รายงานการวิจัย

เรื่อง

การตรวจหาเชื้อบาบีเซีย โบวิสในเลือดโค โดยเทคนิค พีซีอาร์อีไลซา

โดย

อาจารย์กล่าวขวัญ ศรีสุข

รองศาสตราจารย์.ดร.โกสุม จันทร์ศิริ

นายสัตวแพทย์ นพพร ศราธพันธ์

BURAPHA UNIVERSITY LIBRARY

3 2498 00109224 4

571.999
ก313ก
ฉ. 2

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัย

งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2542

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

2(2)

รายงานการวิจัย
เรื่อง

การตรวจหาเชื้อบาบีเซีย โบวิสในเลือดโค โดยเทคนิค พีซีอาร์อีไลซา

โดย
อาจารย์กล่าวขวัญ ศรีสุข
รองศาสตราจารย์.ดร.โกสุม จันทร์ศิริ
นายสัตวแพทย์ นพพร ศราธพันธ์

AQ 0003020
12 มิ.ย. 2544
146403
เริ่มบริการ
13 พ.ค. 2547

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัย
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2542

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
บทนำ	1
วิธีการทดลอง สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์	5
ผลการทดลอง	10
วิจารณ์ผลการทดลอง	20
เอกสารอ้างอิง	22

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 เชื้อ *B. bovis* ในเม็ดเลือดแดงของโค 1

รูปที่ 2 วงจรชีวิตของเชื้อ *B. bovis* 2

รูปที่ 3 แผนภาพของการทำ PCR-ELISA 4

รูปที่ 4 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* ที่สกัดได้ 10

รูปที่ 5 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผลผลิตที่เพิ่มจำนวนได้จากไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 11

รูปที่ 6 ความไวของการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* โดยเทคนิค PCR-ELISA 11

รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร กับปริมาณดีเอ็นเอ 12

รูปที่ 8 ความไวของการตรวจสอบเชื้อ *B.bovis* ในเลือดโคโดยเทคนิค PCR-ELISA 13

รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร กับปริมาณเชื้อ *B.bovis* (% parasitemia) 14

รูปที่ 10 กราฟแสดงการติดตามปริมาณเชื้อ (%parasitemia) อุณหภูมิ และปริมาณ PCV ในโคทดลองที่ฉีดด้วยเชื้อ *B.bovis* 15

รูปที่ 11 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผลผลิต (PCR-ELISA) ที่ได้จากการติดตามปริมาณเชื้อ *B.bovis* ในโคทดลอง 16

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* โดยเทคนิค PCR-ELISA 12

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจสอบเชื้อ *B.bovis* ในเลือดโค โดยเทคนิค PCR-ELISA 13

ตารางที่ 3 แสดงผล PCR-ELISA สำหรับเลือดโคที่ไม่ติดเชื้อ *B.bovis* จำนวน 16 ตัวอย่าง 14

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจสอบเชื้อ *B.bovis* ในโคทดลอง โดยเทคนิค PCR-ELISA 16

ตารางที่ 5 แสดงค่าการตรวจสอบเลือดตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ จำนวน 51 ตัวอย่าง โดยเทคนิค PCR-ELISA และกล้องจุลทรรศน์ 17

บทคัดย่อ

คณะผู้วิจัยพยายามพัฒนาวิธีการตรวจสอบ *Babesia bovis* ให้มีความไวและความจำเพาะสูง และมีความสะดวกในการตรวจสอบเลือดตัวอย่างได้ปริมาณมากในคราวเดียวกัน การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน Carbamoyl Phosphate Synthetase II และตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าเทคนิค PCR-ELISA นี้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ *B.bovis* ได้ต่ำถึง 0.000144 % parasitemia หรือ เท่ากับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อจำนวน 10 เซลล์ในเลือด 1 ไมโครลิตร การตรวจสอบการติดเชื้อในเลือดตัวอย่างจำนวน 53 ตัวอย่าง พบว่ามี 5 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR-ELISA แต่ไม่มีเลือดตัวอย่างใดที่ตรวจพบเชื้อ *B.bovis* โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้เทคนิค PCR-ELISA สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ *B.bovis* ในโคทดลองได้เร็วกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ คือตั้งแต่วันที่ 4 หลังการฉีดเชื้อ.

ABSTRACT

In this work we developed a sufficiently sensitive and specific PCR-based assay for *Babesia bovis*. PCR product was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to simplify the processing of large number of samples. The primer and probe sequences were derived from Carbamoyl Phosphate Synthetase II gene sequences. The assay detected down to 0.000144 % parasitemia (10 infected erythrocytes per microlitre of blood). By the PCR-ELISA method, five of fifty three blood samples showed positive reactions, while with microscopic examination of blood samples were detected *B.bovis*. In addition, the PCR-ELISA can detected since day 4 after infection , in experimental cow, before detection by microscopic examination (day 10 after infection).

บทนำ

เชื้อ *Babesia bovis* เป็นปาราสิตที่ก่อให้เกิดโรคบาบีซิโอซีส (babesiosis) ของโคและกระบือในเขตร้อน เช่น อเมริกากลาง อเมริกาใต้ ออสเตรเลีย และเอเชีย (1) เชื้อปาราสิตนี้อาศัยอยู่ในเม็ดเลือดแดงของโคกระบือ (รูปที่ 1) โดยมีเห็บแข็ง (Ixodid tick) เป็นพาหะของโรค

การจำแนกเชื้อ *B. bovis* (2)

เชื้อ *B. bovis* ถูกจัดอยู่ใน

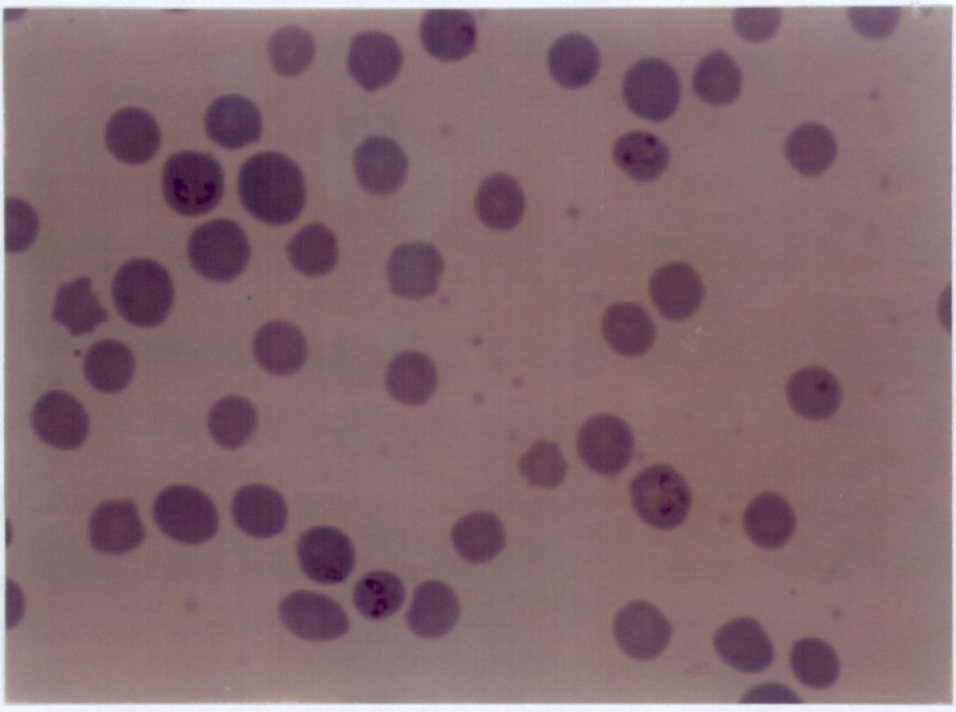
Phylum : Apicomplexa

Class : Piroplasma

Order : Piroplasmida

Family : Babesiidae

Genus : Babesia



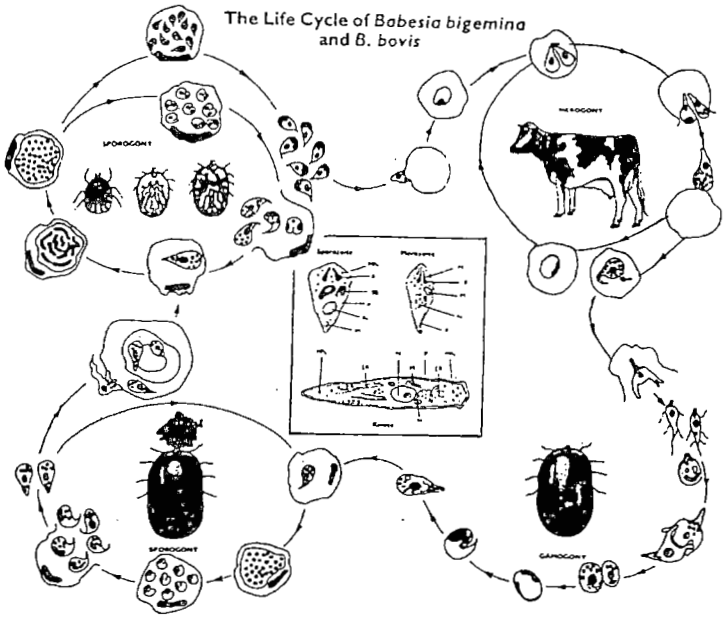
รูปที่ 1 เชื้อ *B. bovis* ในเม็ดเลือดแดงของโค

วงจรชีวิตของ *B. bovis* มี 2 ระยะคือ ระยะการสืบพันธุ์แบบมีเพศเกิดขึ้นในเห็บเท่านั้น แต่ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศเกิดขึ้นทั้งในโคกระบือ และเห็บ (3) ดังแสดงในรูปที่ 2 เมื่อเห็บดูดเลือดโคกระบือ sporozoites ที่อยู่ในต่อมน้ำลายของเห็บ จะผ่านเข้าสู่กระแสเลือดของโคกระบือ และเข้าสู่เม็ดเลือดแดง จากนั้นมีการพัฒนาเป็น trophozoites ซึ่งจะแบ่งตัวเป็นเซลล์ลูกสองเซลล์ เรียกว่า

merozoites ตามลักษณะเฉพาะจะมีลักษณะเป็นรูปลูกแพร์ แต่ก็อาจมีรูปกลม หรือรูปรี ยาวประมาณ 1-2.5 ไมโครเมตร (2) merozoites จะออกจากเม็ดเลือดแดงเซลล์เก่าและเข้าสู่เม็ดเลือดแดงเม็ดใหม่ เจริญเป็น trophozoites และเพิ่มจำนวนอย่างไม่มีเพศต่อไปเรื่อยๆ จนกว่าโคกระบือจะตาย หรือเชื้อถูกกำจัดออกมานอกร่างกาย แต่มีเม็ดเลือดแดงบางเซลล์ที่มี trophozoites อยู่จะเข้าสู่ทางเดินอาหารของเห็บ เมื่อเห็บดูดเลือดโคกระบือที่มีเชื้ออยู่ และเจริญต่อไปเป็น gametes เพศผู้และเพศเมีย หลังจากที่โคกระบือดูดเลือดได้ 2-4 วัน จากนั้น gametes ทั้งสองเพศจะรวมตัวกันและเปลี่ยนเป็น primary kinete หรือ ookinete ซึ่งจะเข้าสู่เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารของเห็บ และมีขนาดโตขึ้น พร้อมทั้งมีการแบ่งตัวแบบ multiple fission (sporogony) และเจริญเป็น sporokinetes

sporokinetes จะออกจากทางเดินอาหารของเห็บ กระจายไปยังเซลล์ทั่วร่างกายของเห็บเพื่อสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศอีก รวมทั้งเข้าสู่ oocytes ของเห็บเพศเมีย ดังนั้นลูกเห็บที่เกิดมาใหม่จะมีเชื้อนี้อยู่ในตัว ซึ่งเป็นการถ่ายทอดแบบ transovarian transmission (2) เมื่อ larvar ของเห็บเกาะที่โคกระบือประมาณ 1 วัน sporokinetes จะเข้าสู่เซลล์ต่อมน้ำลายและเปลี่ยนแปลงเป็น sporozoites จากนั้นเข้าสู่โคกระบือเพื่อเริ่มวงจรในโคกระบืออีกหน

ระยะฟักตัวของโรคนานประมาณ 1-2 สัปดาห์ หลังจากที่โคกระบือถูกเห็บที่มีเชื้อกัด อาการโดยทั่วไปอุณหภูมิของร่างกายจะสูง 41-42 องศาเซลเซียส มีไข้สูงประมาณวันที่ 7-10 หลังการติดเชื้อ หรือหลังจากที่ปัสสาวะเป็นสีแดงเพียงไม่นาน อาการโลหิตจางและปัสสาวะเป็นสีแดงเกิดจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลาย ส่วนการเกิด anoxia เนื่องจากเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อจะเกาะกันและอุดตันเส้นเลือดฝอยตามเนื้อเยื่อต่างๆ โดยเฉพาะ สมองซึ่งมีผลทำให้สัตว์ตายได้ (4) หากไม่ได้รับการรักษาให้ทันท่วงที



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของเชื้อ *B. bovis*

(จาก Young, A.S. และ Mozaria, S.P., 1986 (2))

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *B. bovis*

การตรวจด้วยวิธีการต่างๆ ควบคู่กับอาการทางคลีนิค

1. การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination)

เป็นการตรวจเชื้อในเม็ดเลือดแดงในแผ่นเลือดแบบ thick blood film หรือ thin blood film ย้อมด้วยสี Giemsa หรือสี Wright เป็นวิธีที่ง่ายแต่ต้องอาศัยผู้ที่ชำนาญและมีประสบการณ์สูงในการแยกเชื้อ *B. bovis* ออกจากเชื้อ *Babesia bigemina* ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกันมาก (5)

2. การตรวจทางซีโรโลจิคอล (Serological method)

อาศัยการจับที่จำเพาะของแอนติบอดี้กับแอนติเจน เช่น วิธีIFAT (Indirect Fluorescenct Antobody Test) ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบ *B. bigemina* (6) นอกจากนี้ยังมีวิธี ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay) ถูกนำมาใช้ในการตรวจหา *B. bovis* ในโค (7) วิธีเหล่านี้มีประโยชน์สำหรับแยกชนิดของ *Babesia* ในสัตว์แต่ละตัวซึ่งใช้ในการศึกษาด้านระบาดวิทยา แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นการสัมผัสเชื้อในอดีต หรือในปัจจุบัน

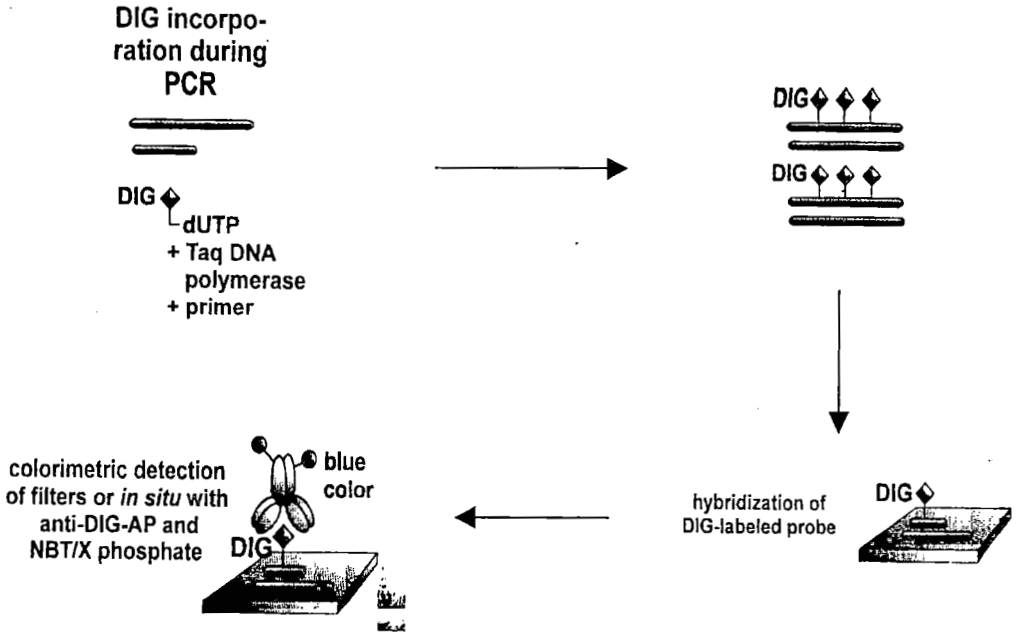
3. การตรวจโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction ; PCR)

เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบปาราสิตชนิดต่างๆ เช่น *B. bovis* (8) และ *Trypanosome evansi* (9) แต่เทคนิค PCR มีข้อจำกัดคือ วิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (Agarose Gel Electrophoresis) ซึ่งต้องย้อมด้วย ethidium bromide และส่องดูด้วยภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ทำให้ผู้ปฏิบัติต้องสัมผัสกับ ethidium bromide ที่เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) และแสงอัลตราไวโอเลตซึ่งก่อให้เกิดมะเร็งได้

4. การตรวจโดยเทคนิค PCR-ELISA (PCR-ELISA)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค PCR-ELISA มาใช้ในการตรวจหาเชื้อปาราสิตชนิดต่างๆ เช่น *Anaplasma marginale* (10) และ *Leishmania* (11) เทคนิค PCR-ELISA เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง เทคนิค PCR-ELISA เป็นการติดฉลากชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเชื้อนั้นด้วยสารเคมีที่ไม่เป็นอันตรายเช่น Digoxigenin (DIG-11-dUTP) โดยปฏิกิริยา PCR จากนั้นติดตามดีเอ็นเอชิ้นที่จำเพาะโดยการนำมาไฮบริไดซ์กับไพรเมอร์ที่ติดด้วยสาร biotin (internal primer) ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสในชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR จากนั้นนำไปจับกับสาร streptavidin ที่เคลือบไว้บน microtiter plate และทำให้เกิดสีต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 3 การตรวจหาเชื้อต่างๆ โดยเทคนิค PCR-ELISA สามารถทำได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน ทำให้การตรวจเชื้อทำได้ง่าย รวดเร็วและประหยัดเวลา ทั้งผู้ตรวจสอบไม่ต้องสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเลต และ ethidium bromide

โรคที่เกิดจากเชื้อ *B. bovis* นี้มีความรุนแรงและทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการผลิตน้ำนมและเนื้อ เพื่อใช้ในการบริโภค เนื่องจากโคและกระบือที่ติดเชื้อนี้ผลิตน้ำนมและเนื้อที่มีคุณ



รูปที่ 3 แผนภาพของการทำ PCR-ELISA

ภาพต่ำกว่ามาตราฐานและยังอาจทำให้พ่อแม่พันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศในราคาแพงตายได้ ดังนั้นผู้วิจัย เห็นว่าการพัฒนาหาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *B. bovis* ให้มีความไวและความจำเพาะสูง สะดวก ประหยัด เวลา และปลอดภัย มีความจำเป็นสำหรับการการตรวจสอบเชื้อในเลือดของสัตว์ ในขณะที่มีปริมาณเชื้อน้อยๆ หรือในสัตว์ที่เป็นพาหะของโรค เพื่อป้องกันและลดความเสียหายจากโรคดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้พยายามพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *B. bovis* โดยเทคนิค PCR-ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น

<u>วัตถุประสงค์ของโครงการ</u>

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *B. bovis* ในเลือดโคกระบือโดย เทคนิค PCR-ELISA

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

สามารถตรวจหาเชื้อ *B. bovis* ในเลือดโคกระบือ ได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อป้องกันและลดความเสียหายที่เกิดจากโรคบาบีซีโอซีส รวมทั้งเป็นข้อมูลในระบาดวิทยาอีกด้วย

วิธีการทดลอง สารเคมี และ วัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

- กรดบอริก (boric acid)
- กรดอะซิติก (acetic acid)
- กรดเอทีลีนไดเอมีนเตตระอะซิติก (ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA)
- กรดไฮโดรคลอริก (hydrocholic acid)
- คลอโรฟอร์ม (chloroform)
- โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)
- โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate)
- โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate)
- ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate : dNTPs)
- ดีเอ็นเอมาตราฐาน (DNA standard marker)
- ไตรตรอนเอ็กซ์ –100 (Triton X-100)
- ทริสเบส (trisbase)
- ฟีนอล (phenol)
- วุ้นอะกาโรส (agarose)
- เอธานอล (ethanol)
- เอธีเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)
- เอนไซม์โปรตีนเนส-เค (proteinase K)
- เอนไซม์แทคดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase)
- เอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase)
- ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเลือด (Insta Gene Whole Blood Kit) ของ BIO RAD
- ชุด PCR-ELISA (DIG Labeling) ของ Boehringer Mannheim
- ชุด PCR-ELISA (DIG Detection) ของ Boehringer Mannheim

อุปกรณ์

- เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycler ; Perkin Elmer 9600)
- ชุดอิเลคโตรโฟรีซีส (eletrophoresis chamber)
- เครื่องแปลงกระแสไฟฟ้า (power supply)
- กล่องผลิตแสงอัลตราไวโอเลต (UV-transilluminator)
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

- ตู้อบความร้อน (hot air oven)
-เครื่องเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- เครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน (hotplate stirrer)
- เครื่องชั่งวิเคราะห์ (analytical balance)
- กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์ชนิดมือถือ (Polaroid camera)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath)
- ไมโครปิเปต (micropipette)
- หลอดทดลองขนาดเล็ก (microtube)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสงช่วงคลื่นที่มองเห็นได้และอัลตราไวโอเลต (UV-Vis spectrophotometer)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสงสำหรับ microtiter plate (Microplate reader ; BioRad Model 3550 UV)

วิธีการทดลอง

1 การเตรียมโคทดลอง

เจาะเลือดลูกโคอายุ ประมาณ 8 เดือน ซึ่งเลี้ยงไว้ในคอกที่ปลอดจากเห็บโค เพื่อตรวจหาเชื้อปาราสิตต่างๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และตรวจหาแอนตี้บอดี้ต่อเชื้อ *B. bovis* โดยวิธี IFAT ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่าลูกโคปลอดจากเชื้อ *B. bovis* และเชื้อปาราสิตในเลือดชนิดอื่นๆ ก่อนตัดม้ามออก จากนั้นจึงนำเลือดซึ่งมีเชื้อ *B. bovis* (TS4) ได้มาจากโคในอำเภอทุ่งสงจังหวัดนครศรีธรรมราช และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวและมี % parasitemia = 9 ผสมกับ 4 M DMSO ในอัตราส่วน 1:1 นำเลือดนี้ปริมาณ 1.5 มล. ฉีดเข้าลูกวัวที่ถูกตัดม้าม จากนั้นทำการวัดอุณหภูมิ เจาะเลือดเพื่อวัดปริมาณ PCV และตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทำ PCR-ELISA ทุกวัน จนได้ peak ของ % parasitemia แล้วจึงเจาะเลือดจากลูกโคเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป โดยการเจาะเลือดโคปริมาตร 450 มล ใส่ในถุงที่บรรจุสารกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) จากนั้นนำเลือดไปปั่นเพื่อแยกซีรั่มแล้วนำไปผ่าน คอลัมน์ CF-11 (Whatman) เพื่อกำจัดเม็ดเลือดขาวของโคออก นำเม็ดเลือดแดงที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ

2. การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis*

2.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis* สำหรับปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลอง (12)

นำเม็ดเลือดแดงมาทำให้เซลล์แตกด้วย 1% acetic acid ที่เย็นจำนวนสองเท่าของ

ปริมาตร จากนั้นปั่นที่ 5,000 rpm นาน 10 นาที และเทน้ำใสส่วนบนทิ้ง แล้วเติม 1 % Triton X-100 จำนวนสองเท่าปริมาตร ปั่นที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที เทน้ำส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย TS บัฟเฟอร์ (10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 8.0, 10 มิลลิโมลาร์ EDTA, 0.85 % NaCl) เติมสารละลาย proteinase K (2 % SDS, proteinase K 500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จำนวนหนึ่งเท่าปริมาตร โดยบ่มที่ 37 °ซ นาน 15-18 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่า สกัด proteinase K ออกด้วยการเติมสารละลาย Phenol อิ่มตัวหนึ่งเท่าปริมาตรของสารละลาย แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 10 นาที นำสารละลายชั้นบนที่ได้มาเติม Phenol-Chloroform ปริมาณสองเท่าปริมาตร ปั่นที่ 12,000 rpm นาน 10 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง แล้วจึงเติมเอนไซม์ RNase ที่ปราศจาก DNase ลงในสารละลายชั้นบนที่สกัดได้ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง สกัด RNase ออกด้วย Phenol-Chloroform เหมือนข้างต้น นำสารละลายที่ได้มาเติม sodium acetate เข้มข้น 3 โมลาร์ จำนวน 0.1 เท่าปริมาตร และเติม absolute ethanol ที่เย็น จำนวนสองเท่าปริมาตร เก็บที่ –20 °ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 12,000 rpm นาน 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ที่เย็น จำนวน 2 ครั้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 7.4, 1 มิลลิโมลาร์ EDTA) นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอีเลคโตรโฟรีซีส เข้มข้น 0.7% และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร (20 $A_{260\ nm}$ = 1 มก./มล.)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดตัวอย่าง (Insta Gene Whole Blood Kit)

ปิเปตเลือดที่ได้จากเส้นเลือดดำที่คอ ของโคและกระบือ จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม lysis buffer จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 นาที ปั่นที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้ง แล้วเติม lysis buffer จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดย vortex ประมาณ 30 วินาที นำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที และเทน้ำส่วนบนทิ้ง (ทำซ้ำอีกครั้ง หรือจนกว่าน้ำส่วนบนจะใส) จกนั้นปิเปต resin จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในตะกอนที่ได้ แล้วนำไปบ่มที่ 70 °ซ นาน 8 นาที หลังจากนั้นเขย่าให้เข้ากันโดย vortex และบ่มที่ 95 °ซ นาน 4 นาที ก่อนนำดีเอ็นเอไปใช้ต้องปั่นที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที แล้วปิเปตน้ำส่วนบนจำนวน 5 ไมโครลิตร ไปทำ PCR-ELISA

3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์

ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบโดยใช้โปรแกรม OLIGO version 4.0 จากลำดับเบสของจีนสำหรับเอนไซม์ Carbamoyl Phosphate Synthetase II (CPS II) ของเชื้อ *B.bovis* (13) ทั้งหมด 3 สาย โดย 2 เส้นแรก (external primers) จะเพิ่มจำนวนส่วนของจีน CPS II ซึ่งมีขนาดประมาณ 446 bp ไพรเมอร์

อีกเส้นหนึ่ง (internal primer) ติดฉลากด้วย biotin ที่ด้าน 5' มีลำดับเบสที่จับคู่สมกับ PCR product ของจีน CPS II ได้

primer Bb1	5'	TTT GGT ATT TGT CTT GGT CAT 3'
primer Bb2	5'	ACC ACT GTA GTC AAA CTC ACC 3'
internal primer	5'	TGT GTT GAT TTG CGT ACT TCT 3'

4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis*

นำดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis* ที่เตรียมได้จำนวน 1 นาโนกรัม มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 โดยการเติมสารละลาย PCR ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย 1xPCR buffer (10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 8.3, 50 มิลลิโมลาร์ KCl, 0.01% (w/v) gelatin, 1.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$) , dNTPs ตัวละ 200 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 ตัวละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ เอนไซม์ Taq Polymerase (Promega) 2 U. จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วนำไปทำ PCR ในสภาวะดังนี้

: 95 °ซ นาน 7 นาที	1 รอบ
: 95 °ซ นาน 30 วินาที, 50 °ซ นาน 30 วินาที , 72 °ซ นาน 30 วินาที	35 รอบ
: 72 °ซ นาน 10 นาที	1 รอบ

นำ ดีเอ็นเอผลผลิต ที่ได้ ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรส เจลอิเลคโตรโฟรีซีสเข้มข้น 1 %

5 การทดลองปฏิกิริยา PCR-ELISA ในหลอดทดลอง

5.1 การทำ PCR ของดีเอ็นเอจากเชื้อ *B.bovis* (DIG Labeling ; Boehringer Mannheim)

นำดีเอ็นเอของ *B.bovis* ที่มีปริมาณต่างๆกันคือ 1 นาโนกรัม, 100 พิโคกรัม, 10 พิโคกรัม, 1 พิโคกรัม, 0.1 พิโคกรัม และ 0.01 พิโคกรัม มาเพิ่มจำนวน โดยให้สภาวะสำหรับ PCR และความเข้มข้นสุดท้ายขององค์ประกอบแต่ละตัวในสารละลาย PCR เหมือนกับข้อ 4 ยกเว้น dNTPs ที่ใช้ประกอบด้วย dATP, dGTP, dCTP ตัวละ 200 ไมโครโมลาร์, dTTP 190 ไมโครโมลาร์และ digoxigenin-11-dUTP ใช้ 10 ไมโครโมลาร์ วิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยอะกาโรส เจลอิเลคโตรโฟรีซีสเข้มข้น 1 %

5.2 การทำ ELISA (DIG Detection ; Boehringer Mannheim) (14)

ปิเปต ดีเอ็นเอผลผลิต จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมกับ alkaline denaturation solution 20 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เติม hybridization solution (Biotin-labeled internal probe 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีและปิเปตสารละลายผสมข้างต้นจำนวน 200

ไมโครลิตร ใส่ลงใน microtiter plate ที่เคลือบด้วย streptavidin แล้วนำไปบ่มที่ 42 °ซ นาน 1 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าตลอดเวลา เมื่อครบเวลาเทสารละลายออกจาก microtiter plate ล้างหลุมด้วย washing solution จำนวน 250 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ปิเปต anti-digoxigenin-peroxidase (anti-DIG-POD, Fab fragments) ที่เจือจางในอัตราส่วน 1 : 99 จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 30 นาที พร้อมทั้งเขย่า เสร็จแล้วล้างหลุมด้วย washing solution จำนวน 250 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เติม ABTS substrate solution (2,2'-Azino-di-[3-ethybenzthiazo line sulfonate] หลุมละ 200 ไมโครลิตร และเก็บ microtiter plate ในที่มืดนาน 30 นาที เมื่อครบเวลา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ใช้ reference filter ที่ 490 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate reader (BioRad Model 3550 UV)

5.3 การทดสอบความไวของการตรวจหาเชื้อ *B.bovis* ในเลือดโค

นำเลือดโคที่ติดเชื้อ *B.bovis* (3 % parasitemia) มาเจือจางด้วยเลือดโคที่ไม่ติดเชื้อ เพื่อทำการเจือจางแบบอนุกรม (serial dilution) ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ตั้งแต่ 0.144-0.0000144 % จากนั้นสกัดเลือดในแต่ละความเข้มข้นตามวิธีข้อ 2.2 เพื่อนำไปทำ PCR-ELISA

6. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (15)

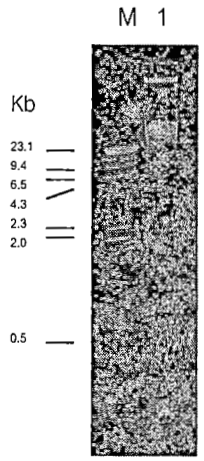
นำวุ้นอะกาโรสใส่ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (89 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, 89 มิลลิโมลาร์ boric acid, 2.5 มิลลิโมลาร์ EDTA) และต้มจนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 60 °ซ จากนั้นนำไปเทใน gel chamber ที่มี comb ตั้งอยู่ และตั้งทิ้งไว้จนอะกาโรสแข็งตัวจึงดึง comb ออก แล้วเทบัฟเฟอร์ TBE (1X) จนท่วมแผ่นวุ้นประมาณ 2 มิลลิเมตร

ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีสำหรับหยอด (loading dye : bromophenol blue และ xylene cyanol) หยอดลงในช่องของแผ่นวุ้น จากนั้นต่อขั้วอิเลคโทรดเข้ากับเครื่องแปลงกระแสไฟฟ้า ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ประมาณ 10 โวลท์/เซนติเมตร นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นวุ้นไปย้อมด้วยสารละลาย ethidiun bromide เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ประมาณ 5 นาที แช่แผ่นวุ้นในน้ำกลั่นประมาณ 10 นาที แล้วนำแผ่นวุ้นไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อดูแบบแผนของดีเอ็นเอ

ผลการทดลอง

การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis*

เมื่อนำเลือดโคที่ติดเชื้อ *B.bovis* ซึ่งได้จากการทำ subinoculation มาแยกเม็ดเลือดขาวออกไป แล้วนำเม็ดเลือดแดงมาทำให้แตก จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี phenol/chloroform แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ได้ดีเอ็นเอที่มีมวลโมเลกุลสูงกว่า 23.1 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 4



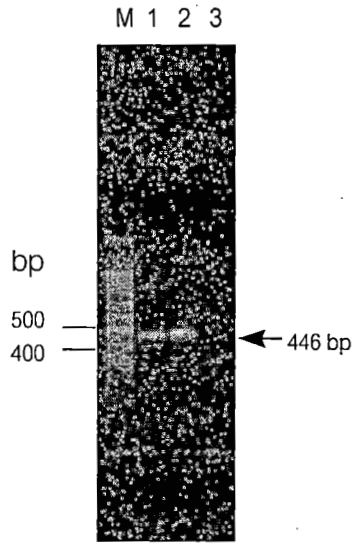
รูปที่ 4 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* ที่สกัดได้
แถวที่ M ดีเอ็นเอมาตราฐาน (λ Hind III)
แถวที่ 1 ดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis*

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis*

นำดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 และวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่ามีดีเอ็นเอผลผลิตขนาดประมาณ 446 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 5

ความไวของการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* โดยเทคนิค PCR-ELISA

เพื่อทดสอบความสามารถในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* โดยเทคนิค PCR-ELISA โดยการเจือจางดีเอ็นเอเป็นแบบอนุกรมจากปริมาณดีเอ็นเอ 1 นาโนกรัม ถึง 0.01 พิโคกรัม เมื่อนำดีเอ็นเอผลผลิต 10 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าสามารถตรวจสอบได้ถึงปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอ 10 พิ โคกรัม (รูปที่ 6) แต่เมื่อนำผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ต่อด้วย ELISA มีผลให้ความไวของการตรวจสอบสูงขึ้นประมาณ 100 เท่า คือตรวจสอบได้ถึง 0.1 พิโคกรัม (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 7)

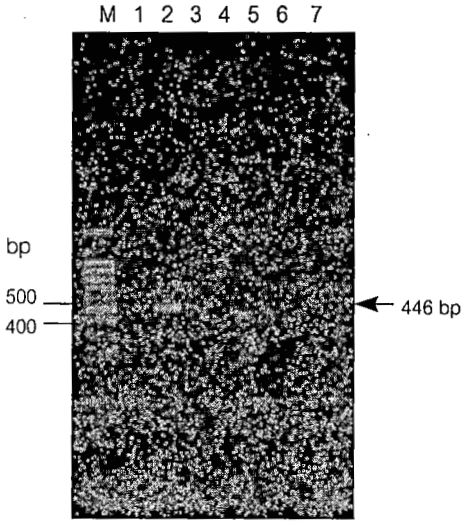


รูปที่ 5 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผลผลิตที่เพิ่มจำนวนได้จากไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2

แถวที่ M ดีเอ็นเอมาตราฐาน (100 bp DNA ladder)

แถวที่ 1 และ 2 ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis*

แถวที่ 3 หลอดควบคุม (reagent control)



รูปที่ 6 ความไวของการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* โดยเทคนิค PCR-ELISA

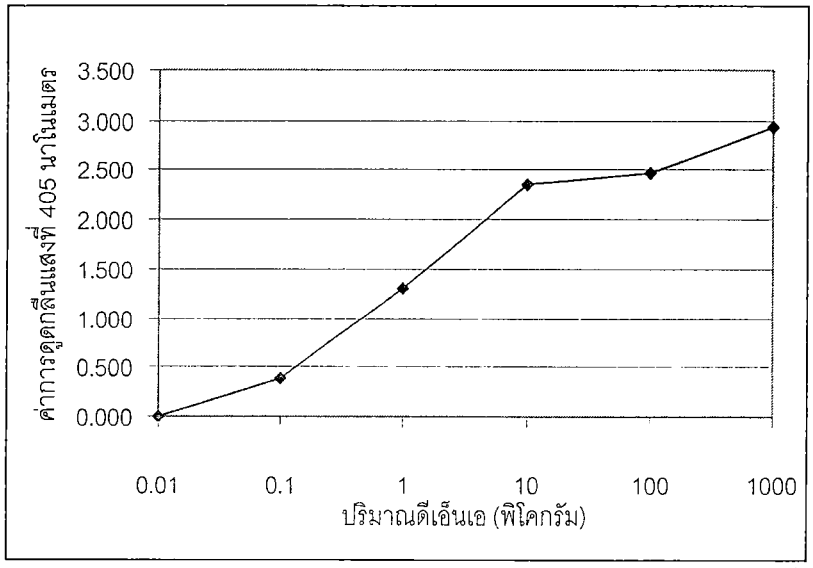
แถวที่ M ดีเอ็นเอมาตราฐาน (100 bp DNA ladder)

แถวที่ 1 หลอดควบคุม (reagent control)

แถวที่ 2-7 ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* จำนวน 1 นาโนกรัม, 100 พิโคกรัม, 10 พิโคกรัม, 1 พิโคกรัม, 0.1 พิโคกรัม และ 0.01 พิโคกรัม ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* โดยเทคนิค PCR-ELISA

ปริมาณดีเอ็นเอ	ผลของ PCR-ELISA	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร
1,000 พิโคกรัม	+	2.945
100 พิโคกรัม	+	2.474
10 พิโคกรัม	+	2.352
1 พิโคกรัม	+	1.300
0.1 พิโคกรัม	+	0.390
0.01 พิโคกรัม	+	0.004
หลอดควบคุม	+	0.004

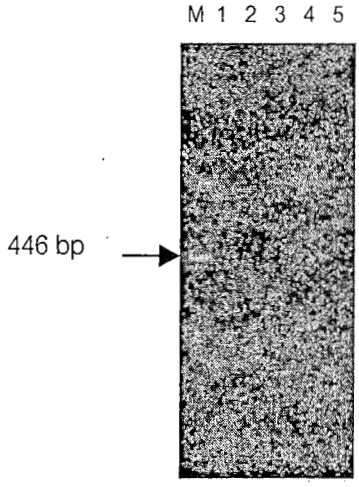


รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร กับปริมาณดีเอ็นเอ

ความไวของการตรวจสอบเชื้อ *B.bovis* ในเลือดโคโดยเทคนิค PCR-ELISA

เลือดโคทดลองที่ติดเชื้อ *B.bovis* และทราบ % parasitemia ถูกเจือจางด้วยเลือดโคที่ไม่ติดเชื้อ จากนั้นนำเลือดที่มีปริมาณเชื้อ *B.bovis* ต่างๆกัน และเลือดโคที่ไม่ติดเชื้อจำนวน 50 ไมโครลิตรมาทดสอบ PCR-ELISA พบว่าการวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ตรวจพบได้ที่ประมาณ 0.0144 % parasitemia (รูปที่ 8) ส่วนผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ELISA สามารถตรวจสอบได้ถึง 0.000144 %

parasitemia (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 9) ซึ่งจุด cut-off ของการตรวจสอบมีค่าเท่ากับ ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงของเลือดโคที่ไม่ติดเชื้อ + 8 ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน หรือเท่ากับ 0.09 (ตารางที่ 3) ในการทดลองนี้ปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ใช้ประมาณ $6.94x10^{6}$ เซลล์ต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ซึ่งทำให้ความไวของการตรวจสอบเท่ากับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ 10 เซลล์ในเลือด 1 ไมโครลิตร



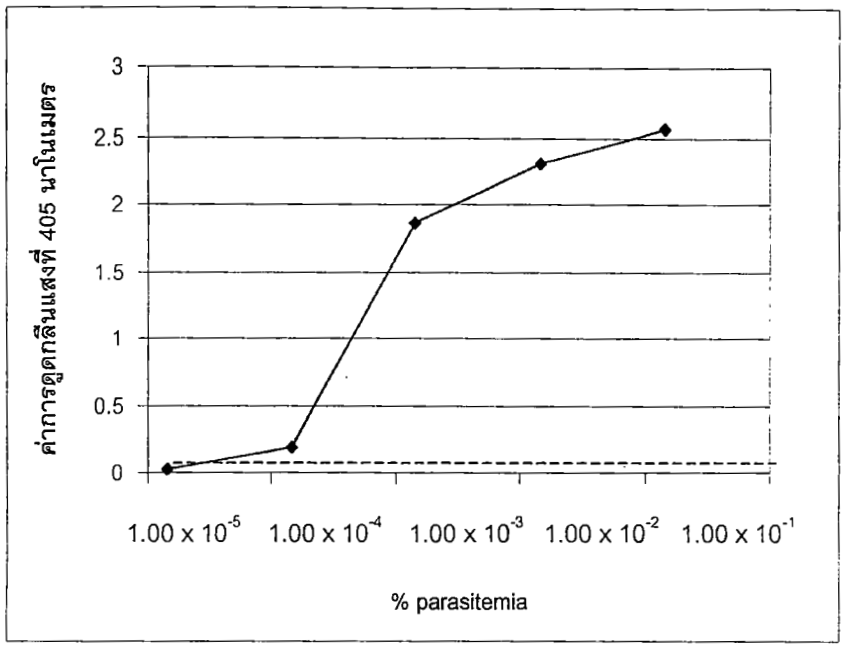
รูปที่ 8 ความไวของการตรวจสอบเชื้อ *B.bovis* ในเลือดโคโดยเทคนิค PCR-ELISA

แถวที่ 1-5 ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากเลือดที่มีเชื้อ *B.bovis* จำนวน $144x10^{-3}$, $144x10^{-4}$, $144x10^{-5}$, $144x10^{-6}$ และ $144x10^{-7}$ % parasitemia ตามลำดับ

แถวที่ 6 เลือดเลือดโคที่ไม่ติดเชื้อ *B.bovis*

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจสอบเชื้อ *B.bovis* ในเลือดโคโดยเทคนิค PCR-ELISA

% parasitemia	ผลของ PCR-ELISA	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร
$144x10^{-3}$	+	2.557
$144x10^{-4}$	+	2.295
$144x10^{-5}$	+	1.859
$144x10^{-6}$	+	0.185
$144x10^{-7}$	-	0.027



รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร กับปริมาณเชื้อ *B.bovis* (% parasitemia)

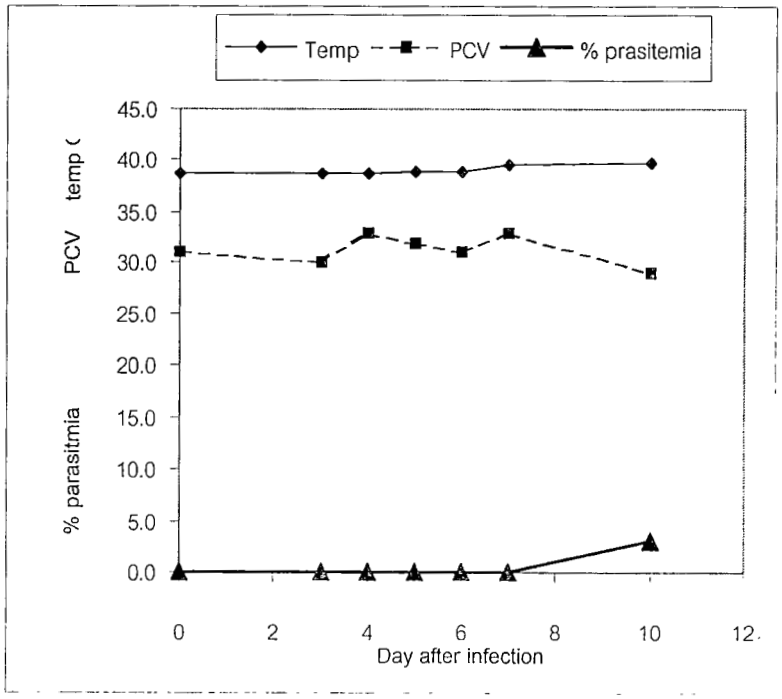
ตารางที่ 3 แสดงผล PCR-ELISA สำหรับเลือดโคที่ไม่ติดเชื้อ *B.bovis* จำนวน 16 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร	ตัวอย่างที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร
1	0.004	9	0.0[illegible]
2	0.010	10	0.01[illegible]
3	0.0[illegible]4	11	0.01[illegible]
4	0.031	12	0.03[illegible]
5	0.031	13	0.031
6	0.03[illegible]	14	0.012
[illegible]	0.03[illegible]	15	0.012
6	0.03[illegible]	1[illegible]	0.012

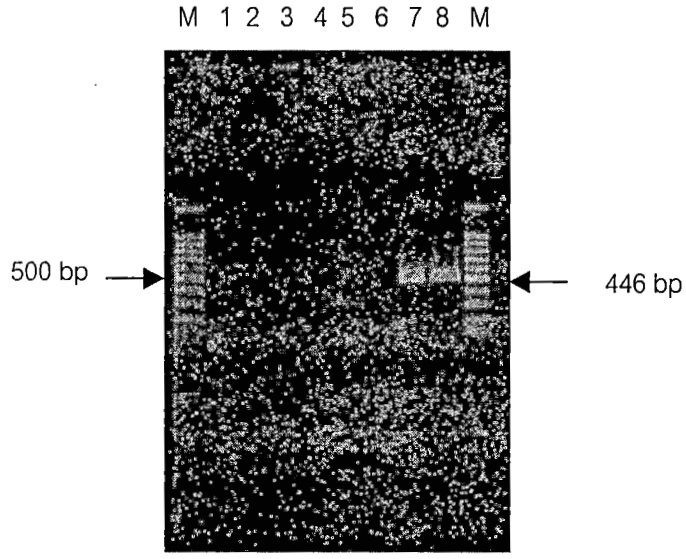
- ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงของเลือดโคที่ไม่ติดเชื้อเท่ากับ 0.017
- ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานเท่ากับ 0.009

การตรวจสอบเชื้อ *B.bovis* ในเลือดโคที่ถูกตัดม้าม (splenectomized calf)

ลูกโคนมเพศผู้ อายุ 8 เดือน ซึ่งถูกตรวจเลือดโดยวิธีตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ และ IFAT ว่าไม่มีการติดเชื้อ *B.bovis* จากนั้นทำการตัดม้ามลูกโค และฉีดเชื้อ *B.bovis* สายพันธ์ TS4 ซึ่งเก็บมาจากอำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช แล้วเจาะเลือดทุกวันเพื่อตรวจสอบหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และ PCR-ELISA พร้อมทั้งวัด PCV (packed cell volume) และวัดอุณหภูมิร่างกาย ผลปรากฏว่าก่อนฉีดเชื้อลูกโคมีอุณหภูมิร่างกายเท่ากับ 38.7 ° ซ แต่หลังจากฉีดเชื้อแล้วอุณหภูมิร่างกายสูงขึ้นเป็นลำดับ และสูงที่สุดที่ 39.8 ° ซ ในวันที่ 10 หลังฉีดเชื้อซึ่งเป็นวันที่ลูกโคตาย และมีปริมาณเชื้อเป็น 3 % parasitemia ซึ่งเป็นวันเดียวที่สามารถตรวจพบเชื้อได้โดยกล้องจุลทรรศน์ และปริมาณเม็ดเลือดแดงแตกมาก มี PCV เท่ากับ 29 % ผลแสดงในรูปที่ 10 สำหรับการตรวจสอบเชื้อ *B.bovis* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA นั้นสามารถตรวจสอบการติดเชื้อในโคทดลองได้ตั้งแต่วันที่ 4 หลังการฉีดเชื้อ ดังแสดงผลในตารางที่ 4



รูปที่ 10 กราฟแสดงการติดตามปริมาณเชื้อ (%parasitemia) อุณหภูมิ และปริมาณ PCV ในโคทดลองที่ฉีดด้วยเชื้อ *B.bovis*



รูปที่ 11 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอผลผลิต (PCR-ELISA) ที่ได้จากการติดตามปริมาณเชื้อ *B.bovis* ในโคทดลอง

แถวที่ M ดีเอ็นเอมาตราฐาน (100 bp DNA ladder)

แถวที่ 1-7 ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากเลือดโคทดลองวันที่ฉีดเชื้อ, วันที่ 3 , 4, 5, 6, 7 และ 10 หลังฉีดเชื้อ *B.bovis*

แถวที่ 8 ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis*

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจสอบเชื้อ *B.bovis* ในโคทดลองโดยเทคนิค PCR-ELISA

วันที่	ผลของ PCR-ELISA	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร
วันที่ฉีดเชื้อ	-	0.016
วันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ	-	0.073
วันที่ 4 หลังการฉีดเชื้อ	+	0.111
วันที่ 5 หลังการฉีดเชื้อ	+	1.450
วันที่ 6 หลังการฉีดเชื้อ	+	2.241
วันที่ 7 หลังการฉีดเชื้อ	-	0.024
วันที่ 10 หลังการฉีดเชื้อ	-	2.326

การตรวจสอบการติดเชื้อ *B.bovis* ในเลือดตัวอย่าง

เลือดจากโคนม 21 ตัวอย่าง โคเนื้อ 18 ตัวอย่าง และกระบือ 14 ตัวอย่าง รวมเป็น 53 ตัวอย่าง จากแหล่งต่างๆ คือ จังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ สระบุรี กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สงขลา นราธิวาส และ ชลบุรี ถูกนำมาทดสอบการติดเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค PCR-ELISA โดยมีจุด cut-off จุดเดียวกับการทดลองในโคทดลองคือ 0.09 พบว่ามีเลือด 5 ตัวอย่าง ที่มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่เหนือจุด cut-off ส่วนเลือดตัวอย่างที่เหลือมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ต่ำกว่าจุด cut-off และไม่มีเลือดตัวอย่างใดเลยที่ตรวจพบเชื้อ *B.bovis* โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงผลในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่าการตรวจสอบเลือดตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ จำนวน 53 ตัวอย่างโดยเทคนิค PCR-ELISA และกล้องจุลทรรศน์

เลือดตัวอย่างที่	แหล่ง	ผลการทดลอง	
		กล้องจุลทรรศน์	ค่าการดูดกลืนแสง
โคนม			
1	สระบุรี	NF	0.068
2	สระบุรี	NF	0.064
3	สระบุรี	NF	0.064
2	สระบุรี	NF	0.064
3	สระบุรี	*A.marginale, B.bigemina*	0.047
6	สระบุรี	*Theileria sp.*	0.047
2	ชลบุรี	NF	0.064
8	ชลบุรี	*A.marginale*	0.008
9	ชลบุรี	*B.bigemina*	0.007
10	ชลบุรี	*B.bigemina*	0.016
11	ชลบุรี	*B.bigemina*	0.007
10	ชลบุรี	NF	0.016
13	ชลบุรี	*Theileria sp.*	0.047
13	ชลบุรี	NF	0.021
13	ชลบุรี	NF	0.006

16	ชลบุรี	*Theileria sp.*	0.008
17	ชลบุรี	*A.marginale, B.bigemina*	0.265*
18	สงขลา	*Theileria sp.*	0.000
19	สงขลา	*Theileria sp., B.bigemina*	0.000
10	สงขลา	*Theileria sp.*	0.000
21	สงขลา	*Theileria sp.*	0.000
โคเนื้อ			
22	กาญจนบุรี	*Theileria sp.*	0.016
21	กาญจนบุรี	NF	0.033
19	กาญจนบุรี	NF	0.008
21	กาญจนบุรี	*T.evansi*	0.012
21	กาญจนบุรี	*Theileria sp.*	-0.003
18	กาญจนบุรี	*Theileria sp.*	0.023
21	กาญจนบุรี	NF	0.669*
19	ประจวบคีรีขันธ์	NF	0.029
30	ประจวบคีรีขันธ์	NF	0.012
21	ประจวบคีรีขันธ์	NF	0.057
21	ประจวบคีรีขันธ์	NF	0.052
30	ประจวบคีรีขันธ์	*T.evansi*	0.028
21	ประจวบคีรีขันธ์	*Theileria sp.*	0.051
35	ประจวบคีรีขันธ์	NF	0.007
36	ประจวบคีรีขันธ์	NF	0.016
36	นราธิวาส	NF	0.042
36	นราธิวาส	NF	0.059
36	นราธิวาส	NF	0.141*
กระบือ			
40	นครราชสีมา	NF	0.026
41	นครราชสีมา	NF	0.033

42	นครราชสีมา	*T.evansi*	0.084
43	บุรีรัมย์	*T.evansi*	0.047
44	บุรีรัมย์	NF	0.002
45	บุรีรัมย์	*T.evansi*	0.0●2
46	บุรีรัมย์	*T.evansi*	0.007
45	บุรีรัมย์	NF	0.002
45	บุรีรัมย์	*T.evansi*	0.0●2
49	บุรีรัมย์	*T.evansi*	0.0●2
50	บุรีรัมย์	NF	0.082
5●	บุรีรัมย์	*T.evansi*	0.082
52	บุรีรัมย์	NF	0.112*
53	บุรีรัมย์	*Theileria sp., B.bigemina*	0.112*

หมายเหตุ NF หมายถึง ตรวจไม่พบเชื้อปาราสิตในเลือดตัวอย่าง

* หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าจุด cut-off

วิจารณ์ผลการทดลอง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* ด้วยไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสของจีน CPS II (13) ได้ดีเอ็นเอผลผลิตขนาดประมาณ 446 คู่เบส ซึ่งเป็นไปตามขนาดที่ควรจะได้คือเท่ากับ 446 คู่เบส ซึ่งไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 เป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงต่อดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* เนื่องจากได้มีการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โดย Tananyutthawongese และคณะ (16) ในปี พ.ศ. 2542 โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 พบว่าไพรเมอร์คู่นี้ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอของปาราสิตชนิดต่างๆ ที่มักพบในเลือด เช่น *B.bigemina*, *A.marginale*, *T.evansi* และ *Theileria sp.* ยกเว้นดีเอ็นเอของ *B.bovis* ดังนั้นการใช้ไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 สามารถหลีกเลี่ยงการเกิดผลบวกปลอมจาก cross-hybridization ที่เกิดจากการที่ไพรเมอร์จับกับบริเวณที่ไม่ใช่เป้าหมายที่แท้จริง .ในการทำ PCR-ELISA นี้จะมีไพรเมอร์อีกหนึ่งสาย (internal primer) ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ ทำให้เพิ่มความจำเพาะ ในการตรวจสอบให้สูงมากยิ่งขึ้น

ปริมาณเชื้อ *B.bovis* ในกระแสเลือดสัตว์ที่ติดเชื้อจะมีปริมาณค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อปริมาณเชื้อในกระแสเลือดมากขึ้น จะทำให้สัตว์มีอาการทางประสาท เช่น กัดฟัน น้ำลายไหล เดินวนหรือวิ่งชนสิ่งต่างๆ และตายในที่สุด เนื่องจากเม็ดเลือดแดงที่มี เชื้อ *B.bovis* อยู่จะไปอุดตันเส้นเลือดในสมอง (17) ดังนั้นการตรวจสอบการติดเชื้อ *B.bovis* ตั้งแต่ยังมีปริมาณเชื้อน้อยๆ จะทำให้รักษาสัตว์เหล่านี้ได้ทันท่วงที แต่มีสัตว์บางตัวที่ติดเชื้อแต่มีปริมาณของเชื้อไม่มาก และไม่มีอาการทางคลินิก ทำให้กลายเป็นพาหะของโรคต่อไป ซึ่งเทคนิค PCR-ELISA นี้มีความไวของการตรวจสอบสูงคือ 0.000144 % parasitemia ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำกว่าระดับของเชื้อ *B.bigemina* (18) ที่ทำให้สัตว์เป็นพาหะของโรค (carrier state) คือน้อยกว่า 0.001 % parasitemia ทั้งยังมีความไวของการตรวจสอบสูงกว่าการวิเคราะห์ดีเอ็นเอผลผลิตด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสถึง 100 เท่า และผู้ตรวจสอบยังไม่ต้องสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเลตซึ่งก่อให้เกิดมะเร็ง หรือไม่ต้องสัมผัสกับสารที่ก่อให้เกิดการผ่าเหล่า เช่น ethidium bromide ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสโดยทั่วไป นอกจากนี้เทคนิค PCR-ELISA ยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจสอบเลือดตัวอย่างที่มีจำนวนมาก สามารถตรวจสอบได้มากถึง 96 ตัวอย่างในคราวเดียว ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมงครึ่ง ในขณะที่การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อยู่ในปัจจุบันนั้นมีข้อจำกัดของเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ ผู้ที่ชำนาญสามารถตรวจได้เพียง 70-80 ตัวอย่างต่อวัน (19) และผู้ตรวจสอบต้องเป็นผู้ที่มีความชำนาญสูง ได้รับการฝึกฝนมาอย่างดีเพื่อที่จะตรวจสอบได้ถูกต้องและแม่นยำ

การตรวจสอบการติดเชื้อ *B.bovis* ในเลือดตัวอย่างโดยเทคนิค นั้นพบว่ามีเลือดตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่างจากทั้งหมด 53 ตัวอย่าง ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าจุด cut-off แต่เลือดเหล่านี้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *B.bovis* ได้โดยกล้องจุลทรรศน์ซึ่งอาจเนื่องจากระดับเชื้อมีอยู่ในปริมาณต่ำมาก จนไม่สามารถตรวจพบได้โดยกล้องจุลทรรศน์ (ตัวอย่างที่ 28 39 และ 52) ส่วนตัวอย่างเลือดที่ 17 และ 53 นั้นพบเชื้อ *B.bigemina* ทั้งสองตัวอย่าง ซึ่งอาจมาจากความผิดพลาดในการจำแนกชนิดของเชื้อ *B.bovis* และ *B.bigemina* ซึ่งทั้งเป็นสายพันธ์ที่พบในโคกระบือ และมีลักษณะที่คล้ายกันมาก ซึ่งจาการศึกษาจะเห็นว่าการตรวจสอบการติดเชื้อ *B.bovis* โดยใช้ทคนิค PCR-ELISA นี้สามารถลดการเกิดผลลบปลอมของการตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์

ปกติการติดเชื้อ *B.bovis* ในลูกโคที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปี นั้นมีต่ำ เนื่องจากมีภูมิต้านทานที่ได้รับจากแม่ ทำให้มีความต้ายทานโรคดีกว่าสัตว์ที่อายุมาก (20) ดังนั้นต้องทำการตัดม้ามลูกโคที่จะใช้ศึกษาการตรวจสอบเชื้อ *B.bovis* ในเลือดโค เนื่องจากม้ามเป็นแหล่งสร้างภูมิคุ้มกันของสัตว์ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งทำลายเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อปาราสิตอยู่ จึงต้องทำการตัดม้ามของโคทดลองเพื่อให้เชื้อเพิ่มจำนวนและทำให้โคเกิดอาการของโรค เหมือนกับอาการของการติดเชื้อในธรรมชาติ จากการทดลองผลปรากฏว่าเทคนิค PCR-ELISA สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ PCR-ELISA ได้ตั้งแต่วันที่ 4 หลังฉีดเชื้อในขณะที่ยังไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับตัวอย่างเลือดในวันที่ 7 หลังการฉีดเชื้อไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ทั้งสองวิธี อาจเนื่องมาจากสาเหตุต่างๆ เช่น ปริมาณเชื้อ *B.bovis* ในกระแสเลือดมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นๆลงๆ ตลอดเวลา (21) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงระดับของเชื้อจะลดต่ำลงกว่าระดับความไวของการตรวจสอบ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเชื้อในกระแสเลือดจะไม่ลดต่ำลงเป็นเวลานาน อีกสาเหตุหนึ่งคือ ประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน รวมทั้งความสะอาดของการสกัดมีผลให้ปริมาณดีเอ็นเอแม่พิมพ์ลดลง หรือมีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR หรืออาจเกิดจากทั้งสองสาเหตุรวมกัน (8)

ดังนั้นการตรวจสอบเชื้อ *B.bovis* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA นี้สามารถนำมาตรวจสอบในเลือดโคและกระบือที่ติดเชื้อแล้ว แต่ยังไม่แสดงอาการ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและมีความไวของการตรวจสอบสูง ซึ่งจะมีผลให้การควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อทำได้ทันเวลา และยังใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของยาต้านเชื้อ *B.bovis* ทั้งยังใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถของวัคซีนว่าสามารถเหนี่ยวนำ หรือป้องกันไม่ให้สัตว์เป็นพาหะของโรค

ขอขอบคุณ

ฝ่ายปาราสิต สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *B.bovis* จากเลือดโคและเลือดตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ และวิธี IFAT

เอกสารอ้างอิง

1. Mahoney, D.F. *Babesia* of domestic animals. In : Parasitic protozoa. Vol. 4 Edited by Kreir, J.P. New York : Academic Press, 1979 : 1-43.
2. Young, A.S. and Morzaria, S.P. Biological of *Babesia*. Parasitol Today 1986 ;2(8) : 211-219.
3. Tsieh Sun. Babesiosis. In :Parasitic disorder :pathology, diagnosis and management. 2nd ed. Maryland : Williams & Wilkins, 1999 : 137-144.
4. Blood, D.C., Rodostits, O.M., Arundel, J.H. and Gay, C.C. Disease caused by protozoa. In : Veterinary Medicine. 7 th ed. London : Bailliere Tindoll, 1989.
5. Bishop, J.P. and Adams, L.G. Combination thin and thick blood films for the detection of *Babesia* parasite. Am J Vet Res 1973 ; 34(9) : 1213-1214.
6. Ristic, M. and Sibinovic, S. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescence antibody test. Res Vet Sci, 1964 : 557.
7. Kung, M.W. and Goodger, B.V. A slide enzyme-linked immunosorbent assay (SELISA) for the diagnosis of *Babesia bovis* infection and for the screening of Babesia-specific monoclonal antibodies. Inter J Parasitol 1990 ; 20(3) : 341-345.
8. Farimal, Y., Goff, W.L. and Jasmer, D.P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using Polymerase Chain Reaction amplification of parasite DNA. J Clin Microb 1992 ; 30 : 1374 - 1379.
9. Wuyts, N., Chokesajjawatee, N. and Panyim, S. A simplified and highly sensitive detection of *Trypanosome evansi* by DNA amplification. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1994 ; 25 : 266-271.
10. Gale, K.R., Dimmock, C.M., Gartside, M. and Leatch, G. *Anaplasma marginale* : Detection of carrier cattle by PCR-ELISA. Int J Parasit 1996 ; 26(10) : 1103-1109.
11. Pinero, J., Martines, E., Pacheco, R., et.al. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. Acta Tropica 1999 ; 73 : 21-29.
12. Tungpradapkul, S., Panyim, S., Wilairat, P. and Yuthavong, Y. Analysis of DNA from various species and strains opf malaria parasites by restriction endonuclease fingerprinting. Comp Biochem Physiol 1983 ; 74b : 481-485.
13. Chansiri, K . and Bagnara, A.S. The structural gene for carbamoyl phosphate

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

synthetase from the protozoan *Babesia bovis*. Mol Biochem Parasitol 1995 ; 54 : 87-96.

14. Boehringer Mannheim. PCR-ELISA (DIG labeling and DIG detection) : application mannual. Molecular Biology Boehringer Mannheim 1996 : 1-4.
15. สุมาลี ตั้งประดับกุล. คู่มือปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม 1 : การขยายยีนและการตัดต่อยีนจากโครโมโซม. ภาควิชาชีวเคมี และโครงการอณูพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2533 : 15-19.
16. Tananyutthawongese, C., Saengsombut, K. , Sukhumsirichat, W., et.al. Detection of bovine hemoparasite infection using Multiplex Polymerase Chain Reaction. Science Asia 1999 ; 25 (2) : 85-90.
17. Wright, I.G., Goodger, B.V., Buffington, G.D., et.al. Immunopathology of babesial infection. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1989 ; 83, Supp : 11-13.
18. Reddy, G.R. and Dame, J.B. rRNA-based method for sensitive detection of *Babesia.bigemina* in bovine blood. J Clin Microbiol 1992 ; 30(7) : 1811-1814.
19. Robert, B.J., Trairat, B., Jeanne, M.C., et.al. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the PCR. Am J Trop Med Hyg 1992 ; 46(4) : 416-426.
20. เอกสารส่งเสริมสุขภาพสัตว์. โรคไข้เห็บโค. ฝ่ายถ่ายทอดเทคโนโลยีและศูนย์สารสนเทศ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์; 2535 1-2.
21. Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S. and Buening, G.M. Detection of *Babesia bigemina* –infected carriers by Polymerase Chain Reaction amplification. J Clin Microbiol 1992 ; 30(10) : 2576-2582.

571.999
ก 3163
ฉ. 2

146403