สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รหัสโครงการ 2554A10862014

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความชุกและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ที่ทำให้เกิดอาการแท้งในโค-กระบือ ในเขตพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชา

Prevalence and Genetic Diversity of *Trypanosoma evansi* Infections Causing Abortions among Cattles and Buffaloes in Eastern Border Area of Thailand-Cambodia

นายไพทูล แก้วหอม
คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา

178043
16 ก.ค. 2558
355595
เริ่มบริการ
2 พ.ค. 2559

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา
และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น ต้องขอกราบขอบพระคุณ รศ.น.สพ.ดร. สถาพร จิตตปาลพงศ์, Mr. Marc DESQUESNES และ ผศ.ดร.กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาจนทำให้โครงการวิจัยในครั้งนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ให้การสนับสนุนเงินงบประมาณการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ และน้องๆ ที่ร่วมในการวิจัยจนทำสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี สุดท้ายนี้ขอขอบคุณทางครอบครัวที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการดำเนินการวิจัยตลอดมา คุณประโยชน์ที่พึงได้จากโครงการวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ไพทูล แก้วหอม
ผู้วิจัย

ชื่อโครงการ ความชุกและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ที่ทำให้เกิดอาการแท้งในโค-กระบือ ในเขตพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชา

แหล่งเงินทุน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)

ประจำปีงบประมาณ 2554 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 500,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 3 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2556

หัวหน้าโครงการ นายไพทูล แก้วหอม คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

บทคัดย่อ

เชื้อ *Trypanosoma evansi* เป็นพยาธิในเลือดของโคและกระบือซึ่งเป็นอีกหนึ่งสาเหตุของการเกิดอาการแท้งในโคและกระบือ การวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความชุกและความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อ *T. evansi* ของโคและกระบือในเขตพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชาโดยใช้เทคนิคทางด้านโมเลกุลาร์ ผลการทดลองพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทป์ที่โคลนได้จากเชื้อ *T. evansi* ของโคและกระบือในเขตอำเภอที่ติดชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชาของจังหวัดสระแก้ว มีความยาวเท่ากับ 164 เบสแพร์

ความชุกของเชื้อ *T. evansi* ของโคและกระบือในเขตอำเภอ ตาพระยา โคกสูง อรัญประเทศ และคลองหาด มีค่าเท่ากับ 19.67 38.57 45.16 และ 35.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อ *T. evansi* ของโคและกระบือในแต่ละอำเภอมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการต่อกัน และชนิดของสัตว์ (โคและกระบือ) ไม่มีผลต่อความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ *T. evansi* ในพื้นที่เขตชายแดนจังหวัดสระแก้ว ซึ่งอาจเนื่องมาจากเกษตรกรผู้เลี้ยงนิยมเลี้ยงสัตว์แบบปล่อยฝูงมากกว่าเลี้ยงแบบขังคอก หรือปล่อยให้หากินตามป่า ซึ่งทำให้ยากต่อการกำจัดแมลงที่เป็นพาหะนำโรค เช่น เหลือบ แมลงวันคอก ยุง เป็นต้น และส่งผลทำให้ง่ายต่อการแพร่กระจาย (transmission) ของเชื้อชนิดนี้

คำสำคัญ: ทริพโนโซม, โค, กระบือ, ชายแดนไทย-กัมพูชา

Research Title: Prevalence and Genetic Diversity of *Trypanosoma evansi* Infections Causing Abortions among Cattles and Buffaloes in Eastern Border Area of Thailand-Cambodia

Researcher: Mr. Paitoon Kaewhom

Faculty: Agricultural Technology, Burapha University, Sa Keao Campus

ABSTRACT

Trypanosoma evansi, a protozoan blood parasite in animals, causes surra disease and easily leads to abortion in cattle and buffaloes. The objectives of this research were to investigate the prevalence and genetic diversity of *T. evansi* infections causing abortions among cattle and buffaloes in eastern border area of Thailand-Cambodia. A polymerase chain reaction method was evaluated for detection of *T. evansi* DNA in cattle and buffaloes of each border district in Sa Kaeo province using the set of primer TBR1 and TBR2. The results demonstrated that the PCR product was 164 bp in length. The overall prevalence of *T. evansi* infection in cattle and buffaloes of Ta Phraya, Khok Sung, Aranyaprathet and Khlong Hat districts in Sa Kaeo province was 19.67% (12/61), 38.57% (27/70), 45.16% (70/155) and 35.45% (25/92), respectively. The satellite DNAs (TBR primer) were analyzed and revealed that it could demonstrate the genetic diversity of *T. evansi* of cattle and buffaloes. Tree construction based on the satellite DNAs in each district of border areas confirmed the close relationship between cattle and buffalo. The results found that trypanosome minor variations might be due to livestock system, a pasture or forest grazing. These feeding are difficult to get rid of insects that are disease vectors such as tabanidae, flies, and mosquitoes as well as also easy to spread or transmission of trypanosome.

Keywords: *Trypanosoma evansi*, Cattle, Buffalo, Eastern Border Area of Thailand-Cambodia

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ I
บทคัดย่อภาษาไทย II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III
สารบัญ IV
สารบัญตาราง VI
สารบัญภาพ VII
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 1
1.2 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 4
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 5
1.4 ขอบเขตของการวิจัย 5
1.5 กรอบแนวความคิดของการวิจัย 6
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6
บทที่ 2 เนื้อเรื่อง 7
2.1 วิธีดำเนินการวิจัย 7
2.1.1 ชนิดและแหล่งที่มาของตัวอย่าง 7
2.1.2 การสกัด DNA และการเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการ (DNA extraction and PCR) 8
2.1.3 การตัดต่อเข้าสู่พาหะ (Construct to cloning vector) 9
2.2 ผลการวิจัย 10
2.2.1 ผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR 10
2.2.2 ความชุกของเชื้อ *Trypanosoma evansi* 15
2.2.3 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของเชื้อ *Trypanosoma evansi* 16
2.2.4 ความหลากหลายของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในTBR ยีน 18
บทที่ 3 อภิปราย/วิจารณ์ 23
3.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Trypanosoma evansi* ด้วยเทคนิคทางด้านโมเลกุลาร์ 23
3.2 ความชุกของเชื้อ Trypanosoma evansi ของโคและกระบือในอำเภอที่ติดชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชา ของจังหวัดสระแก้ว 23
3.3 ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโคและกระบือในอำเภอที่ติดชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชา ของจังหวัดสระแก้ว 24

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 25
4.1 สรุปผลการวิจัย 25
4.2 ข้อเสนอแนะ 25
บทที่ 5 ผลผลิต 27
รายงานสรุปการเงิน 28
บรรณานุกรม 29
ภาคผนวก 32
ประวัตินักวิจัย 36

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 แสดงจำนวนตัวอย่างที่เก็บในแต่ละอำเภอที่ติดชายแดนของจังหวัดสระแก้ว 5

2.1 ความชุกของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในโคและกระบือของแต่ละอำเภอ ในจังหวัดสระแก้ว 15

2.2 ลำดับ nucleotide ของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในโคและกระบือของแต่ละอำเภอ ในจังหวัดสระแก้ว 16

2.3 ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคและกระบือในแต่ละอำเภอ ในจังหวัดสระแก้ว 19

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1.1 เชื้อทริพพาโนโซมา อีแวนซัย (*Trypanosoma evansi*) 2

2.1 แสดงแผนที่ของ 4 อำเภอในจังหวัดสระแก้วที่ติดกับชายแดนไทย-กัมพูชา 7

2.2 ตำแหน่ง promoter และลำดับ nucleotide ตรงจุดโคลนนิ่งของเวคเตอร์ pGEM-T Easy 9

2.3 ลำดับ nucleotide ของเวคเตอร์ pGEM-T Easy ที่ใช้โคลนนิ่ง 10

2.4 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของโคอำเภอตาพระยา Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3: negative control, lane 4- lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดโคของอำเภอตาพระยาที่นำมาตรวจวินิจฉัย 11

2.5 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของกระบือของอำเภอตาพระยา Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3: negative control, lane 4- lane 16: ผลของตัวอย่างเลือดกระบือของอำเภอตาพระยาที่นำมาตรวจวินิจฉัย 11

2.6 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของโคอำเภอโคกสูง Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3: negative control, lane 4- lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดโคของอำเภอโคกสูงที่นำมาตรวจวินิจฉัย 12

2.7 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของกระบืออำเภอโคกสูง Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3: negative control, lane 4- lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดกระบือของอำเภอโคกสูงที่นำมาตรวจวินิจฉัย 12

2.8 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของโคอำเภออรัญประเทศ Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3 - lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดโคของอำเภออรัญประเทศที่นำมาตรวจวินิจฉัย 13

2.9 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของกระบืออำเภออรัญประเทศ Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3: negative control, lane 4- lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดกระบือของอำเภออรัญประเทศที่นำมาตรวจวินิจฉัย 13

2.10 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของโคอำเภอคลองหาด Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3 - lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดโคของอำเภอคลองหาดที่นำมาตรวจวินิจฉัย 14

2.11 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของกระบืออำเภอคลองหาด Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3: negative control, lane 4- lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดกระบือของอำเภอคลองหาดที่นำมาตรวจวินิจฉัย 14

2.12 ผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (164 bp) ด้วย NCBI/ BLAST/ blastn 18

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

2.13 ผลจากการทำ multiple sequence alignment ของโคและกระบือในแต่ละอำเภอในจังหวัดสระแก้ว 20

2.14 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogeny) ของ satellite DNA ของ Trypanosoma evansi (*T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอตาพระยา; TP_Cattle , *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอตาพระยา; TP_Buffalo, *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอโคกสูง; KS_Cattle, *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอโคกสูง; KS_Buffalo, *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภออรัญประเทศ; AR_Cattle, *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภออรัญประเทศ; AR_Buffalo และ *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอคลองหาด; KH_Cattle, และ *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอคลองหาด; KH_Buffalo) กับ satellite DNA ของ Trypanosoma ชนิดอื่น (*Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma congolense* และ *Trypanosoma cruzi*) โดยใช้ Maximum Parsimony method และค่าการตัดสินใจ (cutoff) ของ Bootstrap ที่ 50% (n=2000)..... 21

2.15 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogeny) ของ satellite DNA ของ *Trypanosoma evansi* (*T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอตาพระยา; TP_Cattle , *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอตาพระยา; TP_Buffalo, *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอโคกสูง; KS_Cattle, *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอโคกสูง; KS_Buffalo, *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภออรัญประเทศ; AR_Cattle, *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภออรัญประเทศ; AR_Buffalo และ *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอคลองหาด; KH_Cattle, และ *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอคลองหาด; KH_Buffalo) กับ satellite DNA ของ Trypanosoma ชนิดอื่น และ satellite DNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่เกี่ยวข้องกับ Trypanosome โดยใช้ Maximum Parsimony method และค่าการตัดสินใจ (cutoff) ของ Bootstrap ที่ 50% (n=2000) 22

บทที่ 1
บทนำ

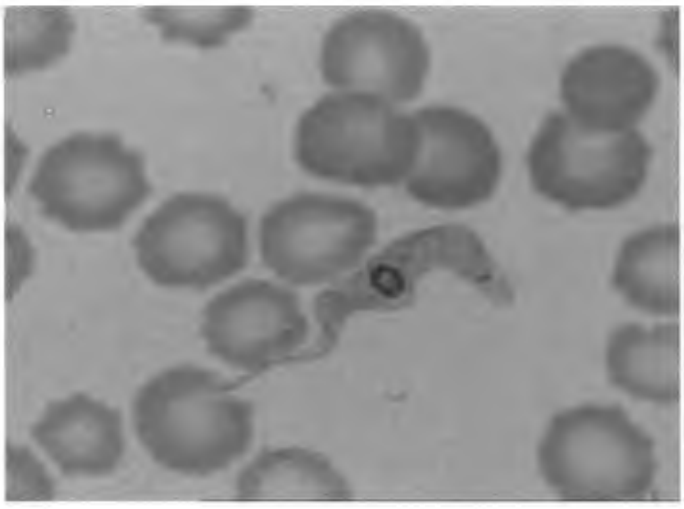
1.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.1.1 การจำแนก *Trypanosoma* spp.

Kingdom	Protista
Subkingdom	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Class	Kinetoplastida
Order	Trypanosomatida
Family	Trypanosomatidae
Genus	*Trypanosoma*
Species	*ambystomae*, *antiquus*, *avium*, *boissoni*, ***brucei***, ***cruzi***, ***congolense***, *equinum*, ***equiperdum***, ***evansi***, *everetti*, *hosei*, ***irwini***, ***lewisi***, *melophagium*, *paddae*, *parroti*, *percae*, *rangeli*, *rotatorium*, *rugosae*, *sergenti*, *simiae*, *sinipercae*, ***suis***, *theileri*, *triglae*, ***vivax***

1.1.2 โรคทริพพาโนโซโมซิส (Trypanosomosis)

สาเหตุและการติดต่อ เกิดจากเชื้อโปรโตซัว ชนิดที่พบในกระแสโลหิตของสัตว์ คือ เชื้อทริพพาโนโซมา อีแวนซัย (*Trypanosoma evansi*) ทำให้เกิดโรคทริพพาโนโซมิเอซิส (Trypanosomiasis) หรือโรคเซอร่า (Surra) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด รวมทั้งโค เชื้อนี้จะพบอยู่นอกเม็ดเลือดแดง ซึ่งลักษณะเป็นโปรโตซัวที่มีรูปร่างยาวเรียว ขนาดยาวประมาณ 24 ไมครอน ด้านหน้ามีแส้ (flagellum) 1 เส้น (ภาพที่ 2.1) การติดโรคมีแมลงดูดเลือด ได้แก่ เหลือบ แมลงวันคอก หรือยุง เป็นพาหะ และจะปล่อยเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตโดยเป็นการติดเชื้อแบบกลไก (Mechanical transmission) (วีรพล, 2547)



ภาพที่ 1.1 เชื้อทริพพาโนโซมา อีแวนซัย (*Trypanosoma evansi*)
ที่มา : วีรพล (2547)

อาการทางคลินิก โคเป็นโฮสต์ที่ค่อนข้างทนทาน แต่ความเสียหายมักเกี่ยวข้องกับทางด้านเศรษฐกิจ โดยโคมักจะแท้งในช่วงท้ายๆ ของการตั้งท้อง อาการทั่วไปที่พบ ได้แก่มีไข้ขึ้นๆ ลงๆ เบื่ออาหาร ผอมโซ บวมน้ำ โดยเฉพาะบริเวณส่วนล่างของร่างกาย เช่น คาง คอ หรือท้อง โลหิตจาง อาจพบอาการดีซ่านด้วย (วีรพล, 2547) สำหรับโคนมไม่ค่อยแสดงอาการให้เห็นเด่นชัด นอกจากซีดและผอม แต่ในรายที่เป็นรุนแรงจะมีไข้ ตาอักเสบหรือขุ่น ขาแข็ง หลังแข็ง คอบิด โลหิตจาง อาจตายอย่างเฉียบพลันได้ ในโคท้องจะแท้งลูกในช่วงตั้งแต่ 4 เดือนขึ้นไป หรืออาจคลอดก่อนกำหนด น้ำหนักลูกแรกคลอดต่ำ รกค้างในโครีดนมน้ำนมลด ส่วนในโคท้องว่างจะไม่แสดงอาการเป็นสัดและอาจมีอาการทางประสาท เช่น เดิน ตื่นตระหนก กระโดด ดุร้าย ซึม เป็นอัมพาต (ทัศนีย์ และคณะ, 2539)

การตรวจวินิจฉัย

1. ตรวจเลือดสด เจาะเลือดใส่สารกันเลือดแข็งตัว หยดเลือดบนสไลด์ ปิดด้วยคอพเวอร์กล๊าส ตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. นำเลือดสัตว์ที่สงสัยเป็นโรค ทำฟิล์มเลือดบางๆ บนสไลด์ (fresh smear) ย้อมด้วยสียิมซ่า ตรวจดูเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. วิธี Haematocrit capillary tube technique หรือ Woo's technique

4. การตรวจทางซีรัมวิทยา เช่น Latex agglutination technique และ indirect fluorescent antibody technique (IFAT) เป็นต้น

5. นำเลือดสัตว์มาฉีดเข้าช่องท้องหนูไมซ์ หลังจากนั้น 3-5 วัน ตัดหางหนู หยดเลือดบนสไลด์ ปิดด้วย clover grass ตรวจดูเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

6. นำเลือดสัตว์ที่สงสัยเป็นโรค มาตรวจด้วยเทคนิคทางด้านโมเลกุลาร์

การรักษา มียาหลายชนิดที่ใช้รักษาแล้วได้ผลดี และที่มีจำหน่ายในประเทศ คือ Diminazine aceturate (Berenil®) ใชขนาด 3.5-7 มิลลิกรัม /น้ำหนักตัวสัตว์ 1 กิโลกรัม มีทั้งที่เป็นเม็ดแกรนูลในซอง ต้องผสมน้ำกลั่น และเป็นของเหลวบรรจุขวด พร้อมฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

การควบคุมและป้องกัน การควบคุมค่อนข้างยาก เนื่องจากแมลงดูดเลือดที่มีอยู่ทั่วไปในประเทศ โดยเฉพาะเหลือบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Tabanus* spp. *Chrysops* spp. และ *Haematopota* spp. รวมทั้ง แมลงวันคอกด้วย ซึ่งเป็นพาหะที่สำคัญ อย่างไรก็ดี ในช่วงที่มีการระบาดของโรคมาก โดยเฉพาะในหน้าฝน ควรมีการฉีดพ่นยาฆ่าแมลงบนตัวสัตว์หรือตามแหล่งแพร่พันธุ์ของแมลงดูดเลือด หรือ อีกวิธีหนึ่งคือฉีดยาซาโมริน (Samorin®) ให้โคเพื่อป้องกันก่อนถึงฤดูฝนและเมื่อหมดฤดูฝน ในขนาด 0.5-1.0 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวสัตว์ 1 กิโลกรัม สามารถป้องกันโรคได้นาน 3-4 เดือน (วีรพล, 2547)

1.1.3 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

โรคสัตว์สู่คน (zoonoses) มีบทบาทสำคัญต่อคนและสัตว์เป็นอย่างยิ่ง ตัวอย่างโรคที่สำคัญที่เกิดจากโปรโตซัว (Protozoa) ได้แก่ โรค Trypanosomosis หรือโรคเซอร่า (surra) ซึ่งเกิดจากเชื้อ Trypanosoma spp. (Webster and MacDonald, 1995). ในประเทศไทยพบว่าเชื้อ *Trypanosoma evansi* มีความสำคัญทางเศรษฐกิจซึ่งพบในสัตว์หลายชนิด เช่น ม้า โค กระบือ สุกร สุนัขสำหรับม้าและสุนัขทำอันตรายรุนแรงถึงตาย มักระบาดในช่วงฤดูฝนจนถึงปลายฤดูหนาว (ระหว่างเดือนกันยายนถึงกุมภาพันธ์) ซึ่งสามารถติดต่อได้โดยมีแมลงดูดเลือด เช่น เหลือบ แมลงวันคอก หรือยุง เป็นพาหะนำโรค โดยอาการในม้ามักเป็นแบบเฉียบพลัน แต่ในบางภูมิภาคอาจเป็นแบบเรื้อรังได้ อาการที่มักพบคือ สัตว์จะมีไข้สูง ผอมแห้ง บวมน้ำบริเวณคอ สวาบ หน้าอก หรือขา ในตัวผู้มักพบหนังหุ้มอวัยวะสืบพันธุ์และอัณฑะบวม หรืออาจพบวงผื่นลมพิษเล็กๆ ตามลำตัว ซึ่งอาจจะเป็นๆ หายๆ ตลอดเวลาของการเป็นโรค สัตว์จะมีไข้สูงเป็นระยะๆ โลหิตจาง สัตว์อ่อนเพลียมาก เบื่ออาหาร อาจมีเยื่อตาขาวอักเสบและขนร่วง หลังจากเริ่มแสดงอาการของโรค กล้ามเนื้ออ่อนแอ ไม่อยากเดิน อาการไข้จะผันแปรตามจำนวนปรสิตในเลือด ระยะท้ายของการเป็นโรคจะมีตาอักเสบแบบมีหนอง ม้าเมื่อเป็นโรคนี้ถ้าไม่รักษา อาจตายภายใน 1 สัปดาห์ถึง 6 เดือน การควบคุมโรคนี้ค่อนข้างยาก (ปัจฉิมา, 2551) ส่วนอาการในโคมักแสดงอาการไข้สูง เบื่ออาหาร กล้ามเนื้อสั่น เดินขาแข็ง ไม่มีแรงหรือเป็นอัมพาต บางตัวมีอาการทางประสาท เช่น เดินวน เป็นต้น สำหรับในกระบือแสดงอาการไข้สูง หายใจดัง เดินลำบาก หลังและขาแข็ง คอบิด นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อ *T. evansi* เป็นสาเหตุที่ทำให้สัตว์เกิดการแท้งลูกระยะท้ายของการตั้งท้อง (6-7 เดือน) ลูกคลอดตายหรือทำให้ลูกอ่อนแออีกด้วย (สุวิทย์และคณะ, 2549)

เชื้อ Trypanosoma spp.ในประเทศไทยพบรายงานในสัตว์ส่วนใหญ่ ได้แก่ *Trypanosoma evansi* ในสัตว์เลี้ยง เช่น ม้า (Boonyawong et al., 1975) ควาย (Matthias and Muangyai, 1980) โคเนื้อ (Chaichanapunpol et al., 1985; Tuntasuvan et al., 1997) โคนม (Trisanarom et al.,

1987) ช้าง (Rodtian et al., 2004) กวาง (Indrakamhang et al., 1996; Tuntasuvan et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ Trypanosoma lewisi ในหนู rat ที่จังหวัดเชียงใหม่ (Natheewattana et al.,1978) และ *Trypanosoma melophagium* จาก nasal swab ของแกะนำเข้าจากประเทศอินเดีย (สาธิตและคณะ, 2532) นอกจากนี้ยังพบว่า มีการติดเชื้อ Trypanosome ในคน พบบ่อยในแถบอัฟริกา ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Trypanosoma gambiense* ทำให้เกิดโรคเหงาหลับ (sleeping sickness) จะมี tsetse fly เป็นพาหะนำโรคเท่านั้นและในอเมริกาใต้ จากเชื้อ *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) โดยมีมวน kissing bug เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ (WHO, 2010) ในประเทศแถบเอเชียเคยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *T. evansi* ในชายอินเดียวัย 40 ปี (Joshi et al., 2005) สำหรับประเทศไทยได้พบเชื้อ Trypanosome ในเด็กทารกเพศชายอายุ 45 วันและถือว่าเป็นรายงานแรกในประเทศไทย (เทียมจันทร์และคณะ, 2548) อีกด้วย ดังนั้นถือได้ว่าโรคนี้เป็นโรคที่สำคัญนอกจากก่อให้เกิดการสูญเสียในทำปศุสัตว์แล้ว ยังเป็นโรคที่สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนได้

1.2 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อ *Trypanosoma evansi* เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรค Trypanosomosis หรือ surra ซึ่งเชื้อดังกล่าวเป็นโปรโตซัว (protozoa) ที่เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว มีรูปร่างแตกต่างกัน โดยบางชนิดมีรูปร่างกลม บางชนิดรูปร่างรี บางชนิดเป็นแท่งหรือบางชนิดมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน นอกจากนี้โปรโตซัวยังมีขนาดแตกต่างกันมากตั้งแต่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าจนกระทั่งไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า โปรโตซัวบางชนิดสามารถดำรงชีวิตแบบอิสระ (free living) โดยสร้างอาหารเองได้หรือโดยกินสารอินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และมีโปรโตซัวอีกจำนวนหนึ่งที่ต้องอาศัยอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ หรือดำรงชีวิตเป็นปรสิต (parasite) อาจเป็นปรสิตของพืช แมลง หรือสัตว์ และที่สำคัญมีอยู่หลายชนิดที่เป็นปรสิตของคนและเป็นสาเหตุของโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์อีกด้วย (เบญจมาส, 2553) ซึ่งเชื้อ *T. evansi* เป็นปรสิตทั้งในคนและในสัตว์ ตัวอย่างเช่น เป็นปรสิตในโค ซึ่งจะทำให้โคแสดงอาการไข้สูง เบื่ออาหาร กล้ามเนื้อสั่น เดินขาแข็ง ไม่มีแรงหรือเป็นอัมพาต บางตัวมีอาการทางประสาท เช่น เดินวน เป็นต้น สำหรับในกระบือแสดงอาการไข้สูง หายใจดัง เดินลำบาก หลังและขาแข็ง คอบิด นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อ *T. evansi* นี้ยังเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้สัตว์เกิดการแท้งลูกระยะท้ายของการตั้งท้อง (6-7 เดือน) ลูกคลอดตายหรือทำให้ลูกอ่อนแออีกด้วย โดยการแพร่กระจายของเชื้อดังกล่าวมีแมลงดูดเลือด เช่น เหลือบ แมลงวันคอก เป็นพาหะนำโรคและมักระบาดในช่วงฤดูฝนจนถึงปลายฤดูหนาว

พื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชา ซึ่งครอบคลุมจังหวัดสระแก้ว จันทบุรีและตราด ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพทางด้านการค้าชายแดน การผลิตพืชและการทำปศุสัตว์เป็นหลัก สำหรับการทำปศุสัตว์ที่สำคัญ คือ การเลี้ยงโคนม โคเนื้อและกระบือ โดยระบบการเลี้ยงสัตว์ส่วนใหญ่ยังเป็นระบบการเลี้ยงเปิด การจัดการและการดูแลสัตว์ยังไม่เป็นระบบเท่าที่ควร เกษตรกรยังให้ความสำคัญในการตรวจโรค การทำวัคซีน การปล่อยสัตว์รวมฝูง รวมถึงการควบคุมและการกำจัดแมลงที่เป็นพาหะนำโรคน้อย ซึ่งการเลี้ยงสัตว์ลักษณะนี้ นอกจากจะทำให้ผลผลิตของ

สัตว์ลดลงแล้ว ยังมักเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคอีกด้วย รวมทั้งข้อมูลเชิงวิชาการด้านโรคติดต่อในพื้นที่มีการศึกษาวิจัยไม่มากนัก นอกจากนี้ถ้าพื้นที่ชนบทที่เป็นเขตพื้นที่ชายแดนด้วยแล้ว อาจเป็นปัจจัยที่เอื้อให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคระหว่างสองประเทศได้ง่าย ทั้งที่เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่สัตว์หรือจากสัตว์สู่คน (zoonoses) และก่อเกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจของทั้งสองประเทศ ดังนั้นการสำรวจความชุกและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *T. evansi* ของโค-กระบือในเขตพื้นที่ชายแดนดังกล่าวจึงมีบทบาทสำคัญทั้งประเทศไทยและกัมพูชา โดยเฉพาะเป็นการให้ข้อมูลเชิงวิชาการที่เป็นประโยชน์ต่อคนในพื้นที่เกี่ยวกับโรคติดต่อจากสัตว์สู่สัตว์และสัตว์สู่คนที่มีแมลงเป็นพาหะนำโรคซึ่งยังไม่ได้รับการกระตุ้นและให้ความสำคัญมากนัก รวมไปถึงเป็นการเผยแพร่องค์ความรู้หรือข้อมูลแก่หน่วยงานอื่นๆที่เกี่ยวข้องอีกด้วย

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสำรวจความชุกของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโค-กระบือในเขตพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชาโดยใช้เทคนิคทางด้านโมเลกุลาร์

2. เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโค-กระบือในเขตพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชา

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ประเมินความชุกของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโค-กระบือในพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทยและกัมพูชา ครอบคลุมใน 4 อำเภอในจังหวัดสระแก้ว ซึ่งจะเก็บตัวอย่าง ชุมชนที่อยู่ติดชายแดน ดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 แสดงจำนวนตัวอย่างที่เก็บในแต่ละอำเภอที่ติดชายแดนของจังหวัดสระแก้ว

พื้นที่ที่ติดชายแดนประเทศกัมพูชา	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ (ตัวอย่าง)		รวม
	โค	กระบือ	
จังหวัดสระแก้ว			
- อ. ตาพระยา	43	18	61
- อ. โคกสูง	48	22	70
- อ. อรัญประเทศ	111	44	155
- อ. คลองหาด	79	13	92
รวมทั้งหมด	281	97	378

1.3.2 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโค-กระบือในพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทยและกัมพูชา ที่ให้ผลบวก (Positive) จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

เนื่องจากในเขตจังหวัดจันทบุรีและจังหวัดตราดไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้เพราะมีการทำอาชีพปศุสัตว์น้อยมากหรือบางอำเภอไม่มีเลย ดังนั้นตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้จึงเป็นตัวอย่างจาก 4 อำเภอที่ติดกับชายแดนไทย-กัมพูชา ของจังหวัดสระแก้วทั้งหมด

1.5 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

ระบบการเลี้ยงสัตว์ในเขตชนบทส่วนใหญ่ยังเป็นระบบการเลี้ยงเปิด การจัดการและการดูแลสัตว์ยังไม่เป็นระบบเท่าที่ควร เกษตรกรยังให้ความสำคัญในการตรวจโรค การทำวัคซีน การปล่อยสัตว์รวมฝูง รวมถึงการควบคุมและการกำจัดแมลงที่เป็นพาหะนำโรคน้อย ซึ่งการเลี้ยงสัตว์ลักษณะนี้นอกจากจะทำให้ผลผลิตของสัตว์ลดลงแล้ว ยังมักเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคอีกด้วย รวมทั้งข้อมูลเชิงวิชาการด้านโรคติดต่อในพื้นที่ชนบทมีการศึกษาวิจัยไม่มากนัก นอกจากนี้ถ้าพื้นที่ชนบทที่เป็นเขตพื้นที่ชายแดนด้วยแล้ว อาจเป็นปัจจัยที่เอื้อให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคระหว่างสองประเทศได้ง่าย ทั้งที่เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่สัตว์หรือจากสัตว์สู่คน (zoonoses) และก่อเกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจของทั้งสองประเทศ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อสำรวจความชุกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในโค-กระบือในเขตพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชา ครอบคลุมใน 3 จังหวัดภาคตะวันออกของประเทศไทยคือ สระแก้ว จันทบุรีและตราด ซึ่งประกอบไปด้วย 4 อำเภอในจังหวัด โดยใช้เทคนิคด้านโมเลกุลาร์ และเพื่อเผยแพร่ข้อมูลเชิงวิชาการที่เป็นประโยชน์ต่อคนในพื้นที่และหน่วยงานอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทำให้ทราบถึงความชุกและความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโปรโตซัว *Trypanosoma evansi* ของโค-กระบือในพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทยและกัมพูชา

1.6.2 หน่วยงานของรัฐบาลหรือเอกชนสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปพัฒนาต่อยอดในการผลิตชุดตรวจสอบเชื้อ และการผลิตวัคซีนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ

1.6.3 หน่วยงานที่เกี่ยวข้องสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปใช้เป็นข้อมูลในกำหนดแนวทางและนโยบายในการป้องกันและการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคติดต่อจากสัตว์สู่สัตว์และจากสัตว์สู่คน

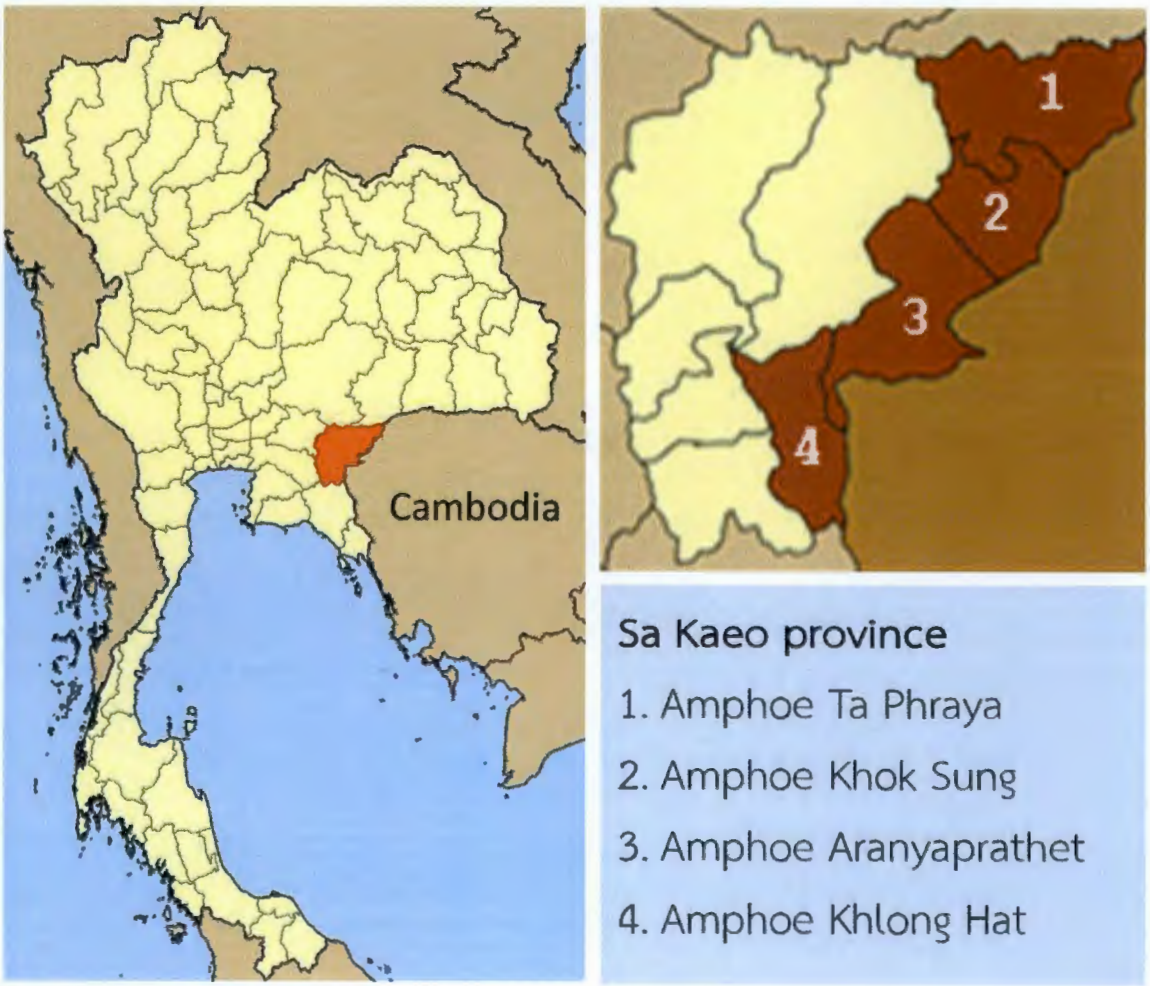
1.6.4 องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยเกิดประโยชน์และได้รับความสนใจจากกลุ่มเป้าหมายโดยการจัดสัมมนาย่อยเพื่อการเผยแพร่งานวิจัย

บทที่ 2
เนื้อเรื่อง

2.1 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1.1 ชนิดและแหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดของโคและกระบือที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทยและกัมพูชา ครอบคลุม 4 อำเภอในจังหวัดสระแก้วที่ติดกับชายแดน (ภาพที่ 3.1) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1.1 ของขอบเขตการวิจัย ซึ่งตัวอย่างเลือดจะถูกเก็บใส่หลอดที่มี EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาสกัด DNA



ภาพที่ 2.1 แสดงแผนที่ของ 4 อำเภอในจังหวัดสระแก้วที่ติดกับชายแดนไทย-กัมพูชา

2.1.2 การสกัด DNA และการเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการ (DNA extraction and PCR)

ตัวอย่างเลือด ที่เก็บไว้จะถูกนำมาสกัด DNA ด้วยวิธี acid phenol extraction method จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการด้วย TBR primers ที่มีความจำเพาะต่อยีนของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ที่เป็นสาเหตุของโรค Trypanosomiasisโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยมีส่วนผสม (PCR mixture) และ PCR condition ดังต่อไปนี้

PCR reaction (TBR primer)

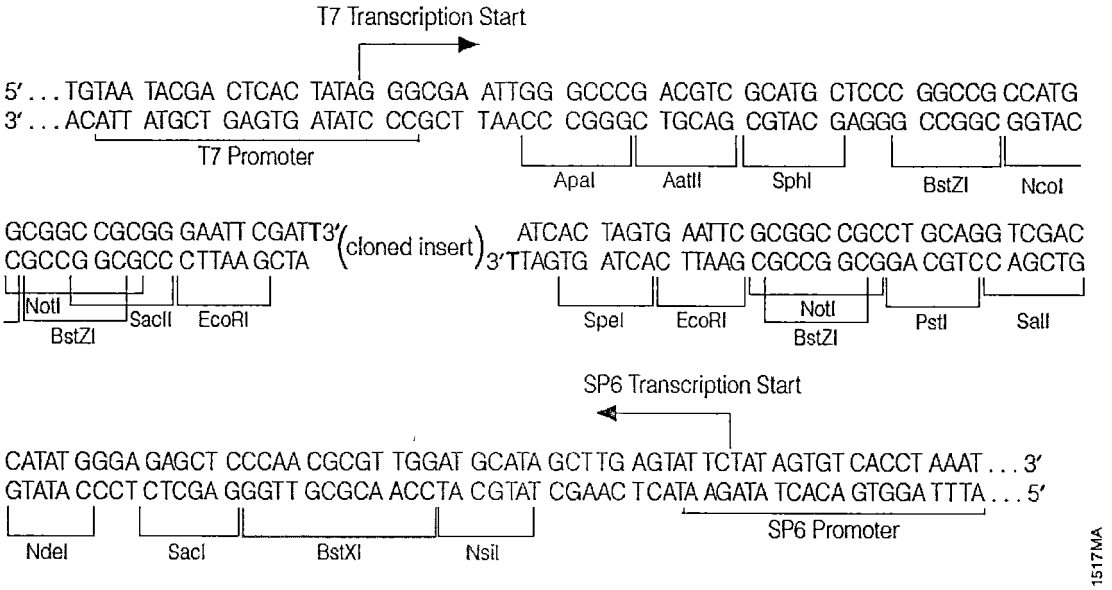
	10X	
10X buffer	10	µl
50mM $Mgcl_2$	3	µl
10mM dNTP	2	µl
10µM F-primer (TBR)	10	µl
10µM R-primer (TBR)	10	µl
DNA template (50 ng/µl)	10	µl
5u Tag *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Germany)	0.8	µl
dH_2O	54.2	µl
Total	100	µl

PCR condition (TBR primer)

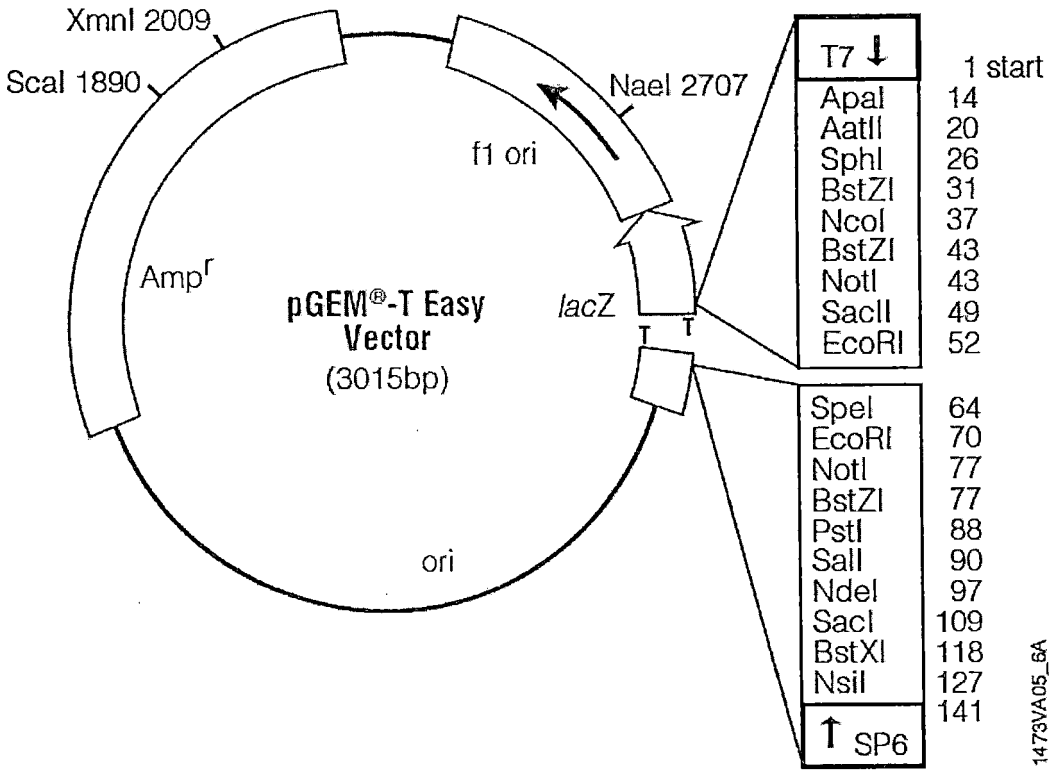
Initial denaturation	94°C	1 min	
Denaturation	94°C	30 S	30 cycles
Annealing	60°C	30 S	
Extension	72°C	30 S	
Terminal extension	72°C	2 min	

2.1.3 การตัดต่อเข้าสู่พาหะ (Construct to cloning vector)

เมื่อได้ตัวอย่างที่ให้ผลบวก (Positive) แล้วนั้น ขั้นตอนถัดไปจะทำการเพิ่มจำนวนยีนของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค และจะเชื่อมต่อเข้ากับพาหะที่เป็นพลาสมิด (pGEMT easy cloning vector) ดังภาพที่ 3.2 และ 3.3 นำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วน DNA ของยีนของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคย้าย (transform) เข้าสู่ DH5α competent cells ซึ่งก็คือ *E.coli* โดยใช้ amplicilin เป็นตัวคัดเลือก และเพิ่มปริมาณ *E. coli* ที่มี DNA ของยีนของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค จากนั้นทำการถอดรหัสพันธุกรรมของเส้น nucleotide ที่ต้องการเปรียบเทียบกับที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ Genbank เพื่อยืนยันและวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้โปรแกรม Mega 3 และประเมินความชุกของเชื้อ *Trypanosoma* spp.จากผลการทำ PCR



ภาพที่ 2.2 ตำแหน่ง promoter และลำดับ nucleotide ตรงจุดโคลนนิ่งของเวคเตอร์ pGEM-T Easy ที่มา : Promega, 2013



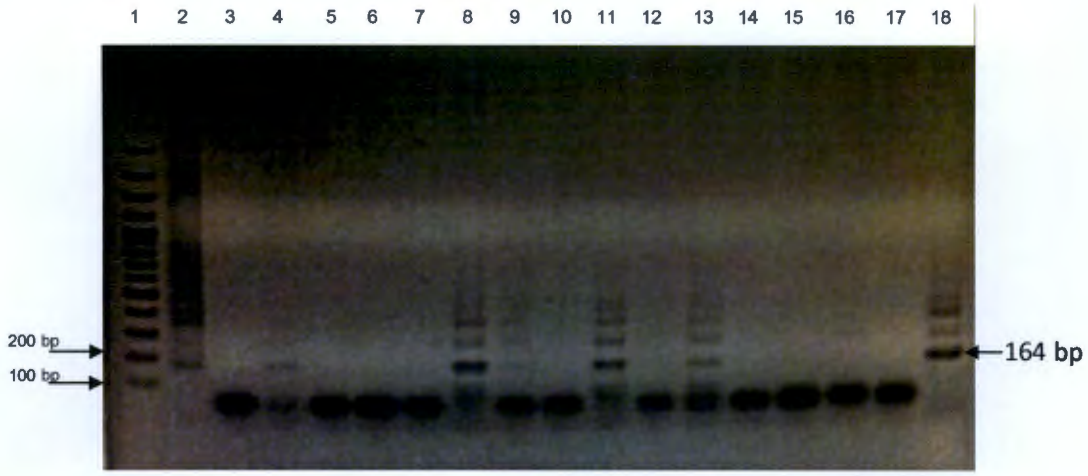
ภาพที่ 2.3 ลำดับ nucleotide ของเวคเตอร์ pGEM-T Easy ที่ใช้โคลนนิ่ง

ที่มา : Promega, 2013

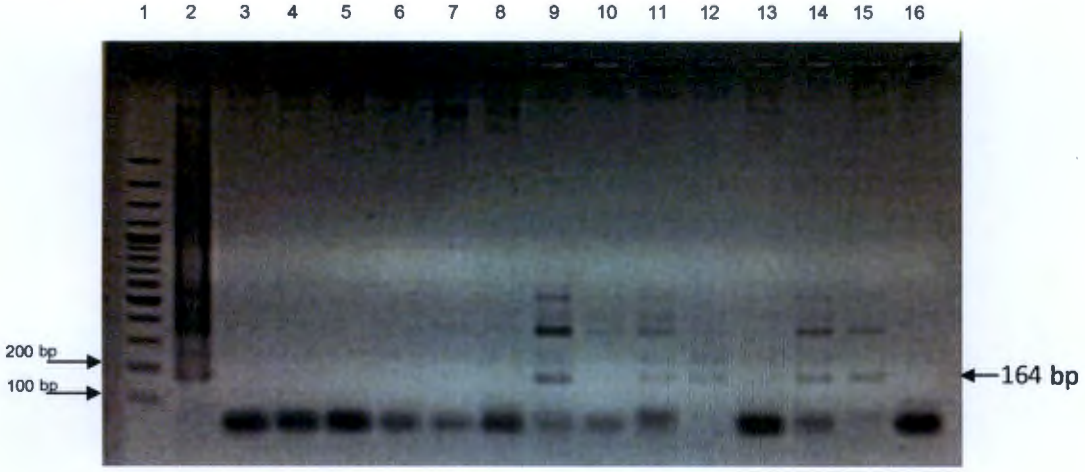
2.2 ผลการวิจัย

2.2.1 ผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR

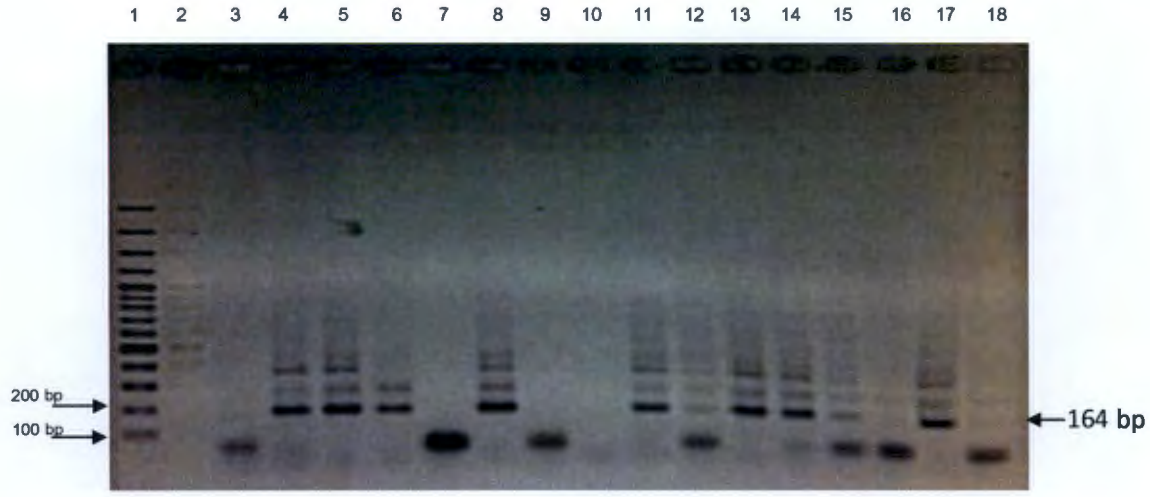
ผลจากการนำตัวอย่างเลือด ที่เก็บแต่ละอำเภอที่ติดชายแดนในจังหวัดสระแก้ว โดยนำมาสกัด DNA ด้วยวิธี acid phenol extraction method จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการด้วย TBR primers ที่มีความจำเพาะต่อยีนของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ที่เป็นสาเหตุของโรค Trypanosomiasisโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยมีส่วนผสม (PCR mixture) และ PCR condition ดังแสดงดังกล่าวข้างต้น จากนั้นนำมาโหลดเพื่อเช็คด้วย 1% agarose gel ซึ่งขนาดความยาวของ PCR product ประมาณ 164 เบสแพร์ สำหรับตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของโคและกระบือจากอำเภอตาพระยาให้ผลดังภาพที่ 2.4 และภาพที่ 2.5 ตามลำดับ ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของโคและกระบืออำเภอโคกสูงให้ผลดังภาพที่ 2.6 และภาพที่ 2.7 ตามลำดับ ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของโคและกระบืออำเภออรัญประเทศให้ผลดังภาพที่ 2.8 และภาพที่ 2.9 ตามลำดับ และตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของโคและกระบืออำเภอคลองหาดให้ผลดังภาพที่ 2.10 และภาพที่ 2.11 ตามลำดับ



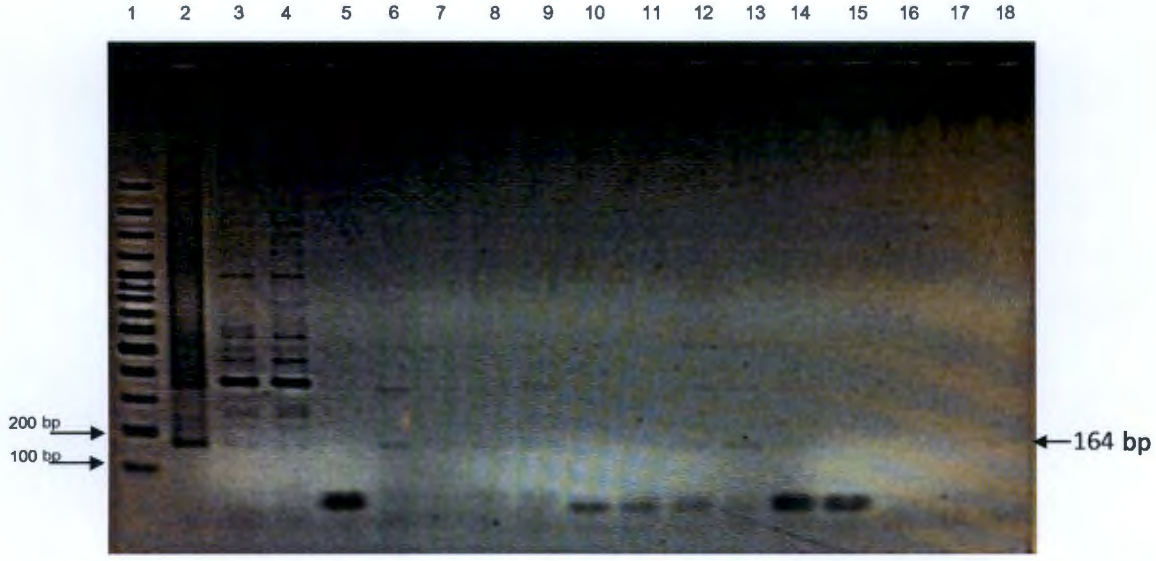
ภาพที่ 2.4 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของโคอำเภอตาพระยา Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3: negative control, lane 4- lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดโคของอำเภอตาพระยาที่นำมาตรวจวินิจฉัย



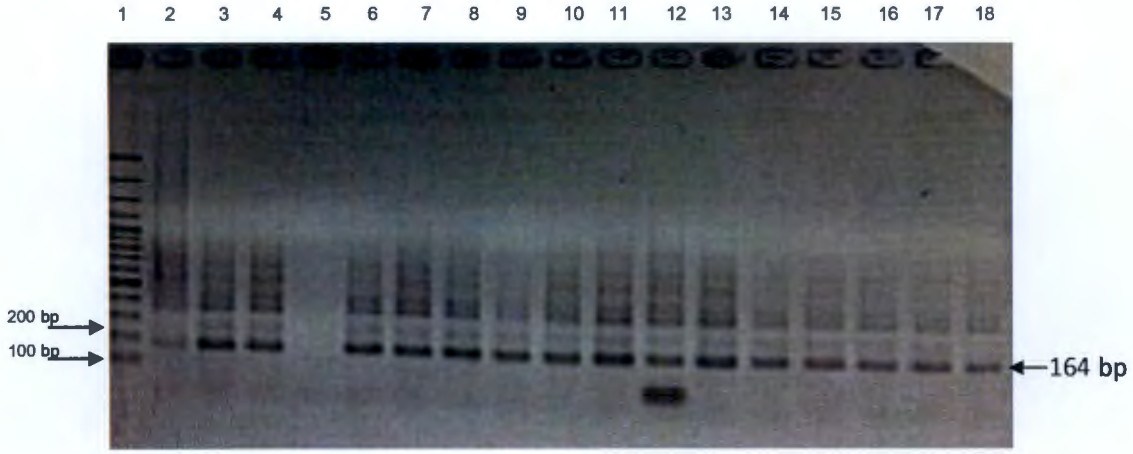
ภาพที่ 2.5 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของกระบือำเภอตาพระยา Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3: negative control, lane 4- lane 16: ผลของตัวอย่างเลือดกระบือของอำเภอตาพระยาที่นำมาตรวจวินิจฉัย



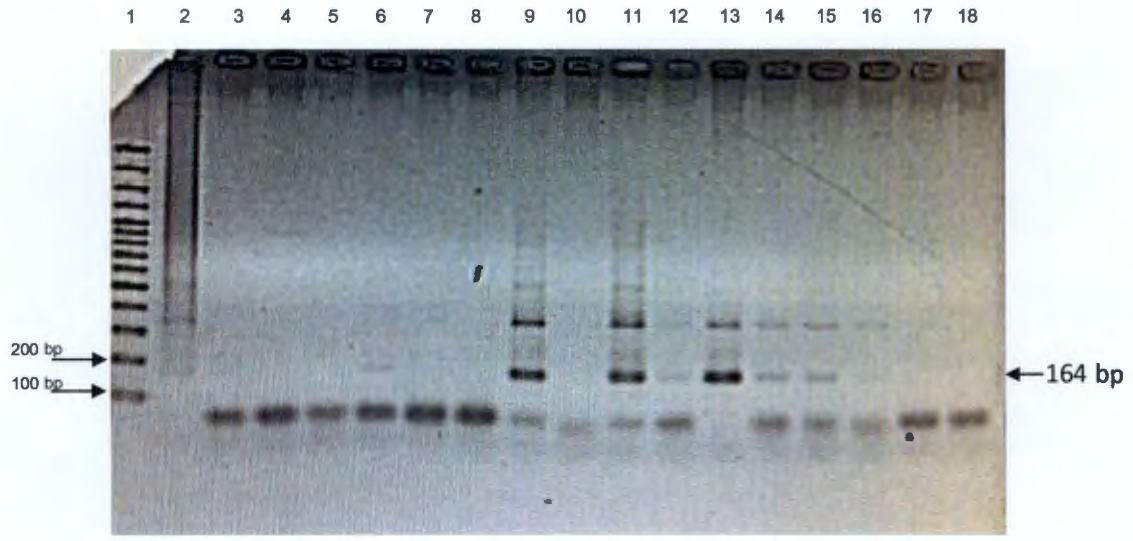
ภาพที่ 2.6 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของโคอำเภอโคกสูง Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3: negative control, lane 4- lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดโคของอำเภอโคกสูงที่นำมาตรวจวินิจฉัย



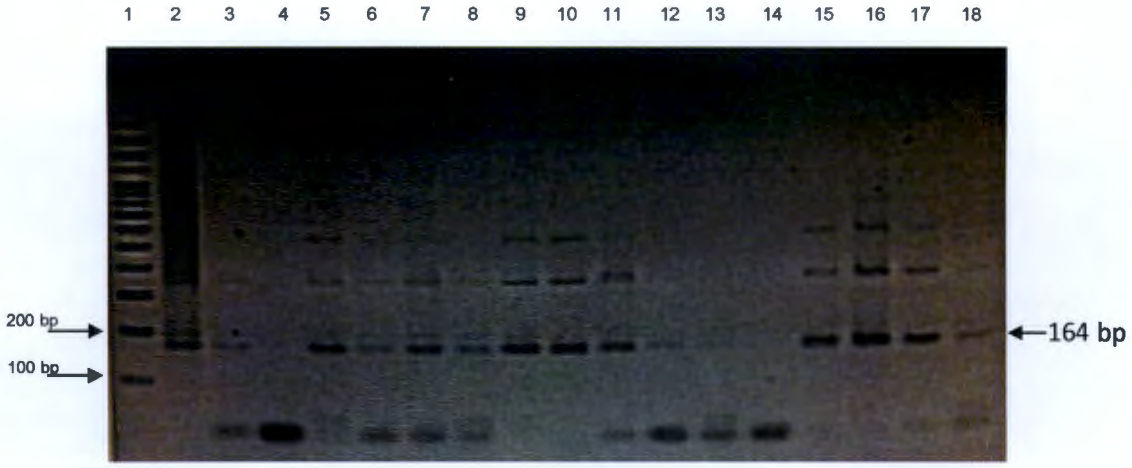
ภาพที่ 2.7 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของกระบืออำเภอโคกสูง Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3: negative control, lane 4- lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดกระบือของอำเภอโคกสูงที่นำมาตรวจวินิจฉัย



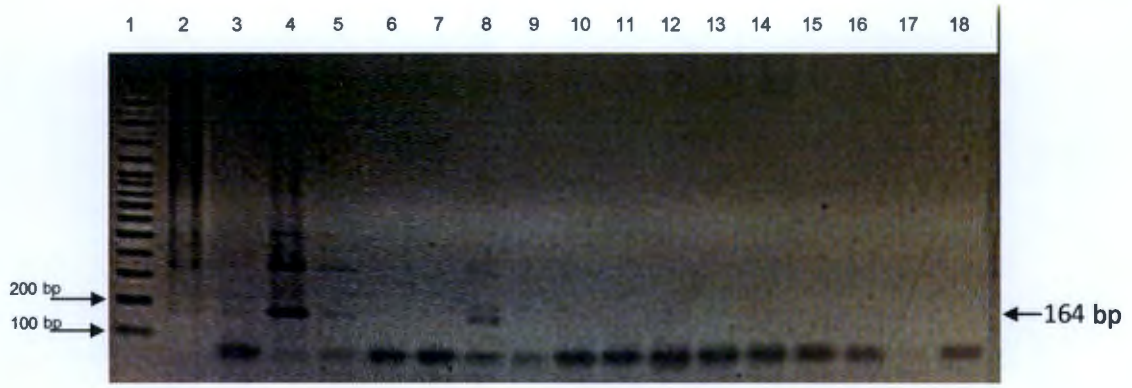
ภาพที่ 2.8 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของโคอำเภออรัญประเทศ Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3 - lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดโคของอำเภออรัญประเทศที่นำมาตรวจวินิจฉัย



ภาพที่ 2.9 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของกระบืออำเภออรัญประเทศ Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3: negative control, lane 4- lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดกระบือของอำเภออรัญประเทศที่นำมาตรวจวินิจฉัย



ภาพที่ 2.10 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของโคอำเภอคลองหาด Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3 - lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดโคของอำเภอคลองหาดที่นำมาตรวจวินิจฉัย



ภาพที่ 2.11 ตัวอย่างผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ของกระบืออำเภอคลองหาด Lane 1: DNA marker, lane 2: Positive control, lane 3: negative control, lane 4- lane 18: ผลของตัวอย่างเลือดกระบือของอำเภอคลองหาดที่นำมาตรวจวินิจฉัย

2.2.2 ความชุกของเชื้อ *Trypanosoma evansi*

จากการนำตัวอย่างเลือด ที่เก็บแต่ละอำเภอที่ติดชายแดนในจังหวัดสระแก้ว โดยนำมาสกัด DNA จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการด้วย TBR primers ที่มีความจำเพาะต่อยีนของเชื้อ *Trypanosoma evansi* โดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยมีส่วนผสม (PCR mixture) และ PCR condition ดังแสดงกล่าวข้างต้น จากนั้นนำมาโหลดเพื่อเช็คด้วย 1% agarose gel ซึ่งถ้าหากตัวอย่างที่มีเชื้อ *T. evansi* จะปรากฏแบนด์ ที่มีขนาดความยาวของ PCR product ประมาณ 164 เบสแพร์ และตัวอย่างที่ไม่ปรากฏแบนด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวแสดงว่าไม่มีเชื้อ *T. evansi* ในเลือดสัตว์ ซึ่งผลจากการตรวจวินิจฉัยสามารถนำมาคำนวณหาความชุกของเชื้อ *T. evansi* พบว่า ความชุกของเชื้อ *T. evansi* ในโค-กระบือของอำเภอตาพระยา โคกสูง อรัญประเทศ และคลองหาด คือ 19.67 38.57 45.16 และ 27.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ความชุกของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในโคและกระบือของแต่ละอำเภอในจังหวัดสระแก้ว

อำเภอ/ชนิดของสัตว์	จำนวนตัวอย่าง	ผล TBR primer (positive)	%ความชุก
1. ตาพระยา			
โค	43	9	20.93
กระบือ	18	3	16.67
รวม	61	12	**19.67**
2. โคกสูง			
โค	48	20	41.67
กระบือ	22	7	31.82
รวม	70	27	**38.57**
3. อรัญประเทศ			
โค	111	52	46.85
กระบือ	44	18	40.91
รวม	155	70	**45.16**
4. คลองหาด			
โค	79	22	27.85
กระบือ	13	3	23.08
รวม	92	25	**27.17**
รวมทั้งหมด	**378**	**134**	**35.45**

2.2.3 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของเชื้อ *Trypanosoma evansi*

เมื่อได้ตัวอย่างที่ให้ผลบวก (Positive) จากการตรวจด้วยเทคนิค PCR แล้วนั้น ขั้นตอนถัดไปคือเพิ่มจำนวนยีนของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค และจะเชื่อมต่อเข้ากับพาหะที่เป็นพลาสมิด (pGEMT easy cloning vector) และนำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วน DNA ของยีน (recombinant plasmids) ของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ย้าย (transform) เข้าสู่ *E.coli* สเตรน DH5α competent cells ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที โดยใช้ amplicilin เป็นตัวคัดเลือก และเพิ่มปริมาณ *E. coli* ที่มี DNA ของยีนของเชื้อ *T. evansi* จากนั้นทำการสกัด recombinant plasmids และวัดความเข้มข้นเพื่อนำไปหาลำดับ nucleotide ซึ่งผลของการหาลำดับ nucleotide โดยใช้ TBR เป็นไพรเมอร์ แสดงในตารางที่ 2.2

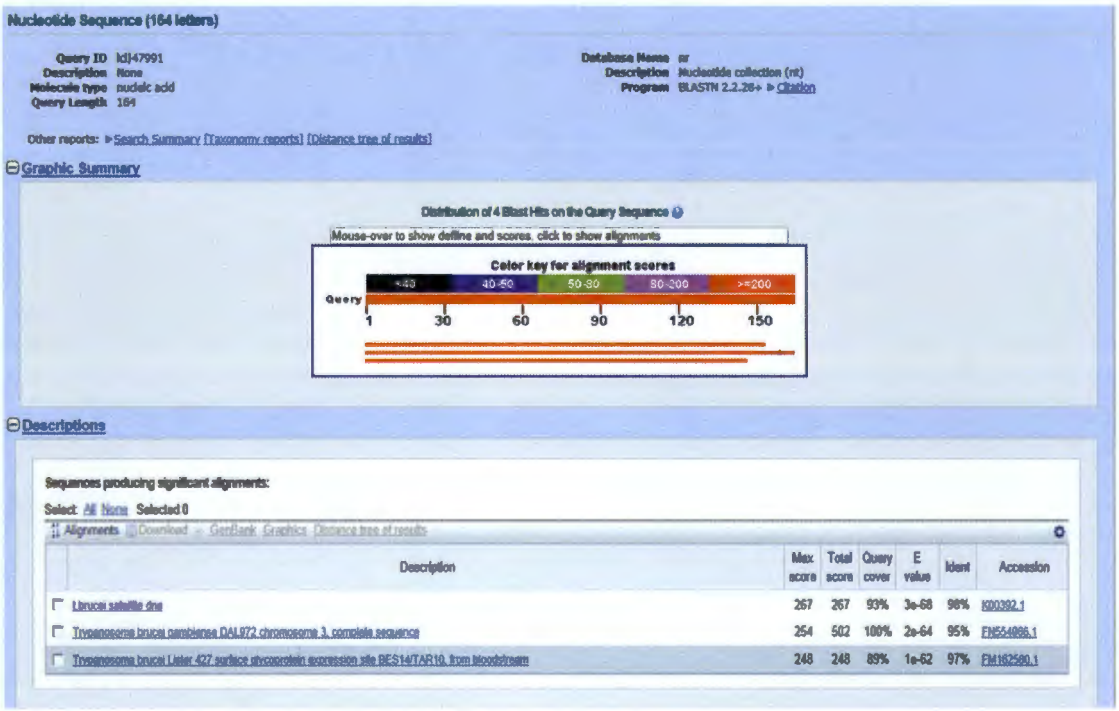
ตารางที่ 2.2 ลำดับ nucleotide ของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในโคและกระบือของแต่ละอำเภอในจังหวัดสระแก้ว

อำเภอ/ชนิดของสัตว์	**ลำดับ nucleotide โดยใช้ TBR เป็นไพรเมอร์**
1. ตาพระยา	
โค TP_Cattle	GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAAT GTGTGCCATATTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACA TTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGTTCTTTAGTGTTTAATGTGTGCAACA AAGCTAATAAATGG
กระบือ TP_Buffalo	GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAAT GTGTGCCATATTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAAC GTTAATTTGCAAGTTTGCCACAATGTTCTTTAGTGTTTAATTGGTGCAAC AAAGCTAATAAATGG
2. โคกสูง	
โค KS_Cattle	GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAAT GTGTGCCATATTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACA TTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGTTCTTTAGTGTTTAATGTGTGCAACA AAGCTAATAAATGG
กระบือ KS_Buffalo	GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAAT GTGTGCCATATTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAAC GTTAATTTGCAAGTTTGCCACAATGTTCTTTAGTGTTTAATTGGTGCAAC AAAGCTAATAAATGG
3. อรัญประเทศ	
โค	GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAAT

อำเภอ/ชนิดของสัตว์	ลำดับ nucleotide โดยใช้ TBR เป็นไพรเมอร์
AR_Cattle	GTGCGCCATATTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAAC GTTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGTTCTTTAGTGTTTAATGGGTGCAAC AAAGCTAATAAATGG
กระบือ AR_Buffalo	GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAAT GTGCGCCATATTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAAC ATTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGTTCTTTAGTGTTTAATGGGTGCAAC AAAGCTAATAAATGG
4. คลองหาด	
โค KH_Cattle	GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAAT GTGTGCCATATTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACA TTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGTTCTTTAGTGTTTAATGGGTGCAACA AAGCTAATAAATGG
กระบือ KH_Buffalo	GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAAT GTGCGCCATATTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAAC ATTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGTTCTTTAGTGTTTAATGGGTGCAAC AAAGCTAATAAATGG

2.2.4 ความหลากหลายของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในTBR ยีน

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างต้นนำมาตรวจสอบด้วย NCBI/ BLAST/ blastn พบว่าเป็นลำดับ นิวคลีโอไทด์ ของ Trypanosome และให้ผล 98% identity กับ *Trypanosoma brucei* satellite DNA 95% identity กับ *Trypanosoma brucei gambiense* และ 97% identity กับ *Trypanosoma brucei* Lister 427 surface glycoprotein ดังแสดงในภาพที่ 2.12 และผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคและกระบือในแต่ละอำเภอพบว่า เหมือนกันมากมีค่าตั้งแต่ 97 เปอร์เซ็นต์ จนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอตาพระยาเหมือนกันกับ *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอโคกสูง 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกัน ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอตาพระยาเหมือนกันกับ *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอโคกสูง 100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 และภาพที่ 2.13



ภาพที่ 2.12 ผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (164 bp) ด้วย NCBI/ BLAST/ blastn

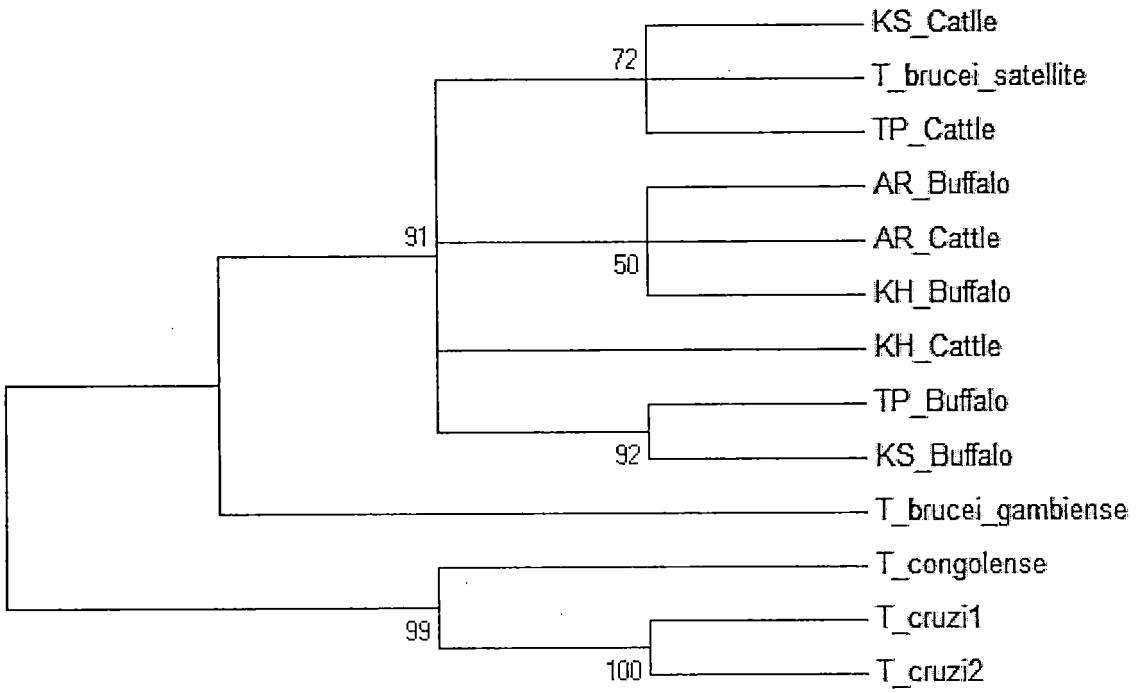
ตารางที่ 2.3 ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคและกระบือในแต่ละอำเภอในจังหวัดสระแก้ว

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	TP_Cattle	164	2	TP_Buffalo	164	97.56
1	TP_Cattle	164	3	KS_Catlle	164	100.0
1	TP_Cattle	164	4	KS_Buffalo	164	97.56
1	TP_Cattle	164	5	AR_Cattle	164	98.17
1	TP_Cattle	164	6	AR_Buffalo	164	98.78
1	TP_Cattle	164	7	KH_Cattle	164	99.39
1	TP_Cattle	164	8	KH_Buffalo	164	98.78
2	TP_Buffalo	164	3	KS_Catlle	164	97.56
2	TP_Buffalo	164	4	KS_Buffalo	164	100.0
2	TP_Buffalo	164	5	AR_Cattle	164	98.17
2	TP_Buffalo	164	6	AR_Buffalo	164	97.56
2	TP_Buffalo	164	7	KH_Cattle	164	98.17
2	TP_Buffalo	164	8	KH_Buffalo	164	97.56
3	KS_Catlle	164	4	KS_Buffalo	164	97.56
3	KS_Catlle	164	5	AR_Cattle	164	98.17
3	KS_Catlle	164	6	AR_Buffalo	164	98.78
3	KS_Catlle	164	7	KH_Cattle	164	99.39
3	KS_Catlle	164	8	KH_Buffalo	164	98.78
4	KS_Buffalo	164	5	AR_Cattle	164	98.17
4	KS_Buffalo	164	6	AR_Buffalo	164	97.56
4	KS_Buffalo	164	7	KH_Cattle	164	98.17
4	KS_Buffalo	164	8	KH_Buffalo	164	97.56
5	AR_Cattle	164	6	AR_Buffalo	164	99.39
5	AR_Cattle	164	7	KH_Cattle	164	98.78
5	AR_Cattle	164	8	KH_Buffalo	164	99.39
6	AR_Buffalo	164	7	KH_Cattle	164	99.39
6	AR_Buffalo	164	8	KH_Buffalo	164	100.0
7	KH_Cattle	164	8	KH_Buffalo	164	99.39

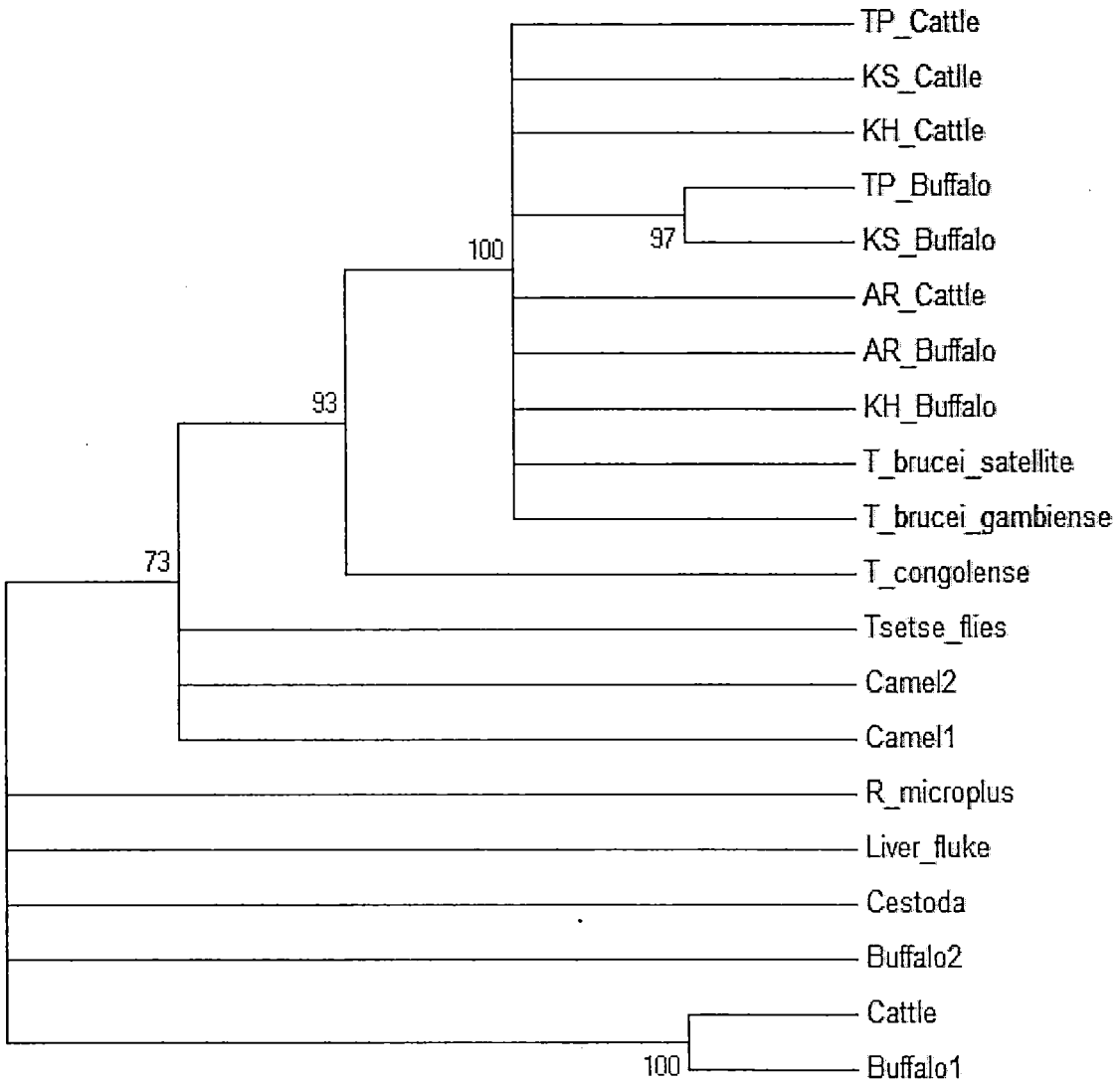
```
TP_Cattle       GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGTGCCATA 60
KS_Catlle       GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGTGCCATA 60
KH_Cattle       GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGTGCCATA 60
AR_Buffalo      GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGCGCCATA 60
KH_Buffalo      GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGCGCCATA 60
AR_Cattle       GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGCGCCATA 60
TP_Buffalo      GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGTGCCATA 60
KS_Buffalo      GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGTGCCATA 60
                ************************************************************ ******

TP_Cattle       TTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACATTAATTTGCAAGTTTGCAAC 120
KS_Catlle       TTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACATTAATTTGCAAGTTTGCAAC 120
KH_Cattle       TTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACATTAATTTGCAAGTTTGCAAC 120
AR_Buffalo      TTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACATTAATTTGCAAGTTTGCAAC 120
KH_Buffalo      TTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACATTAATTTGCAAGTTTGCAAC 120
AR_Cattle       TTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACGTTAATTTGCAAGTTTGCAAC 120
TP_Buffalo      TTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACGTTAATTTGCAAGTTTGCCAC 120
KS_Buffalo      TTAATTACAAGTGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACGTTAATTTGCAAGTTTGCCAC 120
                ************************************************ ********** **

TP_Cattle       AATGTTCTTTAGTGTTTAATGTGTGCAACAAAGCTAATAAATGG 164
KS_Catlle       AATGTTCTTTAGTGTTTAATGTGTGCAACAAAGCTAATAAATGG 164
KH_Cattle       AATGTTCTTTAGTGTTTAATGGGTGCAACAAAGCTAATAAATGG 164
AR_Buffalo      AATGTTCTTTAGTGTTTAATGGGTGCAACAAAGCTAATAAATGG 164
KH_Buffalo      AATGTTCTTTAGTGTTTAATGGGTGCAACAAAGCTAATAAATGG 164
AR_Cattle       AATGTTCTTTAGTGTTTAATGGGTGCAACAAAGCTAATAAATGG 164
TP_Buffalo      AATGTTCTTTAGTGTTTAATTGGTGCAACAAAGCTAATAAATGG 164
KS_Buffalo      AATGTTCTTTAGTGTTTAATTGGTGCAACAAAGCTAATAAATGG 164
                ********************  ***********************
```

ภาพที่ 2.13 ผลจากการทำ multiple sequence alignment ของโคและกระบือในแต่ละอำเภอในจังหวัดสระแก้ว

สำหรับการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อ *Trypanosoma evansi* จากลำดับ nucleotide ที่ใช้ TBR primer ซึ่งเป็น satellite DNA โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank และวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้โปรแกรม Mega 5 version 2 พบว่า satellite DNA ของ *T. evansi* จากเลือดโคและกระบือในแต่ละอำเภอที่ติดชายแดนของจังหวัดสระแก้ว และ satellite DNA ของ Trypanosoma อื่นความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกัน ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มได้อย่างชัดเจน ยกเว้น *Trypanosoma congolense* และพบว่า satellite DNA ของ *T. evansi* จากเลือดโคและกระบือในแต่ละอำเภอที่ติดชายแดนของจังหวัดสระแก้ว มีความแตกต่างกันกับ satellite DNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่เกี่ยวข้องกับ Trypanosome อย่างชัดเจนเช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 2.14 และ 2.15



ภาพที่ 2.14 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogeny) ของ satellite DNA ของ *Trypanosoma evansi* (*T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอตาพระยา; TP_Cattle , *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอตาพระยา; TP_Buffalo, *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอโคกสูง; KS_Cattle, *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอโคกสูง; KS_Buffalo, *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภออรัญประเทศ; AR_Cattle, *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภออรัญประเทศ; AR_Buffalo และ *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอคลองหาด; KH_Cattle, และ *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอคลองหาด; KH_Buffalo) กับ satellite DNA ของ Trypanosoma ชนิดอื่น (*Trypanosoma brucei, Trypanosoma brucei gambiense, Trypanosoma congolense* และ *Trypanosoma cruzi*) โดยใช้ Maximum Parsimony method และค่าการตัดสินใจ (cutoff) ของ Bootstrap ที่ 50% (n=2000)



ภาพที่ 2.15 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogeny) ของ satellite DNA ของ *Trypanosoma evansi* (*T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอตาพระยา; TP_Cattle , *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอตาพระยา; TP_Buffalo, *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอโคกสูง; KS_Cattle, *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอโคกสูง; KS_Buffalo, *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภออรัญประเทศ; AR_Cattle, *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภออรัญประเทศ; AR_Buffalo และ *T. evansi* จากเลือดโคในอำเภอคลองหาด; KH_Cattle, และ *T. evansi* จากเลือดกระบือในอำเภอคลองหาด; KH_Buffalo) กับ satellite DNA ของ Trypanosoma ชนิดอื่น และ satellite DNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่เกี่ยวข้องกับ Trypanosome โดยใช้ Maximum Parsimony method และค่าการตัดสินใจ (cutoff) ของ Bootstrap ที่ 50% (n=2000)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

363.2
W 9950
ว-3

บทที่ 3
อภิปราย/วิจารณ์

3.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Trypanosoma evansi* ด้วยเทคนิคทางด้านโมเลกุลาร์

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Trypanosoma evansi* ด้วยเทคนิคทางด้านโมเลกุลาร์เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ โดยใช้ TBR1 และ TBR2 เป็น primer เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ซึ่งจะได้ PCR product เท่ากับ 164 เบสแพร์ (Masiga *et al.*, 1992; Moser *et al.*, 1989) สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบแบนด์ของ DNA อยู่ในช่วง 100 – 200 เบสแพร์ และเมื่อนำมาโคลนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทป์แล้วพบว่ามีความยาวของนิวคลีโอไทป์ เท่ากับ164 เบสแพร์ ทั้งในโคและกระบือ แสดงว่าการใช้เทคนิค PCR สามารถตรวจวินิจฉัยโรคดิดเชื้อ*T. evansi* ได้เป็นอย่างดี

3.2 ความชุกของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโคและกระบือในอำเภอที่ติดชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชา ของจังหวัดสระแก้ว

ความชุกของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโคและกระบือในเขตอำเภอที่ติดชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชาของจังหวัดสระแก้ว มีค่าตั้งแต่ 19.67 – 45.16 เปอร์เซ็นต์ อำเภอที่มีความชุกของเชื้อน้อยที่สุดคืออำเภอตาพระยา และอำเภอที่มีค่าความชุกมากที่สุดคืออำเภออรัญประเทศ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากอำเภออรัญประเทศเป็นเขตอำเภอที่มีการเลี้ยงปศสัตว์มาก นิยมเลี้ยงสัตว์ปล่อยฝูงให้หากินตามป่า อำเภออรัญประเทศเป็นอำเภอที่มีการเคลื่อนย้ายสัตว์ผ่านแดนอยู่เป็นประจำ และด้วยเทคนิค PCR ที่นำมาใช้ในการตรวจสอบมีความสามารถในการตอบสนองได้ดี (sensitivity) และสามารถตรวจพบเชื้อได้ทั้งในช่วงที่สัตว์มีการติดเชื้อแบบรุนแรง (acute) และแบบเรื้อรัง (chronic) (Ashour *et al.*, 2013)

สำหรับชนิดของสัตว์พบว่าโคจะมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมากกว่ากระบืออย่างเห็นได้ชัดในทุกอำเภอ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากปริมาณตัวอย่างของเลือดกระบือมีจำนวนน้อยหรืออาจจะเนื่องจากการเลี้ยงกระบือในพื้นที่ชายแดนมีปริมาณน้อย และเกษตรกรผู้เลี้ยงเองให้ความสำคัญต่อสุขอนามัยของกระบือมากกว่าโค นอกจากนี้การเลี้ยงโคในพื้นที่ชายแดนนิยมเลี้ยงเป็นฝูงใหญ่และปล่อยให้หากินตามป่า ยากต่อการกำจัดแมลงที่เป็นพาหะนำโรค เช่น เหลือบ แมลงวันคอก และยุง ซึ่งทำให้ง่ายต่อการแพร่กระจาย (Transmission) ของเชื้อชนิดนี้ ต่างจากกระบือที่ผู้เลี้ยงจะไม่นิยมเลี้ยงปล่อยฝูงหรือเลี้ยงในปริมาณ 2-5 ตัวต่อคอก และให้ความดูแลเอาใจใส่ ได้ทั่วถึงมากกว่าโค โดยมีการกำจัดพาหะ เช่น เหลือบ แมลงวันคอก หรือยุง ในช่วงที่มีปริมาณมากอีกด้วย

355595

3.3 ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโคและกระบือในอำเภอที่ติดชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชา ของจังหวัดสระแก้ว

จากการการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อ *Trypanosoma evansi* จากลำดับ nucleotide ที่ใช้ TBR primer ซึ่งเป็น satellite DNA นั้นพบว่า *T. evansi* จากเลือดโคและกระบือในแต่ละอำเภอที่ติดชายแดนของจังหวัดสระแก้ว มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับ satellite DNA ของ *Trypanosoma* sp. อื่น ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มได้ และเชื้อ *T. evansi* ของกระบือ (*Bubalus bubalis*) ในแต่ละอำเภอในจังหวัดสระแก้วมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการต่อกัน สอดคล้องกับการทดลองของ Marjo *et al.*, (2013) ซึ่งรายงานว่าเชื้อ *T. evansi* (โคลนโดยใช้ Internal transcribed spacer; ITS) ของกระบือ (Water buffalo; *Bubalus bubalis*) ในประเทศฟิลิปปินส์ มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกันอย่างใกล้ชิดกับกระบือของประเทศไทย

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการวิจัย

ลำดับนิวคลีโอไทป์ที่โคลนได้จากเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโคและกระบือในแต่ละอำเภอที่ติดชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชาของจังหวัดสระแก้ว มีความยาวเท่ากับ 164 เบสแพร์

ความชุกของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโคและกระบือในเขตอำเภอที่ติดชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชาของจังหวัดสระแก้ว มีค่าตั้งแต่ 19.67 – 45.16 เปอร์เซ็นต์ อำเภอที่มีความชุกของเชื้อน้อยที่สุดคืออำเภอตาพระยา และอำเภอที่มีค่าความชุกมากที่สุดคืออำเภออรัญประเทศ สำหรับชนิดของสัตว์พบว่าโคจะมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมากกว่ากระบืออย่างเห็นได้ชัดในทุกอำเภอ ซึ่งอาจจะเนื่องผู้เลี้ยงไม่นิยมเลี้ยงปล่อยฝูง หรือเลี้ยงในคอก ซึ่งมีปริมาณ 2-5 ตัวต่อคอก ทำให้สามารถดูแลเอาใจใส่ได้อย่างทั่วถึงมากกว่าโค

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโคและกระบือในแต่ละอำเภอที่ติดชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชาของจังหวัดสระแก้ว มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการต่อกัน สามารถแบ่งกลุ่มได้ และชนิดของสัตว์ (โคและกระบือ) ไม่มีผลต่อความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ *T. evansi* ในพื้นที่เขตชายแดนจังหวัดสระแก้ว

4.2 ข้อเสนอแนะ

4.2.1 ความชุกของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโคและกระบือในเขตพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชา

จากการออกเก็บตัวอย่างเลือดโค-กระบือเพื่อใช้ในการทดลองตามอำเภอที่ติดกับชายแดนพบปัญหาต่างๆ เช่น การให้ความร่วมมือของผู้เลี้ยงโคและกระบือ ฤดูกาลในการเก็บจำนวนตัวอย่างที่ได้ไม่เป็นไปตามแผนที่วางไว้ โคและกระบือที่เลี้ยงเป็นฝูงตามชายแดนส่วนใหญ่ไม่ได้มีการสนตะพาย ทำให้ไม่สามารถจับเพื่อเจาะเลือดได้ ซึ่งข้อเสนอแนะจากปัญหาที่พบในการตรวจความชุกของโรคคือ ควรจะประสานงานเบื้องต้นกับปศุสัตว์อำเภอที่จะออกเก็บตัวอย่าง และติดต่อเจ้าหน้าที่ ซึ่งเป็นผู้ปฏิบัติงานหรือรับผิดชอบโดยตรงในการพื้นที่ เพื่อง่ายต่อการทำความเข้าใจต่อผู้เลี้ยงโคและกระบือ ประสานเพื่ออำนวยความสะดวกในการจับโคและกระบือ และผู้ปฏิบัติงานในพื้นที่จะสามารถบอกได้ว่าช่วงฤดูไหนจะมีการทำวัคซีนตามโปรแกรมของกรมปศุสัตว์ ซึ่งจะทำให้ผู้วิจัยสามารถเข้าไปพร้อมกับเจ้าหน้าที่ เพื่อเก็บตัวอย่างได้ง่ายขึ้น สำหรับจำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามแผนนั้น ผู้วิจัยควรมีการศึกษาถึงข้อมูลของสัตว์ในแต่ละพื้นที่ให้ชัดเจนเสียก่อนเพื่อให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นและง่ายต่อการวางแผนในการกำหนดจำนวนและชนิดของสัตว์

4.2.2 ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ของโค-กระบือในเขตพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออกระหว่างประเทศไทย-กัมพูชา

จากการการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อ *Trypanosoma evansi* จากลำดับ nucleotide ที่ใช้ TBR primer ซึ่งเป็น satellite DNA นั้นพบว่า *T. evansi* จากเลือดโคและกระบือในแต่ละอำเภอที่ติดชายแดนของจังหวัดสระแก้ว และ satellite DNA ของ Trypanosoma อื่น พบว่ามีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกัน ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มได้ แต่เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทป์ของ satellite DNA ของ Trypanosome แต่ละชนิดมีข้อมูลที่รายงานในฐานข้อมูล Genbank ไม่มาก จึงมีข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ความหลากหลายน้อย ดังนั้น การใช้ Primer อื่น เช่น Internal transcribed spacer (ITS) มาใช้ในการโคลนยีนของ *T. evansi* จากเลือดโคและกระบือน่าจะเห็นผลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอย่างชัดเจนมากขึ้น เนื่องจากยีนชนิดนี้ (ITS) ใช้เพื่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ที่เกี่ยวกับวิวัฒนาการและสามารถจำแนกหมวดหมู่ (taxonomic identities) ได้ด้วย

บทที่ 5
ผลผลิต

5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

- อยู่ในขั้นตอนการเขียนเพื่อที่จะส่งตีพิมพ์ในวารสาร J Trop Med Parasitol. หรือ Annals of the New York Academy of Sciences. หรือ Experimental Parasitology

5.2 การจดสิทธิบัตร

-

5.3 ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจหรือบุคคลทั่วไป)

-

5.4 ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

- อยู่ในขั้นตอนการทำรายงานฉบับสมบูรณ์ และจะจัดส่งให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในจังหวัดสระแก้วต่อไป

รายงานสรุปการเงิน

รหัสโครงการ 2554A10862014

โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการ ความชุกและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ที่ทำให้เกิดอาการแท้งในโค-กระบือ ในเขตพื้นที่ชายแดนด้านตะวันออก ระหว่างประเทศไทย-กัมพูชา

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย/ผู้รับทุน อ.ดร.ไพทูล แก้วหอม

รายงานในช่วงตั้งแต่ 23 มิถุนายน พ.ศ. 2554 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2556

ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี - เดือน ตั้งแต่ ตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึงวันที่ กันยายน พ.ศ. 2556

รายจ่าย

หมวด	รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	รวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	คงเหลือ
1. ค่าตอบแทน	20,000	-	20,000	40,000	20,000
2. ค่าจ้าง	13,000	16,800	29,800	49,800	20,000
3. ค่าวัสดุ	37,400	233,600	271,000	271,000	-
4. ค่าใช้สอย	10,000	82,000	92,000	102,000	10,000
5. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	18,600	18,600	37,200	37,200	-
รวม	99,000	351,000	450,000	500,000	50,000

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 250,000 บาท เมื่อ มิถุนายน พ.ศ. 2554

งวดที่ 2 200,000 บาท เมื่อ พฤศจิกายน พ.ศ. 2554

รวม **450,000 บาท**

.....

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

.....

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

หัวหน้าโครงการวิจัย(แทน)

บรรณานุกรม

ทัศนีย์ ชมภูจันทร์, สุรีย์ ธรรมศาสตร์, ปนันท์ ธนเจริญวัชร, จิรา คงครอง และเอกรินทร์ วัฒนพลา ชัยกูร . 2539. คู่มือมาตรฐานการชันสูตรโรคสัตว์. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ.โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

ปัจฉิมา อินทรกำแหง. 2551. โรคทริพพาโนโซมีเอสซิส (Trypanomiasis). กลุ่มปาราสิต สำนักงานควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

เทียมจันทร์ เกี่ยวการค้า, อัมไพ ภาษิต, วิจิตรา วรรณโวหาร, มนทกานติ์ วงศ์ภากร และ ปราณี รอดเทียน. 2548. เชื้อทริพาโนโซมบนฟิล์มเลือดจากเด็กทารก. งานโลหิตวิทยา. กลุ่มพยาธิวิทยา. โรงพยาบาลลำปาง จ. ลำปาง

วีรพล ทวีนันท์, 2547. อายุรศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง, ปรสิตที่สำคัญในโคนม, หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิชีววิทยา, คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สาธิต ผลภาค, มาณวิกา ผลภาค และ ศิริพรรณ วภักดิ์เพชร. 2532. เชื้อทริปปาโนโซมที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และความสำคัญทางระบาดวิทยา บทคัดย่อเรื่องวิจัย การประชุมวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 16 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย วันที่ 6-8 ธันวาคม พ.ศ.2532

สุวิทย์ ชอบจิตร, ศราวุธ เขียวศรี, ปราณี รอดเทียน, ปภาสพงศ์ จงชานสิทโธและอนิรุธ เนื่องเม็ก. 2549. การระบาดของโรคเซอร่าในโค-กระบือที่บ้านแม่เหมืองหลวง ตำบลโป่งสา อำเภอปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอน. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 4(2):127-136

Ashour, A.A., Abou EL-Naga T.R., Barghash S.M. and Salama M.S. 2013. Trypanosoma evansi: Detection of Trypanosoma evansi DNA in naturally and experimentally infected animals using TBR(1) and TBR(2) primers. Experimental Parasitology. 134(1): 109-114.

Boonyawong, T., Chantaraprateep P. and Muangyai M. 1975. Surra in Horse. Thai J. Vet. Med. 5: 665-672.

Gabriela, C.A., Misael C.C., Olga Marta G. B. and Elizabeth A. 1998. Effect of *Trypanosoma lewisi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) on the infection of white rats with

Toxoplasma gondii (Eucoccidia: Sarcocystidae) oocysts. Rev. 30oil. Trop v.46 n.4 San José dic.

Indrakamhang, P., Mohkaew K. and Roong-uthai P. 1996. Preliminary report on *Trypanosoma* spp. In native Sambar deer and imported Rusa deer raised in a deer farm in Thailand. In: Proceeding of the 15th Annual Livestock Conference, Department of Livestock Development, Thailand, 4-6 Sep. 55-67.

Joshi P.P., Shegokar V.R., Powar R.M., Herder S., Katti R., Salkar H.R., Dani V.S., Bhargava A., Jannin J. and Truc P. 2005. Human Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma Evansi* in India: The first case report. Am J Trop Med Hyg. 73(3): 491-495.

Marjo, V.V., Claro N.M. and Windell L.R. 2013. Molecular characterization of *Trypanosoma evansi* isolates from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Philippines. Acta Parasitologiga. 58(1): 6-12.

Mathias, E. and Muangyai M. 1980. *Trypanosoma evansi* infection in swamp buffalo calf. Thai J. Vet. Med.10(1): 47-54.

Masiga D.K., Smyth A.J., Hayes P., Bromidge T.J. and Gibson W.C. 1992. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. Int. J. Parasitol. 22: 909–918.

Moser D.R., Cook G.A., Ochs D.E., Bailey C.P., McKane M.R. and Donelson J.E. 1989. Detection of Trypanosoma congolense and Trypanosoma brucei subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. Parasitology. 99: 57–66.

Natheewattana, N., Hongsbhanich L., Khamboonruang C. and Thitasut P. 1978. Preliminary study of a *Trypanosoma lewesi*-like parasite of rats in Chiang Mai, Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 4 (3): 322-323.

Promega. 2013. **pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems: Technical Manual.**

Sarataphan N., Vongpakorn M., Nuansrichay B., Autarkool N., Keowkarnkah T., Rodtian P., Roger W. Stich. And Jittapalapong S. 2007. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (Herpetosoma) infection in a sick infant from Thailand. J Med Microbiol 56: 1118-1121.

Rodtian, P., Hin-on W., Uthaiwan W., Vitoorakool P., Trisanarom A., Chaiyasert S., Klaihong S., Sarataphan N. and Muangyai M. 2004. A case report: *Trypanosoma evansi* infection in Timber Elephant at Lampang province (in press).

Trisanarom, A., markmee S. and Ped-ugsorn C. 1987. *Trypanosoma evansi* infection in Chiangmai dairy cattle. In Proceeding of the 6th Annual Livestock Conference. Department of Livestock Development, Thailand, 18-20 May, 1-12 pp.

Tuntasuvan, D., Mimapun S., Sarataphan N., Trongwongsa L., Intraraksa R. and Luckins A.G. 2000. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. Vet. Parasitol. 87: 223-230.

Tuntasuvan, D., Sarataphan N. and Nishikawa H. 1997. Cerebral trypanomiasis in native cattle. Vet. Parasitol. 73: 357-363.

Webster, J.P. and MacDonald D.W. 1995. Parasites of wild brown rats (Rattus norvegicus) on UK farms. Parasitology (111): 247–255.

World Health Organization, 2010. African trypanosomiasis (sleeping sickness). Online available: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/

ภาคผนวก

ลำดับนิวคลีโอไทป์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

>TP_Cattle

GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGTGCCATATTAATTACAAGT
GTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACATTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGTTCTTTAGTGTTTAATGTGT
GCAACAAAGCTAATAAATGG

>TP_Buffalo

GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGTGCCATATTAATTACAAGT
GTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACGTTAATTTGCAAGTTTGCCACAATGTTCTTTAGTGTTTAATTGGT
GCAACAAAGCTAATAAATGG

>KS_Catlle

GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGTGCCATATTAATTACAAGT
GTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACATTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGTTCTTTAGTGTTTAATGTGT
GCAACAAAGCTAATAAATGG

>KS_Buffalo

GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGTGCCATATTAATTACAAGT
GTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACGTTAATTTGCAAGTTTGCCACAATGTTCTTTAGTGTTTAATTGGT
GCAACAAAGCTAATAAATGG

>AR_Cattle

GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGCGCCATATTAATTACAAGT
GTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACGTTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGTTCTTTAGTGTTTAATGGGT
GCAACAAAGCTAATAAATGG

>AR_Buffalo

GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGCGCCATATTAATTACAAGT
GTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACATTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGTTCTTTAGTGTTTAATGGGT
GCAACAAAGCTAATAAATGG

>KH_Cattle

GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGTGCCATATTAATTACAAGT
GTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACATTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGTTCTTTAGTGTTTAATGGGT
GCAACAAAGCTAATAAATGG

>KH_Buffalo

GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGCGCCATATTAATTACAAGT
GTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACATTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGTTCTTTAGTGTTTAATGGGT
GCAACAAAGCTAATAAATGG

>T_brucei_gambiense (FJ223603)

GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGTGGCCATATTAATTACAAG
TGTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACGTTAATTTGCAAGTTTGCAACAATGACCTTTAGTGTCTAAGCGT
GCCACAAAGCTAAT

> T_brucei_satellite (K00392)

GAATATTAAACAATGCGCAGTTAACGCTATTATACACAATAACTTTTAATGTGTGCAATATTAATTACAAGT
GTGCAACATTAAATACAAGTGTGTAACATTAATTTGCAAGTTTGCAACGCTGTTCTTTAGTGTTTAATGTGT
GCAACAAAG

>T_congolense (X05769)

GATCATTTTTAAAACGCATTTCGGCGTTTTCGATGAAAATTAGGGACAAACAAATCCCGCACAACCATTTTT
GGAACAGAAAAAATTTTCGCCCAAAAAGTCAAAAAAAAATATTTTTTTACAAATTTTTTTTTGAAAATTTGC
AAAAATTAGAAAAAGTTTTTGACACAATTTTTTGCAAAATTTTGAAAAATCACTATGCGCGTCAAATAGGCC
CGAAAACGACAAATACGTGCCAAATACGCGTTTTTCGAATTTTTGCGTTTTTGACATTTTTGACCATTTTCAA
AAAAACCGGTTTTTGGCCATTTGGGCCCAAAAAGGTGAATTTTGGGAAAATCGCAAAGTGCCCGTTCTCGC
TCGAAATTT

> Liver_fluke (AF408147)

TATGCTTAAATTCAGCGGGTAATCACGTCTGATCCGAGGTCAGGAAAGTTGTTAAGCACCAAAGTGCAAAA
CCGATTTGCATCGAATGCATTGCCACTACTGAAGCCTCAACCAAAGACAAAGGACAAACAACGGAGCGCG
CGCATTCACAACAATAACAACAATTGAGCCACGACTCCGCCGCCACCCCCTCATCTAGGCAGTCAGCCCAG
ACATGGTTGCGTCCGGCACATTTGGGGAAAAGCCATAGATCCGGCACCCCACACAATTGCGCGGGGAAAT
CATGCCAGCTGGCAAGACCCAAGCCACGACTTTTTGGGCGTCGTGATAGTTTATAAGCCGACCCTCGGACA
AGCGTGGCCACAAGCAAACCCATGGCCGCAATATGCGTTCAAGATGTCGATGTTCAAAGCAGTATGCAGT
TCGCATTAATTCACACAGTTGCCTGCGCTCTTCATCGACACACGAGCCGAGTGATCCACCGGTACCA

> Cestoda (AY954521)

ACCCTGGACGGTGGATCACTCGGCTCGTGCGTCGATGAAGAGTGCAGCCAACTGTGTGAATTAGTGCGAA
TCGCAGACTGCTTTGAGCATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCATAGGCTTGCCTGTGGCCACGTCTG
TCCGAGCGTCGGCTTAAAAACAATCACTGTGCGTAATGAGCGGTGGCTTGGGAGATTGCTGTTCCGCTGG
TGGCGGTGCGGCTTCTCTCCAAGGTAAGGCGCGGTGCGTGTCTTGTGTTGCGCGCGGTGGGCTGTCAGTG
TGTTTGCTGTGCCGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCGCCGCCTAGCTTCACTCGCTTGCGTCCTTACCGCT
TCGGGTTGCAAGTTGGTTCGCTGATGTTGGTGGTGGCGGTGGCGGTGGTGGTGGCGGGGCTGTTGGTAG
GCGGTGGGTCAGTCAGTCAGCCGGCCGGTCAGCCAGCCACAGTCCACGAGGCGTGGCCCAGTGTGCGTG
TAATTTGGGCGCGTTGCGCACGCAGAGTGGACTGTGATGGTTGAGTGCAGTGCGGTGCGGTGCGGCGCT
GCGGTACTGCCGGGTGGGTGTGTGCCTGTCCGTCGGTCCGTGTGTCTGTGTACTGTCTGTCTGTCTATCTG
ACCTCGGATCAGTCGTGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAAC

>R_microplus (FJ223603)

TAACGAGGGTCTCGTACTGGCAGACGTAGTGCCTCTAGGTTGGATACGGTGGACCATTGGTCAGCTGCCA
ATTAGTAATAAGTTCACGTGCTACGTGACGCCAAACAGGCTCATAACAGAGTGTAGCACAACCGCCGCCAT
GGCTACTAGTGGCGCTGACTGACACTCCCACGTTAA

> Tsetse_flies (AY220504)

CCTGGTCAAAGTGGCAGATAGATCGACTTCACAGTTTGGTGAGGGAGGACATTAACACACCAGCGGACCG
ATTTGTGCGAAAGCTATGTTATTAGTAGTTAATTAATTTAGTGGATTCTAGATATTTGATTAGATTTTAATTG
ACAATGGTTCCCGTGTGGAATACATTGCAGGTGTCTATTTCGGGATCGGTAGGATCACCCTTCTTGAATGG
TGGTTGCACAGTGGCAACCTTCGAGCAAGTTGGGAAAATGGTGAAGANGCTACNAAATAGCGAATTGGC
GATTGTGACAGCACATCATCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATGTNCCATCACTT
ATCTCATGGGATTACACGAACAAATAACGTCCTCCTATTTTCAAAACTTTTATTTGTNAAGGTT

>Cattle (AB471783)
AGCCCCTAAGCCCTCTGCAAGGACGCCTGGCTCCTAGGTCCGAAGGAAGGCGCTGGGCAGGGCTTGGGG
AGGCTCGCCCAGCACAGAGCAGCCTCTTGGCCGGGGCTCTGTTCTATCCCCTGGGCGCAGAGCTGGAGCT
CCCCGGTGTGGAAGCTTCACTCGGTCCTTCCCAGTACAGGCTTGCAAGCACCCACCGGCAGCCAGCCTCTT
CTCTCCCGCGTTCCGGGCATTGGGCTCCAAACCTGGGACAGGCTTGCAAGCACCCACCGGCAGCCAGCCTC
TTCTCTCCCGCGTT

>Buffalo1 (AY956327)

GATCCCTCTGGCTGTGGTGCTGCCTCGCCCAGCCAGGGGCGCTGGGACCCTGATTCCCTCCGCCCAGCGCT
TAGTCTGGGCGGCCAAGCAAGCGCTTGGGAAGGCAGCCCTGGGCGCTCTCTTTGCCTGACAAAGAGCTCT
GCTTGCGGGAGGCTTTGGCAGTGTGCACACCCCCGGCCCCTGAGCCTTCTGCAAAGAGGCCTGGCTCCTA
GGTCCAAAGGGAAGGCGAGAGCGGAGCTGAGGCCAGCCAGGCGCCAGTCACGTCTCCCACACTCCCGCA
GCCTGCTCCTTCCCGGGCGAGAACGCTAGAAGCTGGGAAGCGCTGGGCGAGGCTCGCCCAGGCCAGAGC
AGCCTCTCGGCCGGGGCTCTGCGCTACCGCGCCTGGGCGCAGAGCTGGAGCTCCGCCGCTCTGGCAGCTC
GCTCGGTCCTTCCCAGTAACAGGCCCGCAACCCCTCTCTTCTCTCCGGCGTGCTGGGAACTGGGCTTCCAG
GACTGGGCACAGAGCACTTGCCCGGAGCTCTCTGCTCAGGGACTGGTTCCCCTGCGCTGGGGCTGTGCTCT

CCCTAGCCCAAACGCACCGGGGAAGGCCCCAAACCACATCCACATGACTCTACGCTGGGGGAGAGCTCCA
GGGAAGCCCAGTCTGGCAGGCGCTTGCTGGGCACAAACGGAG

> Buffalo2 (EU086340)

GGCCTGGGAGACTGGGGTCCAGAAACCAAGGTCAGAGCAGAGCAGAAAATCAGAGTGGGTTGGGGAGA
GTCTGTCTCGGGATCCAGACGACCCCTAGGGCACCTGGAACCCTCTCCCTGCCGGGATTCTTATGCCAGGC
CACCTGCTTCTCACAAACGCCCCACCTGGCTCCTAGCTCCCGGCTGGCTGCGTGCAGCCCATGGAGCAGGG
AGTGTCTGAATCCTCACCTTCCCTGGTTCTGCTTACCTTCTTACTCTCTGCCCTGGTGAGCCCAGGTGAGAA
GGAAGAACTTAGAAGCAATCATAACCTGCTTCAAACTGGAAGCAA

>Camel1 (JX093552)

GTGGGAACGAGAGCTCTGCAGTATGAGGTACTGAATTTCTTGGTCTTAAAAAATATTTGAACTCTTTATATT
TACTTTAATACTGTAGGTATGTAGGAGAAGTCTTAAAATTGCTAACTTACCTTTTGGGATTTTACAGGGGAG
AAAATTTCATTAATATTGTGGAATATGAGACTCTTGGAAATAACACASMCAYACACACACACACACACACA
CATACACACACTACATTCTATATTTACTTTAAAAAAAATACTTTGATCCTTATCTCTCAATTGTCCTCCA

>Camel2 (JN845636)

TGGACGAGCTCCATAGTGTGTGTGTGTGTTTTTTTTTTTAATTGAAGTATAGTTGATATACAATGTTGTATTA
ATTTCTGCTGTACAGAAAGATTCAGTTTTTATATATATATATATACACACACACACACACACACACACAC
ACACACACACATTCTTTTTCATATTCTTTTCCACTGTGGTTTATCTCAGGA