุนัขเจ็บป่วยและเสียชีวิตได้ การศึกษาในครั้งนี้ได้ตรวจหาการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือด *E. canis* ในสุนัขจรจัดในจังหวัดมหาสารคาม จำนวน 30 ตัวอย่าง ในเขตอำเภอวาปีปทุม 6 ตัวอย่าง อำเภอแกดำ 8 ตัวอย่าง อำเภอบรบือ 9 ตัวอย่าง อำเภอพยัคภูมิพิสัย 7 ตัวอย่าง ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *E. canis* ระยะ morulae โดยการส่องกล้องจุลทรรศ์ด้วยการทำ thin blood smear และตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค nested polymerase chain reaction (nested PCR) จากการตรวจ thin blood smears พบผลบวกต่อเชื้อ *E. canis* ในระยะ morulae 5 ตัวอย่าง จาก 30 ตัวอย่าง คิดเป็น 16.67% และผลการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค nested PCR พบผลบวกต่อเชื้อ *E. canis* 8 ตัวอย่างจาก 30 ตัวอย่าง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 26.67 % เมื่อเปรียบเทียบกัน 2 วิธี สรุปได้ว่าการทำ nested PCR มีความไวและจำเพาะเจาะจงมากกว่าวิธีการทำ thin blood smears

คำสำคัญ : *Ehrlichia canis*, stray dogs, Nested PCR, Thin blood smears

Abstract
Ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis* is cause of morbidity and mortality in dogs. This study was detected *E. canis* infection in 30 of stray dogs in 4 districts of Mahasarakham province (6 samples from Wapipathum, 8 samples from Kaedam, 9 samples from Borabu, 7 samples from Phayakkhaphum Phisai). Blood samples of stray dogs were collected to morulae screend by thin blood smear and molecular screened for 16s rRNA gene of *E. canis* by nested PCR. The results showed that 5 of 30 samples (16.67%) were positive by thin blood smear. By nested PCR, 8 of 30 samples (26.67%) were positive. Comparing these techniques it was concluded that nested PCR is more sensitivity and specificity technique for detection of *E. canis*.

Keywords : *Ehrlichia canis*, stray dogs, Nested PCR, Thin blood smears

บทนำ
โรคพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขยังคงเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยและเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้สุนัขที่เป็นโรคถึงแก่ชีวิต[1] โดยทั่วไปโรคนี้เกิดจากการติดเชื้อโปรโตซัว ริกเก็ตเซียหรือแบคทีเรียในเม็ดเลือดแดงหรือเม็ดเลือดขาวก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อซึ่งก่อให้เกิดโรคที่มีความรุนแรงแตกต่างกันไป โดยทั่วไปโรคพยาธิเม็ดเลือดถ่ายทอดโดยการมีเห็บ (*Rhipicephalus sanguineus*) เป็นพาหะนำโรค[2]

โรคพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขที่เกิดจากเชื้อริกเก็ตเซียที่สามารถพบการติดเชื้อได้ทั่วโลก ได้แก่ *Ehrlichia* spp. และ *Anaplasma* spp. ซึ่งสามารถติดต่อได้ทั้งจากการถูกเห็บที่มีเชื้อกัด และการถ่ายเลือดจากสุนัขที่เป็นโรค โดยเชื้อเหล่านี้จะเข้าไปเพิ่มจำนวนในเม็ดเลือดขาว (*E. canis, E. chaffeensis, E. muris, E. ewingii, A. phagocytophilum*) และเกล็ดเลือด (*A. platys*)[3] ส่งผลให้ร่างกายสัตว์เกิดความเสียหาย เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดถูกทำลายและลดจำนวนลง สัตว์จะแสดง

[1] *นิสิต, [2]อาจารย์, ภาควิชาปรีคลีนิค, [3] อาจารย์, ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 44000*

[1] *Student, [2] Lecturer, Department of Pre-Clinic, [3] Lecturer, Department of Veterinary Public Health Faculty of Veterinary Sciences, Mahasarakham University, Muang District, Maha Sarakham 44000*

* *Corresponding author; Supawadee Piratae, Faculty of Veterinary Sciences, Mahasarakham University, Muang District, Mahasarakham 44000, Thailand. bios.tah@gmail.com*

อาการ ซีด เหลือง ปัสสาวะมีสีเข้ม มีจ้ำเลือดบนผิวหนัง และเลือดกำเดาไหล[4]

เชื้อริกเก็ตเซียแกรมลบในสกุล *Ehrlichia* ก่อให้เกิดโรค ehrlichiosis[5] ชนิดของเชื้อที่มีบทบาทสำคัญและพบการติดเชื้อมากในสุนัขคือ *E. canis* โดยพบการติดเชื้อได้ทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย[6] โดยตัวเชื้อจะอาศัยอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (monocyte) ของโฮสต์ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในระบบภูมิคุ้มกันดังนั้นการติดเชื้อชนิดนี้จะส่งผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ เนื่องจากตัวเชื้อจะเจริญและเพิ่มจำนวนทำให้เกิดการทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยตรงจึงมักพบโรค ehrlichiosis เกิดร่วมกับการเกิดโรคติดเชื้อชนิดอื่นๆ ได้ด้วย เช่น โรค babesiosis ที่เกิดจากเชื้อ *Babesia canis* หรือโรคติดเชื้อไวรัส เช่น ไข้หัดสุนัข หรือโรคติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ดังนั้นในขณะที่ตรวจพบว่าสัตว์มีเชื้อ *E. canis* ควรระวังโรคแทรกซ้อนอื่นๆ ซึ่งอาจจะทำให้การรักษาโรค ehrlichiosis ไม่ได้ผล ในการรักษาให้หายขาดสามารถใช้ยาในกลุ่ม doxycyclin โดยใช้ระยะเวลาในการรักษาหลายสัปดาห์ร่วมกับการตรวจหาเชื้ออย่างต่อเนื่อง[7] การตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธีการตรวจอื่นๆ นอกเหนือไปจากการตรวจฟิล์มเลือดจะช่วยยืนยันผลการรักษา ป้องกันไม่ให้สัตว์กลับมาแสดงอาการของโรคอีก รวมทั้งลดสภาวะการเป็นตัวนำโรค (carrier) ให้กับสัตว์ตัวอื่นๆ เนื่องมาจากเห็บที่ไม่มีเชื้ออาจมากัดดูดเลือดสัตว์ที่มีเชื้อและแพร่กระจายเชื้อได้ สุนัขที่ติดเชื้อ *E. canis* ในระยะเฉียบพลันตอบสนองดีต่อการรักษา อย่างไรก็ตามโรคติดเชื้อ *E. canis* เป็นโรคที่รักษาให้หายยากและสุนัขที่ได้รับการติดเชื้อจะกลายเป็นโรคเรื้อรังและทำหน้าที่เป็นตัวกักโรค (reservoir host) และเมื่อเกิดการติดเชื้อซ้ำ (re-infection) สุนัขจะมีอาการรุนแรงมากกว่าเดิม

ในประเทศไทยโรคพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขสามารถพบได้ในสุนัขทั่วไปทุกสายพันธุ์ เนื่องจากมีความชุกชุมของการแพร่กระจายของเห็บ[8] การศึกษาในครั้งนี้ทำเพื่อตรวจการติดเชื้อ *Ehrlichia* spp. ในเม็ดเลือดขาวในสุนัขจรจัด ในจังหวัดมหาสารคาม โดยทำการตรวจฟิล์มเลือดเพื่อตรวจหาเชื้อโดยตรง และใช้วิธี nested PCR เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งการตรวจโดยวิธี nested PCR เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง สามารถใช้ตรวจหาเชื้อได้จากเลือดของสัตว์ที่สงสัยในกรณีที่สัตว์มีเชื้ออยู่ในกระแสเลือดจำนวนน้อยจนทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อโดยวิธีตรวจฟิล์มเลือด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

เก็บตัวอย่างจากสุนัขจรจัดในจังหวัดมหาสารคาม ทั้งหมด 30 ตัว จากอำเภอแกดำ 8 ตัวอย่าง อำเภอบรบือ 9 ตัวอย่าง อำเภอพยัคภูมิพิสัย 7 ตัวอย่างและอำเภอวาปีปทุม 6 ตัวอย่างเพื่อมาตรวจด้วยวิธี thin blood smear และใช้เทคนิค nested PCR โดยทำการเจาะเลือดตัวละ 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (0.5M EDTA) ทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี thin blood smear ทันทีที่ตัวอย่างเลือดถึงห้องปฏิบัติการ และเก็บรักษาตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการสกัดดีเอ็นเอ

2. วิธีการตรวจหาเชื้อ *Ehrlichia canis*

2.1 ตรวจหาเชื้อด้วยวิธี Thin blood smears

นำเลือดมาหยดบนแผ่นสไลด์และไถ (smear) เมื่อเลือดแห้งทำการ fix เม็ดเลือดด้วยสาร methanol แล้วย้อมสี Giemsa Stain

2.2 สกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปตามวิธีการของบริษัท (Vivantis) โดยมีหลักการในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแล้วตกตะกอนเอาสารพันธุกรรม DNA ออกมาเกาะยึดอยู่กับเมมเบรนของหลอดสกัด จากนั้นจึงทำการล้าง DNA และชะ DNA ออกมาจากเมมเบรนตรวจสอบคุณภาพและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และการตรวจสอบคุณภาพ DNA ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

2.3 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค nested PCR

ทำ PCR โดยใช้ primer 2 คู่ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งยีน 16s rRNA ไพร์เมอร์ คู่ที่ 1 คือ ECC 5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3' และ ECB 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3' ไพร์เมอร์ คู่ที่ 2 คือ canis 5'-CAATTATTTATAGC CTCTGGCTATAGGA-3' และ HE3 5'-TATAGGTAC CGTCATTATCTTCCCTAT -3' [9,10]

ทำ PCR ครั้งที่ 1 โดยใช้ primer คู่ที่ 1 และนำ PCR product จากรอบแรกมาเป็น DNA ต้นแบบในการทำ PCR รอบที่ 2 ปฏิกิริยา PCR แต่ละรอบมีปริมาตรรวม 25 µl ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 100 ng , 1×PCR Buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 2.5 U DNA Polymerase (Vivantis)

ในการทำ PCR แต่ละรอบนั้นจะมีการเพิ่มจำนวนปฏิกิริยารอบละ 35 cycles แต่ละ cycle ประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน ได้แก่ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 60 °C และ ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1, 1 และ 2 นาที ตามลำดับ

ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างเลือดในสุนัขทั้งหมด 30 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทำ thin blood smear แล้วย้อมสีเพื่อตรวจหาเชื้อ *E. canis* พบว่า ตัวอย่างที่มีพยาธิวิทยาทาง cytology ของการติดเชื้อ *E. canis* มีทั้งหมด 5 ตัวอย่าง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์คือ 16.67 % เมื่อทำการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค nested PCR พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวก (positive) โดยการปรากฏแถบสารพันธุกรรมของเชื้อที่ประมาณ 389 คู่เบส (ภาพที่ 1) มีทั้งสิ้น 8 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่าง คิดเป็น 26.67 % และผลลบ (negative) ต่อเชื้อ *E. canis* มีอยู่ 22 ตัวอย่างคิดเป็น 72.33%

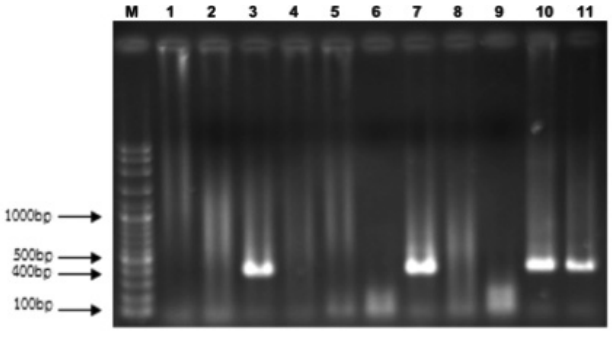

Figure 1 PCR products show amplicons of *E. canis* at 389 bp. (Lane M: vc 100 bp DNA ladder (vivantis); Lane 3, 7, 10: Amplification band of positive samples; Lane 11: positive control)

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขเป็นโรคที่พบได้บ่อยและเป็นสาเหตุที่ทำให้สุนัขเสียชีวิต โรคพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขมีสาเหตุมาจากเห็บ โดยเห็บมีการแพร่กระจายทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยซึ่งมีสภาพอากาศเหมาะแก่การเจริญของเห็บ การศึกษาในครั้งนี้จึงต้องการสำรวจอัตราของการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขจรซึ่งเป็นโฮสต์กักตุนหรือแหล่งรังโรคในการสะสมเชื้อ

จากการศึกษาการติดเชื้อ *E. canis* ในสุนัขจรจัดในจังหวัดมหาสารคามพบว่าผลจากการทำ nested PCR มีความไวและจำเพาะมากกว่าการตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยวิธี thin blood smears สอดคล้องกับการศึกษาของ Laummaunwai และคณะในปี 2014 ที่ทำการตรวจการติดเชื้อ *E. canis* แล้วพบว่าวิธี thin blood smears ให้ผลบวก 1.3% แต่วิธี PCR ให้ผลบวกของการติดเชื้อ 3%[11] ทั้งนี้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี thin blood smears นั้น ต้องอาศัยผู้ที่ชำนาญในการระบุการติดเชื้อเนื่องจากรูปร่างของเชื้อยากแก่การระบุชนิด หรือในกรณีของการติดเชื้อในปริมาณน้อยอาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ ดังนั้นวิธีการตรวจโดย nested PCR จะทำให้ได้ผลที่ถูกต้อง สามารถตรวจหาการติดเชื้อได้แม่นยำกว่าและไวกว่า

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทอาจารย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประจำปีงบประมาณ 2558

เอกสารอ้างอิง

1. Shaw SE, Day MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB. Tick-borne infectious diseases of dogs. Trends Parasitol 2001;17:74–80.
2. Latrofa MS, Dantas-Torres F, Giannelli A, Otranto D. Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. Ticks and Tick-borne Diseases 2014;5:943–946.
3. Irwin PJ, Jefferies R. Arthropod-transmitted diseases of companion animals in Southeast Asia. Trends in Parasitology 2004;20:27-34.
4. Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. The Veterinary Journal 2011;187(3):292–296.
5. Skotarczak B. Canine ehrlichiosis. Ann Agric Environ Med 2003;10:137-141.
6. Pinyoowong D, Jittapalapong S, Suksawat F, Stich RW, Thamchaipenet A. Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. Infect Genet Evol 2008;8(4):433-438.
7. Eddlestone SM, Diniz PP, Neer TM, Gaunt SD, Corstvet R, Cho D et al. Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. J Vet Intern Med 2007;21(6):1237-1242.

8. Tanskul PL, Stark HE, Inlao I. A checklist of ticks of Thailand (Acari: Metastigmata: Ixodoidea). J Med Entomol 1983;20:330-341.
9. Wen B, Rikihisa Y, Mott JM, Greene R, Hyung-Yong K, Zhi N et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. JClin Microbiol 1997;35:1852–1855.
10. Siarkou VI, Mylonakis ME, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas AF. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. Vet Microbiol 2007;15,125(3-4):304-312.
11. Laummaunwai P, Sriraj P, Aukkanimart R, Boonmars T, Boonjaraspinyo S, Sangmaneedet S et al. Molecular detection and treatment of tick-borne pathogens in domestic dogs in Khon Kaen, northeastern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2014;45(5):1157-1166.