รหัสโครงการ: MRG6080110

ชื่อโครงการ: Molecular detection of multiple tick-borne pathogens in canine blood using realtime PCR with high resolution melting (HRM) analysis

ชื่อนักวิจัย: ดร. กิตติศักดิ์ พุทธชาติ หัวหน้าโครงการ

รศ. ดร. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์ นักวิจัยที่ปรึกษาหลัก

ระยะเวลาโครงการ: 1 ปี

คำหลัก (key words) : Tick-borne diseases, blood parasites, molecular detection

บทคัดย่อ

ปัจจุบันสุนัขมีอัตราการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดเพิ่มมากขึ้น แต่การตรวจส่วนใหญ่ใช้ระยะเวลานานและตรวจได้ครั้งละเชื้อเท่านั้น จึงทำให้การวิจัยในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี multiplex real-time PCR HRM ในการตรวจหาเชื้อพยาธิในเลือดสุนัขทั้ง 4 ชนิดได้แก่ *B. vogeli*, *H. canis*, *E. canis* และ *A. platys* โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ส่วน คือ 1. การออกแบบไพรเมอร์ 2. ความจำเพาะเจาะจง 3. ความไวในการตรวจพบ และ 4. การตรวจหาเชื้อในตัวอย่างจริง ผลการศึกษาพบว่า Protz6 และ Bact3 เป็นไพรเมอร์ที่เหมาะสมเนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงและให้ค่า melting temperature (T_m) ของเชื้อทั้ง 4 ชนิดที่แยกออกจากกันได้อย่างชัดเจนที่ $P \leq 0.01$ โดย *A. platys* มีค่า Tm สูงสุดเท่ากับ 83.10ºC รองลงมาได้แก่ *B. vogeli*, *E. canis*, *H. canis* เท่ากับ 82.41, 80.37 และ 78.56ºC ตามลำดับ สำหรับความไวในการตรวจพบ พบว่า *B. vogeli*, *E. canis* และ *A. platys* มีความไวในช่วง 10^7-10^3 copies/µl ส่วน *H. canis* มีความไวในช่วง 10^7-10^4 copies/µl และจากการทดสอบกับสุนัข 68 ตัว พบว่าสุนัขมีการติดเชื้อ 34 ตัว คิดเป็น 50 % โดยมีการติดเชื้อ *E. canis* มากสุดถึง 28 ตัว รองลงมาคือ *B. vogeli*, *A. platys* และ *H. canis* เท่ากับ 6, 5 และ 4 ตามลำดับ ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อพยาธิในเลือดสุนัขต่อไป

คำสำคัญ: โรคที่เกิดจากเห็บ, โรคพยาธิในเลือด, การตรวจทางชีวโมเลกุล

Abstract

Currently, the prevalence of parasites infected dog has increased. The limitation of the parasite examination takes time-consuming and can detect a single species per a reaction. This research aimed to develop a multiplex real-time PCR HRM technique. This technique was used to simultaneously detect four blood canine parasites including *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys*. Our study was divided into four parts: (1) the primer design, (2) the specificity, (3) the sensitivity and (4) the detection of canine blood whether is infected. The results indicated that Protz6 and Bact3 primer were the appropriate primer to detect these agents because their melting temperature (Tm) value derived from two primers can clearly discriminate four parasites. The highest Tm value with 83.10°C was observed in *A. platys* followed by *B. vogeli*, *E. canis* and *H. canis* with Tm value of 82.41, 80.37 and 78.56°C, respectively. For sensitivity, it was found that *B. vogeli*, *E. canis* and *A. platys* have the limit of detection at 10^3 copies/µl while the limit of detection for *H. canis* was 10^4 copies/µl. Of the 68 dogs tested, 34 dogs were infected (50%). We found that *E. canis* showed the highest prevalence with 28 samples while *B. vogeli*, *A. platys* and *H. canis* was detected in 6, 5 and 4 samples, respectively. These results exhibited that a multiplex real-time PCR HRM technique served as the effective tool for the detection of the blood canine parasites.

Keywords; Tick-borne diseases, blood parasites, molecular detection