

การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาอุกโซ่พอลิเมอร์แบบมัลติเพสส์และการสำรวจ
โรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่



เพ็ญภา ตาคำ

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2564

การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาอุกโฆ่พอลิเมอร์แบบมัลติเพิล็กซ์และการสำรวจ
โรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่



เพ็ญภา ตาคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักบริหารและพัฒนาระบบราชการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การพัฒนาเทคนิคปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอร์แบบมัลติเพล็กซ์และการสำรวจ
โรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่

เพ็ญนภา ตาคำ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.วศิน เจริญทัศน์กุล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.สมคิด ดีจริง)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(รองศาสตราจารย์ ดร.วศิน เจริญทัศน์กุล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)

รองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน

อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์และการ สำรวจ โรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่
ชื่อผู้เขียน	นางสาวเพ็ญภา ตาคำ
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.วศิน เจริญทัศน์กุล

บทคัดย่อ

โรคพยาธิในเม็ดเลือดของสุนัขเกิดขึ้นโดยอาศัยพาหะนำโรค คือเห็บแข็งสีน้ำตาล (*Rhipicephalus sanguineus*) และเห็บ (Tabanus spp.) โดยมีเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Babesia canis* (*B. canis*), *Hepatozoon canis* (*H. canis*), *Ehrlichia canis* (*E. canis*), *Anaplasma platys* (*A. platys*) และ *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์ที่มีความจำเพาะกับยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *H. canis* และ *B. canis* ยีน *VirB9* ของเชื้อ *E. canis* ยีน *GroEL* ของเชื้อ *A. platys* และ ยีน *VSG* ของเชื้อ *T. evansi* ในสุนัข จากนั้นนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้สำรวจความชุกของโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่ งานวิจัยนี้เก็บตัวอย่างเลือดสุนัขจำนวน 870 ตัว นำมาตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข ผลการศึกษา พบว่า อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์ คือ 58 °C ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบยีน *VirB9* ของเชื้อ *E. canis* คือ 100 nM ยีน *GroEL* ของเชื้อ *A. platys* และ ยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *H. canis* และ *B. canis* คือ 50 nM และยีน *VSG* ของเชื้อ *T. evansi* คือ 500 nM ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบต่ำสุดที่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. canis* และ *B. canis* คือ 10^1 copy numbers เชื้อ *H. canis* คือ 10^4 copy numbers และเชื้อ *A. platys* คือ 10^3 copy numbers ความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่ที่เป็นการติดเชื้อเพียงชนิดเดียวคือ *H. canis* ร้อยละ 38.0 (331 ตัว) *E. canis* ร้อยละ 0.7 (6 ตัว) *A. platys* ร้อยละ 0.6 (5 ตัว) *B. canis* ร้อยละ 0.2 (2 ตัว) และไม่พบการติดเชื้อ *T. evansi* ความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมในสุนัขที่ติดเชื้อร่วมกันสองชนิดคือ *B. canis* และ *H. canis* ร้อยละ 22.0 (191 ตัว) *H. canis* และ *E. canis* ร้อยละ 1.8 (16 ตัว) *H. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 1.4 (12 ตัว) และไม่พบการติดเชื้อ *B. canis* และ *E. canis*, *B. canis* และ *A. platys*, *E. canis* และ *A. platys* ความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมในสุนัขที่ติดเชื้อร่วมกันสามชนิดคือ *B. canis*, *H. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 0.9 (8 ตัว) *B. canis*, *H.*

canis และ *E. canis* ร้อยละ 0.9 (8 ตัว) *H. canis*, *E. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 0.2 (2 ตัว) และไม่พบการติดเชื้อ *B. canis*, *E. canis* และ *A. platys* ความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมในสุนัขที่ติดเชื้อร่วมกันสี่ชนิดคือ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 0.5 (4 ตัว) สุนัขสุขภาพดีไม่พบการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดคิดเป็นร้อยละ 32.8 (285 ตัว) ผลการศึกษา พบว่าเพศ และอายุไม่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข แต่การมีสถานพยาบาลสัตว์ในระยะ 10 กม. มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ : ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์, โรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข, ความชุก, สุนัข



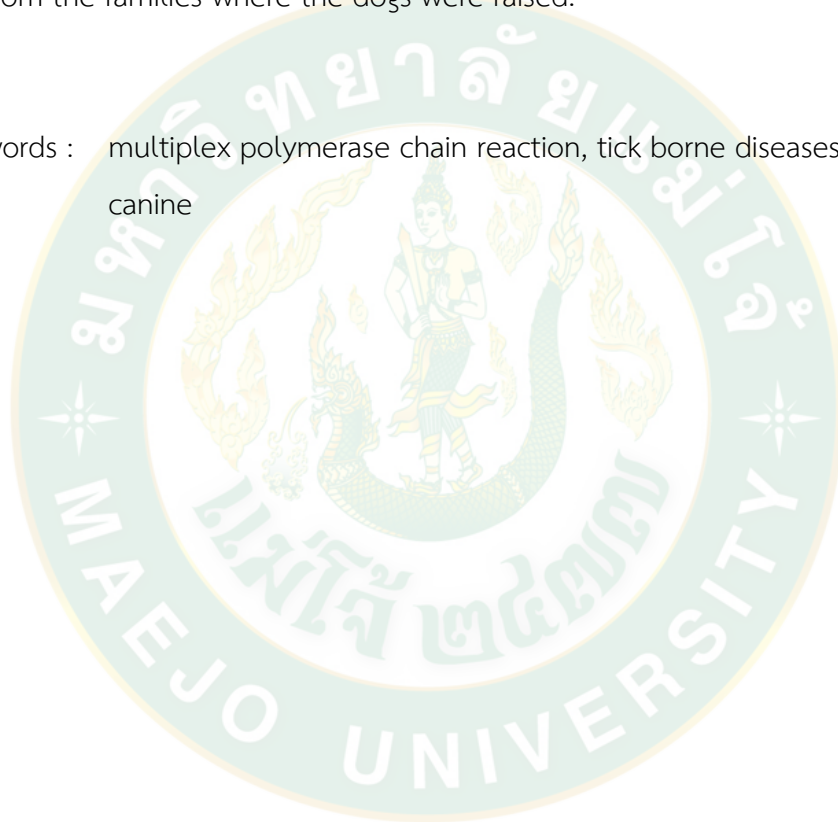
Title	DEVELOPMENT OF MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION AND MOLECULAR SURVEY OF CANINE TICK-BORNE DISEASES IN CHIANGMAI
Author	Miss Pennapa Takam
Degree	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Associate Professor Dr. Wasin Charentantanakul

ABSTRACT

Tick-borne diseases (TBDs) are caused by tick borne pathogens, which include *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Trypanosoma evansi*. These pathogens are typically carried by brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) and biting flies (*Tabanus* spp.). In this study, we developed multiplex polymerase chain reaction (mPCR) for the detection of *18s rRNA* gene of *H. canis* and *B. canis*, *VirB9* gene of *E. canis*, *GroEL* gene of *A. platys* and *VSG* gene of *T. evansi* in canine blood. A total of 870 canine blood samples were collected. The results showed that the optimized annealing temperature for mPCR was 58 degree celsius. The least primer concentration for detection *VSG* gene of *T. evansi* was 500 nM, *VirB9* gene of *E. canis* was 100 nM, *GroEL* gene of *A. platys* and/or *18s rRNA* gene of *B. canis* and *H. canis* were 50 nM. The least DNA template concentration that could be detected by mPCR assay developed in this study was 10^1 copy numbers of *E. canis* and *B. canis*, 10^4 copy numbers of *H. canis* and 10^3 copy numbers of *A. platys*. Prevalence of TBDs in Chiangmai showed that 331 dog cases were singly infected with *H. canis* (38.0%), 6 cases with *E. canis* (0.7%), 5 cases with *A. platys* (0.6%), and 2 cases with *B. canis* (0.2%). No case was infected with *T. evansi*. In addition, 191 dog cases were co-infected with *B. canis* and *H. canis* (22.0%), 16 cases with *H. canis* and *E. canis* (1.8%), and 12 cases with *H. canis* and *A. platys* (1.4%). No co-infection with *B. canis* and *E. canis*, *B. canis* and *A. platys*, and *E. canis* and *A. platys* was detected. Eight dog cases were

co-infected with *B. canis*, *H. canis* and *A. platys* (0.9%), 8 cases with *B. canis*, *H. canis* and *E. canis* (0.9%), and 2 cases with *H. canis*, *E. canis* and *A. platys* (0.2%). No co-infection with *B. canis*, *E. canis* and *A. platys* was found. Four dog cases were coinfecting with *E. canis*, *H. canis*, *B. canis* and *A. platys* (0.5%). There were 285 dogs that were not infected with any TBD-associated pathogens. Statistical analysis revealed that TBDs were not associated with either gender or age group. In contrast, TBDs were associated with an availability of veterinary service in the distance of 10 km from the families where the dogs were raised.

Keywords : multiplex polymerase chain reaction, tick borne diseases, prevalence, canine



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคนิคปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพสส์และการสำรวจโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่ ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรจาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2563

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วศิน เจริญตันธนกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลักที่ให้คำปรึกษา ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ ตลอดการทำวิจัยเรื่องนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต และ อาจารย์ ดร. สมคิด ดีจริง อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ ตลอดการทำวิจัยเรื่องนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ศรัณย์ จินะเจริญ ที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ ในสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ เจ้าหน้าที่โครงการหลวง และนักศึกษาสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ในการอำนวยความสะดวกในการลงพื้นที่สำหรับเก็บตัวอย่างเลือด

เพ็ญนภา ตาคำ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพ.....	ท
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร.....	3
2.1 โรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข.....	3
2.2 วงจรชีวิตของเห็บแข็งสีน้ำตาล.....	3
2.3 การเพิ่มจำนวนของโปรโตซัว.....	5
2.3.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ.....	5
1) การแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสอง.....	5
2) การแบ่งตัวแบบทวีคูณ.....	5
3) การแตกหน่อ.....	5
2.3.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ.....	5
2.3.3 การสืบพันธุ์ของโปรโตซัวใน Phylum Apicomplexa.....	5
2.4 โรคเฮปาโตซูนโนซิส (Hepatozoonosis).....	6

2.4.1 สาเหตุ อาการทางคลินิก และความชุกของเชื้อ <i>H. canis</i>	6
2.4.2 พยาธิกำเนิดของเชื้อ <i>H. canis</i>	7
2.4.3 ภูมิคุ้มกันของสุนัขต่อเชื้อ <i>H. canis</i>	7
2.5 โรคบาบิซิโอซิส (Babesiosis).....	8
2.5.1 สาเหตุ อาการทางคลินิก และความชุกของเชื้อ <i>B. canis</i>	8
2.5.2 พยาธิกำเนิดของเชื้อ <i>B. canis</i>	9
2.5.3 ภูมิคุ้มกันของสุนัขต่อเชื้อ <i>B. canis</i>	9
2.6 โรคเออร์ริชชีโอซิส (Ehrlichiosis)	10
2.6.1 สาเหตุ อาการทางคลินิก และความชุกของเชื้อ <i>E. canis</i>	10
2.6.2 พยาธิกำเนิดของเชื้อ <i>E. canis</i>	10
2.6.3 ภูมิคุ้มกันของสุนัขต่อเชื้อ <i>E. canis</i>	11
2.7 โรคอะนาพลาสโมซิส (Anaplasmosis)	11
2.7.1 สาเหตุ อาการทางคลินิก และความชุกของเชื้อ <i>A. platys</i>	11
2.7.2 พยาธิกำเนิดของเชื้อ <i>A. platys</i>	12
2.7.3 ภูมิคุ้มกันของสุนัขต่อเชื้อ <i>A. platys</i>	12
2.8 โรคทริปปาโนโซมาโอซิส (Trypanosomiasis).....	12
2.8.1 สาเหตุ อาการทางคลินิก และความชุกของเชื้อ <i>T. evansi</i>	12
2.8.2 พยาธิกำเนิดของเชื้อ <i>T. evansi</i>	12
2.8.3 ภูมิคุ้มกันของสุนัขต่อเชื้อ <i>T. evansi</i>	13
2.9 วิธีตรวจโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข	13
2.9.1 วิธีย้อมฟิล์มเลือดบาง.....	13
2.9.2 วิธีทางซีรัมวิทยา.....	13
2.9.3 วิธีทางอนุชีววิทยา.....	14
1) ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	14

1.1) องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	14
1.2) ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	15
1.3) ปริมาณผลิตภัณฑ์หลังการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	15
1.4) รูปแบบต่าง ๆ ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	15
2) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพิล็กซ์	16
2.1) การออกแบบไพเรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพิล็กซ์	16
2.2) ข้อดีของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพิล็กซ์	16
2.3) ยีนที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ- เรสแบบมัลติเพิล็กซ์.....	16
2.4) การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพิล็กซ์	17
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	18
3.1 พื้นที่ศึกษา.....	18
3.2 การเก็บตัวอย่างเลือดสุนัข.....	18
3.3 การสกัดดีเอ็นเอ.....	18
3.4 ไพเรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	19
3.5 การคัดเลือกเชื้อ <i>A. platys</i> , <i>B. canis</i> , <i>H. canis</i> , <i>E. canis</i> และ <i>T. evansi</i> ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสจากตัวอย่างเลือดสุนัข.....	20
3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	21
3.6.1 การทดลองหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด	21
3.6.2 การทดสอบความเข้มข้นของไพเรเมอร์ที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด	21
3.6.3 การทดสอบความเข้มข้นของ 2X Quick Taq® HS DyeMix ที่เหมาะสม	21
3.7 การพัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพิล็กซ์	21
3.8 การศึกษาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ- เรส	22

3.9 การศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์	23
3.10 การศึกษาความชุกของโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่	23
3.11 การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบาง	24
3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	26
4.1 พื้นที่ศึกษาและจำนวนสุนัขที่ใช้ในการสำรวจโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข.....	26
4.2 การคัดเลือกเชื้อ <i>A. platys</i> , <i>B. canis</i> , <i>H. canis</i> , <i>E. canis</i> และ <i>T. evansi</i> ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากตัวอย่างเลือดสุนัข.....	27
4.2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>VirB9</i> ของเชื้อ <i>E. canis</i>	28
4.2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>GroEL</i> ของเชื้อ <i>A. platys</i>	29
4.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>18s rRNA</i> ของเชื้อ <i>B. canis</i>	30
4.2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>18s rRNA</i> ของเชื้อ <i>H. canis</i>	32
4.3 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	33
4.3.1 อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด	33
4.3.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์	33
4.4 การหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน	34
4.5 การทดสอบความเข้มข้นของ 2X Quick Taq® HS DyeMix ที่เหมาะสม.....	35
4.6 การศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์	35
4.7 การศึกษาความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขใน จังหวัดเชียงใหม่.....	36
4.8 การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบาง	44
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	47
บรรณานุกรม.....	48
ภาคผนวก.....	57

ภาคผนวก ก 58

ภาคผนวก ข 60

ประวัติผู้วิจัย..... 93



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ลักษณะของโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข.....	13
ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับตรวจวินิจฉัย.....	19
ตารางที่ 3 เกณฑ์ของการแปลความหมายค่าสัมประสิทธิ์ของ Cramer's V.....	25
ตารางที่ 4 ข้อมูลตัวอย่างในแต่ละอำเภอ.....	26
ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบผลสัมฤทธิ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับฐานข้อมูล.....	27
ตารางที่ 6 ความชุกของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่.....	40
ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข.....	43
ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบางกับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์.....	46

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะของเห็บแข็งสีน้ำตาล.....	4
ภาพที่ 2 เชื้อ <i>H. canis</i> ในตัวอย่างเลือดสุนัขจากการย้อมฟิล์มเลือดบาง.....	6
ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของ <i>H. canis</i>	8
ภาพที่ 4 ลักษณะของเชื้อ <i>B. canis</i>	9
ภาพที่ 5 วงจรชีวิตของเชื้อ <i>B. canis</i>	10
ภาพที่ 6 วงจรชีวิตของเชื้อ <i>E. canis</i>	11
ภาพที่ 7 ลักษณะของเชื้อ <i>A. platys</i>	12
ภาพที่ 8 ลักษณะของเชื้อ <i>T. evansi</i>	13
ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>E. canis</i> กับฐานข้อมูล.....	28
ภาพที่ 10 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>A. platys</i> กับฐานข้อมูล.....	29
ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>B. canis</i> กับฐานข้อมูล.....	30
ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>H. canis</i> กับฐานข้อมูล.....	32
ภาพที่ 13 อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด.....	33
ภาพที่ 14 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์.....	34
ภาพที่ 15 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ- เมอร์.....	34
ภาพที่ 16 ความเข้มข้นสุดท้ายของ 2X Quick Taq® HS DyeMix ที่เหมาะสม.....	35
ภาพที่ 17 ความจำเพาะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบมัลติเพล็กซ์.....	36
ภาพที่ 18 เชื้อ <i>H. canis</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากตัวอย่างเลือดสุนัข.....	44

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

โรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขเป็นโรคที่เกิดจากโปรโตซัว ได้แก่ *Hepatozoon canis* (*H. canis*) *Babesia canis* (*B. canis*) และ *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) และเชื้อริกเกตเซีย ได้แก่ เชื้อ *Ehrlichia canis* (*E. canis*) และ *Anaplasma platys* (*A. platys*) ซึ่งเป็นปัญหาหลักที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพของสุนัขในประเทศไทย โรคนี้มาโดยเห็บแข็งสีน้ำตาล (*Rhipicephalus sanguineus*) และเห็บ (Tabanus spp.) เป็นพาหะนำโรค โรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพสุนัขอย่างมากโดยส่งผลให้สุนัขแสดงอาการแตกต่างกันไป เช่น กล้ามเนื้ออักเสบหรืออัมพฤกษ์ โลหิตจาง ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ เยื่อบุตาขาวอักเสบ ในบางกรณีสุนัขบางตัวเมื่อติดเชื้อมีกระแสเลือดแล้วไม่แสดงอาการป่วยหรือแสดงอาการป่วยเรื้อรัง (Shaw *et al.*, 2001) ดังนั้น การตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว แม่นยำ จึงมีความจำเป็นอย่างมากเพื่อให้ทันต่อการรักษาสุนัขป่วย

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขมีหลายวิธี เช่น การตรวจลักษณะสัณฐานวิทยาผ่านการทำฟิล์มเลือดบาง (thin blood smear) จากนั้นย้อมด้วยสี Romanowsky type stain วิธีนี้นิยมใช้กันในคลินิกการสัตววิทยามีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงแต่มีความไวและความแม่นยำต่ำ การตรวจทางซีรัมวิทยา เช่น Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) และ Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีของเชื้อแต่ละชนิด นิยมใช้กันในห้องปฏิบัติการเนื่องจากเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และแม่นยำ แต่มีข้อด้อยคือใช้ระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัยค่อนข้างนาน และมีความไวต่ำในกรณีที่สุนัขติดเชื้อมีปริมาณเชื้อต่ำซึ่งร่างกายยังไม่ผลิตแอนติบอดีขึ้นมาตอบสนองต่อเชื้อ ในทางตรงกันข้าม วิธีการตรวจวินิจฉัยทางอณูชีววิทยา เช่น ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์ (Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และมีความไวสูงโดยใช้สารพันธุกรรมเพียงแค่ 1 ถึง 10 copy/μl ก็สามารถตรวจพบเชื้อได้ (Peleg *et al.*, 2010) แต่มีข้อด้อยคือต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาสูง ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์ (Multiplex Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง ความไวสูง รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์ (Azhahianambi *et al.*, 2018; Kamani *et al.*, 2013)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 พัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมีลติเพล็กซ์สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *H. canis*, *B. canis*, *E. canis*, *A. platys* และ *T. evansi*
- 1.2.2 สำนวความชุกของการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 ได้เทคนิคการวินิจฉัยการติดเชื้อ *H. canis*, *B. canis*, *E. canis*, *A. platys* และ *T. evansi* ที่รวดเร็ว แม่นยำ และประหยัดเวลา
- 1.3.2 ทราบความชุกของโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่



บทที่ 2

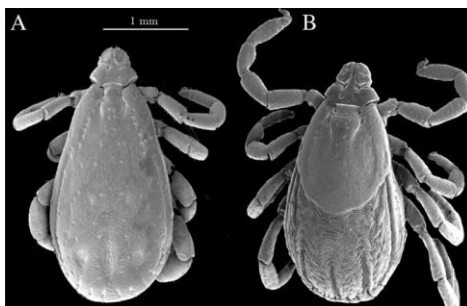
ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

2.1 โรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข

โรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขเป็นโรคที่นำโดยเห็บแคงส์น้ำตาล (Tick-Borne Disease) หรือเห็บ โดยเกิดจากการติดโปรโตซัวหรือเชื้อริกเกตเซียในเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง หรือกระแสเลือดของสุนัข ตัวอย่าง เช่น โรคเฮปพาโตซูนซิส (Hepatozoonosis) โรคบาบิซิโอซิส (Babesiosis) โรคเออร์ริชชีโอซิส (Ehrlichiosis) โรคอะนาพลาสโมซิส (Anaplasmosis) และ โรคทริปพาโนโซมาโอซิส (Trypanosomiasis) เชื้อเหล่านี้ก่อภัยพิบัติที่สำคัญในการนำโรคคือเห็บแคงส์น้ำตาล (*R. sanguineus*) (Shaw *et al.*, 2001) และ เห็บ (Tabanus spp.) (Desquesnes, Dargantes, *et al.*, 2013; Sanisuriwong *et al.*, 2012)

2.2 วงจรชีวิตของเห็บแคงส์น้ำตาล

เห็บแคงส์น้ำตาลมีการเจริญเติบโตโดยแต่ละระยะจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างด้วยการลอกคราบ แบ่งได้เป็น 4 ระยะ ประกอบด้วย ระยะไข่ (egg stage) มีลักษณะกลม ขนาดเล็กสีน้ำตาล มีอายุประมาณ 23 วัน จากนั้นจึงฟักเป็นตัวอ่อน (larva stage) (Jittapalapong *et al.*, 2000; Koch, 1982; Pegram *et al.*, 1987; Petrova-Piontkovskaya, 1968) มีความยาวประมาณ 0.5 มิลลิเมตร กว้างประมาณ 0.4 มิลลิเมตร มีขา 3 คู่ เรียกว่าระยะตัวอ่อน และลอกคราบเข้าสู่ระยะตัวกลางวัย (nymph stage) มีความยาว 1.1 ถึง 1.3 มิลลิเมตร และมีความกว้างจาก 0.6 ถึง 0.7 มิลลิเมตร ประกอบด้วยขา 4 คู่ ในระยะนี้การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศยังไม่สมบูรณ์ และระยะสุดท้ายคือระยะตัวเต็มวัย (adult stage) ประกอบไปด้วยขา 4 คู่ มีขนาดใหญ่และมีระบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศสมบูรณ์ สามารถแบ่งระยะตัวเต็มวัยออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ เห็บเพศผู้ที่มีลักษณะแบนราบ (ยาว 2.3 ถึง 3.2 มิลลิเมตร และ กว้าง 1.1 ถึง 1.7 มิลลิเมตร) ส่วนเห็บเพศเมียมีลักษณะใหญ่กว่าเห็บเพศผู้ (ยาว 2.4 ถึง 2.7 มิลลิเมตร และ กว้าง 1.4 ถึง 1.7 มิลลิเมตร) หลังจากเห็บเพศเมียดูดเลือดแล้วจะมีลำตัวสีเทาขนาดยาว 11.5 มิลลิเมตร และ กว้าง 7.5 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1) (Dantas-Torres, 2008)



ภาพที่ 1 ลักษณะของเห็บแข็งสีน้ำตาลเห็บเพศเมีย (A) และเพศผู้ (B) (Gray *et al.*, 2013)

วงจรชีวิตของเห็บแข็งสีน้ำตาลเริ่มต้นจากเห็บตัวเต็มวัยผสมพันธุ์บนตัวสุนัขโดยเห็บเพศเมียใช้ระยะเวลาในการดูดเลือด 5 ถึง 7 วัน เกาะติดกับผิวหนังสุนัขด้วยหนามแหลมที่อยู่บนอวัยวะส่วนปาก เรียกว่า ไฮโปสโตม (hypostome) โดยหลังสารที่มีคุณสมบัติคล้ายกาวที่ช่วยประสานส่วนปากของเห็บให้เกาะติดกับผิวหนังสุนัข ซึ่งน้ำลายของเห็บประกอบไปด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดและเอนไซม์อีกหลายชนิดที่ทำให้สัตว์มีภาวะเลือดออกและเนื้อเยื่อตายเกิดขึ้นในตำแหน่งที่เห็บเกาะ เมื่อดูดกินเลือดจนเต็มที่แล้วจะทิ้งตัวลงสู่พื้นเพื่อเข้าสู่กระบวนการวางไข่ประมาณ 10 วัน ตามสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน หิน รอยแตกของพื้น และซอกหินเพื่อใช้เป็นที่ยังชีพ หลังจากวางไข่เสร็จสิ้นแล้วเห็บตัวดังกล่าวก็จะตายไป (Dantas-Torres, 2008; Gray *et al.*, 2013) เห็บสามารถให้ไข่ได้มากถึง 3,000 ฟอง จากนั้นไข่จะฟักเป็นตัวอ่อน โดยตัวอ่อนเห็บสามารถอาศัยเป็นปรสิตอยู่บนตัวของสุนัขเห็บจะดูดกินเลือดสุนัขและทิ้งตัวลงสู่พื้นเพื่อลอกคราบ เห็บสุนัขมีการลอกคราบทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อพัฒนาเป็นระยะถัดไป เห็บในระยะตัวอ่อนสามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยไม่กินอาหารได้นานถึง 6 เดือน ระยะตัวกลางวัยเห็บสามารถขึ้นเกาะบนตัวสุนัขได้และดูดกินเลือดจนอิ่ม และทิ้งตัวลงสู่พื้นเพื่อเปลี่ยนเป็นระยะตัวเต็มวัย เห็บในระยะตัวกลางวัยสามารถอยู่ได้โดยไม่กินอาหารนานถึง 19 เดือน จากนั้นเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยเพื่อผสมพันธุ์อีกครั้ง เห็บตัวอ่อน ตัวกลางวัย และตัวเต็มวัย สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยเฉลี่ยได้นาน 6 เดือน ถึง 1 ปี เพื่อรอกลับขึ้นไปอาศัย และกินเลือดบนตัวสุนัขอีกครั้ง ในขณะที่เห็บกินเลือดเห็บจะส่งผ่านเชื้อที่ก่อโรคมะเร็งในเม็ดเลือดเข้าสู่สุนัข

วงจรชีวิตของเห็บมีระยะการเจริญเติบโตมากถึง 3 ระยะ ในแต่ละระยะสามารถขึ้นเกาะดูดเลือดสุนัขและถ่ายเชื้อไปยังสุนัข ใน 1 วงจรชีวิตของเห็บจะมีการขึ้นเกาะล่าตัวสุนัขถึง 3 ครั้ง ทำให้โอกาสในการแพร่กระจายของโรคมะเร็งในเม็ดเลือดสุนัขแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นเห็บจึงเป็นพาหะนำเชื้อจากสุนัขตัวหนึ่งไปสู่ตัวหนึ่งได้อย่างรวดเร็ว โรคดังกล่าวมีการแพร่กระจายในบริเวณพื้นที่เขตร้อนชื้น และกึ่งเขตร้อน (Shaw *et al.*, 2001) เช่น ประเทศอินเดีย (Azhahianambi *et al.*, 2018) ประเทศไนจีเรีย (Kamani *et al.*, 2013) และประเทศไทย (Jusook *et al.*, 2016; Kledmanee *et al.*, 2009; Laummaunwai *et al.*, 2014; Piratae *et al.*, 2015; Piratae *et al.*, 2019; Suksawat *et al.*, 2001) เป็นต้น

2.3 การเพิ่มจำนวนของโปรโตซัว

2.3.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction)

สามารถเกิดขึ้นโดยวิธีง่าย ๆ ได้แก่ การแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสอง (binary fission) การแบ่งตัวแบบทวีคูณ (multiple fission) และการแตกหน่อ (budding)

1) การแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสอง

เป็นวิธีที่พบมากที่สุดซึ่งมีวิธีการแบ่งตัวตามความยาวโดยเซลล์ลูกที่ได้อาจมีขนาดที่เท่ากันหรือไม่เท่ากัน เช่น พวกลีลาแอมบีอะ และ การแบ่งตัวตามขวางโดยส่วนมากพบในพวกลีลาแอมบีอะ

2) การแบ่งตัวแบบทวีคูณ

เป็นการแบ่งตัวโดยภายในเซลล์แม่เกิดการแบ่งนิวเคลียสมากมาย จากนั้นไซโตพลาสซึมจะเข้าไปล้อมรอบแต่ละนิวเคลียสพัฒนากลายเป็นเซลล์ลูกจำนวนมาก การแบ่งตัวแบบนี้สามารถพบได้มากในสปอโรซัว (sporozoa) ได้แก่ เชื้อ *H. canis* และเชื้อ *B. canis* เป็นต้น

3) การแตกหน่อ

เป็นกระบวนการสร้างเซลล์ใหม่ที่เล็กกว่าเซลล์เดิม โดยที่เซลล์แม่อยู่กับที่ปล่อยให้เซลล์ลูกเคลื่อนที่ออกไป เซลล์ลูกเคลื่อนที่ได้แตกต่างจากเซลล์แม่พบในพวกลีลาแอมบีอะที่อยู่กับที่เป็นส่วนใหญ่

2.3.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction)

เกิดจากการแลกเปลี่ยนเซลล์สืบพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดคือ ซินแกมมี (syngamy) หรือแกมีโตแกมี (gametogamy) พบได้ในโปรโตซัวหลายชนิด ซึ่งเกิดกระบวนการคอนจูเกชัน (conjugation) เป็นการรวมกันชั่วคราวของเซลล์เพื่อแลกเปลี่ยนนิวเคลียสซึ่งกันและกัน โดยเซลล์สืบพันธุ์ที่มีรูปร่างเหมือนกัน เรียกว่า ไอโซแกมมีต (isogamete) ส่วนเซลล์สืบพันธุ์ที่รูปร่างแตกต่างกันเรียกว่าแอนนิโซแกมมีต (anisogamete) เซลล์สืบพันธุ์ที่มีขนาดเล็กและเคลื่อนที่ได้ เรียกว่า ไมโครแกมมีต (microgamete) เซลล์สืบพันธุ์ที่มีขนาดใหญ่และเคลื่อนที่ได้ เรียกว่า แมโครแกมมีต (macrogamete)

2.3.3 การสืบพันธุ์ของโปรโตซัวใน Phylum Apicomplexa

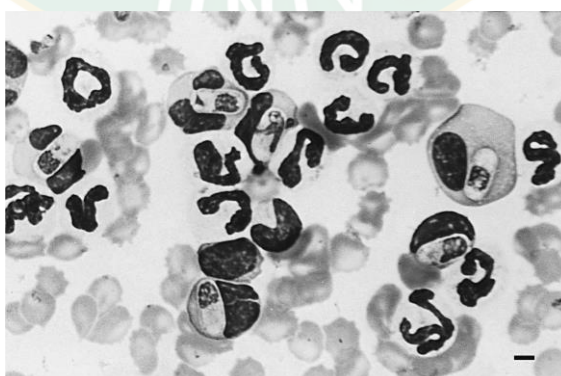
เชื้อ *H. canis* และ *B. canis* ถูกจัดอยู่ใน Phylum Apicomplexa เป็นโปรโตซัวกลุ่มที่เป็นปรสิต มีการสร้างสปอร์ ไม่มีซิเลีย (cilia) บางระยะมีแฟลกเจลลา (flagella) กินอาหารโดยใช้ชูโดพอดีย (pseudopodia) จับอาหารเข้าไปในเซลล์กลายเป็นแวคิวโอล (vacuole) จากนั้นเชื้อผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยอาหาร เรียกว่า ฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยวิธีซินแกมมี และแบบไม่อาศัยเพศด้วยการแบ่งตัวแบบทวีคูณ ตัวอย่าง เช่น เห็บที่มีเชื้อในระยะสปอโรซอยต์ (sporozoite) กัดสุนัข จากนั้นเชื้อในระยะสปอโรซอยต์เข้าสู่สุนัข และเข้าไปแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนที่อวัยวะเป้าหมาย เรียกว่า เมโรซอยต์ (merozoite) เคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในเม็ดเลือดของสุนัข

เพิ่มจำนวนจนทำให้เม็ดเลือดแตก และเชื้อเข้าสู่เม็ดเลือดอื่นต่อไป ในระยะนี้เชื้อจะมีการพัฒนา
รูปร่างเป็นแกมีโตซัยต์ (gametocyte) เมื่อเห็นกัตสุนัขที่มีเชื้อระยะแกมีโตซัยต์จะได้แกมีโตซัยต์และ
เกิดการผสมพันธุ์ขึ้นคือ ซินแกมีเกิดการแบ่งตัวได้สปอโรซอยต์ต่อไปเรื่อย ๆ เป็นการเพิ่มจำนวน
แบบอาศัยเพศ

2.4 โรคเฮปาโตซูนโนซิส (Hepatozoonosis)

2.4.1 สาเหตุ อาการทางคลินิก และความชุกของเชื้อ *H. canis*

โรคเฮปาโตซูนโนซิสเกิดจากโปรโตซัวชนิด *Hepatozoon canis* (Phylum Apicomplexa, Suborder Adeleorina, Family Hepatozoidae) (ภาพที่ 2) มีการตรวจพบครั้งแรกจากตัวอย่างเลือดสุนัขในประเทศอินเดียโดยชื่อเริ่มแรกคือ *Leukocytozoon canis* (Baneth *et al.*, 2007; East *et al.*, 2008; Ivanov & Tsachev, 2008; James, 1905) และตรวจพบเชื้อชนิดนี้ทางตอนใต้ของทวีปยุโรป เอเชีย และทางตอนใต้ของทวีปอเมริกา ความหลากหลายของเชื้อ *Hepatozoon* spp. มีมากกว่า 300 สายพันธุ์โดยมีรายงานในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม 46 สายพันธุ์ สัตว์เลี้ยงคลาน สัตว์ปีก และสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Baneth *et al.*, 2003; Baneth *et al.*, 2007; Ivanov & Tsachev, 2008; Smith, 1996) อาการของสุนัขที่ติดเชื้อ *H. canis* คือ ซึม โลหิตจาง (anemia) ไข้สูง (fever) เบื่ออาหาร (anorexia) ผอม เกล็ดเลือดลดลง (thrombocytopenia) และกล้ามเนื้ออ่อนแรง (ตารางที่ 1) (Baneth *et al.*, 2003; Baneth *et al.*, 2007; Ivanov & Tsachev, 2008) วงจรชีวิตของเชื้อ *H. canis* ประกอบไปด้วยแบบอาศัยเพศ และแบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งอาศัย intermediate host คือ สุนัข และ definitive host เช่น เห็บ และหมัด เป็นต้น พาหะนำเชื้อ *H. canis* ที่พบมากคือ เห็บแข็งสีน้ำตาล



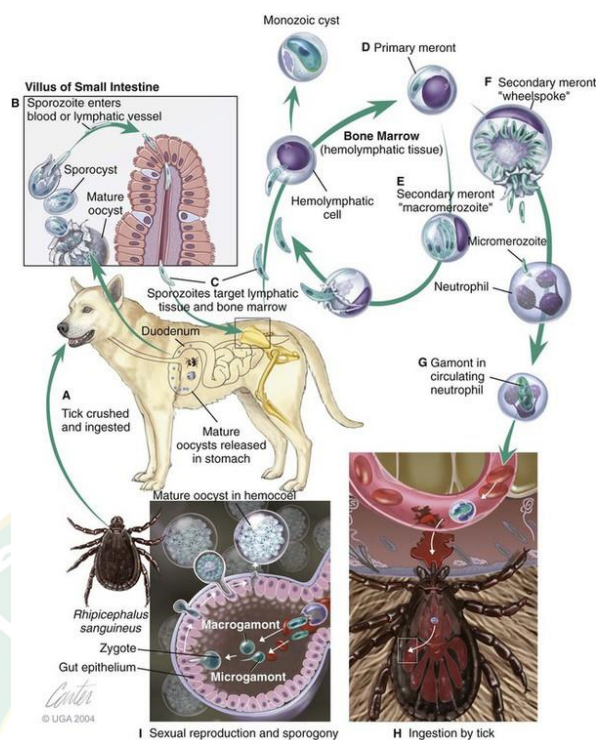
ภาพที่ 2 เชื้อ *H. canis* ในตัวอย่างเลือดสุนัขจากการทำย้อมฟิล์มเลือดบาง (Baneth *et al.*, 1998)

2.4.2 พยาธิกำเนิดของเชื้อ *H. canis*

สุนัขที่ติดเชื้อ *H. canis* ในกระแสเลือดโดยส่วนมากเกิดจากการกินเห็บที่มีเชื้อระยะโอโอซัยต์ (oocysts) เข้าสู่ร่างกาย (Baneth *et al.*, 2001; Gevrey, 1993) เห็บที่มีเชื้อ *H. canis* ระยะโอโอซัยต์เคลื่อนที่ไปยังลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) เมื่อสภาวะเหมาะสมทำให้เยื่อหุ้มของโอโอซัยต์บางจนขาด ส่งผลให้สปอโรซอยต์ที่อยู่ในโอโอซัยต์แพร่กระจายไปอวัยวะเป้าหมายคือ เยื่อบุผนังลำไส้ เยื่อบุผนังหลอดเลือด ไชกระดุก (Ivanov & Tsachev, 2008) จากนั้นพัฒนาเซลล์เป็น primary meront และ secondary meront (wheel spoke) ตามลำดับ เชื้อ *H. canis* เคลื่อนที่โดยอาศัยกระแสเลือด หรือท่อน้ำเหลืองไปยังอวัยวะเป้าหมาย เช่น ม้าม (ลักษณะแบบ wheel spoke) ปอด ไชกระดุก กระดุก กล้ามเนื้อหัวใจ ตับ ไต และเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) ซึ่งอยู่ในกระแสเลือด เมื่อเห็บตัวถัดไปขึ้นเกาะสุนัขเพื่อดูดกินเลือดส่งผลให้เห็บตัวดังกล่าวมีโอกาสได้รับเชื้อ *H. canis* เข้าสู่ตัวเห็บได้ (ภาพที่ 3) (Baneth *et al.*, 2007; Baneth *et al.*, 1998; Hornok *et al.*, 2013) ในลำไส้ของเห็บเชื้อ *H. canis* ในระยะแกมมอนต์ (gamont) สามารถแบ่งเซลล์ 1 วัน หลังจากการติดเชื้อ และหลังจากนั้นจะกลายเป็นเซลล์ในรูปแบบแมโครแกมมอนต์ (macrogamont) และไมโครแกมมอนต์ (microgamont) ในวันที่ 8 ของการติดเชื้อสามารถตรวจพบไซโกต (zygotes) และ young oocytes ได้ และในวันที่ 28 ของการติดเชื้อจะกลายเป็น mature gamonts สามารถพบได้ในเลือดสุนัข (Ivanov & Tsachev, 2008)

2.4.3 ภูมิคุ้มกันของสุนัขต่อเชื้อ *H. canis*

เมื่อสุนัขติดเชื้อ *H. canis* ร่างกายจะสร้างแอนติบอดีชนิด immunoglobulin M (IgM) เป็นลำดับแรกในวันที่ 26 หลังจากติดเชื้อ ปริมาณ IgM ที่ตรวจพบคือ 1:10 ถึง 1:80 และแอนติบอดีจะค่อย ๆ ลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 33 และ 66 หลังจากการติดเชื้อ เมื่อ IgM ค่อย ๆ ลดระดับลงจะมีการสร้างแอนติบอดีชนิด immunoglobulin A (IgA) โดยเฉลี่ยในวันที่ 29 หลังจากการติดเชื้อ ปริมาณ IgA ที่ตรวจพบคือ 1:32 ถึง 1:1024 ปริมาณ IgA เพิ่มสูงสุดในวันที่ 44 และ 63 หลังจากการติดเชื้อ (Baneth *et al.*, 1998)

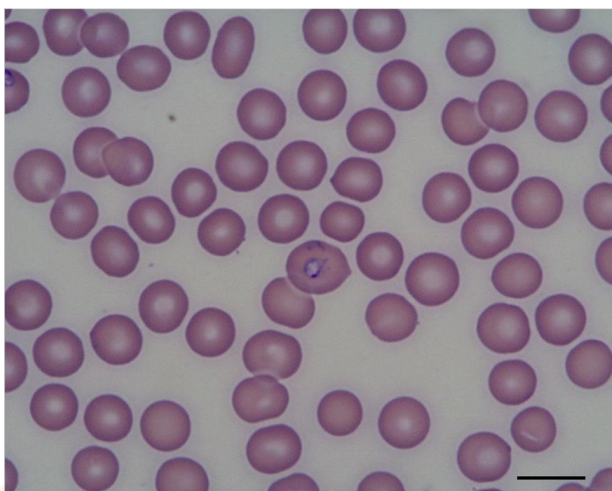


ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของ *H. canis* ในสุนัข (Enteritis, 2013)

2.5 โรคบาบิซิโอซิส (Babesiosis)

2.5.1 สาเหตุ อาการทางคลินิก และความชุกของเชื้อ *B. canis*

โรคบาบิซิโอซิสในสุนัขมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Babesia canis* (Phylum Apicomplexa, Order Piroplasmida, Family Babesiidae) (Irwin, 2009) เมื่อจัดจำแนกตามลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ พบว่า *B. canis* มีขนาดประมาณ 3 ถึง 5 ไมครอน มีลักษณะรูปร่างเป็นลูกแพร์ หลังจากการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 4) (Solano-Gallego *et al.*, 2016) สุนัขที่ติดเชื้อ *B. canis* มีอาการโลหิตจาง มีไข้ ซีด ตีข่าน ม้ามโต อ่อนแอ และ ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (ตารางที่ 1) (Dantas-Torres & Figueredo, 2006; Irwin, 2009) สุนัขส่วนมากที่ติดเชื้อ *B. canis* คิดเป็นร้อยละ 31 ต้องการการรักษาจากโรงพยาบาลสัตว์ (Köster *et al.*, 2015) โรคนี้มีการแพร่ระบาดทั่วโลก สุนัขสามารถติดเชื้อ *B. canis* ได้ 2 วิธี คือการถ่ายทอดโดยอาศัยพาหะนำโรคและการสัมผัสโดยตรงของสุนัข เช่น การต่อสู้อ (Adaszek *et al.*, 2011; Azhahianambi *et al.*, 2018; Solano-Gallego *et al.*, 2016)



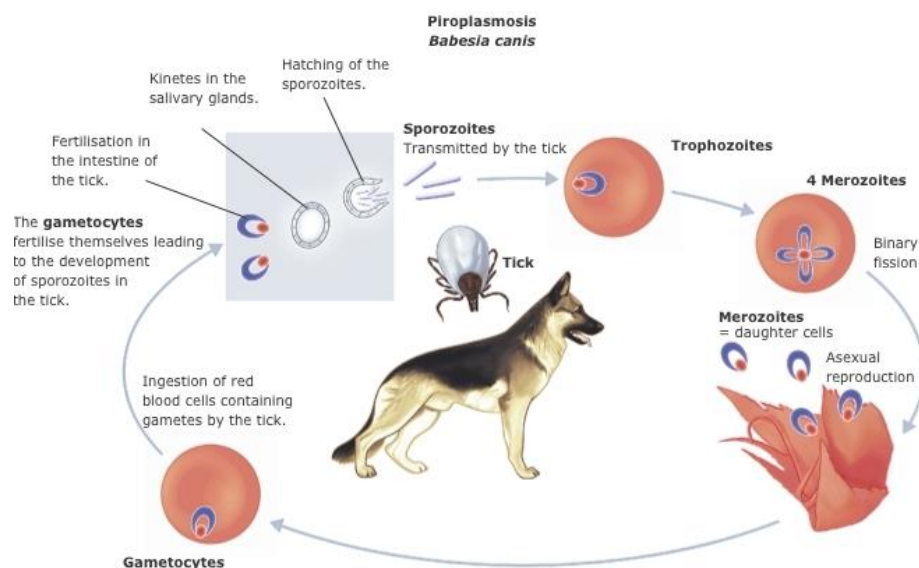
ภาพที่ 4 ลักษณะของเชื้อ *B. canis* ในเม็ดเลือดแดงของสุนัข; scale bar 10 μ m (Solano-Gallego *et al.*, 2016)

2.5.2 พยาธิกำเนิดของเชื้อ *B. canis*

พาหะนำเชื้อ *B. canis* คือ เห็บแข็งสีน้ำตาล (Uilenberg, 2006) สุนัขสามารถติดเชื้อ *B. canis* จากการโดนเห็บที่มีเชื้อ *B. canis* ระยะสปอโรซอยต์กัด เห็บถ่ายทอดเชื้อ *B. canis* ผ่านทางต่อมน้ำลายของเห็บเข้าสู่กระแสเลือดสุนัข เชื้อ *B. canis* เมื่อเข้าสู่ร่างกายของสุนัขจะมีระยะฟักตัวประมาณ 10 ถึง 21 วัน หลังจากเข้าสู่สุนัขแล้วเชื้อ *B. canis* จะเข้าไปแบ่งเซลล์แบบทวีคูณกลายเป็น 2 หรือ 4 เมอโรซอยต์ (merozoites) ในเม็ดเลือดแดง จากนั้นเชื้อ *B. canis* ออกจากเม็ดเลือดแดงด้วยการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และเมอโรซอยต์จะเคลื่อนที่ไปมากในกระแสเลือดและเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงเซลล์ใหม่หรือในบางครั้งเมอโรซอยต์จะย้ายจากเม็ดเลือดแดงเข้าสู่ pre-gametocytes (gamonts) เข้าสู่ร่างกายเห็บเมื่อเห็บดูดเลือดอีกครั้ง (ภาพที่ 5) (Chauvin *et al.*, 2009; Homer *et al.*, 2000; Solano-Gallego *et al.*, 2016)

2.5.3 ภูมิคุ้มกันของสุนัขต่อเชื้อ *B. canis*

เมื่อสุนัขติดเชื้อ *B. canis* ในกระแสเลือด ร่างกายจะสร้างแอนติบอดีชนิด IgG ที่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้โดยเข้าจับกับสปอโรซอยต์ และทำให้เป็นกลางเพื่อไม่ให้เชื้อ *B. canis* บุกรุกเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้สำเร็จ (Homer *et al.*, 2000)



ภาพที่ 5 วงจรชีวิตของเชื้อ *B. canis* ในสุนัข (Hartmann *et al.*, 2013)

2.6 โรคเออร์ริชไอซิส (Ehrlichiosis)

2.6.1 สาเหตุ อาการทางคลินิก และความชุกของเชื้อ *E. canis*

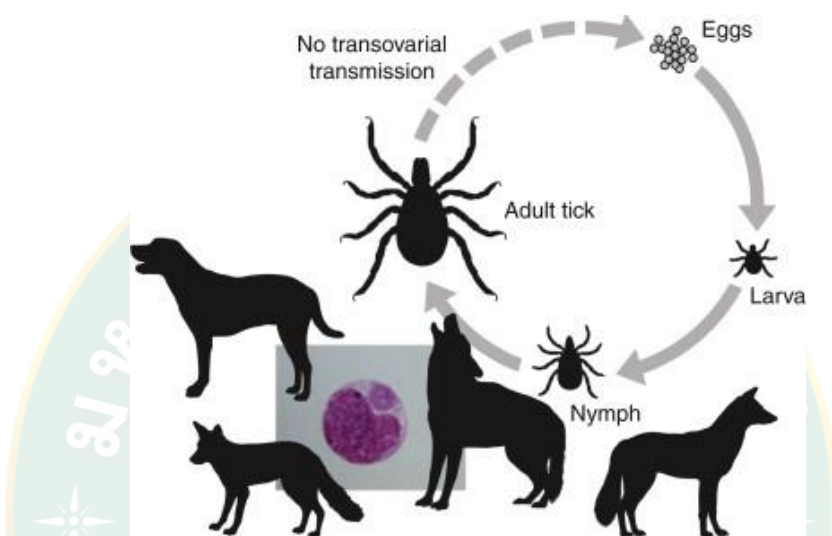
โรคเออร์ริชไอซิสมีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. canis* (Phylum Proteobacteria, Order Rickettsiales, Family Anaplasmataceae) สามารถพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น สุนัขจิ้งจอกหมาป่า และสุนัขพันธุ์พื้นเมืองของแอฟริกา (Van Heerden, 1979) โรคเออร์ริชไอซิสในสุนัขเกิดจากเชื้อ *E. canis* เป็นเชื้อริกเกตเซีย (Gaunt *et al.*, 2010; Waner, 2008) สุนัขที่ติดเชื้อ *E. canis* มีอาการ 3 ระยะ คือ ระยะรุนแรง ระยะไม่แสดงอาการ และระยะเรื้อรัง สุนัขที่ติดเชื้อ *E. canis* จะแสดงอาการโดยรวมดังนี้ เกล็ดเลือดต่ำ โลหิตจาง (Waner, 2008) ไข้สูง เบื่ออาหาร ซึม ม้ามโต และน้ำหนักลด เป็นต้น (ตารางที่ 1) (Eiras *et al.*, 2013; Harrus & Waner, 2011; Kelly, 2000; Straube, 2010) โรคนี้มีการแพร่ระบาดในประเทศโปรตุเกส (Bacellar *et al.*, 1995) อินเดีย (Kalaivanan *et al.*, 2020; Kukreti *et al.*, 2018; Milanjeet *et al.*, 2014) บราซิล (Souza *et al.*, 2010) และอิสราเอล (Fishman *et al.*, 2004) เป็นต้น

2.6.2 พยาธิกำเนิดของเชื้อ *E. canis*

วงจรชีวิตของเชื้อ *E. canis* เริ่มต้นจากเห็บแฉิ่งสีน้ำตาลที่มีเชื้อติดเลือดสุนัข จากนั้นเห็บจะถ่ายทอดเชื้อ *E. canis* ผ่านทางต่อมน้ำลายของเห็บเข้าสู่กระแสเลือดสุนัข เชื้อ *E. canis* เมื่อเข้าสู่ร่างกายของสุนัขจะมีระยะฟักตัวประมาณ 8 ถึง 20 วัน (Harrus, Waner, Aizenberg, & Bark, 1998; Waner, 2008) จากนั้นเชื้อ *E. canis* แพร่กระจายไปยังโมโนนิวเคลียร์เซลล์ (mononuclear cell) เช่น โมโนไซต์ (monocytes) และลิมโฟไซต์ (lymphocytes) และแพร่กระจายไปสู่อวัยวะเป้าหมายในร่างกายของสุนัข ภาพที่ 6 (Waner, 2008)

2.6.3 ภูมิคุ้มกันของสุนัขต่อเชื้อ *E. canis*

เมื่อสุนัขติดเชื้อ *E. canis* ร่างกายจะสร้างแอนติบอดีชนิด IgA IgM และ IgG ต่อเชื้อ *E. canis* (Kelly, 2000) แต่การผลิตแอนติบอดีจะไม่เกิดขึ้นก่อนในช่วง 12 ถึง 14 วัน หลังจากการติดเชื้อ สุนัขจะสร้างแอนติบอดีในวันที่ 15 หลังจากการติดเชื้อ (Harrus, Waner, Aizenberg, & Bark, 1998; Harrus, Waner, Aizenberg, Foley, *et al.*, 1998; Sainz *et al.*, 2015)



ภาพที่ 6 วงจรชีวิตของเชื้อ *E. canis* ในสุนัข (Sykes, 2014)

2.7 โรคอะนาพลาสโมซิส (Anaplasmosis)

2.7.1 สาเหตุ อาการทางคลินิก และความชุกของเชื้อ *A. platys*

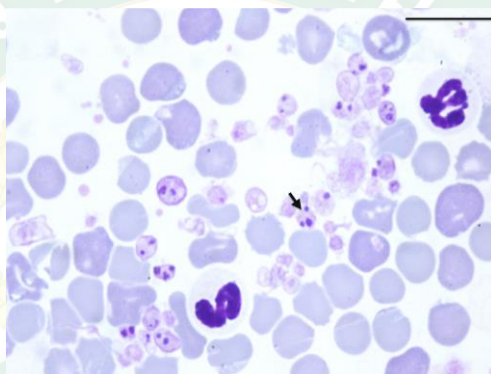
โรคอะนาพลาสโมซิสเกิดจากเชื้อ *Anaplasma platys* หรือ *Ehrlichia platys* (Phylum Proteobacteria, Order Rickettsiales, Family Anaplasmataceae) เชื้อ *A. platys* มีผนังเซลล์ (cell wall) แบบโครงสร้างระดับจุลภาค (ultrastructure) มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อ *A. platys* อาศัยเห็บแคงส์น้ำตาดเป็นพาหะนำโรคเช่นเดียวกับโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขชนิดอื่น (Gaunt *et al.*, 2010) เชื้อ *A. platys* อาศัยเกล็ดเลือด เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล และอีโอซิโนฟิล (eosinophil) ของสุนัขเป็นเซลล์เป้าหมาย เชื้อ *A. platys* มีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นกลุ่ม ๆ เรียกว่า microcolonies หรือ morulae (ภาพที่ 7) (Ramos *et al.*, 2014) สุนัขที่ติดเชื้อ *A. platys* มีอาการคือ เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ มีไข้สูง เบื่ออาหาร และ ต่อม่าน้ำเหลืองผิดปกติ (ตารางที่ 1) (Eiras *et al.*, 2013) โรคนี้มีการแพร่กระจายในบริเตนใหญ่ (Smith & Wall, 2013) ชิลี (Abarca *et al.*, 2007) และโคลัมเบีย (Mccown *et al.*, 2014) เป็นต้น

2.7.2 พยาธิกำเนิดของเชื้อ *A. platys*

วงจรชีวิตของ *A. platys* เริ่มต้นโดยเห็บที่มีเชื้อกัดสุนัข จากนั้นถ่ายทอดเชื้อ *A. platys* ผ่านทางต่อมน้ำลาย เชื้อ *A. platys* จะเข้าสู่ระยะฟักตัวประมาณ 7 ถึง 14 สามารถตรวจหาเชื้อ *A. platys* ได้หลังจากวันที่ 8 ถึง 15 ของการติดเชื้อ เชื้อ *A. platys* อาศัยเกล็ดเลือดเป็นเซลล์เป้าหมายหลักส่งผลให้สุนัขที่ติดเชื้อแสดงอาการเกี่ยวข้องกับเกล็ดเลือด

2.7.3 ภูมิคุ้มกันของสุนัขต่อเชื้อ *A. platys*

เมื่อสุนัขติดเชื้อ *A. platys* ร่างกายจะสร้างแอนติบอดีชนิด IgG ขึ้นเพื่อใช้ในการป้องกันตัวเองโดยจะมีการสร้างแอนติบอดีวันที่ 16 หลังจากการติดเชื้อ (Gaunt *et al.*, 2010; Sainz *et al.*, 2015)



ภาพที่ 7 ลักษณะของเชื้อ *A. platys* ในเกล็ดเลือดสุนัข; scale bar 20 μ m (Ramos *et al.*, 2014)

2.8 โรคทริปาโนโซมาโอซิส (Trypanosomiasis)

2.8.1 สาเหตุ อาการทางคลินิก และความชุกของเชื้อ *T. evansi*

โรคทริปาโนโซมาโอซิสเกิดจากโปรโตซัวชนิด *Trypanosoma evansi* (Phylum Euglenozoa, Order Trypanosomatida, Family Trypanosomatidae) ลักษณะรูปร่างแบนยาว คล้ายใบไม้ หรือปลาไหล เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลัม (flagellum) (ภาพที่ 8) เชื้อ *T. evansi* อาศัยพาหะนำโรคคือเหือบเทศเมีย (*Tabanus spp.*) (Desquesnes, Dargantes, *et al.*, 2013) อาการของโรคทริปาโนโซมาโอซิสคือ เลือดจาง อ่อนแอ ไข้สูง เบื่ออาหาร กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ ตาแดง กระจุกตาอักเสบ และเยื่อตาขาวอักเสบ (ตารางที่ 1) โรคนี้มีการแพร่กระจายในประเทศอินเดีย และบราซิลใหญ่ (Desquesnes, Holzmuller, *et al.*, 2013)

2.8.2 พยาธิกำเนิดของเชื้อ *T. evansi*

วงจรชีวิตของเชื้อ *T. evansi* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือแบ่งตัวในพาหะนำโรค เชื้อจะแบ่งตัวแบบทวีคูณในสุนัขเท่านั้น (Brun *et al.*, 1998) โดยสุนัขสามารถติดเชื้อ *T. evansi* ผ่านการดูดกินเลือดโดยเหือบ และสุนัขกินเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไปในร่างกาย (Aquino *et al.*, 1999)

2.8.3 ภูมิคุ้มกันของสุนัขต่อเชื้อ *T. evansi*

เมื่อสุนัขติดเชื้อ *T. evansi* ร่างกายจะสร้างแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG และสามารถตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้ในวันที่ 9 ถึง 17 วันหลังจากการติดเชื้อ (Aquino *et al.*, 1999)



ภาพที่ 8 ลักษณะของเชื้อ *T. evansi* ในเลือดสุนัข (Defontis *et al.*, 2012)

ตารางที่ 1 ลักษณะของโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข เชื้อก่อโรค พาหะนำโรค และอาการ

โรค	เชื้อ	พาหะ	อาการขั้นรุนแรง
Hepatozoonosis	<i>H. canis</i>	<i>R. sanguineus</i>	อัมพาต หรือกล้ามเนื้ออักเสบ
Babesiosis	<i>B. canis</i>	<i>R. sanguineus</i>	ภาวะเลือดออก เลือดจาง เหงือกซีด
Ehrlichiosis	<i>E. canis</i>	<i>R. sanguineus</i>	ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ
Anaplasmosis	<i>A. platys</i>	<i>R. sanguineus</i>	ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ
Trypanosomaosis	<i>T. evansi</i>	<i>Tabanus spp.</i>	ตาแดง

2.9 วิธีตรวจโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข

2.9.1 วิธีย้อมฟิล์มเลือดบาง (thin blood smear)

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในปัจจุบันมีหลายวิธี ได้แก่ วิธีทางสัตวศาสตร์ เช่น การย้อมฟิล์มเลือดบางเป็นวิธีการตรวจหาเชื้อโดยตรงจากเลือดสดหรือเลือดที่อยู่ในสารป้องกันเลือดแข็งตัวเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันในคลินิกสัตวศาสตร์ วิธีนี้ให้ผลการทดสอบรวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายไม่สูง แต่มีข้อด้อยคือต้องอาศัยบุคคลที่มีความชำนาญ ความไวและความแม่นยำต่ำ (Harrus & Waner, 2011; Kamani *et al.*, 2013; Straube, 2010)

2.9.2 วิธีทางซีรั่มวิทยา

วิธีทางซีรั่มวิทยา เช่น IFAT และ ELISA เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีของเชื้อแต่ละชนิด โดยอาศัยหลักการทำงานระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดีในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น วิธีนี้นิยมใช้กันในห้องปฏิบัติการเนื่องจากเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความแม่นยำสูง แต่มี

ข้อด้อยคือใช้ระยะเวลาในการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดนาน ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจ มีความไวต่ำในกรณีที่สุนัขติดเชื้อในระยะเริ่มต้นซึ่งร่างกายยังไม่ผลิตแอนติบอดีขึ้นมาตอบสนองต่อเชื้อ และสามารถเกิดการจับกันข้ามของปฏิกิริยา (cross reactive) ได้

2.9.3 วิธีทางอณูชีววิทยา

1) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เป็นวิธีที่ใช้กันแพร่หลายมากที่สุดในการศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เป็นวิธีเพิ่มปริมาณ (amplification) สารพันธุกรรมของเชื้อในหลอดทดลองโดยอาศัยหลักการแบบเดียวกันกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์มีข้อดีเนื่องจากมีความแม่นยำ จำเพาะ รวดเร็ว และความไวสูง (Kamani *et al.*, 2013; Straube, 2010) แต่ข้อด้อยของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อได้ที่ละเชื้อในการทำปฏิกิริยาหนึ่งครั้ง

1.1) องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

ดีเอ็นเอแม่แบบ (template DNA) คือส่วนของสายดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการศึกษา ซึ่งทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเพื่อให้ออกแบบไพรเมอร์

ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ (DNA polymerase) คือ เอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการสร้างสายดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ต้องเป็นชนิดที่สามารถทนความร้อนได้สูงอย่างน้อย 94 ถึง 95 °C โดยไม่เสียสภาพ ปัจจุบันเอนไซม์ที่นิยมใช้กันมากในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ คือ *Taq* DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่สกัดมาจากแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Thermus aquaticus* (*Taq*)

Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) คือนิวคลีโอไทด์ชนิด dATP dTTP dGTP และ dCTP สำหรับใช้เป็นสารตั้งต้น (substrate) ในการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่

ไพรเมอร์ (oligonucleotide primers) คือนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวขนาดสั้น ๆ (single-stranded oligonucleotides) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (complementary) กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยไพรเมอร์ทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์จำเป็นต้องมีไพรเมอร์อย่างน้อย 1 คู่ (forward primer และ reverse primer ซึ่งมีทิศทางสวนทางกัน)

บัฟเฟอร์ (buffer) คือ สารละลายที่ควบคุมสถานะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ

Magnesium ion (Mg^{2+}) คือ co-factor เพื่อช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสให้ปฏิกิริยาการสร้างสายดีเอ็นเอดำเนินต่อไป ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน (magnesium ion) ที่มากเกินไปทำให้เกิดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ไม่จำเพาะ แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยเกินไปก็จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่จำเพาะน้อย

1.2) ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารพันธุกรรมประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนคือ ขั้นแรก denaturation การแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (double-stranded DNA; dsDNA) ให้แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว (single-stranded DNA; ssDNA) ด้วยอุณหภูมิสูงประมาณ 90 ถึง 95 °ซ ประมาณ 30 ถึง 60 วินาที ขั้นที่สอง annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมาเหลือประมาณ 50 ถึง 55 °ซ ประมาณ 30 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่แบบสายเดี่ยว ขั้นตอนที่สาม Extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในทิศทางจาก 5' ไป 3' ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบโดยเป็นการสร้างต่อจากไพรเมอร์ที่เกาะอยู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยอาศัยการทำงานของดีเอ็นเอพอลิเมอเรสในการสังเคราะห์โดยนำนิวคลีโอไทด์มาต่อกันแบบคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบ การทำงานของดีเอ็นเอพอลิเมอเรสมีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 72°ซ ประมาณ 30 ถึง 180 วินาที (Schochetman *et al.*, 1988)

1.3) ปริมาณผลิตภัณฑ์หลังการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะดำเนินการสังเคราะห์ในแต่ละรอบซึ่งประกอบด้วย denaturation, annealing และ extension หลังการทำปฏิกิริยาจำนวนทั้งสิ้นประมาณ 30 ถึง 40 รอบ จะมีการเพิ่มดีเอ็นเอบริเวณที่ศึกษาแบบเอกซ์โพเนนเชียลในปริมาณ 2^n (n = จำนวนรอบที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสามารถนำมาศึกษาต่อได้ เช่น การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เพื่อศึกษาขนาดของดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจ การทำ hybridization หรือนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เป็นต้น (Does, 2013)

1.4) รูปแบบต่าง ๆ ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับตรวจโรคพยาธิในเม็ดเลือดมีหลายวิธี ได้แก่ nested PCR (Suksawat *et al.*, 2001), PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) (Baneth *et al.*, 2009) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ (Multiplex Polymerase Chain reaction; mPCR) และ Real-time PCR (Peleg *et al.*, 2010) เป็นต้น

2) ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ (Multiplex Polymerase Chain Reaction)

ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์เป็นวิธีที่มีการพัฒนามาจากปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบดั้งเดิมเพื่อให้เกิดความรวดเร็ว สะดวก และประหยัดค่าใช้จ่าย โดยมีหลักการที่แตกต่างจากปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสคือสามารถตรวจหาชิ้นที่สนใจได้คราวละหลายชิ้นในการทำปฏิกริยาเพียงครั้งเดียวด้วยการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีนของเชื้อแต่ละชนิดซึ่งใช้จำนวนคู่ไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่

2.1) การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ควรมีความยาวของไพรเมอร์อยู่ในช่วง 18 ถึง 24 เบส ให้ขนาดของผลิตภัณฑ์หลังการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ส่วนประกอบของ GC อยู่ในช่วงร้อยละ 35 ถึง 60 ค่า ΔG ของ Hairpin loop และ self-dimer เฉลี่ยไม่ควรเกิน $-6 \text{ kcal.mole}^{-1}$ และมี annealing temperature (T_m) ที่ใกล้เคียงกันประมาณ 52 ถึง 58 °ซ เป็นต้น (Chamberlain & Chamberlain, 1994; Henegariu *et al.*, 1997; Roux, 2009)

2.2) ข้อดีของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์

การตรวจวินิจฉัยด้วยปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ มีข้อดีหลายประการคือ มีความจำเพาะ แม่นยำ รวดเร็ว ง่าย และประหยัดระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัย (Elnifro *et al.*, 2000; Henegariu *et al.*, 1997)

2.3) ยีนที่ใช้ในการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์

การพัฒนาปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือด มีการศึกษายีนต่าง ๆ ได้แก่ *GroEL*, *VirB9* และ *18s rRNA* (Duarte *et al.*, 2008; Kledmanee *et al.*, 2009; Suksawat *et al.*, 2001) โดยมีรายละเอียดดังนี้

ยีน Heat Shock Operon (*GroESL*) ประกอบด้วยบริเวณระหว่าง *GroEL* และ *GroES* มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ เนื่องจากมีความแปรปรวนสูง (variation) มากกว่ายีน *16s rRNA* การสร้าง phylogenetic tree ด้วยยีน *GroEL* มีความคล้ายกับยีน *16s rRNA* นอกจากนี้ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบความไวของยีนทั้งสองชนิดในการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่สภาวะเดียวกัน พบว่า ยีนทั้งสองให้ผลไม่แตกต่างกัน และยังพบว่า ยีน *GroEL* มีความจำเพาะต่อเชื้อ *A. platys* (Inokuma *et al.*, 2002)

ยีน *VirB9* เป็นยีนในกลุ่มหนึ่งในชุดยีน *VirB/D* ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของ type IV secretion system (TFSS) ซึ่งเป็นกลไกที่แบคทีเรียใช้ในการยึดเกาะกับแบคทีเรียด้วยกันหรือยึดเกาะกับเซลล์เจ้าบ้าน ตลอดจนขนส่งสารขนาดแมโครโมเลกุล (macromolecules) เข้าสู่เซลล์ เป้าหมาย TFSS เป็นปัจจัยที่แบคทีเรียใช้ก่อความรุนแรงไปยังเยื่อหุ้มและไซโตพลาสซึมของโฮสต์ โดยยีนในกลุ่ม TFSS มีความจำเป็นสำหรับการอยู่รอดและความหลากหลายของแบคทีเรีย เชื้อ *E. canis* เป็นแบคทีเรียชนิด intracellular pathogen ที่จับอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์และไม่รวมตัวเข้ากับเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (monocytes) และแมโครฟาจ (macrophage) โดยหน้าที่ของยีน *VirB9* ในเชื้อ *E. canis* คือแพร่เชื้อ *E. canis* เข้าสู่ภายในเซลล์ (intracellular) เพื่อความอยู่รอด เพิ่มจำนวน และยังเป็น high antigenic สามารถแสดงออกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและเห็บ จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า ยีน *VirB9* เป็นยีนบริเวณอนุรักษ์สูงกว่ายีนอื่น ๆ เช่น ยีน *p30-10*, ยีน *encode one of the major outer membrane proteins* และยีน *16s rRNA* (Felek et al., 2003)

ยีน *18s ribosomal RNA* (rRNA) เป็นองค์ประกอบสำคัญของไรโบโซมซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือการแปลรหัส โดยยีนที่พบในยูคาริโอตมีหลายประเภท เช่น large rRNA ได้แก่ ยีน *18S rRNA*, *28S rRNA* และ *5.8S rRNA* ประกอบด้วย Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) และ ITS2 ยีน *18s rRNA* เป็นองค์ประกอบหน่วยใหญ่ของไรโบโซม 40S และเป็นบริเวณอนุรักษ์ของเชื้อ *H. canis* และ *B. canis* (Duarte et al., 2008)

2.4) การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์

การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ในการตรวจวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคระบบทางเดินหายใจ และลำไส้ของสุนัข (Canine Respiratory และ Enteric disease) (Deng et al., 2018; Hao et al., 2019) โรคเชื้อราพวกเดอร์มาโทไฟท์ (Dermatophytes) (Leal et al., 2018)

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

3.1 พื้นที่ศึกษา

เก็บตัวอย่างเลือดจากสุนัขในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 19 อำเภอ ได้แก่ ฮอด แม่วาง ฝาง กัลยาณิวัฒนา จอมทอง แม่อน หางดง เชียงดาว ดอยสะเก็ด อมก๋อย เวียงแหง สันทราย สะเมิง แม่แจ่ม แม่อาย ดอยหล่อ ดอยเต่า ไชยปราการ และสันป่าตอง

3.2 การเก็บตัวอย่างเลือดสุนัข

เก็บตัวอย่างเลือดสุนัขจำนวน 870 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนมกราคมถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2562 โดยเก็บเลือดในหลอดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA (BD Vacutainer, USA) จากนั้นเก็บเลือดไว้ในตู้ 4 °ซ จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอ งานวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (Approval No. MACUC 005S/2562)

3.3 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของสุนัขด้วยวิธี chelex resin มีขั้นตอนการสกัดดังต่อไปนี้
ดัดแปลงวิธีของ Nithikadpanich *et al.*, 2019

- 3.3.1 ปิดตัวอย่างเลือดปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.3.2 เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที
- 3.3.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที 4 °ซ นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส
- 3.3.4 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการตีกันหลอดเบา ๆ
- 3.3.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที 4 °ซ นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส
- 3.3.6 เติม Chelex ความเข้มข้นร้อยละ 5 (Sigma-Aldrich, USA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
- 3.3.7 เติมเอนไซม์โปรตีนเอสเค (Proteinase K) (Invitrogen, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยปั่นขึ้นและลง
- 3.3.8 นำไปปั่นที่ 56 °ซ นาน 30 นาที
- 3.3.9 ย้ายไปปั่นต่อที่ 95 °ซ นาน 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วตั้งทิ้งไว้จนเย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 3.3.10 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที 25 °ซ นาน 1 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 °ซ จนกว่าจะใช้งาน วัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260

และ 280 นาโนเมตร โดยเครื่อง Nanodrop 2000/2000C spectrophotometer V1.0 (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการพัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และสำหรับการสำรวจความชุกของโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข ไพรเมอร์ Ap724F และ Ap724R มีความจำเพาะต่อยีน *GroEL* ของเชื้อ *A. platys* มีขนาดของผลิตภัณฑ์ 724 bp, ไพรเมอร์ Ba103F และ Ba721R มีความจำเพาะต่อยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *B. canis* มีขนาดของผลิตภัณฑ์ 619 bp, ไพรเมอร์ Hs462F และ Hs462R มีความจำเพาะต่อยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *H. canis* มีขนาดของผลิตภัณฑ์ 462 bp, ไพรเมอร์ Ehr1401F และ Ehr1780R มีความจำเพาะต่อยีน *VirB9* ของเชื้อ *E. canis* มีขนาดของผลิตภัณฑ์ 380 bp และไพรเมอร์ Te227F และ Te227R มีความจำเพาะต่อยีน *VSG* ของเชื้อ *T. evansi* มีขนาดของผลิตภัณฑ์ 227 bp (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับตรวจวินิจฉัย

เชื้อก่อโรค พยาธิใน เม็ดเลือด	ชื่อไพร เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'	ยีน	ขนาดของ ผลิตภัณฑ์ (base pair)	อ้างอิง
<i>A. platys</i>	Ap724F	AAGGCGAAAGAAGCAGTCTTA	<i>GroEL</i>	724	Inokuma <i>et al.</i> , 2002
	Ap724R	CATAGTCTGAAGTGGAGGAC			
<i>B. canis</i>	Ba103F	CCAATCCTGACACAGGGAGGT AGTGACA	<i>18s</i> <i>rRNA</i>	619	Kledmanee <i>et</i> <i>al.</i> , 2009
	Ba721R	CCCCAGAACCCAAAGACTTTGA TTTCTCTCAAG			
<i>H. canis</i>	Hs462F	TGTGTACAAAGGGCAGGGACG	<i>18s</i> <i>rRNA</i>	462	East <i>et al.</i> , 2008
	Hs462R	GCGGCTTAATTTGACTCAACAC			
<i>E. canis</i>	Ehr1401F	CCATAAGCATAGCTGATAACCC TGTTACAA	<i>VirB9</i>	380	Kledmanee <i>et</i> <i>al.</i> , 2009
	Ehr1780R	TGGATAATAAAACCGTACTATG TATGCTAG			

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับตรวจวินิจฉัย (ต่อ)

เชื้อก่อโรค	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ยีน	ขนาดของผลิตภัณฑ์	อ้างอิง
พยาธิในเม็ดเลือด	เมอร์	5'-3'		(base pair)	
<i>T. evansi</i>	Te227F	TGCAGACGACCTGACGCTACT	VSG	227	Azhahianambi <i>et al.</i> , 2018
	Te227R	CTCCTAGAAGCTTCGGTGTCTCT			

3.5 การคัดเลือกเชื้อ *A. platys*, *B. canis*, *H. canis*, *E. canis* และ *T. evansi* ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสจากตัวอย่างเลือดสุนัข

คัดเลือกเชื้อ *A. platys*, *B. canis*, *H. canis*, *E. canis* และ *T. evansi* ด้วยการเพิ่มปริมาณ ยีน *GroEL* ของเชื้อ *A. platys*, ยีน *VirB9* ของเชื้อ *E. canis*, ยีน *VSG* ของเชื้อ *T. evansi* และ *18s rRNA* ของเชื้อ *H. canis* และ *B. canis* ด้วยไพรเมอร์ของแต่ละยีน (ตารางที่ 2) จากตัวอย่างเลือด โดยมีขั้นตอนดังนี้ สกัดดีเอ็นเอจากเลือดสุนัข จากนั้นเตรียมปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่สภาวะ Initial denaturation (94 °ซ, 3 นาที, 1 รอบ) ตามด้วย 35 รอบของ Denaturation (94 °ซ, 30 วินาที) Annealing (58 °ซ, 30 วินาที) และ Extension (68 °ซ, 30 วินาที) ปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย 2X Quick Taq® HS DyeMix (Toyobo, Japan) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 500 nM และดีเอ็นเอของสุนัข ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตร อ่านผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยใช้อะกาโรส-เจลร้อยละ 2 (Agarose gel; Biobasic, Canada) และ Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer (Biobasic) ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 60 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) (Biobasic) เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ภายใต้แสงเหนือม่วง (Ultraviolet) บันทึกภาพด้วยเครื่อง GelMax® UV Gel Imager (Labortechnik, Germany) เมื่อเกิดแถบผลิตภัณฑ์นำไปเพิ่มปริมาณยีนอีกครั้ง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR Clean-Up & Gel Extraction Kit (Bio-Helix, Taiwan) แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing; 1st base, Malaysia) เปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) สำหรับเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) และนำไปพัฒนาปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ต่อไป

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

3.6.1 การทดลองหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด

เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ที่สภาวะ Initial denaturation (94 °ซ, 3 นาที, 1 รอบ) ตามด้วย 35 รอบของ Denaturation (94 °ซ, 30 วินาที) Annealing (57, 58, 59 และ 60 °ซ, 30 วินาที) และ Extension (68 °ซ, 30 วินาที) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ประกอบด้วย 2X Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 500 nM (ตารางที่ 2) และดีเอ็นเอของเชื้อ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis* และ *A. platys* ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (10⁴ copy numbers) ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์หลังการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.6.2 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด

เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ที่มีสภาวะ Initial denaturation (94 °ซ, 3 นาที, 1 รอบ) ตามด้วย 35 รอบของ Denaturation (94 °ซ, 30 วินาที) Annealing (58 °ซ, 30 วินาที) และ Extension (68 °ซ, 30 วินาที) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ประกอบด้วย 2X Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 nM และดีเอ็นเอของเชื้อ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis* และ *A. platys* ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (10⁴ copy numbers) ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์หลังการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.6.3 การทดสอบความเข้มข้นของ 2X Quick Taq® HS DyeMix ที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบมัลติเพล็กซ์ที่มีสภาวะ Initial denaturation (94 °ซ, 3 นาที, 1 รอบ) ตามด้วย 35 รอบของ Denaturation (94 °ซ, 30 วินาที) Annealing (58 °ซ, 30 วินาที) Extension (68 °ซ, 30 วินาที) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบมัลติเพล็กซ์ ประกอบด้วย 2X Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้าย 1 เท่า และ 1.2 เท่า ดีเอ็นเอปริมาณ 1 ไมโครลิตร (10⁵ ถึง 10¹⁰ copy numbers) ไพรเมอร์ Ap724F และ Ap724R ความเข้มข้นสุดท้าย 400 nM, ไพรเมอร์ Ehr1401F, Ehr1780R, Ba103F และ Ba721R ความเข้มข้นสุดท้าย 200 nM และไพรเมอร์ Hs462F และ Hs462R ความเข้มข้นสุดท้าย 100 nM ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 และ 30 ไมโครลิตร เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์หลังการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.7 การพัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบมัลติเพล็กซ์

พัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบมัลติเพล็กซ์สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อสี่ชนิดคือ *A. platys*, *B. canis*, *H. canis* และ *E. canis* เนื่องจากสุนัขจำนวน 870 ตัว ไม่เกิดแถบผลิตภัณฑ์

ของยีน VSG ของเชื้อ *T. evansi* ดังนั้น ผู้วิจัยจึงไม่สามารถนำมาพัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์ได้

เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์ที่มีสภาวะ Initial denaturation (94 °ซ, 3 นาที, 1 รอบ) ตามด้วย 35 รอบของ Denaturation (94 °ซ, 30 วินาที) Annealing (58 °ซ, 30 วินาที) Extension (68 °ซ, 30 วินาที) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์ ประกอบด้วย 2X Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ Ap724F และ Ap724R ความเข้มข้นสุดท้าย 400 nM, ไพรมเมอร์ Ehr1401F, Ehr1780R, Ba103F และ Ba721R ความเข้มข้นสุดท้าย 200 nM และไพรมเมอร์ Hs462F และ Hs462R ความเข้มข้นสุดท้าย 100 nM ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร

3.8 การศึกษาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

คำนวณเปลี่ยนความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากหน่วย ng เป็น copy numbers จากเว็บไซต์ Genomics & Sequencing Center สร้างโดย Andrew Staroscik, 2004 โดยมีสูตรดังนี้

$$\text{copy numbers} = (\text{amount} \times 6.022 \times 10^{23}) / (\text{length} \times 1 \times 10^9 \times 650)$$

$$\text{numbers} = (\text{ng} \times \text{number/mole}) / (\text{bp} \times \text{ng/g} \times \text{g/mole of bp})$$

เมื่อ	6.022×10^{23}	คือ	เลขอาโวกาโดร (Avogadro's number)
	1×10^9	คือ	copy numbers ที่เปลี่ยนหน่วยเป็น ng
	650	คือ	ขนาดความยาวของผลิตภัณฑ์
	amount	แทนค่า	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหน่วย ng
	length	แทนค่า	ความยาวของดีเอ็นเอต้นแบบ

เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่มีสภาวะ Initial denaturation (94 °ซ, 3 นาที, 1 รอบ) ตามด้วย 35 รอบของ Denaturation (94 °ซ, 30 วินาที) Annealing (58 °ซ, 30 วินาที) Extension (68 °ซ, 30 วินาที) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ประกอบด้วย 2X Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร เจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่คำนวณในหน่วย copy numbers ให้มีความเข้มข้น 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 และ 10^0 copy numbers ไพรมเมอร์ Ap724F และ Ap724R ความเข้มข้นสุดท้าย 400 nM, ไพรมเมอร์ Ehr1401F, Ehr1780R, Ba103F และ

Ba721R ความเข้มข้นสุดท้าย 200 nM และ ไพรเมอร์ Hs462F และ Hs462R ความเข้มข้นสุดท้าย 100 nM ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์หลังการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.9 การศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์

นำตัวอย่างเลือดสุนัขที่ตรวจพบยีน *VirB9* ของเชื้อ *E. canis*, ยีน *GroEL* ของเชื้อ *A. platys* และ *18s rRNA* ของเชื้อ *H. canis* และ *B. canis* มาศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างเลือดของสุนัขที่ไม่ติดเชื้อ เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ที่มีสถานะ Initial denaturation (94 °ซ, 3 นาที, 1 รอบ) ตามด้วย 35 รอบของ Denaturation (94 °ซ, 30 วินาที) Annealing (58 °ซ, 30 วินาที) Extension (68 °ซ, 30 วินาที) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ ประกอบด้วย 2X Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Ap724F และ Ap724R ความเข้มข้นสุดท้าย 400 nM, ไพรเมอร์ Ehr1401F, Ehr1780R, Ba103F และ Ba721R ความเข้มข้นสุดท้าย 200 nM และไพรเมอร์ Hs462F และ Hs462R ความเข้มข้นสุดท้าย 100 nM ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์หลังการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.10 การศึกษาความชุกของโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่

เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ที่มีสถานะ Initial denaturation (94 °ซ, 3 นาที, 1 รอบ) ตามด้วย 35 รอบของ Denaturation (94 °ซ, 30 วินาที) Annealing (58 °ซ, 30 วินาที) Extension (68 °ซ, 30 วินาที) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ ประกอบด้วย 2X Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Ap724F และ Ap724R ความเข้มข้นสุดท้าย 400 nM, ไพรเมอร์ Ehr1401F, Ehr1780R, Ba103F และ Ba721R ความเข้มข้นสุดท้าย 200 nM และไพรเมอร์ Hs462F และ Hs462R ความเข้มข้นสุดท้าย 100 nM ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ภายใต้แสงเหนือม่วง

เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับตรวจเชื้อ *T. evansi* โดยมีสถานะดังนี้ Initial denaturation (94 °ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ) ตามด้วย 35 รอบของ Denaturation (94 °ซ, 30 วินาที) Annealing (58 °ซ, 30 นาที) Extension (68 °ซ, 30 วินาที) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประกอบด้วย 2X Quick Taq® HS DyeMix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร

ไพรมเมอร์ที่ความเข้มข้น 500 nM (ตารางที่ 2) ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 10 ไมโครลิตร เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ภายใต้แสงเหนือม่วง

3.11 การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบาง

นำตัวอย่างเลือดสุนัขที่อยู่ในสารป้องกันเลือดแข็งตัวจำนวน 122 ตัวอย่าง ป้ายลงบนสไลด์ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร เกลี้ยเลือดให้กระจายด้วยสไลด์สะอาดทำมุม 30 ถึง 45 องศา รอจนเลือดแห้งสนิท (Neel) จากนั้นตรึง (fixation) ด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ (absolute methyl alcohol) ความเข้มข้นร้อยละ 99.9 นาน 3 นาที รอจนแห้ง นำสไลด์จุ่มในสายละลายลาย romanowsky-type stain (Wright-Giemsa):buffer ในอัตราส่วน 1:30 นาน 60 นาที (RVL Supply, Thailand) เมื่อย้อมสีเสร็จแล้วล้างเบา ๆ ด้วยน้ำสะอาด ตั้งทิ้งไว้จนแห้งจึงสามารถนำไปศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขต่อปัจจัยเสี่ยง 3 ปัจจัย ได้แก่ เพศ อายุ และการมีสถานพยาบาลสัตว์ในระยะ 10 กม. ด้วยสถิติทดสอบไค-สแควร์ (chi-square test: χ^2 -square) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตัวแปรอิสระ (Independent Variables) ได้แก่ เพศ อายุ และการมีสถานพยาบาลสัตว์ในระยะ 10 กม. และตัวแปรตามคือ (Dependent Variable) คือการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

เมื่อ	χ^2	แทนค่า	ไค-สแควร์ (Chi-square)
	O_{ij}	แทนค่า	ค่าความถี่ที่ได้จากการสังเกตในแถวที่ i คอลัมน์ที่ j
	E_{ij}	แทนค่า	ค่าความถี่ที่คาดหวังในแถวที่ i คอลัมน์ที่ j
	r	แทนค่า	จำนวนกลุ่มของตัวแปรด้านแถว
	c	แทนค่า	จำนวนกลุ่มของตัวแปรคอลัมน์

ซึ่ง E_{ij} แทนค่า $\frac{(\text{ผลรวมของความถี่แถวที่ } i) \times (\text{ผลรวมของความถี่คอลัมน์ที่ } j)}{\text{ผลรวมของความถี่ทั้งหมด}}$

เมื่อ พบว่า ตัวแปรมีความสัมพันธ์กันต้องทดสอบระดับความสัมพันธ์โดยใช้สถิติ Cramer's V เพื่อใช้วัดระดับของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามเมื่อมีตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งหรือทั้ง 2 ตัวแปรเป็นข้อมูลชนิดสเกลนาม (ตารางที่ 3) กำหนดโดยมีสูตรดังนี้

$$Cramer's V = \sqrt{\frac{x^2}{n(t-1)}}$$

เมื่อ	Cramer's V	แทนค่า	สัมประสิทธิ์ Cramer's V
	x^2	แทนค่า	ค่าของ x^2 จากการทดสอบความเป็นอิสระต่อกัน
	n	แทนค่า	ขนาดของตัวอย่าง
	t	แทนค่า	จำนวนแถวหรือจำนวนคอลัมน์ที่มีค่าน้อย

ตารางที่ 3 เกณฑ์ของการแปลความหมายค่าสัมประสิทธิ์ของ Cramer's V (กัลยา, 2553)

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	ระดับความสัมพันธ์
0.9 – 1.0	สัมพันธ์สูงมาก
0.7 – 0.9	สัมพันธ์สูง
0.3 – 0.7	สัมพันธ์ปานกลาง
0.0 – 0.3	สัมพันธ์ต่ำ
0.0	ไม่สัมพันธ์

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 พื้นที่ศึกษาและจำนวนสุนัขที่ใช้ในการสำรวจโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข

งานวิจัยนี้เก็บตัวอย่างเลือดสุนัขจำนวน 870 ตัว ในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย จำนวน 19 อำเภอ ระหว่างเดือนมกราคมถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2562 โดยเก็บข้อมูลดังนี้ เพศ อายุ และการมีสถานพยาบาลสัตว์ในระยะ 10 กม. (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ข้อมูลตัวอย่างในแต่ละอำเภอ

ว/ด/ป ที่เก็บตัวอย่าง	อำเภอ	จำนวน ตัวอย่าง (ตัว)	สถานที่เก็บ เลือดสุนัข	การมีสถานพยาบาล สัตว์ในระยะ 10 กม.
24 ม.ค. 2562	ดอยสะเก็ด	120	มูลนิธิ	มี
25 ม.ค. 2562	อมก๋อย	52	หมู่บ้าน	ไม่มี
2 ก.พ. 2562	เวียงแหง	52	หมู่บ้าน	ไม่มี
25 ก.พ. 2562	สะเมิง	72	หมู่บ้าน	ไม่มี
11 มี.ค. 2562	แม่แจ่ม	48	หมู่บ้าน	ไม่มี
18 มี.ค. 2562	กัลยาณิวัฒนา	37	หมู่บ้าน	ไม่มี
22 มี.ค. 2562	แม่วาง	71	หมู่บ้าน	มี
3 เม.ย. 2562	สันทราย	4	หมู่บ้าน	มี
29 เม.ย. 2562	ฮอด	5	หมู่บ้าน	ไม่มี
8 พ.ค. 2562	แม่อาว	71	หมู่บ้าน	ไม่มี
13 พ.ค. 2562	แม่ออน	57	หมู่บ้าน	มี
17 พ.ค. 2562	เชียงดาว	59	หมู่บ้าน	ไม่มี
28 พ.ค. 2562	จอมทอง	8	หมู่บ้าน	ไม่มี
3 มิ.ย. 2562	หางดง	21	หมู่บ้าน	มี
11 มิ.ย. 2562	ฝาง	52	หมู่บ้าน	ไม่มี
18 มิ.ย. 2562	ดอยหล่อ	21	หมู่บ้าน	มี
21 มิ.ย. 2562	ดอยเต่า	28	หมู่บ้าน	มี

ตารางที่ 4 ข้อมูลตัวอย่างในแต่ละอำเภอ (ต่อ)

ว/ด/ป ที่เก็บตัวอย่าง	อำเภอ	จำนวน ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ เลือดสุนัข	การมีสถานพยาบาล สัตว์ในระยะ 10 กม.
24 มิ.ย. 2562	ไชยปราการ	17	หมู่บ้าน	ไม่มี
15 ก.ค. 2562	สันป่าตอง	75	มูลนิธิ	มี
รวม	19	870	-	-

4.2 การคัดเลือกเชื้อ *A. platys*, *B. canis*, *H. canis*, *E. canis* และ *T. evansi* ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสจากตัวอย่างเลือดสุนัข

จากการคัดเลือกเชื้อ *T. evansi* จากตัวอย่างเลือดจำนวน 870 พบว่า ไม่พบตัวอย่างเลือด
สุนัขที่ติดเชื้อ *T. evansi* ดังนั้น ผู้วิจัยจึงไม่ได้ศึกษาในขั้นต่อไป

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. platys*, *B. canis* และ *E. canis* ที่พบในจังหวัดเชียงใหม่
(ภาคผนวก ก) มีความเหมือนร้อยละ 96 ถึง 99 จึงมีความสอดคล้องกับรายงานในฐานข้อมูลโดย
สามารถบ่งบอกได้ว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน ส่วนเชื้อ *H. canis* ที่พบในจังหวัดเชียงใหม่ (ภาคผนวก ก)
มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนเชื้อ *H. canis* ในฐานข้อมูลร้อยละ 89.3 ซึ่งสามารถบ่งบอกได้ว่าเป็นเชื้อ
ชนิดเดียวกันแต่อาจจะเป็นไอโซเลทใหม่ที่ยังไม่พบการรายงานในฐานข้อมูล (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบผลิตรหัสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับฐานข้อมูล

คำอธิบาย	GenBank accession No. ของฐานข้อมูล	BLAST details			
		Max score	Query coverage	Per. identity	E- value
<i>Anaplasma platys</i> RDC heat shock protein GroEL gene, partial cds	AF478129.1	1188	99.0%	96.1% (707/736)	0
<i>Babesia canis vogeli</i> from Venezuela 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	DQ297390.1	1064	99.0%	99.5% (584/587)	0


```

Query 238 GAGTGATATCCATAATTAACACTACTTTATATATTTCTGTATTACTGTATACAAAAGTT 297
          |||
Sbjct 297 GAGTGATATCCATAATTAACACTACATTATATATTTTCGTTATTACTGTATACAAAAGTT 238

```

```

Query 298 TTAATTCTACTATCTATTGTAACAGGGTTATCATCTATGCTTATGGA 344
          |||
Sbjct 237 TTAATTCTACTATCTATTGTAACAGGGTTATCAGCTATGCTTATGGA 191

```

ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *E. canis* กับฐานข้อมูล

4.2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GroEL* ของเชื้อ *A. platys*

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GroEL* ของเชื้อ *A. platys* จากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูโก้พอลิเมอไรส พบว่า มีความเหมือนเมื่อเทียบกับยีน *GroEL* ของเชื้อ *A. platys* จากฐานข้อมูลร้อยละ 96.0 (707/736), Accession No. AF478129.1, Gaps ร้อยละ 1 (11/736), Score 1188 bits (643) และ Strand Plus/Minus (ภาพที่ 10)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1188 bits (643)	0.0	707/736 (96%)	11/736 (1%)	Plus/Minus
Query 1	ATCATAGTTCGGGAG-GGAGGACTCCATCTGTNGCTTTGATTACAGTGAGTTCGCTGGC	59		
Sbjct 1178	ATCATAG-TCTGAAGTGGAGGACTCCATCTGT-GCTTTGATT-TGGTTAGTTCGCTGGC	1122		
Query 60	AATAACGTTAAGAATTGCTGTCAACACTTCGCCTTAAGACTGGTCGTTGCATCATAGGTG	119		
Sbjct 1121	AATAAC-TTCAGAATTGCTGTCAACACTTC--C-TATTA-TTGTTCGTTGTATCCTTTGTG	1067		
Query 120	ATACGAACGTATATAGCAGTTCCTAGATCACTTAGCGAGATGCCTCCATCTTAACTGCT	179		
Sbjct 1066	ATACGAACGTTTTTAGCAGTTCCTAGATCACTTAGCGAGATGCCTCCATCTTAACTGCT	1007		
Query 180	AGCTCGTCATTACGACGTAAGTACTTAGCACCAGCAATTACTGCGATATCACCAAGCATATCC	239		
Sbjct 1006	AGCTCGTCATTACGACGTAAGTACTTAGCACCAGCAATTACTGCGATATCACCAAGCATATCC	947		
Query 240	TTCCTTCTATCACCAAAGCCAGGAGCCTTAACAGCTGCAACTTGGAGACCACCACGCAGC	299		
Sbjct 946	TTCCTTCTATCACCAAAGCCAGGAGCCTTAACAGCTGCAACTTGGAGACCACCACGCAGC	887		
Query 300	TTGTTTCAGAACCAGAGTGCTTAAAGCTTCTCCTTCTACATCCTCAGCGATGATGAGCAGA	359		
Sbjct 886	TTGTTTCAGAACCAGAGTGCTTAAAGCTTCTCCTTCTACATCCTCAGCGATGATGAGCAGA	827		

```

Query 360 GGCCTGCCGGATCTAGCAACGTTTTCAAGGATCGGCAGAATGTGCTGTACTACGTTTATT 419
          |||
Sbjct 826 GGCCTGCCGGATCTAGCAACGTTTTCAAGGATCGGCAGAATGTGCTGTACTACGTTTATT 767

Query 420 TTCTTCTCTGTAGGAATATGTACGGATTCTCGAACTCCACCAGCATCTTTTCTGCATTG 479
          |||
Sbjct 766 TTCTTCTCTGTAGGAATATGTACGGATTCTCGAACTCCACCAGCATCTTTTCTGCATTG 707

Query 480 GTTACGAAGTAAGGAGAGAGATAACCGCGATCAAACGCATACCATCAGTTTTCTCGACT 539
          |||
Sbjct 706 GTTACGAAGTAAGGAGAGAGATAACCGCGATCAAACGCATACCATCAGTTTTCTCGACT 647

Query 540 TCTAGGTCTTTGAATCCCTTGCTTTCTTCGACAGTTATAACCCCATCAGACCAACTTCC 599
          |||
Sbjct 646 TCTAGGTCTTTGAATCCCTTGCTTTCTTCGACAGTTATAACCCCATCAGACCAACTTCC 587

Query 600 TTCACACACTGAGCAATTTTGCTTCCATGTTCTTATCGCCGTTAGCAGAGATGGTAGCA 659
          |||
Sbjct 586 TTCACACACTGAGCAATTTTGCTTCCATGTTCTTATCGCCGTTAGCAGAGATGGTAGCA 527

Query 660 ACCTGAGCAACTTCCTCTTCTCAACTTCACGACTTCAGTGACATTAAGCGCGGTTAAGA 719
          |||
Sbjct 526 ACCTGAGCAACTTCCTCTTCTCAACTTCACGCCT-CATTGACA-TAAGCGCGGTTAAGA 469

Query 720 CTGCTTCTTTGCCTT 735
          |||
Sbjct 468 CTGCTTCTTTGCCTT 453

```

ภาพที่ 10 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. platys* กับฐานข้อมูล

4.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *B. canis*

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *B. canis* จากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่า มีความเหมือนเมื่อเทียบกับยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *B. canis* จากฐานข้อมูลร้อยละ 99.4 (584/587), Accession No. DQ297390.1, Gaps ร้อยละ 0 (3/587), Score 1064 bits (576) และ Strand Plus/Minus (ภาพที่ 11)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1064 bits (576)	0.0	584/587 (99%)	3/587 (0%)	Plus/Minus

```

Query 1 TCCTGAAGGGGT CAGCAAA-CGACGACCTCCAATCACTAGGTCGGCATGGTTTATGGTTA 59
          |||
Sbjct 988 TCCTGAAGGGGT CAGCAAAACGACGACCTCCAATCACTAG-TCGGCATGGTTTATGGTTA 930

```

Query 60 GGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTGATTAATGGAAA 119
 |||
 Sbjct 929 GGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCTTGATTAATGGAAA 870

Query 120 CGTCCTTGGCAAATGCTTTCGCAGTAGTTCGTCTTTAACAAATCTAAGAATTTACCTCT 179
 |||
 Sbjct 869 CGTCCTTGGCAAATGCTTTCGCAGTAGTTCGTCTTTAACAAATCTAAGAATTTACCTCT 810

Query 180 GACAGTTAAATACGAATGCCCCAACCGTTCCTATTAACCATTACTAAGGTTCAATAACC 239
 |||
 Sbjct 809 GACAGTTAAATACGAATGCCCCAACCGTTCCTATTAACCATTACTAAGGTTCAATAACC 750

Query 240 AACAAAATAGAACCAAAGTCTACTCTATTATTCCATGCTGAAGTATTCAAGACAAAAGT 299
 |||
 Sbjct 749 AACAAAATAGAACCAAAGTCTACTCTATTATTCCATGCTGAAGTATTCAAGACAAAAGT 690

Query 300 CTGCTTGAAACACTCTAATTTTCTcaaagtaaaaaggaaaacccaaaagcgaactcgaa 359
 |||
 Sbjct 689 CTGCTTGAAACACTCTAATTTTCTCAAAGTAAAAGGGAAAACCCAAAAGCGAACTCGAA 630

Query 360 aaagccaaacgaatggcaaactcgaacACGCTAAAATTCAACTACGAGCTTTTTAACTGC 419
 |||
 Sbjct 629 AAAGCCAAACGAATGGCAAACCGAACACGCTAAAATTCAACTACGAGCTTTTTAACTGC 570

Query 420 AACAAAGTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGC 479
 |||
 Sbjct 569 AACAAAGTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGC 510

Query 480 CCTCCAATTGCTACTCTGGTGAGGGTTGGGTACCATCATTCCAATTACAAGACATTAG 539
 |||
 Sbjct 509 CCTCCAATTGCTACTCTGGTGAGGGTTGGGTACCATCATTCCAATTACAAGACATTAG 450

Query 540 CCCTGTATTGTTATTTCTGTCACTACCTCCCTGTGTGAGGGATTGG 586
 |||
 Sbjct 449 CCCTGTATTGTTATTTCTGTCACTACCTCCCTGTGTGAGG-ATTGG 404

ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *B. canis* กับฐานข้อมูล

4.2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *H. canis*

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *H. canis* จากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่า มีความเหมือนเมื่อเทียบกับยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *H. canis* จากฐานข้อมูลร้อยละ 89.3 (383/429), Accession No. MH615006.1, Gaps ร้อยละ 3 (17/429), Score 521 bits (282) และ Strand Plus/Plus (ภาพที่ 12)

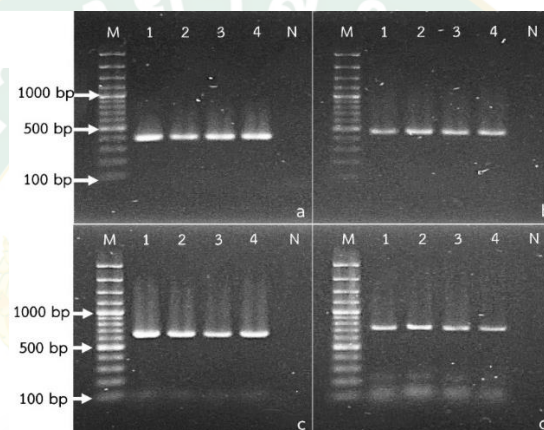
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
521 bits(282)	1e-143	383/429 (89%)	17/429 (3%)	Plus/Plus
Query 1	TTTGACTCAACACGGGAAAACCTCACCTGGCCCGGACACCGTGAGGATTGACAGATTGAGA			60
Sbjct 1695	TTTGACTCAACACGGGAAAACCTCACAGGTCCAGACATAGAAAGGATTGACAGATTGATA			1754
Query 61	GCTCTTTCATAATTCGATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTG			120
Sbjct 1755	GCTCTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTG			1814
Query 121	TCTGGTTAATTCGGATAACGAACGAGACCTCTAACCTACTAAATAGGGACTGGAAAAGCT			180
Sbjct 1815	TCTGGTTAATTCGGTTAACGAACGAGACCT-TAACCTGCTAAATAGGG--T-GAAAAGCT			1870
Query 181	TTAGTCGTCCAGAAATTACTTCTTAGAAGGACAATGCGGTGTCTAACGCGCAGGAAGTTT			240
Sbjct 1871	TTAGTTTT--A-AAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCG-TGTCTAACGCG-AGGAAGTTT			1925
Query 241	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCAGGGCTGCACGCGCTACAATGG			300
Sbjct 1926	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCGCTACAAT-G			1984
Query 301	AGGAATCCAACAAGTGCTATAACCATTACCTGATAAGCTATGGGTAACCCCTTGAAAATC			360
Sbjct 1985	ATGCATCCAACAAGTT-TATAACC-TTGGCTGGTAAGCT-TGGGTAATCTTTTGAATATG			2041
Query 361	CATCCGTGATCGGGAATAGGGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGT			420
Sbjct 2042	CATC-GTGAT-GGGAATA--GATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGT			2097
Query 421	AAGCGCGAG	429		
Sbjct 2098	AAGCGCGAG	2106		

ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *H. canis* กับฐานข้อมูล

4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

4.3.1 อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด

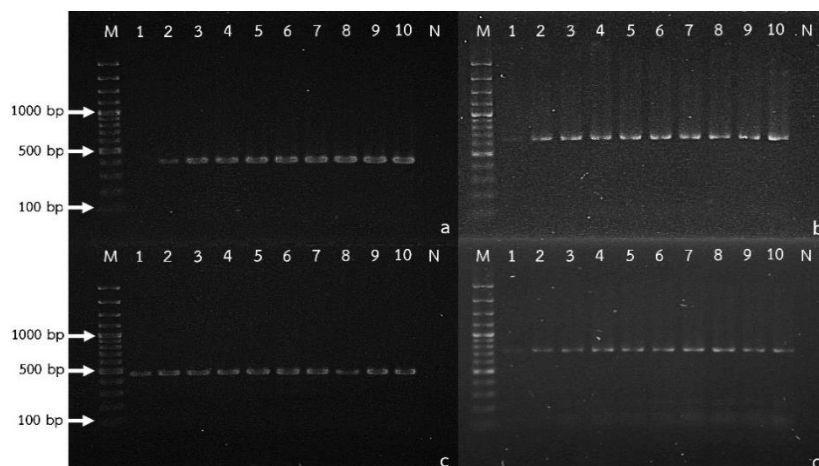
อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 57 ถึง 60 °ซ สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่มีขนาดของผลิตภัณฑ์ตรงกับที่กำหนด คือ 380, 462, 619 และ 724 bp สำหรับเชื้อ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis* และ *A. platys* ตามลำดับ โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้น 10^4 copy numbers (ภาพที่ 13) ส่วนการศึกษาดีเอ็นเอทั้งจีโนม (Genomic DNA) พบว่า ที่อุณหภูมิ 57, 59 และ 60 °ซ ไม่สามารถตรวจพบแถบผลิตภัณฑ์ ดังนั้น จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 58 °ซ สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์



ภาพที่ 13 อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด (แถว M คือ 100 bp plus DNA marker; ยีน *VirB9* ของเชื้อ *E. canis*(a); ยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *H. canis*(b); ยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *B. canis*(c); ยีน *GroEL* ของเชื้อ *A. platys*(d); แถว N คือ ตัวควบคุมเชิงลบ) (หมายเลข 1-4 คือ อุณหภูมิ annealing 57, 58, 59 และ 60 °ซ ตามลำดับ)

4.3.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์

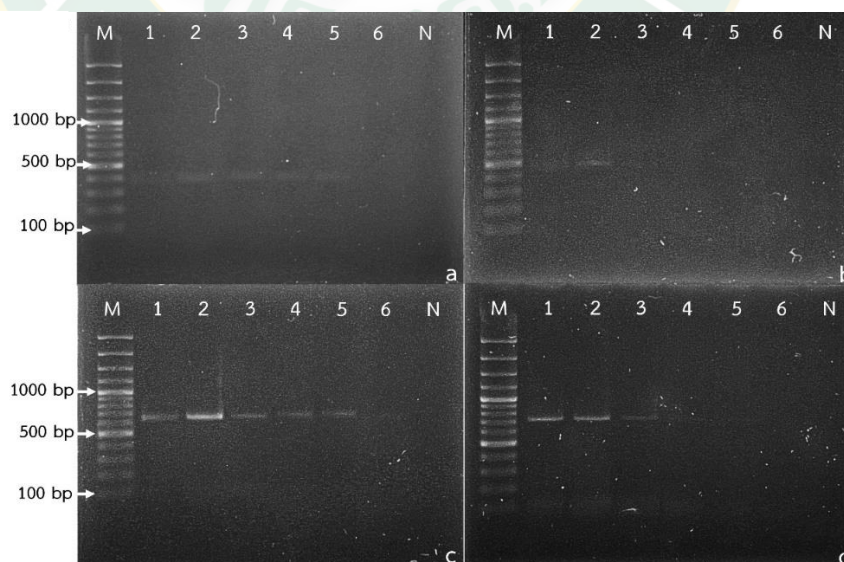
ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบยีน *VirB9* ของเชื้อ *E. canis* คือ 100 nM, ยีน *GroEL* ของเชื้อ *A. platys* และ ยีน *18s rRNA* ของเชื้อ *H. canis* และ *B. canis* คือ 50 nM โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้น 10^4 copy numbers ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์ โดยให้ความเข้มข้นของแถบผลิตภัณฑ์ที่ใกล้เคียงกัน คือ 200 nM สำหรับไพรเมอร์ Ehr1401F, Ehr1780R, Ba103F และ Ba721R 100 nM สำหรับไพรเมอร์ Hs462F และ Hs462R และ 400 nM สำหรับไพรเมอร์ Ap724F และ Ap724R (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ของเชื้อ *E. canis*(a); *B. canis*(b); *H. canis*(c) และ *A. platys*(d) (แถว M คือ 100 bp plus DNA marker; แถว 1 คือ 50 nM; แถว 2 คือ 100 nM; แถว 3 คือ 150 nM; แถว 4 คือ 200 nM; แถว 5 คือ 250 nM; แถว 6 คือ 300 nM; แถว 7 คือ 350 nM; แถว 8 คือ 400 nM; แถว 9 คือ 450 nM; แถว 10 คือ 500 nM; แถว N คือตัวควบคุมเชิงลบ)

4.4 การหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือ 10^1 copy numbers ของเชื้อ *E. canis* และเชื้อ *B. canis* 10^4 copy numbers ของเชื้อ *H. canis* และ 10^3 copy numbers ของเชื้อ *A. platys* (ภาพที่ 15)

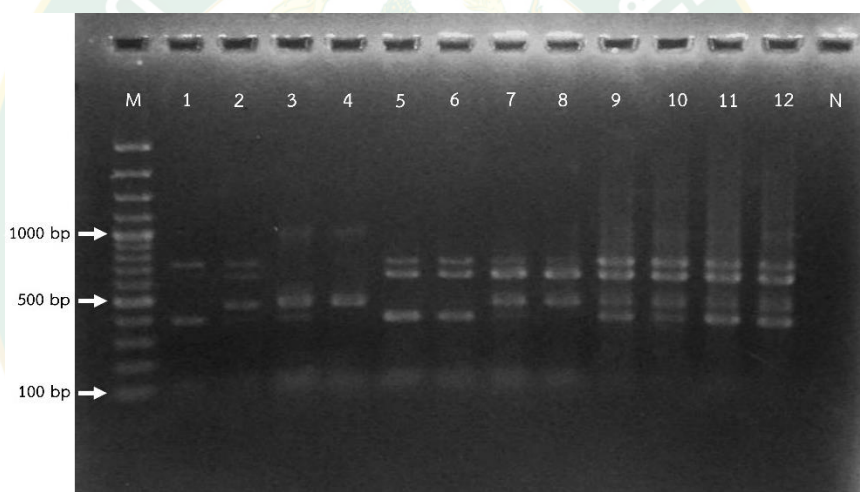


ภาพที่ 15 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของเชื้อ *E. canis*(a); *H. canis*(b); *B. canis*(c) และ *A. platys*(d) (แถว M คือ 100 bp plus DNA marker; แถว 1 คือ 10^5 copy numbers; แถว 2 คือ 10^4 copy numbers; แถว 3 คือ

10^3 copy numbers; แถว 4 คือ 10^2 copy numbers; แถว 5 คือ 10^1 copy numbers; แถว 6 คือ 10^0 copy numbers; แถว N คือตัวควบคุมเชิงลบ)

4.5 การทดสอบความเข้มข้นของ 2X Quick Taq® HS DyeMix ที่เหมาะสม

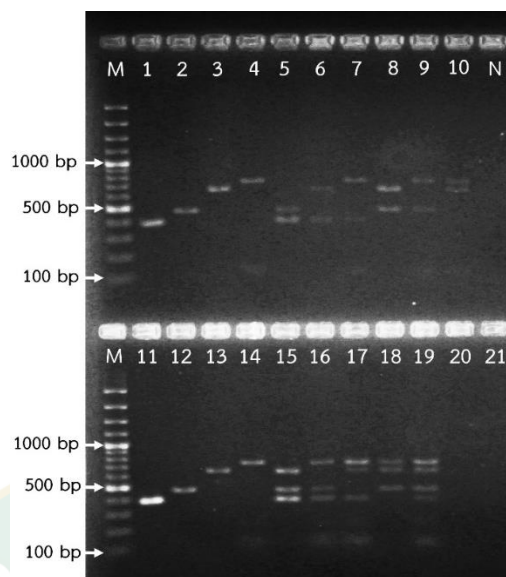
การทดสอบความเข้มข้นสุดท้ายของ 2X Quick Taq® HS DyeMix สำหรับการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมีดีเอ็นเอ พบว่า การใช้ 2X Quick Taq® HS DyeMix เป็น 1.2 เท่า ให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ 2X Quick Taq® HS DyeMix 1 เท่า เมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากกว่า 10^7 copy numbers ในทางตรงกันข้าม เมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำกว่า 10^6 copy numbers การใช้ 2X Quick Taq® HS DyeMix เป็น 1 เท่า ให้แถบผลิตภัณฑ์มากกว่าการใช้ 2X Quick Taq® HS DyeMix เป็น 1.2 เท่า (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 ความเข้มข้นสุดท้ายของ 2X Quick Taq® HS DyeMix ที่เหมาะสม (แถว M คือ DNA marker; แถว 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 คือ 2X Quick Taq® HS DyeMix ความเข้มข้น 1.2 เท่า; แถว 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือ 2X Quick Taq® HS DyeMix ความเข้มข้น 1 เท่า; แถว 1, 2 คือ 10^5 copy numbers; แถว 3, 4 คือ 10^6 copy numbers; แถว 5, 6 คือ 10^7 copy numbers; แถว 7, 8 คือ 10^8 copy numbers; แถว 9, 10 คือ 10^9 copy numbers; แถว 11, 12 คือ 10^{10} copy numbers; แถว N คือตัวควบคุมเชิงลบ)

4.6 การศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมีดีเอ็นเอ

สุนัขที่ติดเชื้อ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis* และ *A. platys* สามารถตรวจพบได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมีดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยตรวจพบแถบผลิตภัณฑ์ตรงกับยีน *VirB9* ของ *E. canis*, *18s rRNA* ของ *H. canis* และ *B. canis* และ *GroEL* ของ *A. platys* (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 ความจำเพาะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ (แถว M คือ DNA marker; แถว 1, 11 คือ *E. canis*; แถว 2, 12 คือ *H. canis*; แถว 3, 13 คือ *B. canis*; แถว 4, 14 คือ *A. platys*; แถว 5 คือ *E. canis* และ *H. canis*; แถว 6 คือ *E. canis* และ *B. canis*; แถว 7 คือ *E. canis* และ *A. platys*; แถว 8 คือ *B. canis* และ *H. canis*; แถว 9 คือ *H. canis* และ *A. platys*; แถว 10 คือ *B. canis* และ *A. platys*; แถว 15 คือ *E. canis* และ *H. canis* และ *B. canis*; แถว 16 คือ *E. canis* และ *H. canis* และ *A. platys*; แถว 17 คือ *E. canis* และ *B. canis* *A. platys*; แถว 18 คือ *H. canis* และ *B. canis* และ *A. platys*; แถว 19 คือ *B. canis* และ *H. canis*, *E. canis* และ *A. platys*; แถว 20, 21 คือตัวอย่างเลือดสุนัขที่ไม่ติดเชื้อ; แถว N คือตัวควบคุมเชิงลบ)

4.7 การศึกษาความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดสุนัขจำนวน 870 ตัว (ภาคผนวก ข) พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ng/ μ l ถึง 20 μ g/ μ l สัดส่วนระหว่าง A260/A280 ต่ำกว่า 1.5 และสัดส่วนระหว่าง A260/A230 ต่ำกว่า 1 แสดงให้เห็นว่าคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้อาจจะมีการปนเปื้อนอาร์เอ็นเอและสารอื่น ๆ ที่อาจจะมีผลยับยั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่งผลให้อาจจะตรวจไม่พบเชื้อเป็นจำนวนมากกว่าความเป็นจริง ดังนั้น การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคควรเลือกใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอที่ให้คุณภาพดีเอ็นเอสูงกว่านี้

การศึกษาความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดของสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 870 ตัวอย่าง ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่า สุนัขที่ติดเชื้อเพียงชนิดเดียวคือ *H. canis* ร้อยละ 38.0 (331 ตัว) *E. canis* ร้อยละ 0.7 (6 ตัว) *A. platys* ร้อยละ 0.6 (5 ตัว) *B. canis* ร้อยละ 0.2 (2 ตัว) และไม่พบ

การติดเชื้อ *T. evansi* ความชุกของของการตรวจพบสารพันธุกรรมในสุนัขที่ติดเชื้อร่วมกันสองชนิด คือ *B. canis* และ *H. canis* ร้อยละ 22.0 (191 ตัว) *H. canis* และ *E. canis* ร้อยละ 1.8 (16 ตัว) *H. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 1.4 (12 ตัว) และไม่พบการติดเชื้อ *B. canis* และ *E. canis*, *B. canis* และ *A. platys*, และ *E. canis* และ *A. platys* ความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมในสุนัขที่ติดเชื้อร่วมกันสามชนิดคือ *B. canis*, *H. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 0.9 (8 ตัว) *B. canis*, *H. canis* และ *E. canis* ร้อยละ 0.9 (8 ตัว) *H. canis*, *E. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 0.2 (2 ตัว) และไม่พบการติดเชื้อ *B. canis*, *E. canis* และ *A. platys* ความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมในสุนัขที่ติดเชื้อร่วมกันสี่ชนิดคือ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 0.5 (4 ตัว) สุนัขสุขภาพดีไม่พบการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดคิดเป็นร้อยละ 32.8 (285 ตัว) (ตารางที่ 6) การติดเชื้อร่วมกันหลายชนิดสามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากเชื้อทั้งสี่สายพันธุ์มีการใช้เห็บสายพันธุ์เดียวกันเป็นพาหะนำโรค (Baneth *et al.*, 2015; Eiras *et al.*, 2013)

ในการศึกษานี้ พบว่า สุนัขติดเชื้อ *H. canis* สูงที่สุดร้อยละ 38.0 เนื่องจากสุนัขสามารถติดเชื้อ *H. canis* ได้จากการกินเห็บเข้าสู่ร่างกาย จากนั้นเชื้อเพิ่มจำนวนและเข้าสู่อวัยวะเป้าหมาย เช่น ม้าม ต่อมมน้ำเหลือง ไชกระดูก และเม็ดเลือดขาว เป็นต้น เมื่อเห็บตัวถัดไปดูดเลือดสุนัขที่ติดเชื้อ *H. canis* ทำให้เห็บมีโอกาสดูดเลือดของสุนัขที่มีเชื้อเข้าสู่ตัวเห็บไปด้วย สุนัขที่ติดเชื้อ *H. canis* ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้โดยเชื้อจะเข้าไปแฝงในอวัยวะต่าง ๆ โดยส่วนมากมักจะแสดงอาการของโรคในระยะต้นของการติดเชื้อ เมื่อสุนัขอ่อนแอก็จะแสดงอาการของโรคออกมา นอกจากนี้ ผนังเซลล์ของโอโอซัยต์ของเห็บที่มีเชื้อชนิดนี้แฝงอยู่มีขนาดบางทำให้ง่ายต่อการทำลายโดยน้ำดีของสุนัข ทำให้สปOROซอยต์เชื้อแพร่กระจายเข้าสู่สุนัขได้มากขึ้น (Baneth *et al.*, 2007; Ivanov & Tsachev, 2008) การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ *H. canis* มีความยุ่งยากโดยต้องควบคุมเห็บในสิ่งแวดล้อมตรงกันข้ามกับเชื้อ *E. canis*, *B. canis* และ *A. platys* โดยการใช้ยากำจัดเห็บเท่านั้น (Dantas-Torres & Otranto, 2016) นอกจากนี้ เชื้อ *H. canis* สามารถติดเชื้อร่วมกับเชื้อชนิดอื่นได้เนื่องจากเชื้อ *H. canis* มีกลไกที่ซับซ้อนคือทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวของสุนัขมีการป้องกันตัวเองลดต่ำลง และสร้างความเสียหายให้กับเยื่อหุ้มชั้นนอกของโมโนซัยต์ระหว่างการบุกรุก จากนั้นทำให้เชื้อชนิดอื่น ๆ เข้ามาบุกรุกตามได้ง่ายขึ้น (Baneth *et al.*, 2015) สอดคล้องกับรายงานการตรวจความชุกของโรคดังกล่าวด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในประเทศอินเดีย พบว่า สุนัขติดเชื้อ *H. canis* มากที่สุดรองลงมาคือ *E. canis*, *A. platys*, *B. vogeli* และ *B. gibsoni* (Rani *et al.*, 2011)

ความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. canis* ในการทดลองนี้ต่ำเนื่องจากสุนัขที่ป่วยด้วยเชื้อ *B. canis* ร้อยละ 31 ต้องการการรักษาจากโรงพยาบาลสัตว์แต่ในการทดลองนี้ได้เก็บตัวอย่างเลือดจากสุนัขสุขภาพดีไม่แสดงอาการของโรคส่งผลให้ความชุกของเชื้อ *B. canis* ต่ำ (Köster *et al.*, 2015) จากการศึกษาความชุกของโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในต่างประเทศ เช่น ประเทศ

ไต้หวัน (Wu *et al.*, 2009) จากโรงพยาบาลสัตว์ พบว่า ความชุกของเชื้อ *B. gibsoni* (ร้อยละ 6.3) สูงที่สุด ตามด้วยเชื้อ *E. canis* (ร้อยละ 2.0) และเชื้อ *A. phagocytophillum* (ร้อยละ 1.6) เป็นต้น และ ประเทศโรมาเนีย (Andersson *et al.*, 2017) ที่เก็บตัวอย่างเลือดจากโรงพยาบาลสัตว์ พบว่า ความชุกของเชื้อ *B. canis* (ร้อยละ 29.2) ตามด้วยเชื้อ *H. canis* (ร้อยละ 15.0)

การสำรวจความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขใน จังหวัดเชียงใหม่ พบว่า อำเภอดอยสะเก็ดสุนัขติดเชื้อสูงที่สุดร้อยละ 10.3 อำเภอสะเมิงร้อยละ 8.2 และอำเภอแม่เมาะร้อยละ 6.3 เป็นต้น (ตารางที่ 6) งานวิจัยนี้ไม่พบสุนัขติดเชื้อ *T. evansi* เนื่องจาก สุนัขมีอัตราการติดเชื้อชนิดนี้สูงในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคมซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวเหลือบมีการ เจริญเติบโตสูงที่สุด และในประเทศไทยมีรายงานสุนัขติดเชื้อ *T. evansi* เฉลี่ยร้อยละ 1.3 ต่อปีจาก สุนัขเข้าตรวจหาเชื้อร้อยละ 4.5 ด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบางซึ่งมีโอกาสต่ำมากที่สุนัขจะติดเชื้อ *T. evansi* (Sangmaneeet *et al.*, 2002) ในประเทศไทยมีการศึกษาความชุกของโรคพยาธิในเม็ด เลือดสุนัขด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ณ ด่านกักกันสัตว์ จังหวัดนครพนม สำรวจสุนัขจรจัด จำนวน 43 ตัว พบว่า สุนัขติดเชื้อ *H. canis* (ร้อยละ 44.2) มากกว่าเชื้อ *E. canis* (ร้อยละ 9.3) และ เชื้อ *B. canis* (ร้อยละ 7.0) (Juasook *et al.*, 2016) จังหวัดสงขลามีการสำรวจความชุกของโรค พยาธิในเม็ดเลือดสุนัขจรจัดในอำเภอคลองหอยโข่ง สะเดา และหาดใหญ่ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ- เรส พบว่า สุนัขติดเชื้อ *H. canis* (ร้อยละ 18.8) มากกว่าเชื้อ *B. canis* (ร้อยละ 9.4) เชื้อ *A. platys* (ร้อยละ 4.4) และเชื้อ *E. canis* (ร้อยละ 3.9) (Liu *et al.*, 2016) จากรายงานการสำรวจโรคพยาธิใน เม็ดเลือดสุนัขจรจัดในจังหวัดนครพนม และจังหวัดสงขลา พบว่า สุนัขมีการติดเชื้อ *H. canis* มาก ที่สุดซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ในทางตรงกันข้ามการสำรวจความชุกของโรคพยาธิในเม็ด เลือดสุนัขที่เข้ารับการตรวจที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร จำนวน 1,104 ตัว โดยการย้อมสี Diff-Quick จากนั้นตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า สุนัขติดเชื้อ *B. vogeli* (ร้อยละ 8.7) มากกว่าเชื้อ *E. canis* (ร้อยละ 2.5) เชื้อ *H. canis* (ร้อยละ 0.8) และเชื้อ *A. platys* (ร้อยละ 0.4) สุนัขที่มาจากโรงพยาบาลสัตว์มีอัตราการติดเชื้อ *B. vogeli* มากกว่าสุนัขที่มาจากด่าน กักกันสัตว์ และสุนัขจรจัด เนื่องจากสุนัขที่ป่วยด้วย *B. vogeli* ส่วนใหญ่จะแสดงอาการของโรค รุนแรง เช่น เลือดออก และเหงือกซีด ทำให้ต้องเข้ารับการรักษามาตามโรงพยาบาล ดังนั้นโรงพยาบาล สัตว์จึงพบสุนัขที่ติดเชื้อ *B. vogeli* มากกว่าสุนัขตามสถานที่อื่น ๆ

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขโดยวิธีทางอณูชีววิทยาให้ผลบวกมากกว่าการ ตรวจด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบาง เนื่องจากวิธีทางอณูชีววิทยาเป็นวิธีที่ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ สามารถบอกได้ว่าในขณะที่สุนัขติดเชื้ออยู่ มีความจำเพาะ แม่นยำสูง และความไวสูง (Azhahianambi *et al.*, 2018; Peleg *et al.*, 2010)

ความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมในเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขเมื่อจำแนกตามปัจจัยเสี่ยง พบว่า สุนัขเพศผู้มีการติดเชื้อร้อยละ 68.1 (324 ตัว) ส่วนสุนัขเพศเมียมีการติดเชื้อร้อยละ 66.2 (261 ตัว) โดยมีความสอดคล้องกับการศึกษาความชุกในจังหวัดกาฬสินธุ์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่า สุนัขเพศผู้มีการติดเชื้อร้อยละ 50 เพศเมียติดเชื้อร้อยละ 29.2 (Piratae *et al.*, 2019) เมื่อจำแนกตามอายุ พบว่า สุนัขช่วงอายุ 9 ถึง 11 ปี มีการติดเชื้อมากกว่าช่วงอายุอื่น พื้นที่ห่างไกลสถานพยาบาลสัตว์ในระยะ 10 กม. พบว่า สุนัขในพื้นที่ดังกล่าวมีอัตราการติดเชื้อสูงกว่าพื้นที่ที่มีสถานพยาบาลสัตว์ในระยะ 10 กม. การวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงทั้งสามปัจจัย พบว่า เพศ ($p = 0.330$) และอายุ ($p = 0.498$) ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข ในทางตรงกันข้ามปัจจัยการมีสถานพยาบาลสัตว์ในระยะ 10 กม. มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข ($p = 0.000$) (ตารางที่ 7) สุนัขที่ติดเชื้อโดยส่วนมากมีปัจจัยเสี่ยงดังนี้ เพศผู้ อายุต่ำกว่าสองปี พันธุ์ผสมเลี้ยงนอกบ้าน สุนัขเพศผู้มีการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดมากกว่าสุนัขเพศเมีย (Sanisuriwong *et al.*, 2012; Suksawat *et al.*, 2001; Yuasa *et al.*, 2012) และฤดูกาลมีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดซึ่งฤดูหนาวมีความเกี่ยวข้องกับวงจรชีวิตของเห็บ เห็บในช่วงฤดูหนาวจะมีอัตราการเจริญและมีการทำกิจกรรมสูงที่สุดรวมไปถึงเห็บในช่วงฤดูหนาวจัดอยู่ในระยะตัวเต็มวัย โดยเห็บในระยะนี้สามารถปล่อยเชื้อเข้าสู่ตัวสุนัข 3 ชั่วโมง หลังจากขึ้นเกาะ ส่วนในฤดูร้อนเห็บจะเข้าสู่การจำศีลและการลอกคราบเพื่อเข้าสู่ระยะตัวกลางวัยหรือตัวเต็มวัย (Milanjeet *et al.*, 2014; Sainz *et al.*, 2015; Solano-Gallego *et al.*, 2016) โดยมีความสอดคล้องกับรายงานความชุกของเชื้อดังกล่าวในประเทศไนจีเรียที่เก็บตัวอย่างเลือดสุนัขในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคม (ฤดูฝนเข้าฤดูร้อน 22 °ซ - 34 °ซ) พบว่า เชื้อ *H. canis* (ร้อยละ 41.4) มีความชุกมากที่สุด (Kamani *et al.*, 2013) การศึกษาความชุกของโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในประเทศบราซิลในเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน (ฤดูร้อนในบราซิล) พบว่า สุนัขมีการติดเชื้อ *A. platys* (ร้อยละ 48.8) *E. canis* (ร้อยละ 38.0) *B. canis* (ร้อยละ 7.3) และ *H. canis* (ร้อยละ 0.5) (Ramos *et al.*, 2010) โดยมีความชุกตรงกันข้ามกับรายงานในประเทศบราซิลเนื่องจากในฤดูร้อนเชื้อ *A. platys* และ *E. canis* สามารถเข้าสู่เห็บในฤดูร้อนได้ดีมีอัตราการเจริญสูง (Eiras *et al.*, 2013; Harrus & Waner, 2011) ส่วนปัจจัยการมีสถานพยาบาลสัตว์ในระยะ 10 กม. มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขจากรายงานการศึกษาปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับโรคพยาธิในเม็ดเลือด พบว่า สถานที่ที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข ในทางตรงกันข้ามการศึกษาความสัมพันธ์ของการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขกับอายุ เพศ body score พบว่า เพศ และอายุไม่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข (Rani *et al.*, 2011)

ตารางที่ 6 ความชุกของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่

อำเภอ	จำนวนสุนัข (%)	จำนวนสุนัขที่พบเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือด (%)																	
		E	H	B	A	T	EH	EB	EA	HB	HA	BA	EHB	EHA	EBA	HBA	EHBA	ไม่พบเชื้อ	
ไชยปราการ	17 (2.0)	0	8 (0.9)	0	1 (0.1)	0	0	0	0	3 (0.3)	0	0	0	0	0	0	0	0	5 (0.6)
เชียงดาว	59 (6.8)	0	40 (4.6)	0	1 (0.1)	0	2 (0.2)	0	0	4 (0.5)	1 (0.1)	0	0	0	0	0	0	0	11 (1.3)
จอมทอง	8 (0.9)	0	3 (0.3)	0	0	0	0	0	0	4 (0.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.1)
ดอยหล่อ	21 (2.4)	1 (0.1)	6 (0.7)	1 (0.1)	0	0	0	0	0	8 (0.9)	0	0	2 (0.2)	0	0	1 (0.1)	0	0	2 (0.2)
ดอยสะเก็ด	120 (13.8)	2 (0.2)	43 (4.9)	1 (0.1)	3 (0.3)	0	4 (0.5)	0	0	27 (3.1)	5 (0.6)	0	2 (0.2)	0	0	2 (0.2)	2 (0.2)	2 (0.2)	29 (3.3)
ดอยเต่า	28 (3.2)	1 (0.1)	11 (1.3)	0	0	0	0	0	0	14 (1.6)	0	0	1 (0.1)	0	0	0	0	0	1 (0.1)
ฝาง	52 (6.0)	0	19 (2.2)	0	0	0	0	0	0	7 (0.8)	0	0	0	0	0	0	0	0	26 (3.0)

E, H, B, A และ T คือ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis*, *A. platys* และ *T. evansi* ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ความชุกของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่ (ต่อ)

อำเภอ	จำนวนสุนัข (%)	จำนวนสุนัขที่พบเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือด (%)																	
		E	H	B	A	T	EH	EB	EA	HB	HA	BA	EHB	EHA	EBA	HBA	EHBA	ไม่พบเชื้อ	
หางดง	21 (2.4)	0	5 (0.6)	0	0	0	0	0	0	4 (0.5)	0	0	1 (0.1)	0	0	0	0	0	11 (1.3)
ฮอด	5 (0.6)	0	2 (0.2)	0	0	0	0	0	0	3 (0.3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
กัลยาณี วัฒนา	37 (4.3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37 (4.3)
แม่เมาะ	71 (8.2)	0	36 (4.1)	0	0	0	0	0	0	18 (2.1)	1 (0.1)	0	0	0	0	0	0	0	16 (1.8)
แม่แจ่ม	48 (5.5)	0	11 (1.3)	0	0	0	0	0	0	6 (0.7)	1 (0.1)	0	0	0	0	1 (0.1)	0	29 (3.3)	
แม่อน	57 (6.6)	0	18 (2.1)	0	0	0	0	0	0	25 (2.9)	2 (0.2)	0	0	0	0	3 (0.3)	0	9 (1.0)	
แม่วาง	71 (8.2)	2 (0.2)	4 (0.5)	0	0	0	0	0	0	1 (0.1)	0	0	0	0	0	0	0	64 (7.4)	

E, H, B, A และ T คือ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis*, *A. platys* และ *T. evansi* ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ความชุกของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่ (ต่อ)

อำเภอ	จำนวนสุนัข (%)	จำนวนสุนัขที่พบเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือด (%)																
		E	H	B	A	T	EH	EB	EA	HB	HA	BA	EHB	EHA	EBA	HBA	EHBA	ไม่พบเชื้อ
สะเมิง	72 (8.3)	0	53 (6.1)	0	0	0	4 (0.5)	0	0	13 (1.5)	0	0	1 (0.1)	0	0	0	0	1 (0.1)
สันป่าตอง	75 (8.6)	0	25 (2.9)	0	0	0	6 (0.7)	0	0	9 (1.0)	2 (0.2)	0	1 (0.1)	2 (0.2)	0	1 (0.1)	2 (0.2)	27 (3.1)
สันทราย	4 (0.5)	0	1 (0.1)	0	0	0	0	0	0	1 (0.1)	0	0	0	0	0	0	0	2 (0.2)
เวียงแหง	52 (6.0)	0	18 (2.1)	0	0	0	0	0	0	30 (3.4)	0	0	0	0	0	0	0	4 (0.5)
อมก๋อย	52 (6.0)	0	28 (3.2)	0	0	0	0	0	0	14 (1.6)	0	0	0	0	0	0	0	10 (1.2)
รวม	870 (100)	6 (0.7)	331 (38.0)	2 (0.2)	5 (0.5)	0	16 (1.8)	0	0	191 (22.0)	12 (1.4)	0	8 (0.9)	2 (0.2)	0	8 (0.9)	4 (0.5)	285 (32.8)

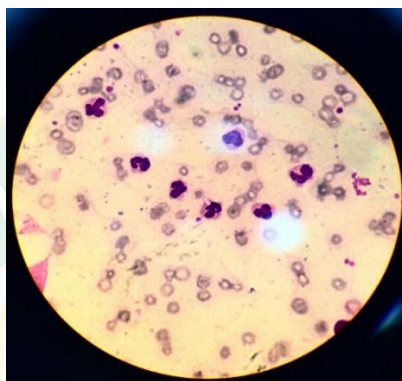
E, H, B, A และ T คือ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis*, *A. platys* และ *T. evansi* ตามลำดับ

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข

ปัจจัยเสี่ยง	จำนวนสุนัข ที่ทดสอบ	จำนวนสุนัข ที่ตรวจพบ เชื้อ	จำนวนสุนัข ที่ตรวจไม่ พบเชื้อ	χ^2 Sig. (2- sided)	P- value	Cramer's V value
เพศ						
เมีย	394 (45.3)	261 (66.2)	133 (33.8)	0.660	0.330	0.099
ผู้	476 (54.7)	324 (68.1)	152 (31.9)			
อายุ						
<1	158 (18.2)	111 (70.3)	47 (29.8)	0.995	0.498	0.091
1 ถึง 3	371 (42.6)	245 (66.0)	126 (34.0)			
3 ถึง 5	181 (20.8)	119 (65.8)	62 (34.3)			
5 ถึง 7	76 (8.7)	54 (71.1)	22 (29.0)			
7 ถึง 9	27 (3.1)	18 (66.7)	9 (33.3)			
9 ถึง 11	37 (4.3)	28 (75.7)	9 (24.3)			
11 ถึง 13	9 (1.0)	3 (33.3)	6 (66.7)			
13 ถึง 15	7 (0.8)	5 (71.4)	2 (28.6)			
15 ถึง 17	0	0	0			
17 ถึง 19	4 (0.5)	2 (50.0)	2 (50.0)			
การมีสถานพยาบาลสัตว์ในระยะ 10 กม.						
มี						
สถานพยาบาล	397 (45.6)	251 (63.5)	145 (36.5)	0.000	0.000	0.251
สัตว์						
ไม่มี						
สถานพยาบาล	473 (54.4)	333 (70.4)	140 (29.6)			
สัตว์						
รวม	870 (100.0)	585 (67.2)	285 (32.8)	-	-	-

4.8 การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบาง

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขจากสุนัขจำนวน 122 ตัว ด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบาง พบว่า สุนัขติดเชื้อเพียงชนิดเดียวคือ *H. canis* ร้อยละ 10.7 (13 ตัว) (ภาพที่ 18) *E. canis* ร้อยละ 0.8 (1 ตัว) *A. platys* ร้อยละ 0.8 (1 ตัว) สุนัขที่ติดเชื้อร่วมกันสองชนิดคือ *E. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 0.8 (1 ตัว) และสุนัขที่ไม่ติดเชื้อ ร้อยละ 86.9 (106 ตัว)



ภาพที่ 18 เชื้อ *H. canis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากตัวอย่างเลือดสุนัข

เมื่อตรวจด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์ พบว่า สุนัขที่ติดเชื้อเพียงชนิดเดียวคือ *H. canis* ร้อยละ 36.2 (44 ตัว) *E. canis* ร้อยละ 0.8 (1 ตัว) *A. platys* ร้อยละ 0.8 (1 ตัว) สุนัขที่ติดเชื้อร่วมกันสองชนิดคือ *B. canis* และ *H. canis* ร้อยละ 21.3 (26 ตัว) *H. canis* และ *E. canis* ร้อยละ 4.9 (6 ตัว) *H. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 1.6 (2 ตัว) สุนัขที่ติดเชื้อร่วมกันสามชนิดคือ *B. canis*, *H. canis* และ *E. canis* ร้อยละ 1.6 (2 ตัว) *H. canis*, *E. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 1.6 (2 ตัว) *B. canis*, *H. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 0.8 (1 ตัว) สุนัขที่ติดเชื้อร่วมกันสี่ชนิดคือ *B. canis*, *H. canis*, *E. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 1.6 (2 ตัว) และสุนัขสุขภาพดีไม่พบการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดมีจำนวน ร้อยละ 28.8 (35 ตัว)

การเปรียบเทียบวิธีตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัข พบว่า การตรวจด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์ให้ผลบวกมากกว่าการตรวจด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบาง ร้อยละ 58.2 (71 ตัว) เนื่องจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์มีประสิทธิภาพสูงโดยสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำได้ (ความไวสูง) เช่น ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. canis* (purified DNA) ความเข้มข้น 0.2 pg สามารถตรวจพบได้ด้วยการใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์เพียง 250 nM (Harrus, Waner, Aizenberg, Foley, *et al.*, 1998) สามารถตรวจวินิจฉัยโรคได้คราวละหลาย ๆ โรคในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว และสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมในสุนัขที่ติดเชื้อในระยะเริ่มต้นได้ ในทางตรงกันข้ามการตรวจด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบางมีข้อด้อยคือ เชื้อแต่ละชนิดมี

ระยะฟักตัวที่แตกต่างกันซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อที่อวัยวะเป้าหมายดังนี้ เชื้อ *H. canis* หลังจากสุนัขได้รับเชื้อ 27 ถึง 28 วัน เชื้อจะเคลื่อนที่ไปยังเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (Baneth *et al.*, 2007) เชื้อ *E. canis* หลังจากสุนัขได้รับเชื้อ 2 ถึง 5 วัน เชื้อจะเคลื่อนที่ไปยังโมโนไซต์และมีลักษณะเป็น morulae ซึ่งเป็นกรณีที่หายากมากที่จะตรวจพบ morula ของเชื้อ *E. canis* โดยโอกาสเกิดขึ้นเพียงร้อยละ 4 ถึง 6 เท่านั้นด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบาง (Sainz *et al.*, 2015) เชื้อ *B. canis* หลังจากสุนัขได้รับเชื้อ 21 วันเชื้อจะเคลื่อนที่ไปยังเม็ดเลือดแดง (Chauvin *et al.*, 2009) และ เชื้อ *A. platys* หลังจากสุนัขได้รับเชื้อ 8 ถึง 15 วัน เชื้อจะเคลื่อนที่ไปยังเกล็ดเลือด (Sainz *et al.*, 2015) ส่งผลให้ความไวของวิธีย้อมฟิล์มเลือดบางต่ำเนื่องจากตรวจวินิจฉัยจากเลือดก็ต้องรอจนวันที่เชื้อเคลื่อนที่ไปยังอวัยวะเป้าหมายประมาณ 2 ถึง 28 วัน ถึงจะสามารถตรวจพบเชื้อได้ วิธีนี้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ในการติดเชื้อระยะแรกได้ (ตารางที่ 8) จากการทดสอบการย้อมฟิล์มเลือดบาง พบว่า สุนัขติดเชื้อร่วมระหว่าง *E. canis* และ *A. platys* ร้อยละ 0.8 (1 ตัว) ในทางตรงกันข้ามปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อร่วมระหว่าง *E. canis* และ *A. platys* (ตารางที่ 8) เนื่องจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอของเชื้อ *E. canis* และ *A. platys* ที่ตรวจพบด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบางมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำคือ 24.0 ng/ μ l (ตัวอย่างที่ 855) (ภาคผนวก ข) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ติดเชื้อทั้งสี่ชนิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ พบว่า ต้องใช้ดีเอ็นเอทั้งจีโนมความเข้มข้น 72.8 ng/ μ l (ตัวอย่างที่ 829) เป็นอย่างน้อย (ภาคผนวก ข) ขึ้นไปจึงจะสามารถตรวจพบได้

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดบางกับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์

วิธีทดสอบ	จำนวนสุนัข ที่ทดสอบ (%)	จำนวนสุนัขที่ตรวจพบเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือด (%)																	
		E	H	B	A	T	EH	EB	EA	HB	HA	BA	EHB	EHA	EBA	HBA	EHBA	ไม่พบ เชื้อ	
ย้อมฟิล์มเลือดบาง	122 (100)	1 (0.8)	13 (10.7)	0	1 (0.8)	0	0	0	1 (0.8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	106 (86.9)
ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ เมอเรสแบบ มัลติเพล็กซ์	122 (100)	1 (0.8)	44 (36.2)	0	1 (0.8)	0	6 (4.9)	0	0	26 (21.3)	2 (1.6)	0	2 (1.6)	2 (1.6)	0	1 (0.8)	2 (1.6)	35 (28.8)	

E, H, B, A และ T คือ *E. canis*, *H. canis*, *B. canis*, *A. platys* และ *T. evansi* ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *H. canis*, *B. canis*, *E. canis* และ *A. platys* พบว่าอุณหภูมิ annealing เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์คือ 58 °ซ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบยีน *VirB9* คือ 100 nM ยีน *GroEL* และยีน *18s rRNA* คือ 50 nM ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบต่ำ ที่สุดที่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. canis* และ *B. canis* คือ 10^1 copy numbers เชื้อ *H. canis* คือ 10^4 copy numbers และเชื้อ *A. platys* คือ 10^3 copy numbers

ความซุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคพยาธิในเม็ดเลือดสุนัขในจังหวัด เชียงใหม่คิดเป็นร้อยละ 67.2 (585 ตัว) สุนัขสุขภาพดีไม่พบการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดคิดเป็นร้อยละ 32.8 (285 ตัว)



บรรณานุกรม

- กัลยา กมลรัตน์. (2553). ปัจจัยด้านผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อพฤติกรรม การซื้อชุดชั้นในชายใน กรุงเทพมหานคร. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- Abarca, K., López, J., Perret, C., Guerrero, J., Godoy, P., Veloz, A., & Azócar, T. (2007). *Anaplasma platys* in dogs, Chile. *Emerging Infectious Diseases*, 13(9), 1392.
- Adaszek, Ł., Martinez, A. C., & Winiarczyk, S. (2011). The factors affecting the distribution of babesiosis in dogs in Poland. *Veterinary Parasitology*, 181(2-4), 160-165.
- Andersson, M. O., Tolf, C., Tamba, P., Stefanache, M., Waldenström, J., Dobler, G., & Chitimia-Dobler, L. (2017). Canine tick-borne diseases in pet dogs from Romania. *Parasites & Vectors*, 10(1), 1-6.
- Aquino, L. P. C. T. d., Machado, R. Z., Alessi, A. C., Marques, L. C., Castro, M. B. d., & Malheiros, E. B. (1999). Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(2), 255-260.
- Azhahianambi, P., Jyothimol, G., Baranidharan, G., Aravind, M., Latha, B. R., & Raman, M. (2018). Evaluation of multiplex PCR assay for detection of *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* and *Trypanosoma evansi* in dogs. *Acta Tropica*, 188, 58-67.
- Bacellar, F., Dawson, J., Silveira, C., & Filipe, A. (1995). Antibodies against *Rickettsiaceae* in dogs of Setúbal, Portugal. *Central European Journal of Public Health*, 3(2), 100.
- Baneth, G., Harrus, S., Gal, A., & Aroch, I. (2015). Canine vector-borne co-infections: *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in the same host monocytes. *Veterinary Parasitology*, 208(1), 30-34.
- Baneth, G., Harrus, S., Ohnona, F. S., & Schlesinger, Y. (2009). Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Veterinary Microbiology*, 136(3-4), 321-325.
- Baneth, G., Mathew, J. S., Shkap, V., Macintire, D. K., Barta, J. R., & Ewing, S. A. (2003). Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. *Trends in Parasitology*, 19(1), 27-31.

- Baneth, G., Samish, M., Alekseev, E., Aroch, I., & Shkap, V. (2001). Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Journal of Parasitology*, *87*(3), 606-612.
- Baneth, G., Samish, M., & Shkap, V. (2007). Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: *Hepatozoidae*) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Parasitology*, *93*(2), 283-299.
- Baneth, G., Shkap, V., Samish, M., Pipano, E., & Savitsky, I. (1998). Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, *74*(2-4), 299-305.
- Brun, R., Hecker, H., & Lun, Z.-R. (1998). *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Veterinary Parasitology*, *79*(2), 95-107.
- Chamberlain, J. S., & Chamberlain, J. R. (1994). Optimization of multiplex PCRs. In *The polymerase chain reaction*, 38-46.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, *40*(2), 1-18.
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, *152*(3-4), 173-185.
- Dantas-Torres, F., & Figueredo, L. A. (2006). Canine babesiosis: a Brazilian perspective. *Veterinary Parasitology*, *141*(3-4), 197-203.
- Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2016). Best practices for preventing vector-borne diseases in dogs and humans. *Trends in Parasitology*, *32*(1), 43-55.
- Defontis, M., Richartz, J., Engelmann, N., Bauer, C., Schwierk, V. M., Büscher, P., & Moritz, A. (2012). Canine *Trypanosoma evansi* infection introduced into Germany. *Veterinary Clinical Pathology*, *41*(3), 369-374.
- Deng, X., Zhang, J., Su, J., Liu, H., Cong, Y., Zhang, L., & Yan, X. (2018). A multiplex PCR method for the simultaneous detection of three viruses associated with canine viral enteric infections. *Archives of Virology*, *163*(8), 2133-2138.
- Desquesnes, M., Dargantes, A., Lai, D. H., Lun, Z. R., Holzmüller, P., & Jittapalpong, S.

- (2013). *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. *BioMed Research International*.
- Desquesnes, M., Holzmüller, P., Lai, D. H., Dargantes, A., Lun, Z. R., & Jittaplaong, S. (2013). *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *BioMed Research International*.
- Does, W. P. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133.
- Duarte, S. C., Linhares, G. F. C., Romanowsky, T. N., da Silveira Neto, O. J., & Borges, L. M. F. (2008). Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Veterinary Parasitology*, 152(1-2), 16-20.
- East, M. L., Wibbelt, G., Lieckfeldt, D., Ludwig, A., Goller, K., Wilhelm, K., & Hofer, H. (2008). A Hepatozoon species genetically distinct from *H. canis* infecting spotted hyenas in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(1), 45-52.
- Eiras, D. F., Craviotto, M. B., Vezzani, D., Eyal, O., & Baneth, G. (2013). First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(2), 169-173.
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 559-570.
- Enteritis, C. C. (2013). Public Health Considerations. *Infectious Diseases of the Dog and Cat-E-Book*, 76.
- Felek, S., Huang, H., & Rikihisa, Y. (2003). Sequence and expression analysis of *virB9* of the type IV secretion system of *Ehrlichia canis* strains in ticks, dogs, and cultured cells. *Infection and Immunity*, 71(10), 6063-6067.
- Fishman, Z., Gonen, L., Harrus, S., Strauss-Ayali, D., King, R., & Baneth, G. (2004). A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. *Veterinary Parasitology*, 119(1), 21-26.

- Gaunt, S., Beall, M., Stillman, B., Lorentzen, L., Diniz, P., Chandrashekar, R., & Breitschwerdt, E. (2010). Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & Vectors*, 3(1), 33.
- Gevrey, J. (1993). Hepatozoonose canine. *Recueil de Medecine Veterinaire*, 169(5), 6.
- Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A., & Levin, M. (2013). Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(3), 171-180.
- Hao, X., Liu, R., He, Y., Xiao, X., Xiao, W., Zheng, Q., & Li, S. (2019). Multiplex PCR methods for detection of several viruses associated with canine respiratory and enteric diseases. *PLoS One*, 14(3), e0213295.
- Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Veterinary Journal*, 187(3), 292-296.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., & Bark, H. (1998). Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), 2140-2142.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J. E., Poland, A. M., & Bark, H. (1998). Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 73-76.
- Hartmann, K., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., & Lutz, H. (2013). Babesiosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(7), 643-646.
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G., & Vogt, P. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23(3), 504-511.
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., & Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451-469.
- Hornok, S., Tánčzos, B., de Mera, I. G. F., de la Fuente, J., Hofmann-Lehmann, R., & Farkas, R. (2013). High prevalence of *Hepatozoon*-infection among shepherd dogs in a region considered to be free of *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, 196(1-2), 189-193.
- Inokuma, H., Fujii, K., Okuda, M., Onishi, T., Beaufile, J.-P., Raoult, D., & Brouqui, P. (2002).

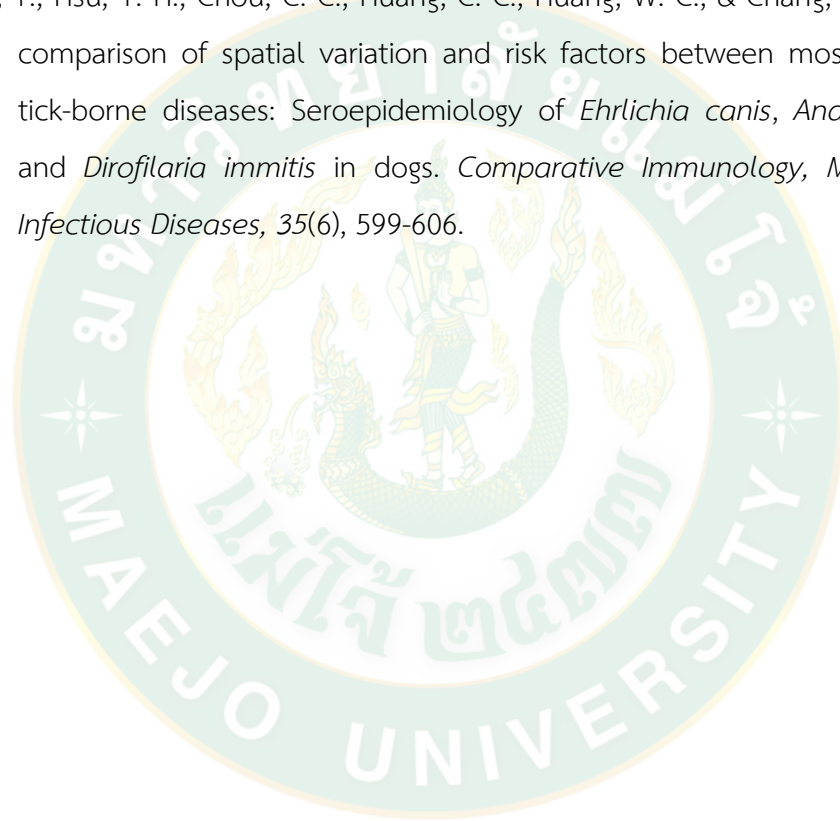
- Determination of the nucleotide sequences of *heat shock operon groESL* and the *citrate synthase* gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for phylogenetic and diagnostic studies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(5), 1132-1136.
- Irwin, P. J. (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, 2(1), S4.
- Ivanov, A., & Tsachev, I. (2008). Mini-review *Hepatozoon canis* and Hepatozoonosis in the dog. *Trakia Journal of Sciences*, 6(2), 27.
- James, S. (1905). On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. Office of the Superintendent of Government Printing.
- Jittapalapong, S., Stich, R. W., Gordon, J. C., Wittum, T. E., & Barriga, O. O. (2000). Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. *Journal of Medical Entomology*, 37(4), 601-611.
- Juasook, A., Boonmars, T., Sriraj, P., Aukkanimart, R., Jitjuk, T., Sudsarn, P., & Maleewong, W. (2016). Prevalence of Tick-borne Pathogens in Quarantined Dogs at Nakornpranom Animal Quarantine Station, Thailand. *Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine*, 11(1), 1-9.
- Kalaivanan, M., Saravanan, S., Palanivel, K., & Ponnudurai, G. (2020). Identification of *Ehrlichia canis* by PCR with phylogenetic analysis in dogs from south India. *Haryana Veterinarian*, 59 (Special Issue), 79-82.
- Kamani, J., Baneth, G., Mumcuoglu, K. Y., Waziri, N. E., Eyal, O., Guthmann, Y., & Harrus, S. (2013). Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3), e2108.
- Kelly, P. (2000). Canine ehrlichioses: an update. *Journal of the South African Veterinary Association*, 71(2), 77-86.
- Kledmanee, K., Suwanpakdee, S., Krajangwong, S., Chatsiriwech, J., Suksai, P., Suwannachat, P., & Chaichoun, K. (2009). Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon canis* in canine blood. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 40(1), 35-39.

- Koch, H. G. (1982). Oviposition of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) in the laboratory. *Annals of the Entomological Society of America*, 75(5), 583-586.
- Köster, L. S., Lobetti, R. G., & Kelly, P. (2015). Canine babesiosis: a perspective on clinical complications, biomarkers, and treatment. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 6, 119.
- Kukreti, K., Pandey, L., Das, M., Rastogi, A., Dubey, R., & Sharma, P. (2018). Prevalence of Canine Monocytic Ehrlichiosis in Canine Population Across India. *Archives of Razi Institute*, 73(2), 87-93.
- Laummaunwai, P., Sriraj, P., Aukkanimart, R., Boonmars, T., Wonkchalee, N., Boonjaraspinyo, S., & Khianman, P. (2014). Molecular detection and treatment of tick-borne pathogens in domestic dogs in Khon Kaen, northeastern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 45(5), 1157.
- Leal, C. A., Kim, P. C., Almeida, J. C., Melo, R. P., Santos, A. S., Lima, D., & Mota, R. A. (2018). Standardization of a PCR multiplex for the detection of dermatophytes in dogs and cats fur and crusts. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(9), 1824-1828.
- Liu, M., Ruttayaporn, N., Saechan, V., Jirapattharasate, C., Vudriko, P., Moumouni, P. F. A., & Suzuki, H. (2016). Molecular survey of canine vector-borne diseases in stray dogs in Thailand. *Parasitology International*, 65(4), 357-361.
- Mccown, M., Alleman, A., Sayler, K., Chandrashekar, R., Thatcher, B., Tyrrell, P., & Barbet, A. (2014). Point prevalence survey for tick-borne pathogens in military working dogs, shelter animals, and pet populations in northern Colombia. *Journal of Special Operations Medicine*, 14(4), 81-85.
- Milanjeet, H. S., Singh, N., Singh, N., Singh, C., & Rath, S. (2014). Molecular prevalence and risk factors for the occurrence of canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Medicine*, 59(3), 129-136.
- Neel, J. A. Blood Smear Basics.
- Nithikadpanich, C., Takam, P., & Charerntantanakul, W. (2019). Development of Multiplex Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection of *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* and *Babesia canis* in Canine Blood. *Journal of Agricultural Research & Extension*, 36(2), 80-90.
- Pegram, R., Keirans, J., Clifford, C., & Walker, J. B. (1987). Clarification of the

- Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. *Systematic Parasitology*, 10(1), 27-44.
- Peleg, O., Baneth, G., Eyal, O., Inbar, J., & Harrus, S. (2010). Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. *Veterinary Parasitology*, 173(3-4), 292-299.
- Petrova-Piontkovskaya, S. (1968). *Comparative data on the biology of Rhipicephalus sanguineus Latr. and Rhipicephalus turanicus Pom. under laboratory conditions.*
- Piratae, S., Pimpjong, K., Vaisusuk, K., & Chatan, W. (2015). Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in stray dogs in Maharakham province, Thailand. *Annals of Parasitology*, 61(3).
- Piratae, S., Senawong, P., Chalermchat, P., Harnarsa, W., & Sae-chue, B. (2019). Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* and the association of infections with hematological responses in naturally infected dogs in Kalasin, Thailand. *Veterinary World*, 12(1), 131.
- Ramos, R., Latrofa, M. S., Giannelli, A., Lacasella, V., Campbell, B. E., Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2014). Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. *Veterinary Parasitology*, 205(1), 285-288.
- Ramos, R., Ramos, C., Araújo, F., Oliveira, R., Souza, I., Pimentel, D., & Faustino, M. (2010). Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitology Research*, 107(5), 1115-1120.
- Rani, P., Irwin, P. J., Coleman, G. T., Gatne, M., & Traub, R. J. (2011). A survey of canine tick-borne diseases in India. *Parasit Vectors*, 4(1), 141.
- Roux, K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4, 66.
- 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. *Parasites & Vectors*, 8(1), 75.
- Sangmaneedet, S., Kanbutra, P., & Viriyameiharoj, S. (2002). Prevalence of Blood

- Parasites in Dogs Examined at the KKU-Veterinary Teaching Hospital During 1994-2001. *The 3rd Conference of KKU Veterinary Medicine*, 12(1), 1-7.
- Sanisuriwong, J., Juntuck, N., Pavasutthipaisit, S., Boonsriroj, H., & Wiengcharoen, J. (2012). Prevalence of hemoparasite in dogs in Nongchok, Bangkok, Thailand. *Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine*, 7(1), 25-35.
- Schochetman, G., Ou, C. Y., & Jones, W. K. (1988). Polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases*, 158(6), 1154-1157.
- Shaw, S. E., Day, M. J., Birtles, R. J., & Breitschwerdt, E. B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*, 17(2), 74-80.
- Smith, F. D., & Wall, L. E. R. (2013). Prevalence of *Babesia* and *Anaplasma* in ticks infesting dogs in Great Britain. *Veterinary Parasitology*, 198(1-2), 18-23.
- Smith, T. G. (1996). The genus *hepatozoon* (apicomplexa: adeleina). *The Journal of Parasitology*, 565-585.
- Solano-Gallego, L., Sainz, Á., Roura, X., Estrada-Peña, A., & Miró, G. (2016). A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasites & Vectors*, 9(1), 336.
- Souza, B. M. P. d. S., Leal, D. C., Barboza, D. C. P. M., Uzêda, R. S., Alcântara, A. C. D., Ferreira, F., & Franke, C. R. (2010). Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 19(2), 89-93.
- Straube, J. (2010). Canine Ehrlichiosis—from Acute Infection to Chronic Disease. *Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Germany*.
- Suksawat, J., Xuejie, Y., Hancock, S. I., Hegarty, B. C., Nilkumhang, P., & Breitschwerdt, E. B. (2001). Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(5), 453-462.
- Sykes, J. E. (2014). Chapter 28 - Ehrlichiosis. In J. E. Sykes (Ed.), *Canine and Feline Infectious Diseases*. Saint Louis: W.B. Saunders, 278-289.
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia* a historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 3-10.
- Van Heerden, J. (1979). The transmission of canine ehrlichiosis to the wild dog *Lycaon*

- pictus (Temminck) and black-backed jackal *Canis mesomelas* Schreber. *Journal of the South African Veterinary Association*, 50(4), 245-248.
- Waner, T. (2008). Hematopathological changes in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 63(1), 19.
- Wu, T. J., Sun, H. J., Wu, Y. C., & Huang, H. P. (2009). Prevalence and risk factors of canine ticks and tick-borne diseases in Taipei, Taiwan. *Journal of Veterinary Clinical Sciences*, 2(3), 75-78.
- Yuasa, Y., Hsu, T. H., Chou, C. C., Huang, C. C., Huang, W. C., & Chang, C. C. (2012). The comparison of spatial variation and risk factors between mosquito-borne and tick-borne diseases: Seroepidemiology of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* species, and *Dirofilaria immitis* in dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(6), 599-606.





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดสุนัขในจังหวัดเชียงใหม่

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *E. canis* จากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

5'CTTAGGTNGAGTATCTGCTTCAACTCTTTTTATCATTGTTGGATTACCTGCGCTAC
GGCATATCAGGTCAAAAGCATAACTCCTACCCTTGCTTGTCTATTAGCATATTTGTTTTCCG
TTTTTTCTAATGGAATTATGAAGAGCTTGTGATCTACTGGCTTTACTTTCCAACCTACGGTATC
ACCTATTGCTAACATTTTTATAGTTTCACCCTTGAAAATTCAATATATGAGTGATATCCATAAT
TAAACACTACTTTATATATTTCTGTATTACTGTATACAAAAGTTTTAATTCTACTATCTATTGTAA
CAGGGTTATCATCTATGCTTATGGA3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. platys* จากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

5'ATCATAGTTCGGGAGGGAGGACTCCATCTGTNGCTTTGATTACAGTGAGTTCTGCTG
GCAATAACGTTAAGAATTGCTGTCAACACTTCGCCTTAAGACTGGTCGTTGCATCATAGGTGAT
ACGAACGTATATAGCAGTTCCTAGATCACTTAGCGAGATGTCCTCCATCTTAAGTCTAGCTCG
TCATTACGACGTACTTAGCACCAGCAATTACTGCGATATCACCAAGCATATCCTTCCTTCTATC
ACCAAAGCCAGGAGCCTTAACAGCTGCAACTTGGAGACCACCACGCAGCTTGTTCAGAACCAGA
GTGCTTAAAGCTTCTCCTTCTACATCCTCAGCGATGATGAGCAGAGGCCTGCCGGATCTAGCAA
CGTTTTCAAGGATCGGCAGAATGTGCTGTAAGTACTACGTTTATTTCTTCTGTTAGGAATATGTAC
GGATTCTCGAACTCCACCAGCATCTTTTCTGCATTGGTTACGAAGTAAGGAGAGAGATAACCGC
GATCAAAGTGCATACCATCAGTTTTCTCGACTTCTAGGTCTTTGAATCCCTTGCTTCTTCGACA
GTTATAACCCCATCAGCACTTCTTCTCACACTGAGCAATTTTGCTTCTATGTTCTTATC
GCCGTTAGCAGAGATGGTAGCAACCTGAGCAACTTCTTCTTCAACTTCACGACTTCAGTGA
CATTAAAGCGCGTTAAGACTGCTTCTTTTCGCCTTAAAA3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *B. canis* จากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

5'TCCTGAAGGGGTCAGCAAACGACGACCTCCAATCACTAGGTCGGCATGGTTTTATGGT
TAGGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTTTGTTCTTGATTAATGGAAACGT
CCTTGCAAATGCTTTTCGAGTAGTTCGTCTTTAACAAATCTAAGAATTTACCTCTGACAGTTA
AATACGAATGCCCCCAACCGTTCCTATTAACCATTACTAAGGTTCAATAACCAACAAAATAGAA
CCAAAGTCTACTCTATTATTCCATGCTGAAGTATTCAAGACAAAAGTCTGCTTGAACACTCTA

ATTTTCTCAAAGTAAAAGGGAAAACCCAAAAGCGAACTCGAAAAAGCCAAACGAATGGCAAAC
 TCGAACACGCTAAAATTCAACTACGAGCTTTTTAACTGCAACAAGTTAATATACGCTATTGGAG
 CTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATTGCTACTCTGGTGAGGGTTTGG
 GTCACCATCATTCCAATTACAAGACATTAGCCCTGTATTGTTATTTCTTGCTACTACCTCCCTGT
 GTCAGGGATTGGAA3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *H. canis* จากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

5'TTTGACTCAACACGGGAAAACCTCACCTGGCCCGGACACCGTGAGGATTGACAGATTG
 AGAGCTCTTTCATAATTCGATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGT
 CTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACCTCTAACCTACTAAATAGGGACTGGAAAAGCTTTAGT
 CGTCCAGAAATTACTTCTTAGAAGGACAATGCGGTGTCTAACGCGCAGGAAGTTTGAGGCAATA
 ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCAGGGCTGCACGCGCGCTACAATGGAGGAATCCAACAA
 GTGCTATAACCATTACCTGATAAGCTATGGGTAACCCCTTGAAAATCCATCCGTGATCGGGAAT
 AGGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCGAG3'



ภาคผนวก ข
การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดสุนัขจำนวน 870 ตัว
ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

โดยค่า สัดส่วนระหว่าง A260/A280 ที่เหมาะสมคือ ประมาณ 1.8
 สัดส่วนระหว่าง A260/A230 ที่เหมาะสมคือ ประมาณ 2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
1	118.3	2.4	2.6	0.9	0.2
2	161.0	3.2	3.1	1.1	0.3
3	130.1	2.6	2.7	1.0	0.2
4	80.1	1.6	1.7	0.9	0.2
5	55.3	1.1	1.0	1.1	0.2
6	135.9	2.7	2.6	1.0	0.3
7	124.4	2.5	2.5	1.0	0.2
8	118.2	2.4	2.3	1.0	0.2
9	166.7	3.3	3.7	0.9	0.3
10	117.0	2.3	2.7	0.9	0.2
11	126.8	2.5	2.6	1.0	0.2
12	108.2	2.2	2.2	1.0	0.2
13	131.6	2.6	2.5	1.1	0.3
14	106.3	2.1	2.2	1.0	0.2
15	83.8	1.7	1.9	0.9	0.2
16	129.4	2.6	2.6	1.0	0.2
17	123.3	2.5	2.7	0.9	0.2
18	98.8	2.0	2.1	0.9	0.2
19	139.3	2.8	2.7	1.0	0.2
20	112.3	2.2	2.2	1.0	0.2
21	123.0	2.5	2.4	1.0	0.2
22	109.5	2.2	2.1	1.1	0.3

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
23	168.0	3.4	3.4	1.0	0.3
24	64.8	1.3	1.5	0.8	0.2
25	155.3	3.1	3.1	1.0	0.3
26	103.4	2.1	2.1	1.0	0.2
27	99.7	2.0	2.7	0.8	0.2
28	76.5	1.5	1.6	1.0	0.2
29	116.8	2.3	2.7	0.9	0.2
30	65.4	1.3	1.6	0.8	0.2
31	91.8	1.8	1.9	1.0	0.2
32	92.4	1.8	1.6	1.1	0.3
33	94.1	1.9	2.3	0.8	0.2
34	88.6	1.8	2.0	0.9	0.2
35	75.4	1.5	1.9	0.8	0.2
36	95.9	1.9	2.2	0.9	0.2
37	125.1	2.5	2.5	1.0	0.2
38	86.9	1.7	1.8	1.0	0.2
39	89.7	1.8	2.0	0.9	0.2
40	48.3	1.0	1.1	0.9	0.2
41	128.4	2.6	2.5	1.0	0.2
42	93.6	1.9	2.1	0.9	0.2
43	117.8	2.4	2.5	0.9	0.2
44	80.7	1.6	1.9	0.8	0.2
45	161.1	3.2	3.1	1.0	0.3
46	131.6	2.6	2.6	1.0	0.2
47	128.4	2.6	2.5	1.0	0.2
48	117.9	2.4	2.4	1.0	0.2
49	117.5	2.4	2.2	1.1	0.3
50	78.3	1.6	1.7	0.9	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
51	57.5	1.2	1.3	0.9	0.2
52	65.1	1.3	1.8	0.7	0.2
53	77.9	1.6	1.5	1.0	0.2
54	64.3	1.3	1.4	0.9	0.2
55	61.9	1.2	1.3	1.0	0.2
56	92.5	1.9	1.9	1.0	0.2
57	70.1	1.4	1.4	1.0	0.2
58	91.6	1.8	2.0	0.9	0.2
59	73.1	1.5	1.4	1.0	0.2
60	117.5	2.4	2.3	1.0	0.2
61	120.1	2.4	2.3	1.0	0.3
62	99.6	2.0	2.1	1.0	0.2
63	95.7	1.9	2.0	1.0	0.2
64	56.6	1.1	1.1	1.0	0.2
65	59.5	1.2	1.2	1.0	0.2
66	61.5	1.2	1.3	1.0	0.2
67	161.0	3.2	2.9	1.1	0.3
68	73.0	1.5	1.5	1.0	0.2
69	104.5	2.1	2.5	0.9	0.2
70	78.3	1.6	1.6	1.0	0.2
71	100.2	2.0	1.9	1.1	0.3
72	87.9	1.8	2.3	0.8	0.2
73	94.7	1.9	1.8	1.1	0.2
74	134.5	2.7	3.1	0.9	0.2
75	87.5	1.8	2.4	0.7	0.2
76	127.6	2.6	2.8	0.9	0.2
77	102.8	2.1	2.2	0.9	0.2
78	68.1	1.4	1.8	0.7	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
79	93.5	1.9	1.8	1.0	0.2
80	137.2	2.7	2.6	1.1	0.3
81	137.5	2.7	3.5	0.8	0.2
82	112.0	2.2	2.9	0.8	0.2
83	73.4	1.5	1.7	0.9	0.2
84	84.5	1.7	1.9	0.9	0.2
85	147.9	3.0	3.2	0.9	0.2
86	107.6	2.2	2.4	0.9	0.2
87	90.8	1.8	2.0	0.9	0.2
88	234.8	4.7	4.4	1.1	0.3
89	234.4	4.7	4.4	1.1	0.3
90	188.9	3.8	3.7	1.0	0.3
91	163.0	3.3	4.0	0.8	0.3
92	141.8	2.8	2.7	1.0	0.3
93	200.8	4.0	4.0	1.0	0.3
94	181.0	3.6	3.5	1.0	0.3
95	160.2	3.2	3.4	1.0	0.3
96	86.2	1.7	1.9	0.9	0.2
97	75.9	1.5	1.6	1.0	0.2
98	89.7	1.8	2.0	0.9	0.2
99	84.3	1.7	2.0	0.9	0.2
100	122.9	2.5	3.2	0.8	0.2
101	134.0	2.7	2.7	1.0	0.3
102	68.6	1.4	1.3	1.1	0.3
103	119.9	2.4	2.5	1.0	0.2
104	118.7	2.4	2.4	1.0	0.2
105	122.5	2.4	2.4	1.0	0.2
106	101.1	2.0	2.1	1.0	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
107	110.5	2.2	2.2	1.0	0.2
108	117.5	2.4	2.7	0.9	0.2
109	56.0	1.1	1.5	0.8	0.2
110	149.9	3.0	3.1	1.0	0.3
111	98.0	2.0	1.8	1.1	0.2
112	105.8	2.1	1.9	1.1	0.2
113	68.7	1.4	1.3	1.0	0.2
114	74.6	1.5	1.6	0.9	0.2
115	79.8	1.6	2.1	0.8	0.2
116	50.1	1.0	1.0	1.1	0.3
117	111.3	2.2	2.1	1.1	0.2
118	62.4	1.2	1.4	0.9	0.2
119	96.6	1.9	2.0	1.0	0.3
120	108.4	2.2	2.1	1.1	0.3
121	6.0	1.1	2.2	1.5	0.1
122	47.6	1.0	1.0	1.0	0.2
123	0.3	0.0	1.0	1.0	0.0
124	45.5	0.9	1.0	0.9	0.1
125	56.9	1.1	1.2	0.9	0.2
126	81.0	1.6	1.6	1.0	0.2
127	124.0	2.5	2.2	1.1	0.3
128	63.6	1.3	1.2	1.1	0.2
129	65.7	1.3	1.4	1.0	0.2
130	146.0	2.9	2.9	1.0	0.3
131	77.0	1.5	1.5	1.0	0.3
132	59.1	1.2	1.3	0.9	0.2
133	83.1	1.7	1.5	1.1	0.3
134	370.0	7.4	4.2	1.8	0.5

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230
135	197.2	3.9	3.2	1.2	0.4
136	191.7	3.8	3.1	1.2	0.4
137	170.3	3.4	2.8	1.2	0.4
138	69.4	1.4	1.3	1.0	0.3
139	63.5	1.3	1.1	1.1	0.3
140	71.8	1.4	1.6	0.9	0.2
141	99.4	2.0	1.8	1.1	0.3
142	161.4	3.2	2.8	1.2	0.4
143	152.3	3.0	3.0	1.0	0.3
144	97.8	2.0	1.5	1.3	0.3
145	47.7	1.0	0.8	1.2	0.3
146	248.3	5.0	3.7	1.3	0.6
147	214.7	4.3	3.1	1.4	0.6
148	222.6	4.5	3.2	1.4	0.6
149	227.1	4.5	3.3	1.4	0.6
150	235.0	4.7	3.5	1.4	0.6
151	421.9	8.4	5.8	1.5	0.7
152	417.4	8.3	5.0	1.7	0.8
153	375.3	7.5	5.1	1.5	0.7
154	516.2	10.3	6.1	1.7	0.9
155	351.3	7.0	4.1	1.7	0.6
156	433.6	8.7	4.8	1.8	0.8
157	381.7	7.6	4.4	1.7	0.8
158	397.0	7.9	5.0	1.6	0.7
159	295.9	5.9	3.4	1.7	0.7
160	455.3	9.1	5.3	1.7	0.7
161	56.9	1.1	1.0	1.2	0.3
162	49.3	1.0	0.9	1.1	0.3

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
163	121.9	2.4	2.2	1.1	0.3
164	114.9	2.3	2.3	1.0	0.3
165	33.2	0.7	0.7	1.0	0.2
166	39.1	0.8	0.7	1.1	0.1
167	71.0	1.4	1.3	1.1	0.3
168	57.9	1.2	1.1	1.1	0.3
169	93.7	1.9	1.7	1.1	0.3
170	66.1	1.3	1.1	1.2	0.3
171	47.7	1.0	0.9	1.0	0.3
172	69.0	1.4	1.2	1.2	0.3
173	87.5	1.8	2.4	0.7	0.2
174	24.7	0.5	0.5	1.0	0.3
175	70.8	1.4	1.5	1.0	0.3
176	91.4	1.8	1.9	1.0	0.3
177	75.6	1.5	1.5	1.0	0.2
178	70.6	1.4	1.5	1.0	0.3
179	42.6	0.9	0.8	1.0	0.3
180	40.8	0.8	0.7	1.1	0.3
181	84.0	1.7	1.8	0.9	0.2
182	50.4	1.0	1.3	0.8	0.2
183	87.9	1.8	2.4	0.7	0.1
184	137.2	2.7	2.6	1.1	0.3
185	58.6	1.2	1.2	0.9	0.2
186	68.8	1.4	1.4	1.0	0.3
187	75.7	1.5	1.4	1.1	0.3
188	164.8	3.3	3.4	1.0	0.2
189	78.4	1.6	1.6	1.0	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
190	64.3	1.3	1.3	1.0	0.2
191	62.3	1.2	1.2	1.1	0.3
192	36.9	0.7	0.8	0.9	0.2
193	27.0	0.5	0.6	0.8	0.2
194	53.9	1.1	1.1	1.0	0.2
195	57.3	1.1	1.2	1.0	0.2
196	23.1	0.5	0.5	0.9	0.2
197	140.5	2.8	2.8	1.0	0.3
198	79.6	1.6	1.6	1.0	0.3
199	129.6	2.6	2.7	1.0	0.3
200	48.2	1.0	1.1	0.9	0.2
201	73.3	1.5	1.8	0.8	0.2
202	93.3	1.9	2.0	0.9	0.2
203	108.9	2.2	2.3	0.9	0.2
204	52.5	1.0	1.3	0.8	0.2
205	107.4	2.1	2.2	1.0	0.2
206	65.4	1.3	1.4	0.9	0.2
207	99.0	2.0	2.2	0.9	0.2
208	57.2	1.1	1.2	0.9	0.2
209	56.4	1.1	1.2	0.9	0.2
210	74.6	1.5	1.8	0.8	0.2
211	107.1	2.1	2.4	0.9	0.2
212	158.0	3.2	3.2	1.0	0.3
213	158.2	3.2	3.2	1.0	0.3
214	64.8	1.3	1.5	0.9	0.2
215	132.4	2.6	3.3	0.8	0.2
216	42.0	0.8	0.9	0.9	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
217	109.4	2.2	2.5	0.9	0.2
218	68.9	1.4	1.6	0.9	0.2
219	72.6	1.5	1.6	0.9	0.2
220	74.2	1.5	1.7	0.9	0.2
221	87.7	1.8	1.9	0.9	0.2
222	86.6	1.7	1.8	1.0	0.2
223	81.2	1.6	1.8	0.9	0.2
224	79.4	1.6	1.6	1.0	0.2
225	90.0	1.8	1.9	0.9	0.2
226	96.1	1.9	2.1	0.9	0.2
227	121.1	2.4	2.6	1.0	0.2
228	141.3	2.8	2.6	1.1	0.3
229	29.8	0.6	0.5	1.1	0.2
230	130.2	2.6	2.4	1.1	0.2
231	25.0	0.5	0.6	0.8	0.2
232	371.0	7.4	7.0	1.1	0.2
233	132.9	2.7	2.6	1.0	0.3
234	83.9	1.7	1.7	1.0	0.2
235	68.9	1.4	1.5	0.9	0.2
236	221.0	4.4	3.8	1.2	0.3
237	120.8	2.4	2.6	0.9	0.2
238	97.4	1.9	1.9	1.0	0.2
239	104.5	2.1	2.1	1.0	0.2
240	211.7	4.2	4.4	1.0	0.3
241	85.4	1.7	1.7	1.0	0.2
242	98.3	2.0	1.9	1.0	0.2
243	206.2	4.1	3.8	1.1	0.3

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
244	95.2	1.9	1.8	1.1	0.3
245	49.5	1.0	1.0	1.0	0.2
246	122.4	2.4	2.5	1.0	0.3
247	109.7	2.2	2.3	1.0	0.2
248	199.3	4.0	3.6	1.1	0.3
249	134.5	2.7	2.8	0.9	0.2
250	73.5	1.5	1.4	1.1	0.2
251	212.8	4.3	4.9	0.9	0.2
252	277.9	5.6	4.8	1.2	0.4
253	126.0	2.5	2.4	1.1	0.3
254	118.1	2.4	2.8	0.8	0.2
255	66.1	1.3	1.4	0.9	0.2
256	249.3	5.0	5.1	1.0	0.4
257	116.7	2.3	2.3	1.0	0.2
258	155.2	3.1	3.2	1.0	0.3
259	107.2	2.1	2.5	0.9	0.2
260	215.5	4.3	4.5	1.0	0.3
261	115.7	2.3	2.4	1.0	0.2
262	188.6	3.8	3.7	1.0	0.3
263	107.9	2.2	2.2	1.0	0.2
264	230.6	4.6	4.4	1.1	0.4
265	102.8	2.1	2.1	1.0	0.2
266	151.3	3.0	3.0	1.0	0.3
267	181.4	3.6	3.5	1.0	0.3
268	71.4	1.4	1.5	1.0	0.2
269	117.6	2.4	2.5	0.9	0.2
270	125.1	2.5	2.7	0.9	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
271	106.6	2.1	2.5	0.9	0.2
272	127.5	2.5	3.0	0.9	0.2
273	110.3	2.2	2.2	1.0	0.2
274	159.3	3.2	3.4	0.9	0.3
275	130.0	2.6	3.0	0.9	0.2
276	107.6	2.2	2.9	0.8	0.2
277	74.7	1.5	1.6	0.9	0.2
278	136.3	2.7	2.6	1.1	0.3
279	83.0	1.7	1.7	1.0	0.2
280	50.2	1.0	1.1	0.9	0.2
281	171.3	3.4	3.5	1.0	0.3
282	81.8	1.6	1.9	0.9	0.2
283	118.0	2.4	2.8	0.9	0.2
284	107.2	2.1	2.0	1.1	0.3
285	106.1	2.1	2.6	0.8	0.2
286	50.3	1.0	1.1	0.9	0.2
287	125.0	2.5	2.4	1.0	0.3
288	133.8	2.7	3.0	0.9	0.2
289	87.5	1.8	1.7	1.0	0.2
290	105.9	2.1	2.4	0.9	0.2
291	109.6	2.2	2.3	1.0	0.2
292	58.1	1.2	1.2	1.0	0.2
293	286.0	5.7	5.2	1.1	0.4
294	71.8	1.4	1.5	1.0	0.2
295	72.4	1.4	1.5	1.0	0.2
296	106.6	2.1	2.1	1.0	0.2
297	194.6	3.9	3.7	1.1	0.3

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230
298	234.7	4.7	4.1	1.1	0.4
299	424.2	8.5	7.3	1.2	0.3
300	177.4	3.5	3.4	1.0	0.3
301	70.5	1.4	1.2	1.2	0.2
302	110.7	2.2	2.0	1.1	0.3
303	70.7	1.4	1.1	1.3	0.3
304	75.9	1.5	1.3	1.1	0.3
305	20.1	0.4	0.3	1.5	0.3
306	117.2	2.3	2.2	1.1	0.2
307	115.6	2.3	2.2	1.0	0.2
308	128.1	2.6	2.3	1.1	0.3
309	110.1	2.2	2.3	1.0	0.2
310	99.1	2.0	2.6	0.8	0.2
311	93.1	1.9	1.8	1.1	0.2
312	49.2	1.0	0.9	1.2	0.3
313	164.1	3.3	2.7	1.2	0.3
314	94.8	1.9	1.9	1.0	0.2
315	128.4	2.6	2.3	1.1	0.3
316	142.3	2.8	2.4	1.2	0.3
317	105.1	2.1	1.8	1.2	0.2
318	81.4	1.6	1.8	0.9	0.2
319	127.2	2.5	2.4	1.1	0.3
320	166.4	3.3	3.1	1.1	0.3
321	165.0	3.3	3.2	1.0	0.3
322	173.7	3.5	4.2	0.8	0.3
323	174.8	3.5	3.4	1.0	0.3
324	144.0	2.9	2.7	1.1	0.3

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
325	86.9	1.7	1.8	1.0	0.2
326	61.0	1.2	1.3	1.0	0.2
327	79.0	1.6	1.7	0.9	0.2
328	70.5	1.4	1.4	1.0	0.2
329	119.5	2.4	2.3	1.0	0.3
330	155.0	3.1	3.4	0.9	0.3
331	144.0	2.9	3.1	0.9	0.3
332	153.9	3.1	3.3	0.9	0.3
333	170.4	3.4	3.5	1.0	0.3
334	73.8	1.5	1.6	1.0	0.2
335	98.1	2.0	2.3	0.9	0.2
336	199.9	4.0	4.1	1.0	0.4
337	134.1	2.7	3.0	0.9	0.3
338	87.0	1.7	2.0	0.9	0.2
339	622.2	12.4	10.2	1.2	0.4
340	82.5	1.7	1.6	1.0	0.3
341	901.7	18.0	13.6	1.3	0.4
342	72.0	1.4	1.7	0.9	0.2
343	83.1	1.7	2.1	0.8	0.2
344	137.6	2.8	3.1	0.9	0.3
345	133.9	2.7	2.8	1.0	0.3
346	77.3	1.5	1.6	1.0	0.2
347	86.5	1.7	1.8	0.9	0.2
348	81.7	1.6	1.7	1.0	0.2
349	116.3	2.3	2.3	1.0	0.3
350	131.9	2.6	2.6	1.0	0.3
351	103.3	2.1	2.2	1.0	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230
352	121.0	2.4	2.4	1.0	0.3
353	98.8	2.0	1.9	1.0	0.2
354	64.8	1.3	1.4	1.0	0.2
355	111.3	2.2	2.3	1.0	0.3
356	152.1	3.0	2.8	1.1	0.3
357	111.8	2.2	2.5	0.9	0.2
358	173.5	3.5	3.5	1.0	0.3
359	87.6	1.8	1.8	1.0	0.3
360	88.4	1.8	1.8	1.0	0.2
361	26.5	0.5	0.6	0.9	0.2
362	60.0	1.2	1.4	0.8	0.2
363	53.7	1.1	1.2	0.9	0.2
364	80.1	1.6	1.8	0.9	0.2
366	1074.6	21.5	17.2	1.3	0.3
367	63.4	1.3	1.3	1.0	0.2
368	88.1	1.8	2.3	0.8	0.2
369	41.9	0.8	1.0	0.9	0.2
370	45.2	0.9	1.1	0.8	0.2
371	103.5	2.1	2.1	1.0	0.2
372	59.3	1.2	1.3	0.9	0.2
373	191.0	3.8	3.2	1.2	0.4
374	76.8	1.5	1.6	1.0	0.2
375	56.6	1.1	1.4	0.8	0.2
376	65.6	1.3	1.3	1.0	0.2
377	101.9	2.0	1.8	1.1	0.3
378	184.6	3.7	3.1	1.2	0.3
379	128.9	2.6	2.5	1.0	0.3

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
380	201.4	4.0	3.8	1.1	0.4
381	220.3	4.4	4.7	0.9	0.3
382	124.6	2.5	2.5	1.0	0.3
383	227.6	4.6	4.5	1.0	0.2
384	123.5	2.5	2.5	1.0	0.3
385	105.5	2.1	2.2	1.0	0.3
386	130.8	2.6	2.7	1.0	0.3
387	118.6	2.4	2.4	1.0	0.3
388	142.6	2.9	2.8	1.0	0.3
389	217.7	4.4	3.8	1.2	0.4
390	134.9	2.7	2.6	1.0	0.3
391	62.9	1.3	1.3	1.0	0.3
392	58.8	1.2	1.3	0.9	0.3
393	199.2	4.0	3.4	1.2	0.4
394	854.6	17.1	14.1	1.2	0.4
395	68.5	1.4	1.4	1.0	0.3
396	87.8	1.8	1.8	1.0	0.3
397	74.5	1.5	1.5	1.0	0.3
398	77.5	1.6	1.5	1.1	0.3
399	56.4	1.1	1.2	0.9	0.2
400	55.5	1.1	1.2	0.9	0.2
401	71.4	1.4	1.8	0.8	0.2
402	59.5	1.2	1.3	1.0	0.3
403	83.5	1.7	1.8	0.9	0.3
404	81.4	1.6	1.7	1.0	0.3
405	116.8	2.3	2.3	1.0	0.3
406	79.9	1.6	1.8	0.9	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
407	970.3	19.4	15.8	1.2	0.4
408	152.3	3.0	3.0	1.0	0.3
409	105.5	2.1	2.4	0.9	0.3
410	85.3	1.7	1.9	0.9	0.2
411	96.5	1.9	1.9	1.0	0.3
412	85.1	1.7	2.2	0.8	0.2
413	59.3	1.2	1.5	0.8	0.2
414	100.0	2.0	2.0	1.0	0.3
415	208.2	4.2	3.8	1.1	0.4
416	57.5	1.2	1.2	1.0	0.3
417	85.2	1.7	1.8	0.9	0.3
418	133.5	2.7	2.6	1.0	0.3
419	297.8	6.0	5.0	1.2	0.4
420	115.7	2.3	2.4	1.0	0.3
421	154.2	3.1	3.1	1.0	0.3
422	138.6	2.8	2.9	0.9	0.3
423	185.3	3.7	3.5	1.0	0.4
424	109.5	2.2	2.1	1.1	0.3
425	96.2	1.9	2.1	0.9	0.2
426	66.8	1.3	1.3	1.0	0.3
427	122.6	2.5	2.7	0.9	0.3
428	84.9	1.7	1.9	0.9	0.2
429	170.1	3.4	3.3	1.0	0.3
430	87.7	1.8	1.9	0.9	0.2
431	149.4	3.0	3.0	1.0	0.3
432	89.5	1.8	1.9	1.0	0.2
433	110.2	2.2	2.2	1.0	0.3

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
434	126.0	2.5	2.6	1.0	0.3
435	131.7	2.6	2.5	1.1	0.3
436	128.5	2.6	2.5	1.0	0.3
437	69.5	1.4	1.5	0.9	0.2
438	65.9	1.3	1.2	1.1	0.3
439	85.3	1.7	1.7	1.0	0.3
440	72.8	1.5	1.4	1.0	0.3
441	118.4	2.4	2.4	1.0	0.3
442	147.4	2.9	3.4	0.9	0.3
443	113.4	2.3	2.7	0.8	0.2
444	47.2	0.9	1.0	0.9	0.2
445	135.7	2.7	3.0	0.9	0.3
446	220.4	4.4	4.0	1.1	0.4
447	118.8	2.4	2.8	0.9	0.2
448	280.9	5.6	5.4	1.0	0.5
449	95.8	1.9	2.1	0.9	0.2
450	177.7	3.6	4.1	0.9	0.3
451	75.3	1.5	1.4	1.1	0.3
452	140.4	2.8	3.3	0.9	0.3
453	48.1	1.0	1.0	1.0	0.2
454	55.6	1.1	1.2	1.0	0.2
455	15.2	0.3	0.3	1.1	0.2
456	76.0	1.5	1.7	0.9	0.2
457	76.3	1.5	1.4	1.1	0.3
458	63.7	1.3	1.2	1.0	0.2
459	78.5	1.6	1.5	1.1	0.2
460	85.3	1.7	1.9	0.9	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
461	46.2	0.9	0.8	1.1	0.2
462	65.5	1.3	1.1	1.1	0.3
463	19.6	0.4	0.3	1.3	0.3
464	80.5	1.6	1.3	1.2	0.3
465	37.4	0.7	0.5	1.4	0.3
466	98.2	0.9	1.2	1.2	0.3
467	64.2	1.3	1.0	1.3	0.3
468	208.3	4.2	3.6	1.2	0.3
469	141.0	2.8	2.3	1.2	0.3
470	39.2	0.8	0.7	1.1	0.2
471	132.3	2.6	2.1	1.2	0.3
472	71.4	1.4	1.3	1.1	0.3
473	17.7	0.4	0.3	1.1	0.2
474	103.3	2.1	2.3	0.9	0.2
475	35.1	0.7	0.7	1.0	0.2
476	30.4	0.6	0.5	1.3	0.2
477	85.4	1.7	1.3	1.3	0.4
478	32.6	0.7	0.6	1.2	0.3
479	19.3	0.4	0.4	1.0	0.2
480	75.5	1.5	1.4	1.1	0.2
481	46.2	0.9	0.7	1.3	0.3
482	16.7	0.3	0.2	1.7	0.4
483	17.0	0.3	0.2	1.5	0.3
484	10.0	0.2	0.2	1.2	0.2
485	19.6	0.4	0.4	1.1	0.2
486	40.1	0.8	0.7	1.1	0.2
487	4.9	0.1	0.0	3.9	0.5

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
488	0.8	0.0	0.0	1.1	0.2
489	2.4	0.0	0.0	17.3	0.3
490	13.6	0.3	0.3	0.9	0.2
491	13.5	0.3	0.2	1.1	0.2
492	110.1	2.2	2.0	1.1	0.2
493	128.8	2.6	2.3	1.1	0.3
494	19.5	0.4	0.3	1.2	0.2
495	36.6	0.7	0.5	1.4	0.3
496	25.3	0.5	0.4	1.3	0.3
497	14.0	0.3	0.2	1.5	0.3
498	7.9	0.2	0.1	3.1	1.0
499	66.0	1.3	1.2	1.1	0.2
500	73.7	1.5	1.3	1.1	0.3
501	88.6	1.8	1.5	1.2	0.3
502	261.8	5.2	4.3	1.2	0.4
503	44.3	0.9	0.7	1.3	0.3
504	71.5	1.4	1.3	1.1	0.2
505	29.5	0.6	0.5	1.2	0.2
506	122.9	2.5	2.3	1.1	0.3
507	38.9	0.8	0.6	1.3	0.3
508	36.9	0.7	0.6	1.3	0.3
509	136.7	2.7	2.4	1.1	0.3
510	36.8	0.7	0.6	1.3	0.3
511	56.5	1.1	1.1	1.1	0.2
512	262.4	5.2	2.3	2.3	0.4
513	30.8	0.6	0.4	1.6	0.2
514	57.5	1.2	1.1	1.0	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
515	101.0	2.0	2.0	1.0	0.2
516	75.1	1.5	1.4	1.1	0.2
517	41.0	0.8	0.6	1.3	0.3
518	73.0	1.5	1.2	1.2	0.3
519	59.9	1.2	0.8	1.4	0.4
520	91.9	1.8	1.2	1.6	0.3
521	58.3	1.2	0.9	1.3	0.3
522	164.3	3.3	3.4	1.0	0.3
523	208.6	4.2	3.9	1.1	0.3
524	181.9	3.6	2.8	1.3	0.3
525	98.3	2.0	1.6	1.2	0.3
526	89.9	1.8	1.6	1.2	0.2
527	41.0	0.8	0.6	1.3	0.3
528	131.0	2.6	3.2	0.8	0.2
529	4.7	0.1	0.0	9.5	0.4
530	175.0	3.5	3.7	1.0	0.3
531	165.5	3.3	2.8	1.2	0.3
532	96.0	1.9	1.7	1.2	0.3
533	117.7	2.4	2.0	1.2	0.3
534	236.7	4.7	3.8	1.2	0.4
535	79.3	1.6	1.6	1.0	0.2
536	134.7	2.7	2.4	1.1	0.3
537	91.1	1.8	1.7	1.1	0.3
538	83.5	1.7	1.5	1.1	0.3
539	58.3	1.2	1.0	1.2	0.2
540	95.7	1.9	1.9	1.0	0.3
541	91.1	1.8	1.9	0.9	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
542	70.7	1.4	1.4	1.0	0.2
543	103.4	2.1	2.0	1.0	0.2
544	179.5	3.6	3.2	1.1	0.3
545	68.1	1.4	1.3	1.1	0.3
546	55.4	1.1	1.2	1.0	0.2
547	208.2	4.2	3.8	1.1	0.4
548	91.9	1.8	1.7	1.1	0.2
549	71.7	1.4	1.6	0.9	0.2
550	67.1	1.3	1.1	1.2	0.2
551	69.2	1.4	1.3	1.1	0.2
552	33.4	0.7	0.8	0.9	0.2
553	62.4	1.2	1.2	1.0	0.2
554	87.7	1.8	1.6	1.1	0.2
555	106.4	2.1	1.9	1.1	0.3
556	62.8	1.3	1.1	1.2	0.2
557	346.0	6.9	5.3	1.3	0.3
558	325.7	6.5	5.8	1.1	0.6
559	177.7	3.6	3.0	1.2	0.3
560	168.8	3.4	2.8	1.2	0.3
561	159.8	3.2	2.6	1.2	0.3
562	50.1	1.0	1.0	1.0	0.2
563	65.4	1.3	1.2	1.1	0.2
564	124.7	2.5	2.4	1.0	0.3
565	124.4	2.5	2.3	1.1	0.3
566	257.2	5.1	4.3	1.2	0.4
567	114.2	2.3	2.0	1.1	0.3
568	83.1	1.7	1.7	1.0	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
569	94.8	1.9	1.7	1.1	0.3
570	123.2	2.5	2.2	1.1	0.3
571	95.2	1.9	1.6	1.2	0.3
572	103.7	2.1	1.8	1.1	0.2
573	145.9	2.9	2.5	1.2	0.3
574	94.4	1.9	1.6	1.2	0.2
575	111.5	2.2	2.0	1.1	0.3
576	84.6	1.7	1.5	1.1	0.3
577	161.0	3.2	2.9	1.1	0.3
578	103.3	2.1	2.0	1.0	0.2
579	143.3	2.9	2.8	1.0	0.3
580	68.3	1.4	1.5	0.9	0.2
581	99.4	2.0	1.9	1.0	0.3
582	94.4	1.9	1.9	1.0	0.3
583	117.4	2.3	2.2	1.0	0.3
584	169.7	3.4	3.0	1.1	0.3
585	40.7	0.8	0.9	1.0	0.2
586	104.2	2.1	2.1	1.0	0.2
587	102.5	2.1	2.1	1.0	0.2
588	168.2	3.4	3.4	1.0	0.3
589	150.0	3.0	2.7	1.1	0.3
590	97.4	1.9	2.0	1.0	0.2
591	78.0	1.6	1.7	0.9	0.2
592	66.2	1.3	1.4	1.0	0.2
593	211.1	4.2	3.6	1.2	0.4
594	108.6	2.2	2.0	1.1	0.3
595	96.0	1.9	1.9	1.0	0.3

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230
596	92.5	1.9	1.8	1.0	0.2
597	169.7	3.4	3.3	1.0	0.3
598	113.2	2.3	2.2	1.0	0.3
599	168.6	3.4	3.3	1.0	0.3
600	142.2	2.8	2.7	1.0	0.3
601	89.2	1.8	2.0	0.9	0.2
602	36.4	0.7	1.1	0.7	0.2
603	79.0	1.6	1.7	0.9	0.2
604	96.9	1.9	2.1	0.9	0.2
605	60.7	1.2	1.3	0.9	0.2
606	82.0	1.6	1.7	0.9	0.2
607	89.4	1.8	1.8	1.0	0.2
608	77.1	1.5	1.7	0.9	0.2
609	94.5	1.9	2.0	0.9	0.2
610	87.2	1.7	1.6	1.1	0.3
611	99.1	2.0	2.2	0.9	0.2
612	91.1	1.8	2.0	0.9	0.2
613	117.1	2.3	2.2	1.1	0.3
614	68.2	1.4	1.5	0.9	0.2
615	109.3	2.2	2.6	0.9	0.2
616	124.1	2.5	2.4	1.0	0.3
617	78.2	1.6	1.6	1.0	0.2
618	60.8	1.2	1.3	0.9	0.2
619	89.7	1.8	2.0	0.9	0.2
620	51.1	1.0	1.1	0.9	0.2
621	89.3	1.8	2.1	0.9	0.2
622	58.7	1.2	1.4	0.8	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
623	74.0	1.5	1.6	0.9	0.2
624	77.3	1.5	1.8	0.9	0.2
625	124.8	2.5	2.3	1.1	0.3
626	122.9	2.5	2.2	1.1	0.3
627	195.6	3.9	3.7	1.1	0.3
628	66.1	1.3	1.5	0.9	0.2
629	78.9	1.6	1.8	0.9	0.2
630	115.9	2.3	2.0	1.1	0.3
631	82.6	1.7	1.9	0.9	0.2
632	180.7	3.6	3.5	1.0	0.3
633	64.8	1.3	1.5	0.9	0.2
634	74.9	1.5	1.6	0.9	0.2
635	104.0	2.1	2.2	1.0	0.3
636	84.8	1.7	1.8	0.9	0.2
637	98.1	2.0	2.2	0.9	0.2
638	72.3	1.4	1.6	0.9	0.2
639	78.6	1.6	1.9	0.8	0.2
640	776.7	15.5	13.3	1.2	0.4
641	139.7	2.8	3.0	0.9	0.3
642	113.1	2.3	2.9	0.8	0.2
643	94.9	1.9	2.1	0.9	0.2
644	63.9	1.3	1.6	0.8	0.2
645	59.7	1.2	1.6	0.7	0.2
646	62.9	1.3	1.5	0.8	0.2
647	64.2	1.3	1.4	0.9	0.2
648	126.2	2.5	2.4	1.0	0.3
649	69.4	1.4	1.4	1.0	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
650	77.2	1.5	1.5	1.0	0.2
651	101.2	2.0	2.0	1.0	0.3
652	62.4	1.2	1.4	0.9	0.2
653	124.2	2.5	2.3	1.1	0.3
654	133.6	2.7	2.8	0.9	0.3
655	152.4	63.0	1.5	1.0	1.2
656	60.4	1.2	1.4	0.9	0.2
657	31.7	0.6	0.8	0.8	0.2
658	25.3	0.5	0.6	0.8	0.2
659	38.4	0.8	1.0	0.7	0.2
660	53.9	1.1	1.3	0.8	0.2
661	106.8	2.1	2.1	1.0	0.3
662	70.8	1.4	1.3	1.1	0.3
663	111.6	2.2	2.5	0.9	0.3
664	149.6	3.0	3.2	1.0	0.3
665	114.8	2.3	1.8	1.3	0.3
666	55.5	1.1	1.1	1.0	0.2
667	75.5	1.5	1.9	0.8	0.2
668	102.8	2.1	2.6	0.8	0.2
669	44.5	0.9	1.1	0.8	0.2
670	37.2	0.7	1.1	0.7	0.1
671	36.8	0.7	0.9	0.8	0.2
672	33.8	0.7	0.8	0.8	0.2
673	46.8	0.9	1.2	0.8	0.2
674	34.9	0.7	0.9	0.8	0.2
675	52.3	1.0	1.2	0.9	0.2
676	82.6	1.7	1.9	0.9	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
677	59.3	1.2	1.4	0.8	0.2
678	26.7	0.5	0.7	0.7	0.1
679	13.8	0.3	0.3	0.8	0.1
680	71.1	1.4	1.5	1.0	0.2
681	30.5	0.6	0.7	0.9	0.2
682	49.6	1.0	1.0	1.0	0.2
683	311.8	6.2	4.4	1.4	0.3
684	48.6	1.0	1.0	0.9	0.2
685	2.0	0.0	0.2	0.2	0.0
686	222.1	4.4	3.6	1.2	0.4
687	62.4	1.2	1.0	1.2	0.3
688	43.9	0.9	0.9	1.0	0.2
689	52.7	1.1	1.0	1.1	0.2
690	52.1	1.0	0.9	1.1	0.2
691	20.0	0.4	0.4	1.0	0.2
692	12.0	0.2	0.3	0.7	0.1
693	8.4	0.2	0.2	0.8	0.1
694	25.1	0.5	0.5	1.1	0.2
695	75.1	1.5	1.3	1.2	0.2
696	31.6	0.6	0.6	1.0	0.2
697	61.3	1.2	1.1	1.1	0.2
698	26.4	0.5	0.6	0.8	0.2
699	20.8	0.4	0.7	0.6	0.1
700	60.8	1.2	1.3	1.0	0.2
701	46.7	0.9	1.2	0.8	0.2
702	11.8	0.2	0.2	1.5	0.4
703	100.6	2.0	1.5	1.3	0.3

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
704	27.7	0.6	0.4	1.3	0.3
705	57.2	1.1	1.1	1.0	0.2
706	28.8	0.6	0.4	1.5	0.3
707	68.2	1.4	1.2	1.2	0.3
708	37.8	0.8	0.5	1.5	0.3
709	17.5	0.4	0.2	1.5	0.3
710	25.9	0.5	0.4	1.4	0.3
711	49.8	1.0	0.9	1.1	0.3
712	18.3	0.4	0.3	1.2	0.2
713	42.8	0.9	0.7	1.2	0.2
714	24.2	0.5	0.3	1.4	0.3
715	49.4	1.0	0.8	1.2	0.3
716	41.6	0.8	0.8	1.1	0.2
717	36.1	0.7	0.5	1.4	0.3
718	78.5	1.6	1.1	1.4	0.3
719	46.8	0.9	0.8	1.2	0.3
720	33.1	0.7	0.6	1.1	0.2
721	62.1	1.2	1.0	1.2	0.3
722	8.5	0.2	0.1	2.6	0.4
723	16.1	0.3	0.2	1.5	0.3
724	34.4	0.7	0.5	1.4	0.3
725	62.4	1.2	1.4	0.9	0.2
726	8.9	0.2	0.2	1.1	0.2
727	96.2	1.9	1.7	1.2	0.3
728	82.2	1.6	1.7	1.0	0.2
729	139.7	2.8	2.5	1.1	0.3
730	131.7	2.6	2.4	1.1	0.3

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
731	99.3	2.0	1.9	1.1	0.3
732	69.7	1.4	1.2	1.2	0.3
733	33.0	0.7	0.6	1.1	0.1
734	341.6	0.8	1.1	1.2	1.3
735	20118.8	2.4	363.0	1.1	1.1
736	17.7	0.4	0.4	1.0	0.2
737	107.6	2.2	2.2	1.0	0.3
738	103.8	2.1	1.9	1.1	0.3
739	182.9	3.7	3.1	1.2	0.4
740	118.1	2.4	2.7	0.9	0.2
741	107.5	2.2	2.0	1.1	0.3
742	91.6	1.8	2.1	0.9	0.2
743	75.8	1.5	1.5	1.0	0.2
744	194.5	3.9	4.3	0.9	0.3
745	189.0	3.8	3.6	1.1	0.3
746	132.8	2.7	3.0	0.9	0.3
747	91.9	1.8	2.2	0.8	0.2
748	117.6	2.4	2.3	1.0	0.3
749	128.3	2.6	2.6	1.0	0.3
750	146.8	2.9	2.7	1.1	0.3
751	96.8	1.9	2.0	1.0	0.2
752	72.4	1.4	1.5	1.0	0.2
753	119.3	2.4	2.5	1.0	0.3
754	118.4	2.4	2.3	1.0	0.2
755	93.1	1.9	1.8	1.0	0.2
756	79.3	1.6	1.6	1.0	0.2
757	96.0	1.9	1.8	1.1	0.3

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
758	50.7	1.0	1.2	0.8	0.2
759	267.6	5.4	4.1	1.3	0.5
760	201.1	4.0	4.4	0.9	0.3
761	225.1	4.5	4.7	1.0	0.3
762	73.1	1.5	1.3	1.1	0.3
763	142.5	2.9	2.6	1.1	0.3
764	140.4	2.8	2.4	1.2	0.3
765	102.6	2.1	1.8	1.1	0.3
766	217.8	4.4	3.8	1.2	0.4
767	105.9	2.1	2.1	1.0	0.3
768	27.9	1.6	1.2	1.0	1.1
769	85.8	1.7	1.5	1.1	0.3
770	96.9	1.9	1.7	1.2	0.3
771	158.6	3.2	2.4	1.3	0.4
772	111.6	2.2	2.1	1.1	0.3
773	124.3	2.5	2.2	1.1	0.3
774	127.7	2.6	2.5	1.0	0.3
775	163.5	3.3	3.1	1.1	0.3
776	143.3	2.9	2.5	1.2	0.3
777	184.1	3.7	3.2	1.2	0.3
778	83.3	1.7	1.7	1.0	0.3
779	84.6	1.7	1.6	1.1	0.2
780	122.0	2.4	2.5	1.0	0.3
781	143.6	2.9	2.7	1.1	0.3
782	151.5	3.0	3.0	1.0	0.3
783	103.3	2.1	2.0	1.0	0.3
784	54.5	1.1	1.3	1.1	1.4

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
785	40.0	1.8	1.0	1.1	1.3
786	113.3	2.3	2.0	1.1	0.3
787	140.4	2.8	2.5	1.1	0.3
788	102.7	2.1	1.9	1.1	0.3
789	163.4	3.3	2.8	1.2	0.3
790	70.3	1.4	1.3	1.1	0.2
791	81.2	1.6	1.5	1.1	0.2
792	94.8	1.9	1.7	1.1	0.3
793	146.8	2.9	2.8	1.1	0.3
794	75.1	1.5	1.7	0.9	0.2
795	101.4	2.0	2.3	0.9	0.2
796	155.3	3.1	3.4	0.9	0.2
797	55.1	1.1	1.2	0.9	0.2
798	100.5	2.0	2.3	0.9	0.2
799	66.3	1.3	1.5	0.9	0.2
800	65.0	1.3	1.5	0.9	0.2
801	54.9	1.1	1.2	0.9	0.2
802	128.2	2.6	2.7	1.0	0.2
803	88.1	1.8	1.9	0.9	0.2
804	72.5	1.5	1.6	0.9	0.2
805	31.9	0.6	0.8	0.8	0.2
806	50.3	1.0	1.0	1.0	0.2
807	39.1	0.8	0.8	1.0	0.2
808	73.6	1.5	1.5	1.0	0.2
809	66.5	1.3	1.1	1.2	0.3
810	60.8	1.2	1.5	0.8	0.2
811	158.9	3.2	4.1	0.8	0.1

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
812	45.4	0.9	0.8	1.1	0.2
813	99.5	2.0	2.3	0.9	0.2
814	178.8	3.6	4.1	0.9	0.3
815	95.7	1.9	1.6	1.2	0.3
816	53.7	1.1	1.2	0.9	0.2
817	169.3	3.4	4.0	0.9	1.1
818	58.3	1.2	1.4	0.9	0.2
819	130.6	2.6	2.6	1.0	0.3
820	14.5	0.3	0.2	1.6	0.2
821	87.5	1.8	1.8	1.0	0.2
822	38.6	0.8	0.7	1.1	0.2
823	36.1	0.7	0.7	1.0	0.2
824	30.5	0.6	0.7	0.9	0.2
825	58.3	1.2	1.3	0.9	0.2
826	76.2	1.5	1.6	0.9	0.2
827	35.9	0.7	0.7	1.0	0.2
828	29.8	0.6	0.7	0.8	0.2
829	72.8	1.5	1.2	1.2	0.3
830	72.1	1.4	1.0	1.4	0.3
831	28.8	0.6	0.7	0.8	0.2
832	198.2	4.0	3.3	1.2	0.3
833	41.8	0.8	0.6	1.4	0.3
834	167.9	3.4	3.8	0.9	0.3
835	107.8	2.2	2.6	0.8	0.2
836	43.5	0.9	0.7	1.2	0.2
837	52.1	1.0	1.0	1.0	0.2
838	59.5	1.2	1.0	1.2	0.2

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
839	107.5	2.2	2.0	1.1	0.3
840	45.3	0.9	1.1	0.8	0.3
841	99.0	2.0	2.1	1.0	0.2
842	101.2	2.0	2.0	1.0	0.3
843	124.0	2.5	3.2	0.8	0.2
844	101.1	2.0	2.0	1.0	0.3
845	113.9	2.3	2.5	0.9	0.3
846	67.7	1.4	1.5	0.9	0.2
847	110.2	2.2	2.7	0.8	0.2
848	52.8	1.1	1.1	0.9	0.2
849	45.0	0.9	1.0	0.9	0.2
850	143.9	2.9	3.7	0.8	0.3
851	127.6	2.6	3.3	0.8	0.2
852	119.9	2.4	2.1	1.1	0.3
853	33.8	0.7	0.8	0.8	0.2
854	60.0	1.2	1.4	0.9	0.2
855	24.0	0.5	0.5	1.1	0.2
856	40.8	0.8	1.0	0.8	0.2
857	70.5	1.4	1.4	1.0	0.2
858	63.8	1.3	1.6	0.8	0.2
859	80.0	1.6	1.9	0.8	0.2
860	141.7	2.8	3.1	0.9	0.3
861	39.8	0.8	1.1	0.7	0.2
862	57.0	1.1	1.3	0.9	0.2
863	51.8	1.0	1.2	0.9	0.2
864	74.0	1.5	1.9	0.8	0.2
865	164.1	3.3	3.1	1.1	0.3

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	A260	A280	260/280	260/230
866	169.1	3.4	4.0	0.8	0.3
867	78.1	1.6	1.6	1.0	0.2
868	90.9	1.8	2.2	0.8	0.2
869	91.9	1.8	2.3	0.8	0.2
870	178.0	3.6	3.8	0.9	0.3



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวเพ็ญภา ตาคำ
เกิดเมื่อ	06 พฤศจิกายน 2538
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษา ปี พ.ศ.2560 ระดับปริญญาตรี คุณวุฒิ วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) เกียรตินิยมอันดับ 1 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัด เชียงใหม่
ประวัติการทำงาน	-

