



วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.

KKU Veterinary Journal

ISSN 0858-2297



RESEARCH ARTICLE

A comparative study of routine rapid test and polymerase chain reaction (PCR) assays to diagnose canine tick-borne disease and associated clinical signs and hematological findings in Chonburi Province, Thailand

Tonnam Chatbut¹, Weranon Rungrueng¹, Peeranat Sangsittayakorn¹, Wipa Khiewsalab², Sarut Muangsri², Wachirawit Chatmontee³, Kulchai Nakbubpa², Suttitas Tongkamsai^{2*}

¹5th year student, Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Tawan-ok Chonburi, 20110, Thailand.

²Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Chonburi, 20110, Thailand.

³Graduate student in Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Chonburi, 20110, Thailand.

*Corresponding author E-mail: suttitas_to@mutto.ac.th

Received 3 January 2023, Revised 28 March 2023 Accepted 21 April 2023, Published 25 June 2023

Abstract

Objectives: To compare commercial test and polymerase chain reaction (PCR) techniques for canine tick-borne disease diagnosis and to evaluate the correlation of clinical signs and hematological profile with the disease.

Materials and Methods: Forty-five blood samples that had positive results with commercial test kits (SNAP 4DX Plus) for canine tick-borne pathogens were stored. Those samples were tested for molecular detection of *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma platys*, and *Ehrlichia canis* by PCR technique. In addition, the prevalence of infection, related clinical signs, and hematological profile were analyzed using the Chi-square test.

Results: In this study, *Anaplasma platys* are the most hemoparasites found. Mixed infection of tick-borne pathogens was found in more than a single infection. Lymphopenia was associated with mixed infections; *A. platys* + *B. canis*, *A. platys* + *H. canis*, *B. canis* + *H. canis*, *A. platys* + *B. canis* + *H. canis* ($p < 0.05$). In addition, *B. canis* was associated with pale mucous membranes ($p < 0.05$). Overall, the result shows that the number of positive samples with rapid test kits did not match those with PCR tests (75.56%).

Conclusion: Regarding this study's results, rapid test kits could not detect mixed and *B. canis* infections. Mixed infections were associated with the critical hematological profile (Lymphopenia). *B. canis* infections were associated with the apparent clinical sign (pale mucous membranes). We concluded that veterinarians should diagnose hemoparasitic disease in dogs based on clinical signs and hematological profiles. Detection of hemoparasite could be done by PCR for increasing diagnostic accuracy.

Keywords: : Hemoparasitic infection, polymerase chain reaction (PCR) technique, clinical diagnosis

การศึกษาเปรียบเทียบการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปและเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (พีซีอาร์) ในการวินิจฉัยโรคที่มีเห็บเป็นพาหะของสุนัขและความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิกและค่าโลหิตวิทยาในจังหวัดชลบุรี

ต้นน้ำ ซาติบุตร¹, วีระนนท์ รุ่งเรือง¹, พิรณัฐ สังสิทธิ์ยากร¹, วิภา เขียวสลัป², ศรุต ม่วงศรี², วชิรวิทย์ ซาติมนตรี³, กุลชัย นาคบุปผา², สุธิตัทศน์ ทองคำใส^{2*}

¹นักศึกษาระดับปีที่ 5 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตบางพระ 20110

²คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตบางพระ 20110

³นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตบางพระ 20110

*ผู้ประพันธ์บรรณกิจ อีเมล: suttitas_to@rmutto.ac.th

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีเห็บเป็นพาหะในสุนัขจากชุดตรวจสำเร็จรูปและเทคนิค PCR และหาความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิกและค่าโลหิตวิทยาที่สำคัญ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ เก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 45 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป (SNAP 4DX Plus) และทำการยืนยันผลการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดของสุนัขจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma platys* และ *Ehrlichia canis* รวมทั้งบันทึกข้อมูลความชุกของเชื้อ อาการทางคลินิก และค่าทางโลหิตวิทยา เพื่อใช้หาความสัมพันธ์ทางสถิติด้วยวิธี Chi-square test

ผลการศึกษา จากผลการศึกษาการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขด้วยเทคนิค PCR พบความชุกการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดชนิด *A. platys* มากที่สุด และรูปแบบการติดพบว่าการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป (mixed infection) มากกว่าการติดเชื้อเพียงชนิดเดียว (single infection) โดยที่การติดเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป (*A. platys* + *B. canis*, *A. platys* + *H. canis*, *B. canis* + *H. canis* และ *A. platys* + *B. canis* + *H. canis*) มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อภาวะ lymphopenia รวมทั้งการติดเชื้อชนิด *B. canis* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อการเกิดอาการทางคลินิกคือ เยื่อเมือกซีด และจากการศึกษายืนยันผลด้วย PCR พบว่า สุนัขที่ให้ผลบวกต่อชุดตรวจสำเร็จรูป มีผลไม่ตรงกับ PCR เป็นส่วนใหญ่ (75.56%)

สรุป จากผลการศึกษาพบว่าชุดตรวจสำเร็จรูปไม่สามารถตรวจการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไปและการติดเชื้อ *B. canis* ได้ การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิดมักจะทำให้เกิดภาวะ lymphopenia และการติดเชื้อ *B. canis* มีความเกี่ยวข้องกับภาวะเยื่อเมือกซีดอย่างชัดเจน ดังนั้นสัตวแพทย์ควรจะทำการศึกษาวินิจฉัยโรคพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขด้วยการสังเกตอาการทางคลินิกและค่าทางโลหิตวิทยา ร่วมกับการยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR เพื่อให้การตรวจวินิจฉัยมีความแม่นยำมากขึ้น

คำสำคัญ: การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือด, เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (พีซีอาร์), การตรวจวินิจฉัยทางคลินิก

บทนำ

โรคพยาธิเม็ดเลือดในสุนัข เป็นโรคที่ติดต่อโดยมีเห็บเป็นพาหะ (Tick-borne disease) มีสาเหตุมาจากเชื้อโปรโตซัวและริคเก็ตเซียหลายชนิด เช่น *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma platys* และ *Ehrlichia canis* (Ahantarig et al., 2008) จากการศึกษาโรคพยาธิเม็ดเลือดที่ผ่านมา พบว่ามีการระบาดในหลายพื้นที่ของประเทศไทย โดยในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรีได้ทำการตรวจการติดเชื้อด้วยวิธีสเมียร์ฟิล์มเลือดบางจำนวนทั้งสิ้น 2,292 ตัวอย่าง พบว่า ความชุกของการติดเชื้อคือ 22.20% โดยเชื้อที่พบมากที่สุดคือ *E. canis* (16.97%) (Wong-sawang and Jeimthaweeboon, 2020) ในทางปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิเม็ดเลือด สัตวแพทย์มักจะใช้การซักประวัติและผลตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การตรวจดูค่าเม็ดเลือดโดยรวมและค่าเคมีในเลือด ที่บ่งชี้ถึงการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือด เช่น เกล็ดเลือดต่ำ โลหิตจางเม็ดเลือดขาวสูงในช่วงแรกของการติดเชื้อ เม็ดเลือดขาวต่ำในช่วงท้ายของการติดเชื้อ ระดับอัลบูมินในเลือดต่ำกว่าปกติ และการมีสารประกอบไนโตรเจนในเลือดมากเกินไป (Sainz et al., 2015) จากนั้นจะทำการตรวจเพื่อยืนยันพยาธิเม็ดเลือดซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป ซึ่งเป็นการตรวจหาภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยวิธีนี้มีข้อจำกัดที่สามารถตรวจเชื้อได้เพียงบางชนิดเท่านั้น ได้แก่ *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *Borrelia burgdorferi*, *E. canis* และ *E. ewingii* และอีกวิธีก็คือการนำฟิล์มเลือดที่ย้อมสีไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูโครงสร้างของเชื้อ ซึ่งวิธีนี้มีความไวต่ำ แต่มีความจำเพาะสูงจากนั้นจะทำการรักษาโดยวิธีการจ่ายยาปฏิชีวนะ ซึ่งถ้าหากมีการวินิจฉัยที่ไม่ถูกต้อง จะทำให้การรักษาไม่มีประสิทธิภาพ หรือในกรณีการจ่ายยาปฏิชีวนะที่เกินความจำเป็น ก็อาจจะก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อได้ การตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) จะสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อได้ตั้งแต่การติดเชื้อในระยะแรก มีความไวและจำเพาะสูง ซึ่งจะเป็นการบ่งชี้ได้ว่าสัตว์กำลังมีการติดเชื้ออยู่ในขณะนั้น (Sathish et al., 2021; Taweethavon-sawat, 2012) โดยการศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อยืนยันผลการวินิจฉัยที่ได้จากการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปด้วยเทคนิค PCR และหาความสัมพันธ์กับอาการ และค่าโลหิตวิทยาที่สำคัญ โดยสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการตัดสินใจในการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคพยาธิเม็ดเลือดและโรคอื่นๆในทางคลินิกต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วิธีการเลือกตัวอย่างและการเก็บข้อมูล

ทำการเลือกตัวอย่างเลือดสุนัขที่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อเพียงชนิดเดียว (single infection) และการติดเชื้อร่วมกัน (co-infection) ของเชื้อทั้งสองชนิด ได้แก่ *A. platys* และ *E. canis* ต่อการตรวจพยาธิเม็ดเลือดด้วยวิธีการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (SNAP 4Dx Plus) จำนวน 45 ตัวอย่าง โดยเก็บในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด *Ethylendiaminetetraacetic acid* (EDTA) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจการติดเชื้อด้วยเทคนิค PCR จำนวน 4 เชื้อ ได้แก่ *B. canis*, *H. canis*, *A. platys* และ *E. canis* พร้อมทั้งบันทึกอาการทางคลินิกที่สนใจ ได้แก่ ซึม (depress) เยื่อเมือกซีด (pale mucous membrane) เบื่ออาหาร (anorexia) และอาเจียน (vomit) เป็นต้น และบันทึกค่าโลหิตวิทยาที่สนใจ ได้แก่ จำนวนเกล็ดเลือดต่ำกว่าปกติ (thrombocytopenia) จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลสูงกว่าปกติ (neutrophilia) จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ต่ำกว่าปกติ (lymphopenia) เป็นต้น ซึ่งถูกตรวจด้วยเครื่อง auto hematology analyzer (mindray)

การตรวจเชื้อโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

ตัวอย่างเลือดของสุนัขปริมาณ 200 µl ถูกนำมาสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดสกัด DNA G-spin™ Total DNA Extraction Mini Kit (iNtRON Biotechnology) จากนั้นนำสารพันธุกรรม (DNA) มาวัดค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์โดยใช้ Spectrophotometer (Thermo Scientific) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำ DNA มาทำการเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วน DNA ของเชื้อ โดยใช้ Primers สำหรับ *A. platy* ที่ส่วนของยีน 16S ribosomal RNA คือ 5'-GGGCATGTAGGCGGTTTCG-3' และ 5'-CTCATCGTTTACAGCGTGGA-3' โดยผลที่ได้จะได้ product size 250 bp (Rucksaken et al., 2019), Primers สำหรับ *E. canis* ที่ส่วนของยีน virB9 คือ 5'-CCATAAGCATAGCTGATA-ACCCTGTTACAA-3' และ 5'-TGGATAATAAACCGTACTATGTATGCTAG-3' โดยผลที่ได้จะได้ product size 380 bp ในขณะเดียวกัน Primers สำหรับ *B. canis* และ *H. canis* ที่ส่วนของยีน 18S ribosomal RNA ตามลำดับดังนี้ *B. canis*:

5'-CAGGGCTAATGTCTTGTAAATTGG-3' และ 5'-ATTTCTCT-CAAGCTCCTGAAGG-3' โดยผลที่ได้จะได้ product size 557 bp และ *H. canis*: 5'-TTAACGGGGGATTAGGGTTC-3' และ 5'-CGGCCTGCTAGAAACACTCT-3' โดยผลที่ได้จะได้ product size 437 bp (Laummaunwai et al., 2014) โดยจะใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบดั้งเดิม (Conventional PCR) เตรียมแต่ละ reaction ปริมาตรรวม 26 µl ที่ประกอบด้วย PCR master mix (PCRBIO SYSTEMS) reverse osmosis (RO) water forward และ reverse primer และ DNA โดยมีวงรอบของการทำ PCR เริ่มจาก initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบและ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และจบด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง Thermal cycler (Bio-Rad T100) นำผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) มาทำการแยกวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใน 2% agarose gel โดยย้อมสีเจลด้วย Nucleic Acid Staining Solution (RedSafe™) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำเจลไปตรวจสอบการปรากฏแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง gel documentation (Daihan WGD20)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

หาความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิก ได้แก่ depress, pale mucous membrane, anorexia และ vomit และค่าโลหิตวิทยา โดยใช้วิธีตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count; CBC) ได้แก่ เม็ดเลือดแดง (red blood cell; RBC) เม็ดเลือดขาว (white blood cell; WBC) และเกล็ดเลือด (platelet; PLT) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Chi-square test และคำนวณค่า Odd ratio (OR) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ GraphPad Prism 8.0

ผลการศึกษา

การศึกษาความชุกของการติดเชื้อ

ผลของการศึกษายืนยันการติดพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขที่ให้ผลบวกจากชุดตรวจสำเร็จรูป 2 ชนิด คือ *A. platys* และ *E. canis* ทั้งนี้ชุดตรวจสำเร็จรูปมีข้อจำกัดคือไม่สามารถตรวจหาเชื้อ *B. canis* และ *H. canis* ได้ โดยใช้เทคนิค PCR ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง โดยให้ผลลบทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ให้ผลบวกทั้งหมด 41 ตัวอย่าง แบ่งเป็น การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดเพียงชนิดเดียว

(single infection) และการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิด (mixed infection)

การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดเพียงชนิดเดียว

จากการใช้เทคนิค PCR พบสุนัขที่ติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดเพียงชนิดเดียว จำนวน 18 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40 โดยพบการติดเชื้อ *A. platys* มากที่สุด รองลงมาคือชนิด *E. canis* จำนวน 11 และ 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24.44 และ 15.55 ตามลำดับ โดยที่ไม่พบการติดเชื้อ *B. canis* หรือ *H. canis* ผลจากชุดตรวจสำเร็จรูป พบการติดเชื้อ *A. platys* และ *E. canis* จำนวน 4 และ 27 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.89 และ 60 ตามลำดับ โดยที่ *B. canis* หรือ *H. canis* ไม่ถูกทดสอบ เนื่องจากข้อจำกัดของชุดตรวจ (Figure 1)

การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิด

จากผลการศึกษาการติดพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขด้วยเทคนิค PCR พบสุนัขที่ติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิด จำนวน 23 ตัวเป็นร้อยละ 51.11 พบการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดร่วมกัน 2 เชื้อ โดยพบการติดเชื้อ *A. platys* ร่วมกับ *E. canis* มากที่สุด รองลงมา คือ *A. platys* ร่วมกับ *B. canis* และ *A. platys* ร่วมกับ *H. canis* จำนวน 9, 4 และ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 20 8.89 และ 2.22 ตามลำดับ พบการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดร่วมกัน 3 เชื้อระหว่าง *A. platys*, *B. canis*, *H. canis* กับ *A. platys*, *E. canis*, *H. canis* มากที่สุด รองลงมา คือ *A. platys*, *B. canis*, *E. canis* จำนวน 3, 3 และ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.67, 6.67 และ 2.22 ตามลำดับ พบการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดร่วมกัน 4 เชื้อระหว่าง *A. platys*, *B. canis*, *E. canis* และ *H. canis* จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4.44 (Figure 2) ผลจากชุดตรวจสำเร็จรูป พบการติดเชื้อ *A. platys* ร่วมกับ *E. canis* จำนวน 14 ตัวอย่าง โดยที่การติดเชื้อร่วมชนิดอื่น ไม่ถูกทดสอบ เนื่องจากข้อจำกัดของชุดตรวจ

การศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจการติดเชื้อ

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบการติดพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขด้วยเทคนิค PCR พบว่า ตัวอย่างเลือดสุนัขที่ให้ผลบวกจากชุดตรวจสำเร็จรูปจำนวน 45 ตัวอย่าง ได้ผลตรงกันกับ PCR เป็นจำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24.44 และ ได้ผลที่ไม่ตรงกับ PCR เป็นจำนวน 34 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 75.56 โดยผลที่ไม่ตรงกับ PCR แบ่งออกได้เป็น มีการติดเชื้อเพิ่มเติมนอกจากที่ตรวจได้จากชุดทดสอบสำเร็จรูป จำนวน 12 ตัวอย่าง มีการติดเชื้อแตกต่างชนิดจากผลที่ตรวจได้จากชุดทดสอบสำเร็จรูปบางส่วน จำนวน 5 ตัวอย่าง และ มีการติดเชื้อแตกต่างชนิดจากผลที่



Figure 1. SNAP 4Dx Plus test kit with positive *A. platys* (central), *E. canis* (bottom left corner). positive control was shown in the upper left corner of the sample spots.

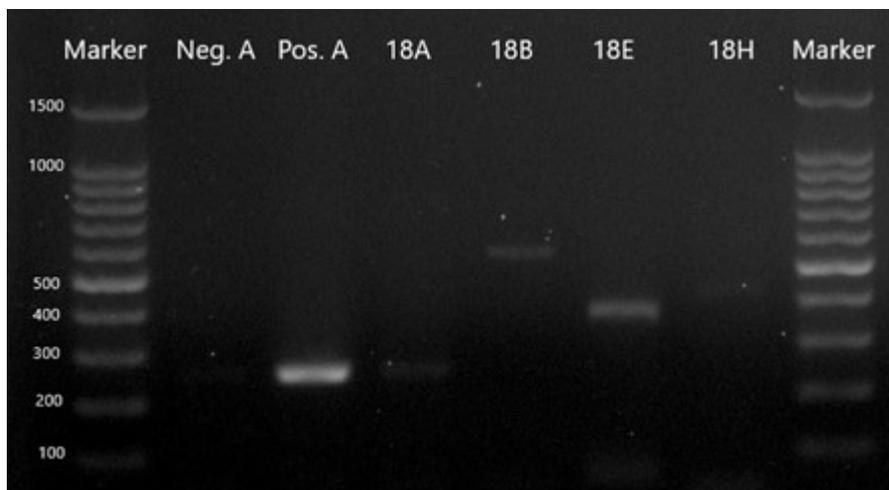


Figure 2. Electrophoresis display with positive result of *A. platys*, *B. canis*, *E. canis* and *H. canis*. 100 bp DNA maker was shown in lane 1 and 8, Uninfected *A. platys* sample was shown in lane 2 as the negative control, *A. platys* positive sample was shown in lane 3 as the positive control and canine tick-borne pathogen infections were shown in lane 4-7 (A stands for *A. platys*, B stands for *B. canis*, E stands for *E. canis* and H stands for *H. canis*). 18 represents the number of samples.

ตรวจได้จากชุดทดสอบสำเร็จรูปอย่างสิ้นเชิง จำนวน 13 ตัวอย่าง และให้ผลลบต่อผลที่ตรวจได้จากชุดทดสอบสำเร็จรูป จำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.67, 11.11, 28.89 และ 8.89 ตามลำดับ (Table 1)

การศึกษาความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิกและค่าทางโลหิตวิทยาของสุนัขที่ติดเชื้อ

ความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิกต่อการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือด

จากการศึกษา สุนัขที่ติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมีอาการทางคลินิกที่พบมากที่สุดคือ depress เป็นจำนวน 32 ตัวอย่าง รองลงมาคือ pale mucous membrane, anorexia และ vomit เป็นจำนวน 14, 7 และ 6 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 71.11, 31.11, 15.56 และ 13.33 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าอาการ depress ไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ

พยาธิเม็ดเลือดชนิดใดเพียงชนิดเดียว หรือการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิด สุนัขที่ติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดชนิด *B. canis* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ต่อภาวะเยื่อเมือกซีด ในขณะที่การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดชนิดอื่นไม่พบความสัมพันธ์กับภาวะนี้ ส่วนอาการ anorexia และ vomit ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติกับการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดชนิดใดเพียงชนิดเดียว หรือการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิด (Table 2)

ความสัมพันธ์ของค่าโลหิตวิทยาต่อการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือด

จากการศึกษา สุนัขที่ติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมีค่าทางโลหิตวิทยาที่บ่งชี้ถึงภาวะ thrombocytopenia มากที่สุด 24 ตัวอย่าง รองลงมาคือ anemia, neutrophilia และ lymphopenia เป็นจำนวน 18, 6 และ 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 53.33, 40, 13.33, และ 11.11 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าภาวะ thrombocytopenia anemia และ neutrophilia ไม่มี

Table 1. Positive results of canine tick-borne disease in this study

Tick-borne pathogens	Diagnostic techniques	
	SNAP 4Dx Plus	PCR
Single infection		
<i>A. platys</i>	4	11
<i>B. canis</i>	-U	0
<i>E. canis</i>	27	7
<i>H. canis</i>	-U	0
Double infection		
<i>A. platys</i> + <i>B. canis</i>	-U	4
<i>A. platys</i> + <i>E. canis</i>	14	9
<i>A. platys</i> + <i>H. canis</i>	-U	1
Triple infection		
<i>A. platys</i> + <i>B. canis</i> + <i>H. canis</i>	-U	3
<i>A. platys</i> + <i>B. canis</i> + <i>E. canis</i>	-U	1
<i>A. platys</i> + <i>E. canis</i> + <i>H. canis</i>	-U	3
Quadruple infection		
<i>A. platys</i> + <i>B. canis</i> + <i>E. canis</i> + <i>H. canis</i>	-U	2
Negative	0	4
Total	45	45

U = Unavailable

Table 2. Correlation between clinical signs and associated tick-borne pathogens in this study

Species	Pale mucous membrane	Infections		Prevalence of infection (%) (n=45)	Odd ratio (95% CI)	P-values
		Positive	Negative			
<i>A. platys</i>	Yes	12 (26.66 %)	3 (6.66%)	35.29	1.455 (0.3058-5.773)	0.1249
	No	22 (48.89 %)	8 (17.78 %)	64.71		
<i>B. canis</i>	Yes	6 (13.33 %)	9 (20.00 %)	60.00	4.333 (1.094-15.56)	0.0425
	No	4 (8.89 %)	26 (57.78 %)	40.00		
<i>E. canis</i>	Yes	6 (13.33 %)	9 (20.00 %)	27.27	0.5833 (0.1812-1.94)	0.3990
	No	16 (35.56 %)	14 (31.11 %)	72.73		
<i>H. canis</i>	Yes	3 (6.66 %)	12 (26.67 %)	33.33	1.00 (0.2411-4.258)	>0.9999
	No	6 (13.33 %)	24 (53.33 %)	66.67		

ความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดเพียงชนิดเดียว หรือ การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิด ในการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไปพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ต่อภาวะเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ในกระแสเลือดต่ำโดยแบ่งเป็น การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดร่วมกันระหว่าง *A. platys* และ *B. canis* การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดร่วมกันระหว่าง *A. platys* และ *H. canis* การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดร่วมกันระหว่าง *B. canis* และ *H. canis* และ การติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดร่วมกันระหว่าง *A. platys*, *B. canis* และ *H. canis* แต่ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติกับการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *A. platys* และ *E. canis* หรือการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *E. canis* และ *H. canis* หรือการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *B. canis* และ *E. canis* รวมทั้งไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติกับการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดเพียงชนิดเดียว (Table 3)

วิจารณ์

จากผลการศึกษาริดพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขด้วยเทคนิค PCR พบว่า ความชุกของเชื้อพยาธิเม็ดเลือด ชนิด *A. platys* มากที่สุด 11 ตัว (ร้อยละ 24.44) รองลงมาคือชนิด *E. canis* จำนวน 7 ตัว (ร้อยละ 15.55) แตกต่างจากการศึกษาของ Wankaew and Asawapattanakul (2022) ที่พบว่า พยาธิเม็ดเลือดในสุนัขชนิด *E. canis* มีความชุกมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 35.92 รองลงมาคือชนิด *A. platys* ร้อยละ 5.48 ส่วนการติดเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป พบว่า พบการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *A. platys* และ *E. canis* มากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ คิดเป็นร้อยละ 20 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wankaew and Asawapattanakul (2022) ที่พบความชุกของการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดชนิด

A. platys ร่วมกับ *E. canis* มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 14.18 ทั้งนี้โอกาสในการพบเชื้อพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขของแต่ละพื้นที่อาจมีความแตกต่างกันความสภาพแวดล้อมของพื้นที่และลักษณะการเลี้ยงดูสุนัข

เมื่อศึกษายืนยันผลการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขด้วยเทคนิค PCR พบว่า สุนัขที่ได้รับผลบวกจากชุดตรวจสำเร็จรูปให้ผลตรงกับ PCR เป็นจำนวน 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 24.44) และได้ผลที่ไม่ตรงกับ PCR เป็นจำนวน 34 ตัวอย่าง (ร้อยละ 75.56) ทั้งนี้เนื่องจากการตรวจด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปเป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ของสุนัขที่ติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือด ซึ่งต้องใช้เวลาในการที่ร่างกายจะต้องสร้างแอนติบอดีเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อ เช่น ในกรณีที่เกิดการติดเชื้อ *E. canis* แอนติบอดีชนิด IgG จะเริ่มตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 15 หลังการติดเชื้อ ดังนั้นในระยะการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน ถ้ามีการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปตรวจมีโอกาสให้ผลลบลง (false negative) นอกจากนี้ แอนติบอดีดังกล่าว จะสามารถอยู่ในกระแสเลือดได้นาน 6-9 เดือนจึงไม่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบหาเชื้ออีกครั้งภายหลังจากการรักษา เพราะยังคงให้ผลบวกลง (false positive) อยู่ (Taweethavonsawat, 2012) อีกทั้งชุดตรวจสำเร็จรูปยังมีข้อจำกัดคือไม่สามารถตรวจหาแอนติบอดีของเชื้อพยาธิเม็ดเลือดชนิด *B. canis* และ *H. canis* ได้ แต่มีข้อดีคือมีความไวที่สูงในการตรวจหาว่าสัตว์เคยสัมผัสกับเชื่อนั้นมาก่อน ดังนั้น การพัฒนาเทคนิค PCR โดยเฉพาะ multiplex PCR เพื่อตรวจหาการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดหลายๆชนิดพร้อมกันมีความไวและความจำเพาะที่สูงสำหรับทำการศึกษาที่จำเพาะต่อเชื้อในแต่ละชนิดหรือการติดเชื้อร่วมกัน รวมถึงใช้ประเมินการกำจัดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดภายหลังการรักษา (Sathish et al., 2021)

Table 3. Correlation between hematological profiles and coinfecting tick-borne pathogens in this study

Species	Lymphopenia	Infections		Prevalence of infection (%) (n=45)	Odd ratio (95% CI)	P-values
		Positive	Negative			
<i>A. platys</i> + <i>B. canis</i>	Yes	4 (8.89 %)	2 (4.44 %)	40.00	11.00 (1.89-62.59)	0.0049
	No	6 (13.33 %)	33 (73.33 %)	60.00		
<i>A. platys</i> + <i>E. canis</i>	Yes	1 (2.22 %)	5 (11.11 %)	6.67	0.3571 (0.02851-2.634)	0.3522
	No	14 (31.11%)	25 (55.56 %)	93.33		
<i>A. platys</i> + <i>H. canis</i>	Yes	3 (6.67 %)	3 (6.67 %)	33.33	5.50 (1.03-26.78)	0.0485
	No	6 (13.33 %)	33 (73.33 %)	66.67		
<i>B. canis</i> + <i>E. canis</i>	Yes	1 (2.22 %)	5 (11.11 %)	33.33	3.7 (0.2154-35.00)	0.2915
	No	2 (4.44 %)	37 (82.22 %)	66.67		
<i>B. canis</i> + <i>H. canis</i>	Yes	3 (6.67 %)	3 (6.67 %)	60.00	18.50 (2.564-119.6)	0.0011
	No	2 (4.44 %)	37 (82.22 %)	40.00		
<i>E. canis</i> + <i>H. canis</i>	Yes	1 (2.22 %)	5 (11.11 %)	20.00	1.75 (0.1209-16.94)	0.6418
	No	4 (8.89 %)	35 (77.78 %)	80.00		
<i>A. platys</i> + <i>B. canis</i> + <i>H. canis</i>	Yes	3 (6.67 %)	3 (6.67 %)	60.00	18.50 (2.564-119.6222)	0.0011
	No	2 (4.44 %)	37 (82.22 %)	40.00		

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ในการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดพบว่า สุนัขที่ติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดชนิด *B. canis* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อการเกิดอาการทางคลินิก คือ ภาวะเยื่อเมือกซีด เนื่องจากสุนัขที่ติดเชื้อ *Babesia spp.* จะก่อให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงในหลอดเลือด (intravascular hemolysis) และ การทำลายเม็ดเลือดแดงนอกหลอดเลือด (extravascular hemolysis) ส่งผลให้เกิดภาวะโลหิตจาง (anemia) ทำให้สัตว์อาจจะแสดงอาการเยื่อเมือกซีด รวมไปถึงภาวะดีซ่านตามมาได้ (Ayob et al., 2010) และจากการศึกษาความสัมพันธ์ของค่าทางโลหิตวิทยาต่อการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดพบว่า เมื่อมีการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป (mixed infection) มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อภาวะเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ในกระแสเลือดต่ำ (lymphopenia) ทั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาวิจัยของ Salakij et al. (1999) ที่กล่าวว่า ลักษณะทางโลหิตวิทยาของสุนัขที่ติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป จะมีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ในกระแสเลือดลดลง (lymphopenia) และจากผลการศึกษาของ Thongsahuan et al. (2020) บ่งบอกได้ว่า ภาวะ lymphopenia มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการติดเชื้อ *B. canis* (73.3%) ร่วมกับผลการศึกษาของ Singh et al. (2017) พบว่า ภาวะ lymphopenia เป็นค่าทางโลหิตวิทยาหลักๆที่พบได้ในการติดเชื้อ *H. canis* (24/31 ตัวอย่าง) จึงมีความ

เป็นไปได้ว่า เมื่อมีการติดเชื้อร่วมกัน จะส่งผลให้เกิดภาวะเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ในกระแสเลือดต่ำมากขึ้นได้ นอกจากนี้ การศึกษาทางพยาธิวิทยาของการติดเชื้อร่วมกันของ *E. canis* และ *H. canis* พบการลดลงของ lymphocytes และ lymphoblasts ใน lymph nodes จึงเป็นไปได้ว่า เมื่อมีการติดเชื้อร่วมกันภายในกระแสเลือด ส่งผลให้เกิดภาวะเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ในกระแสเลือดต่ำลงได้ (Tsachev et al., 2008)

สรุป

การศึกษายืนยันการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกของโรคในสุนัขที่เฝ้าเป็นพาหะด้วยเทคนิค PCR พบว่ามีความชุกของกลุ่มสุนัขที่ติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิดมากกว่า กลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดเพียงชนิดเดียว โดยที่เมื่อมีการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป จะมีความสัมพันธ์ต่อภาวะเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ในกระแสเลือดต่ำ (lymphopenia) อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อมีการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดชนิด *B. canis* จะมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ต่อภาวะเยื่อเมือกซีด เนื่องจากผลของการทำลายเม็ดเลือดแดงทั้งในและนอกหลอดเลือด เมื่อศึกษายืนยันผลการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดในสุนัขด้วยเทคนิค PCR พบว่า สุนัขที่ได้รับผลบวกจากชุดตรวจสำเร็จรูป มีผลไม่ตรงกับ PCR เป็นส่วนใหญ่ (75.56 %) ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดในการตรวจ

หาแอนติบอดีของพยาธิเม็ดเลือดบางชนิดที่ไม่สามารถตรวจหาได้จากชุดทดสอบสำเร็จรูป รวมถึงช่วงเวลาของการติดเชื้อมีผลต่อการตรวจหาแอนติบอดีของเชื้อด้วยชุดทดสอบ จึงแนะนำให้ทำการตรวจหาพยาธิเม็ดเลือดด้วยวิธีการทางคลินิก ประกอบกับการสังเกตอาการทางคลินิกและผลทางโลหิตวิทยา ร่วมกับการยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR เพื่อให้การตรวจวินิจฉัยมีความแม่นยำมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษานี้ขอขอบพระคุณนายสัตวแพทย์วศวรรษ คุวิจิตรสุวรรณ ผู้อำนวยการโรงพยาบาลสัตว์ Petpro Animal Health Center ที่ให้การสนับสนุนตัวอย่าง ขอขอบพระคุณ นางสาววิษญา ธาระวานิช และนางสาวปญฺษิรษา เหมพิจิตร ที่ช่วยตรวจตัวอย่างในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

- Ahantarig A, Trinachartvanit W, Milne JR, 2008. Tick-borne pathogens and diseases of animals and humans in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 39, 1015-1032.
- Ayoob AL, Hackner SG, Prittie J, 2010. Clinical management of canine babesiosis. J Vet Emerg Criti Care 20, 77-89.
- Laummaunwai P, Sriraj P, Aukkanimart R, Boonmars T, Boonjaspinyo S, Sangmaneedet S, Potchimlee P, Khianman P, Maleewong W, 2014. Molecular detection and treatment of tick-borne pathogens in domestic dogs in Khon Kaen, northeastern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 45, 1157-1166.
- Rucksaken R, Maneeruttanarungroj C, Maswana T, Sussadee M, Kanbutra P, 2019. Comparison of conventional polymerase chain reaction and routine blood smear for the detection of *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma platys* in Buriram Province, Thailand. Vet World 12, 700-705.
- Sainz Á, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L, 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Parasit Vectors 8, 75.
- Salakij C, Salakij J, Rochanapat N, Suthunmapinunta P, Nunklang G, 1999. Hematological characteristics of blood parasite infected dogs. Witthayasan Kasetsart 33, 589-600.
- Sathish G, Subramanian S, Parthiban M, Vairamuthu S, 2021. Detection of canine blood parasites by a multiplex PCR. Vet Parasitol 35.
- Singh K, Singh H, Singh NK, Kashyap N, Sood NK, Rath SS, 2017. Molecular prevalence, risk factors assessment and hae-

mato-biochemical alterations in hepatozoonosis in dogs from Punjab, India. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 55, 53-58.

- Taweethavonsawat P, 2012. Update Ehrlichiosis in dog. The journal of Thai veterinary practitioners 24, 49-53.
- Thongsahuan S, Chethanond U, Wasiksiri S, Saechan V, Thongtako W, Musikacharoen T, 2020. Hematological profile of blood parasitic infected dogs in Southern Thailand. Vet World 13, 2388-2394.
- Tsachev I, Ivanov A, Dinev I, Kanakov D, 2008. Clinical *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* co-infection in a dog in Bulgaria. Rev Med Vet 159, 68-73.
- Wankaew S, Asawapattanakul T, 2022. Prevalence and factors affecting of blood parasite in dogs in the veterinary teaching hospital of Mahasarakham University. Prawarun agricultural journal 19, 66-72.
- Wongsawang W, Jeimthaweeboon S, 2020. Retrospective study of canine blood parasites infections in Kanchanaburi province during 2012-2016. J Anim Health Sci Tech 3, 32-42.