การตรวจหาเชื้อ *Babesia bovis* ในเลือดโคโดยเทคนิคพีซีอาร์-อีไลซา

Detection of *Babesia bovis* in Cow Blood by PCR-ELISA

กล่าวขวัญ ศรีสุข[1*] นพพร ศราธพันธ์[2] และโกสุม จันทร์ศิริ[3]

[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

[2]ฝ่ายปาราสิต สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ 10900

[3]ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพ 10110

Klaokwan Srisook[1*] Nopporn Sarataphan[2] and Kosum Chansiri[3]

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131.

[2]Parasitology Section, National Institute of Animal Health, Department of Livestock,
Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, 10900.

[3]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot university, Bangkok, 10110.

บทคัดย่อ

คณะผู้วิจัยพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Babesia bovis* ให้มีความไวและความจำเพาะสูง และมีความสะดวกในการตรวจสอบเลือดตัวอย่างได้ปริมาณมากในคราวเดียวกัน การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนคาร์บาโมอิลฟอสเฟตซินทีเธส (Carbamoyl Phosphate Synthetase II) โดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction, PCR) และตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าเทคนิค PCR-ELISA นี้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ *Anaplasma marginale Trypanosoma evansi Babesia bigemina Theileria* sp. หรือดีเอ็นเอของโค ในขณะที่ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis* ได้ต่ำถึง 0.1 พิโคกรัม และตรวจสอบปริมาณเชื้อ *B. bovis* ในเลือดโคในระดับ 1.4×10^{-6}% parasitemia การตรวจสอบการติดเชื้อในเลือดตัวอย่างจำนวน 53 ตัวอย่าง พบว่ามี 5 ตัวอย่าง (9.4 %) ที่ให้ผลบวกกับการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR-ELISA ในขณะที่ไม่มีเลือดตัวอย่างใดที่ตรวจพบเชื้อ *B. bovis* โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้เทคนิค PCR-ELISA สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ *B. bovis* ในโคทดลองได้ตั้งแต่วันที่ 4 หลังการฉีดเชื้อในขณะที่การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์สามารถตรวจพบเชื้อได้ในวันที่ 10 หลังการฉีดเชื้อ

คำสำคัญ : บาบีเซีย โบวิส พีซีอาร์ อีไลซา

Abstract

In this work, we developed a sufficiently sensitive and specific PCR-based assay for *Babesia bovis*. PCR products were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to simplify the processing of large number of samples. The primers were derived from Carbamoyl Phosphate Synthetase II gene sequences and could not amplify DNA from *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma evansi*, *Babesia bigemina*, *Theileria* sp. or cow. The sensitivity of *B. bovis* DNA detection was 0.1 pg. Furthermore, the assay detected *B. bovis* parasite in cow blood down to 1.4×10^{-6}% parasitemia. By the PCR-ELISA method, five of fifty-three blood samples showed

*** Corresponding author.** E-mail: klaokwan@yahoo.com

positive reactions, while no blood samples were detected by microscopic examination. In addition, the PCR-ELISA could detect the infection since day 4 after inoculation, in experimental cow, before detection by microscopic examination (day 10 after inoculation).

Keywords : *Babesia bovis*, PCR, ELISA

บทนำ

เชื้อ *Babesia bovis* เป็นปาราสิตที่ก่อให้เกิดโรคบาบีซิโอซีส (babesiosis) ของโคและกระบือ เชื้อปาราสิตนี้อาศัยอยู่ในเม็ดเลือดแดงของโค โดยมีเห็บโค (*Boophilus microplus*) เป็นพาหะของโรค (Mahoney, 1979) อาการของโรคโดยทั่วไปคือเชื้อจะทำให้โคหรือกระบือที่ติดเชื้อมีปริมาณเม็ดเลือดแดงต่ำลงเนื่องจากเชื้ออาศัยและแบ่งตัวในเม็ดเลือดแดงจึงทำให้เม็ดเลือดแดงแตก อันเป็นสาเหตุอาการโลหิตจาง มีไข้ปานกลางจนถึงสูง ปัสสาวะเป็นสีแดงและมีอาการดีซ่าน นอกจากนี้เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อจะเกาะกันและอุดตันเส้นเลือดฝอยตามเนื้อเยื่อต่างๆ โดยเฉพาะสมองซึ่งมีผลทำให้สัตว์ตายได้ หากไม่ได้รับการรักษาให้ทันท่วงที (Young and Morzaria , 1986; Wright et al., 1989)

วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *B. bovis* ในปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นการตรวจเชื้อในเม็ดเลือดแดงบนแผ่นเลือดย้อมด้วยสี Giemsa หรือสี Wright เป็นวิธีที่ง่ายแต่ต้องอาศัยผู้ที่ชำนาญและมีประสบการณ์สูงในการแยกเชื้อ *B. bovis* ออกจากเชื้อ *B. bigemina* ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกันมาก (Bishop and Adams, 1973) การตรวจทางซีโรโลจิคอลอาศัยการจับที่จำเพาะของแอนติบอดีกับแอนติเจน เช่น วิธี ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay) ถูกนำมาใช้ในการตรวจหา *B. bovis* ในโค (Kung and Goodger , 1990; Boonchit et al., 2002) วิธีเหล่านี้มีประโยชน์สำหรับแยกชนิดของ Babesia ในสัตว์แต่ละตัวซึ่งใช้ในการศึกษาด้านระบาดวิทยาแต่ไม่สามารถ บอกได้ว่าเป็นการสัมผัสเชื้อในอดีต หรือในปัจจุบัน การตรวจโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบปาราสิตชนิดต่างๆ (Farimal et al., 1992; Wuyts et al., 1994) แต่เทคนิค PCR มีข้อจำกัดคือการวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (Agarose Gel Electrophoresis) ซึ่งต้องย้อมด้วย ethidium bromide และส่องดูด้วยภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ทำให้ผู้ปฏิบัติต้องสัมผัสกับ ethidium bromide ที่เป็นสารที่ก่อให้เกิดการผ่าเหล่า และแสงอัลตราไวโอเลตซึ่งก่อให้เกิดมะเร็งได้ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค PCR-ELISA มาใช้ในการตรวจหาเชื้อปาราสิตชนิดต่างๆ เช่น Anaplasma marginale (Gale et al., 1996) Leishmania (Pinero et al., 1999) Trypanosoma evansi (Chansiri et al., 2002) เทคนิค PCR-ELISA เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง โดยการติดฉลากชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเชื้อนั้นด้วยสารเคมีที่ไม่เป็นอันตราย เช่น Digoxigenin (DIG-11-dUTP) โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จากนั้นติดตามดีเอ็นเอชิ้นที่จำเพาะโดยการนำมาไฮบริไดซ์กับไพรเมอร์ที่ติดด้วยสาร biotin (internal primer) ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสในชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR จากนั้นนำไปจับกับสาร streptavidin ที่เคลือบไว้บน microtiter plate และทำให้เกิดสีต่อไป การตรวจหาเชื้อต่างๆ โดยเทคนิค PCR-ELISA สามารถทำได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกันทำให้การตรวจเชื้อทำได้ง่าย รวดเร็วและประหยัดเวลา ทั้งผู้ตรวจสอบไม่ต้องสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเลต และ ethidium bromide

โรคที่เกิดจากเชื้อ *B. bovis* นี้มีความรุนแรงและทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการผลิตน้ำนมและเนื้อเพื่อใช้ในการบริโภค เนื่องจากโคและกระบือที่ติดเชื้อนี้ผลิตน้ำนมและเนื้อที่มีคุณภาพต่ำกว่ามาตราฐานและยังอาจทำให้พ่อแม่พันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงตายได้ ดังนั้นการพัฒนาหาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *B. bovis* ให้มีความไวและความจำเพาะสูง สะดวก ประหยัดเวลา และปลอดภัย มีความจำเป็นสำหรับการการตรวจสอบเชื้อในเลือดของสัตว์ ในขณะที่มีปริมาณเชื้อน้อยๆหรือในสัตว์ที่เป็นพาหะของโรคเพื่อป้องกันและลดความเสียหายจากโรค ดังกล่าวงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *B. bovis* โดยเทคนิค PCR-ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเลือดโคและกระบือ

ทำการเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอของโคจากฟาร์มในจังหวัดชลบุรี สระบุรี บุรีรัมย์ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สงขลา และนราธิวาส ระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ.2542 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ.2543 จำนวน 53 ตัวอย่าง โดยผสมเลือดตัวอย่างผสมกับสารกันเลือดแข็ง EDTA และสกัดดีเอ็นเอจากเลือดตัวอย่างจำนวน 50 ไมโครลิตรโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Insta Gene Whole Blood Kit (Bio-Rad)

ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ทั้งหมดออกแบบโดยใช้โปรแกรม OLIGO version 4.0 จากลำดับเบสของยีนสำหรับเอนไซม์ คาร์บาโมอิลฟอสเฟตซินทีเธส [Carbamoyl Phosphate Synthetase II (CPS II)] ของเชื้อ *B. bovis* (Chansiri and Bagnara, 1995) โดยไพรเมอร์ Bb1 (5' TTTGGTATTTGTCTTGGTCAT 3'; ลำดับเบสที่ 2738-2758) และ Bb2 (5' ACCACTGTAGTCA AACTCACC 3'; ลำดับเบสที่ 3178-3190) ส่วนไพรเมอร์ Bb3 (5' TGTGTTGATTTGCGTACTTCT 3'; ลำดับเบสที่ 2831-2851) ติดฉลากด้วยสารไบโอติน (biotin) ที่ด้าน 5' และมีลำดับเบสที่จับคู่สมกับผลผลิตดีเอ็นเอของไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 ได้

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นำดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis* มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ บัฟเฟอร์ [10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 8.3, 50 มิลลิโมลาร์ KCl, 0.01% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เจลาติน, 1.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$] dATP dGTP dCTP ตัวละ 200 ไมโครโมลาร์ dTTP 190 ไมโครโมลาร์ และ digoxigenin-11-dUTP 10 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 ตัวละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ เอนไซม์ Taq Polymerase (Promega) 2 ยูนิต จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycler; Perkin Elmer 9600) ในสภาวะดังนี้ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน1 รอบ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรส เจลอิเลคโตรโฟรีซีสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ หรือด้วยวิธี ELISA

การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอด้วยวิธี ELISA

วิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นด้วยวิธี ELISA โดยใช้ PCR-ELISA detection kit (Boehringer Mannheim) นำผลผลิตดีเอ็นเอจำนวน 10 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย alkaline จำนวน 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันดีและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม hybridization solution ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ Bb3 ปริมาณ15 พิโคโมล จำนวน 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีและปิเปตสารละลายผสมข้างต้นจำนวน 200 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microtiter plate ที่เคลือบด้วย streptavidin แล้วนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าตลอดเวลา เมื่อครบเวลาเทสารละลายออกจาก microtiter plate ล้างหลุมด้วย washing solution จำนวน 250 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม anti-digoxigenin-peroxidase (250 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร) จำนวน 200 ไมโครลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พร้อมทั้งเขย่า เสร็จแล้วล้างหลุมด้วย washing solution จำนวน 250 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethybenzthiazo line sulfonate] หลุมละ 200 ไมโครลิตร และเก็บ microtiter plate ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate reader (BioRad Model 3550 UV)

การทดสอบความจำเพาะของการตรวจหาเชื้อ *B. bovis* ในเลือดโค

นำดีเอ็นเอจำนวน 10 นาโนกรัม ของปาราสิตชนิดต่างๆ คือ *A. marginale T. evansi B. bigemina Theileria sp.*และดีเอ็นเอของโค มาทดสอบปฏิกิริยา PCR-ELISA

การทดสอบความไวของการตรวจหาเชื้อ *B. bovis* ในเลือดโค

นำเลือดโคที่ติดเชื้อ *B. bovis* มาเจือจางด้วยเลือดโคที่ไม่ติดเชื้อ เพื่อทำการเจือจางให้มีจำนวนปาราสิตตั้งแต่ $1.4x10^{-3}$- $1.4x10^{-7}$ เปอร์เซ็นต์ (% parasitemia) โดยมีปริมาตรรวมของเลือดเป็น 50 ไมโครลิตร จากนั้นสกัดเลือดในแต่ละความเข้มข้นโดยชุดสกัดดีเอ็นเอ Insta Gene Whole Blood Kit เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR-ELISA

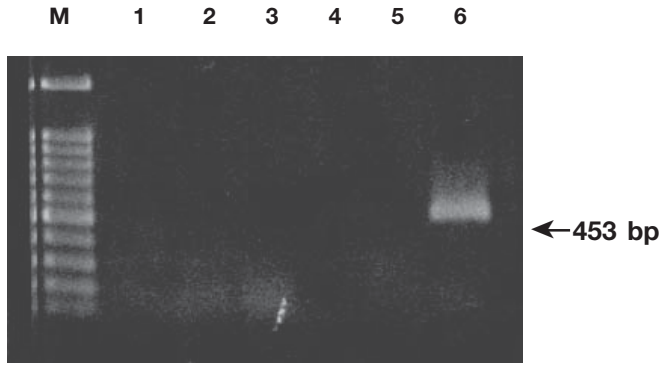
การเพาะเชื้อ *B. bovis* ในโคที่ตัดม้าม (Sub-inoculation into splenectomized calf)

เจาะเลือดลูกโคนมอายุ 8 เดือน ซึ่งเลี้ยงไว้ในคอกที่ปลอดจากเห็บโค ณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลางบางเขน เพื่อตรวจหาเชื้อปาราสิตต่างๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. bovis* โดยวิธี IFAT (Indirect Fluorescenct Antobody Test) ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่าลูกโคปลอดจากเชื้อ *B. bovis* และเชื้อปาราสิตในเลือดชนิดอื่นๆ ก่อนตัดม้ามออก หลังตัดม้ามออกสองสัปดาห์นำเลือดซึ่งมีเชื้อ *B. bovis* (TS4) ได้มาจากโคในอำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช ที่มีจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเท่ากับ 9 เปอร์เซ็นต์ (% parasitemia) นำเลือดนี้ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ฉีดเข้าลูกวัวที่ถูกตัดม้าม หลังจากฉีดเชื้อเข้าลูกโคแล้วทำการวัดอุณหภูมิ เจาะเลือดเพื่อตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทำ PCR-ELISA จนถึงวันที่ 10 หลังการฉีดเชื้อ

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ความจำเพาะของการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis* โดยเทคนิค PCR-ELISA

การทดสอบความจำเพาะของการตรวจหาเชื้อ *B. bovis* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 10 นาโนกรัมจากเชื้อที่มักพบในเลือดโคคือ *A. marginale T. evansi B. bigemina* และ *Theileria* sp.พบว่าไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อต่างๆรวมทั้งดีเอ็นเอของโค ยกเว้นดีเอ็นเอจากเชื้อ *B. bovis* ได้ดังแสดงผลในรูปที่ 1 เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนี้ มาทดสอบด้วยปฏิกิริยา ELISA ผลที่ได้แสดงว่าปฏิกิริยา ELISA ให้ผลบวกกับเชื้อ *B. bovis* เท่านั้น (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 ความจำเพาะของการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 ดังแสดงในผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเลคโตรโฟรีซีส M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder); land 1 : ดีเอ็นเอของโค ; lane 2 : ดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bigemina*; lane 3 : ดีเอ็นเอของเชื้อ *Theileria* sp; lane 4 : ดีเอ็นเอของเชื้อ *A. marginale*; lane 5 : ดีเอ็นเอของเชื้อ *T. evansi*; lane 6 : ดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis*

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อปาราสิตต่างๆ ด้วยเทคนิค PCR-ELISA

ดีเอ็นเอ	ผล PCR-ELISA
โค	-
B. bigemina	-
Theileria sp	-
A. marginale	-
T. evansi	-
B. bovis	+

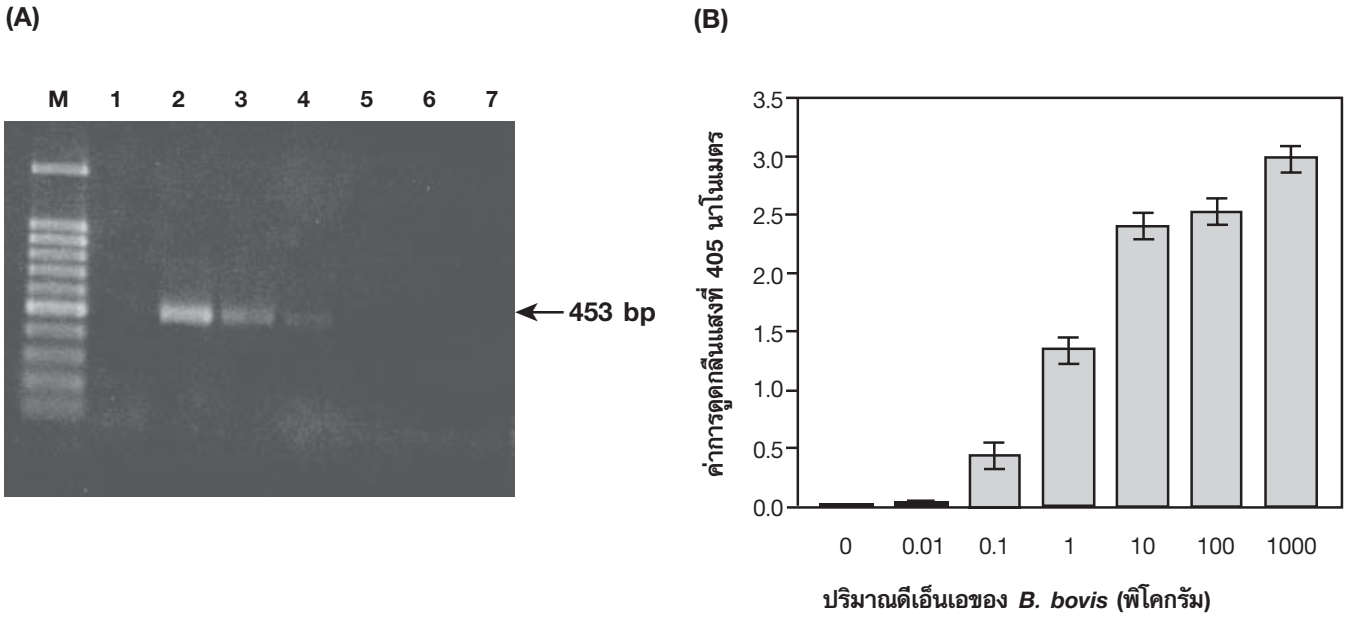
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis* ด้วยไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสของยีน CPS II ได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดประมาณ 453 คู่เบส จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 เป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis* ไพรเมอร์คู่นี้ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอของปาราสิตชนิดต่างๆ ที่มักพบในเลือด

เช่น *B. bigemina, A. marginale, T. evansi* และ *Theileria* sp. ยกเว้นดีเอ็นเอของ *B. bovis* ดังนั้นการใช้ไพรเมอร์ Bb1 และ Bb2 สามารถหลีกเลี่ยงการเกิดผลบวกปลอมจากปฏิกิริยาข้าม (cross-hybridization) ที่เกิดจากการที่ไพรเมอร์จับกับบริเวณที่ไม่ใช่เป้าหมายที่แท้จริง นอกจากนี้ในการทำ PCR-ELISA นี้จะมีไพรเมอร์ Bb3 ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ทำให้เพิ่มความจำเพาะในการตรวจสอบให้สูงมากยิ่งขึ้น

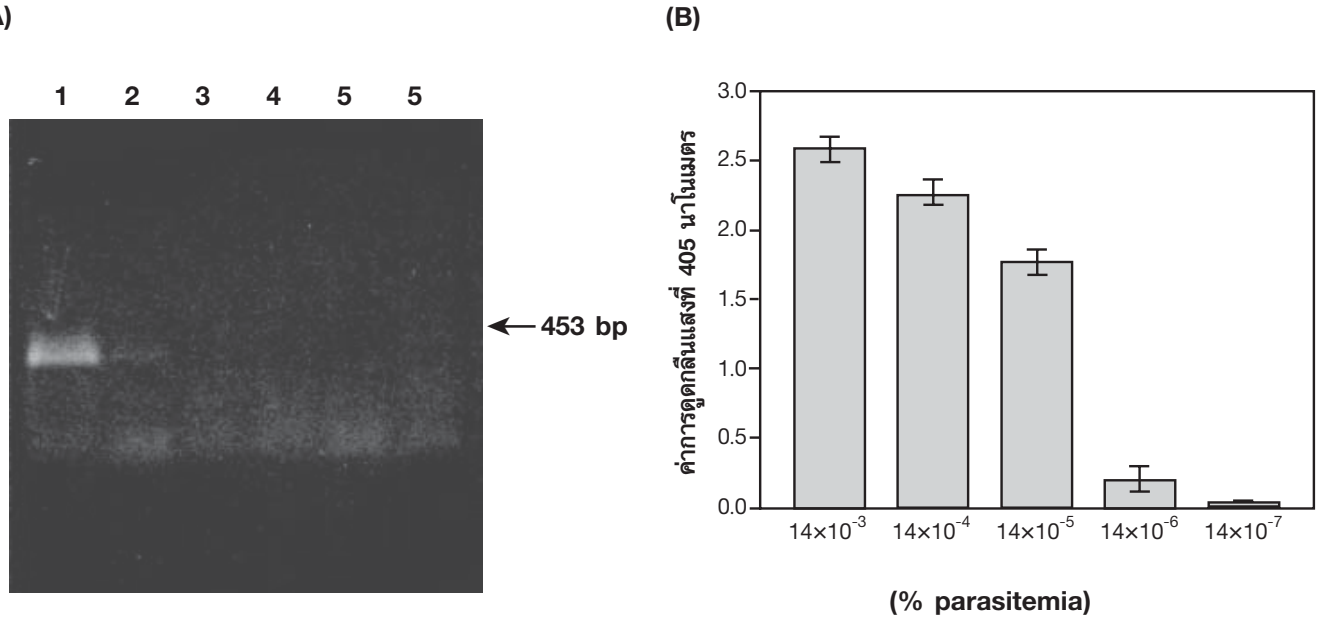
ความไวของการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis* โดยเทคนิค PCR-ELISA

เพื่อทดสอบความสามารถในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ B. bovis ด้วยเทคนิค PCR-ELISA ดีเอ็นเอปริมาณ 1 นาโนกรัม ถึง 0.01 พิโคกรัมถูกนำมาทำปฏิกิริยา PCR-ELISA และนำดีเอ็นเอผลผลิต 10 ไมโครลิตรมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าสามารถตรวจสอบได้ถึงปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอ 10 พิโคกรัม (รูปที่ 2A) แต่เมื่อนำผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ต่อด้วย ELISA มีผลให้ความไวของการตรวจสอบสูงขึ้นประมาณ 100 เท่า คือตรวจสอบได้ถึง 0.1 พิโคกรัม (รูปที่ 2B) ซึ่งเป็นจุดที่ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าค่าที่ได้จากหลอดควบคุมหรือหลอดที่ไม่มีดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis*

จากการทดสอบความไวของการตรวจสอบเชื้อ *B. bovis* ในเลือดโคทดลองที่ติดเชื้อ *B. bovis* โดยเจือจางด้วยเลือดโคที่ไม่ติดเชื้อ จากนั้นนำเลือดที่มีปริมาณเชื้อ *B. bovis* ต่างๆกันและเลือดโคที่ไม่ติดเชื้อจำนวน 50 ไมโครลิตรมาทดสอบ PCR-ELISA พบว่าการวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสตรวจพบได้ที่ 1.4x10-4% parasitemia (รูปที่ 3A) ส่วนผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ELISA สามารถตรวจสอบได้ถึงระดับ 1.4x10-6% parasitemia (รูปที่ 3B) ในการทดลองนี้ปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ใช้ประมาณ 6.94x106 เซลล์ต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ซึ่งทำให้ความไวของการตรวจสอบเท่ากับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *B. bovis* จำนวน10 เซลล์ในเลือด 1 ไมโครลิตร จุด cut-off ของการตรวจสอบการตรวจเชื้อในเลือดโคนั้นมีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 0.09 ซึ่งได้มาจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา PCR-ELISA ของเลือดโคปกติจำนวน 16 ตัว ที่เลี้ยงในคอกปลอดจากเห็บโค ณ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ และเป็นโคที่ปลอดจากเชื้อปาราสิตต่างๆในเลือดโดยการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. bovis* โดยวิธี IFAT



รูปที่ 2 ความไวของการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *B. bovis* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย (A) วิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส M : ดีเอ็นเอมาตราฐาน (100 bp DNA ladder); lane 1 : ดีเอ็นเอปริมาณ 0 พิโคกรัม ; lane 2 : ดีเอ็นเอปริมาณ 1000 พิโคกรัม ; lane 3 : ดีเอ็นเอปริมาณ 100 พิโคกรัม ; lane 4 : ดีเอ็นเอปริมาณ 10 พิโคกรัม ; lane 5 : ดีเอ็นเอปริมาณ 1 พิโคกรัม ; lane 6 : ดีเอ็นเอปริมาณ 0.1 พิโคกรัม (B) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรจากวิธี PCR-ELISA



รูปที่ 3 ความไวของการตรวจสอบเชื้อ *B. bovis* ในเลือดโคโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย (A) วิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส lane 1: เชื้อ *B. bovis* จำนวน $1.4x10^{-3}$ % parasitemia; lane 2: เชื้อ *B. bovis* จำนวน $1.4x10^{-4}$ % parasitemia; lane 3: เชื้อ *B. bovis* จำนวน $1.4x10^{-5}$ % parasitemia; lane 4: เชื้อ *B. bovis* จำนวน $1.4x10^{-6}$ % parasitemia; lane 5: เชื้อ *B. bovis* จำนวน $1.4x10^{-7}$ % parasitemia; lane 6: เชื้อ *B. bovis* จำนวน 0 % parasitemia (B) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรจากวิธี PCR-ELISA

การตรวจสอบเชื้อ *B. bovis* ในเลือดโคทดลอง

นอกจากนี้ได้ทำการตรวจสอบการติดเชื้อ *B. bovis* ในโคทดลอง โดยทำการทดลองในลูกโคนมเพศผู้ ซึ่งถูกตรวจเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์และวิธี IFAT เพื่อยืนยันว่าไม่มีการติดเชื้อ *B. bovis* จากนั้นทำการตัดม้ามลูกโค และฉีดเชื้อ *B. bovis* แล้วเจาะเลือดเพื่อตรวจสอบหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และเทคนิค PCR-ELISA พร้อมทั้งวัดอุณหภูมิร่างกาย ผลปรากฏว่าก่อนฉีดเชื้อลูกโคมีอุณหภูมิร่างกายเท่ากับ 38.7 องศาเซลเซียส แต่หลังจากฉีดเชื้อแล้วอุณหภูมิร่างกายสูงขึ้นเป็นลำดับ และสูงที่สุดที่ 39.8 องศาเซลเซียสในวันที่ 10 หลังฉีดเชื้อซึ่งเป็นวันที่ลูกโคตายและมีปริมาณเชื้อสูงถึง 3 % parasitemia ซึ่งโดยทั่วไปจำนวนปาราสิตที่ทำให้เกิดอาการทางคลีนิคของโรคบาบีซีโอซีสคือ 0.01 ถึง 50 % parasitemia (McLaughlin et al., 1986) สำหรับการตรวจสอบเชื้อ *B. bovis* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA นั้นสามารถตรวจสอบการติดเชื้อในโคทดลองได้ตั้งแต่วันที่ 4 หลังการฉีดเชื้อในขณะที่การตรวจเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ ดังแสดงผลในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลของการตรวจสอบเชื้อ *B. bovis* ในเลือดโคทดลองโดยเทคนิค PCR-ELISA และการตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์

เวลา	PCR-ELISA	กล้องจุลทรรศน์
วันที่ฉีดเชื้อ	-	-
วันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ	-	-
วันที่ 4 หลังการฉีดเชื้อ	+	-
วันที่ 5 หลังการฉีดเชื้อ	+	-
วันที่ 6 หลังการฉีดเชื้อ	+	-
วันที่ 7 หลังการฉีดเชื้อ	-	-
วันที่ 10 หลังการฉีดเชื้อ	+	+

ปกติการติดเชื้อ *B. bovis* ในลูกโคที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปี มีอัตราต่ำ เนื่องจากมีภูมิต้านทานที่ได้รับจากแม่ ทำให้มีความต้านทานโรคดีกว่าสัตว์ที่อายุมาก (นิดารัตน์ ไพรคณะฮก และคณะ, 2543) ดังนั้นต้องทำการตัดม้ามลูกโคที่จะใช้ศึกษาการตรวจสอบเชื้อ *B. bovis* ในเลือดโคเนื่องจากม้ามเป็นแหล่งทำลายเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อปาราสิตอยู่ เมื่อทำการตัดม้ามของโคทดลองมีผลให้เชื้อเพิ่มจำนวนและทำให้โคเกิดอาการของโรคบาบีซิโอซีสเหมือนกับอาการของการติดเชื้อในธรรมชาติ จากการทดลองผลปรากฏว่าเทคนิค PCR-ELISA สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ PCR-ELISA ได้ตั้งแต่วันที่ 4 หลังฉีดเชื้อในขณะที่ยังไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับตัวอย่างเลือดในวันที่ 7 หลังการฉีดเชื้อไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ทั้งสองวิธี อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเชื้อจะลดต่ำลงกว่าระดับความไวของการตรวจสอบเพราะปริมาณเชื้อ *Babesia* sp.ในกระแสเลือดมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นๆลงๆ ตลอดเวลา แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเชื้อในกระแสเลือดจะไม่ลดต่ำลงเป็นเวลานาน (Mahoney et al., 1973)

การตรวจสอบการติดเชื้อ *B. bovis* ในเลือดตัวอย่าง

จากการตรวจสอบเลือดโคจำนวน 53 ตัวอย่าง จากแหล่งต่างๆ คือ จังหวัดบุรีรัมย์ สระบุรี กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สงขลา นราธิวาส และชลบุรี พบว่ามีเลือด 5 ตัวอย่าง (9.4 %) ที่ให้ผลบวก มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 0.09 และไม่มีเลือดตัวอย่างใดเลยที่ตรวจพบเชื้อ *B. bovis* โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงผลในตารางที่ 3 เหตุที่เลือดตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่างให้ผลบวกโดยเทคนิค PCR-ELISA แต่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อาจเนื่องจากระดับเชื้อในเลือดมีปริมาณต่ำมากจนไม่สามารถตรวจพบได้โดยกล้องจุลทรรศน์ เลือดตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับเทคนิค PCR-ELISA จำนวนสองตัวอย่างตรวจพบเชื้อ *B. bigemina* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ซึ่งอาจมาจากความผิดพลาดในการจำแนกชนิดของเชื้อ *B. bovis* และ *B. bigemina* ซึ่งทั้งเป็นสายพันธ์ที่พบการระบาดในโคกระบือ และมีลักษณะคล้ายกันมากซึ่งจากการศึกษาจะเห็นว่าการตรวจสอบการติดเชื้อ *B. bovis* โดยใช้ทคนิค PCR-ELISA นี้สามารถลดการเกิดผลลบปลอมของการตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์

ปริมาณเชื้อ *B. bovis* ในกระแสเลือดสัตว์ที่ติดเชื้อจะมีปริมาณค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อปริมาณเชื้อในกระแสเลือดมากขึ้นจะทำให้สัตว์มีอาการทางประสาท เช่น กัดฟัน น้ำลายไหล เดินวนหรือวิ่งชนสิ่งต่างๆ และตายในที่สุด เนื่องจากเม็ดเลือดแดงที่มี เชื้อ *B. bovis* อยู่จะไปอุดตันเส้นเลือดในสมอง (Wright et al., 1989) ดังนั้นการตรวจพบการติดเชื้อ *B. bovis* ได้ตั้งแต่ยังมีปริมาณเชื้อน้อยๆ จะทำให้รักษาสัตว์เหล่านี้ได้ทันท่วงที แต่มีสัตว์บางตัวที่ติดเชื้อแต่มีปริมาณของเชื้อไม่มากและไม่มีอาการทางคลินิก ทำให้กลายเป็นพาหะของโรคต่อไป ซึ่งเทคนิค PCR-ELISA นี้มีความไวของการตรวจสอบสูงคือ $1.4x10^{-6}$% parasitemia ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำกว่าระดับของเชื้อที่ทำให้สัตว์เป็นพาหะของโรคคือน้อยกว่า 0.001 % parasitemia (Reddy and Dame, 1992) ทั้งยังมีความไวของการตรวจสอบสูงกว่าการวิเคราะห์ดีเอ็นเอผลผลิตด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสถึง 100 เท่า และผู้ตรวจสอบ ยังไม่ต้องสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเลตซึ่งก่อให้เกิดมะเร็งหรือไม่ต้องสัมผัสกับสารที่ก่อให้เกิดการผ่าเหล่า เช่น ethidium bromide ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสโดยทั่วไป นอกจากนี้เทคนิค PCR-ELISA ยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจสอบเลือดตัวอย่างที่มีจำนวนมาก สามารถตรวจสอบได้มากถึง 96 ตัวอย่างในคราวเดียว ใช้เวลา ประมาณ 4 ชั่วโมง ในขณะที่การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อยู่ในปัจจุบันนั้นมีข้อจำกัดของเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ ผู้ที่ชำนาญสามารถตรวจได้เพียง 70-80 ตัวอย่างต่อวัน (Robert et al., 1992) และผู้ตรวจสอบต้องเป็นผู้ที่มีความชำนาญสูงได้รับการฝึกฝนมาอย่างดีเพื่อที่จะตรวจสอบได้ถูกต้องและแม่นยำ

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบเชื้อ *B. bovis* ในเลือดโคตัวอย่างจำนวน 53 ตัวอย่างที่เก็บในระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ.2542 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ.2543 โดยเทคนิค PCR-ELISA กับการตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลอง	จำนวนเลือดโคตัวอย่าง	
	กล้องจุลทรรศน์	PCR-ELISA
ผลลบ	53	48
ผลบวก	0	5 (4.9%)

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบเชื้อ *B. bovis* โดยเทคนิค PCR-ELISA ด้วยไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสมาจากยีน CPS II สามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอได้ต่ำถึง 0.1 พิโคกรัม และตรวจสอบปริมาณเชื้อ *B. bovis* ในเลือดโคในระดับ $1.4x10^{-6}$% parasitemia จากการตรวจสอบการติดเชื้อในเลือดตัวอย่างจำนวน 53 ตัวอย่าง พบว่ามี 5 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR-ELISA ในขณะที่ไม่มีเลือดตัวอย่างใดที่ตรวจพบเชื้อ *B. bovis* โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้เทคนิค PCR-ELISA สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ *B. bovis* ในโคทดลองได้เร็วกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

กิติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปีการศึกษา 2542 จากมหาวิทยาลัยบูรพา และผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายปาราสิตวิทยาสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลางบางเขน

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ในการตรวจสอบเลือดโคด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์และวิธี IFAT

เอกสารอ้างอิง

นิดารัตน์ ไพรคณะฮก เชาวฤทธิ์ บุญมาทิต และ นพพร สราธพันธุ์ 2543 สภาวะของโรคและการทำนายความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคไข้เห็บโคของโคนมในบางจังหวัดของประเทศไทย วารสารสัตวแพทย์ 1: 13-23

Barker, R.H., Banchongaksorn, T., Courval, J.M., Suwonkerd, W., Rimwungtragoon, K., Wirth, D.F. 1992. A simple method to detect Plasmodium falciparum directly from blood samples using the PCR. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46: 416-426.

Bishop, J.P.; and Adams, L.G. 1973. Combination thin and thick blood films for the detection of Babesia parasite. Am. J. Vet. Res. 34: 1213-1214.

Boonchit, S.; Xuan, X.; Yokoyama, N.; Goff, W.L.; Wagner, G.; and Igarashi, I. 2002. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant rhoptry-associated protein 1 antigen against *Babesia bovis* for the detection of specific antibodies in cattle. J. Clin. Microbiol. 40: 3771-3775.

Chansiri, K.; and Bagnara, A.S. 1995. The structural gene for carbamoyl phosphate synthetase from the protozoan parasite *Babesia bovis*. Mol. Biochem. Parasitol. 74: 239-243.

Chansiri, K.; Khuchareontaworn, S.; and Sarataphan, N. 2002. PCR-ELISA for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in animals and vector. Mol. Cell Probes.16: 173-177.

Fahrimal, Y.; Goff, W.L.; and Jasmer, D.P. 1992. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. J. Clin. Microbiol. 30: 1374-1379.

Gale, K.R.; Dimmock, C.M.; Gartside, M.; and Leatch, G. 1996 *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. Int. J. Parasit. 26: 1103-1109.

Kung'u, M.W.; and Goodger, B.V. 1990. A slide enzyme-linked immunosorbent assay (SELISA) for the diagnosis of Babesia bovis infections and for the screening of Babesia-specific monoclonal antibodies. Int. J. Parasitol. 20: 341-345.

Mahoney, D.F.; Wright, I.G.; and Mirre, G.B. 1973. *Bovine babesiosis*: the persistence of immunity of *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* in calves (Bos Taurus) after naturally acquired infections. Ann. Trop. Med. Parasitol. 67: 197-202.

Mahoney, D.F. 1979. *Babesia* of domestic animals. pp 1-43. In Kreir, J.P. (ed). Parasitic protozoa. Vol. 4. Academic Press, New York.

McLaughlin, G.L.; Edlind, T.D.; and Ihler, G.M. 1986. Detection of *Babesia bovis* using DNA hybridization. J. Protozool. 33:125-128.

Pinero, J.; Martinez, E.; Pacheco, R.; Aragon, Z.; Armas, F.D.; Castillo, A.D.; and Valladares, B. 1999. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. Acta Trop 73: 21-29.

Reddy, G.R.; and Dame, J.B. 1992. rRNA-based method for sensitive detection of *Babesia bigemina* in bovine blood. J. Clin. Microbiol. 30: 1811-1814.

Wright, I.G.; Goodger, B.V.; Buffington, G.D.; Clark, I.A.; Parrodi, F.; and Waltisbuhl, D.J. 1989. Immunopathophysiology of babesial infections. Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg. 83(Suppl 1): 11-13.

Wuyts, N.; Chokesajjawatee, N.; and Panyim, S. 1994. A simplified and highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* by DNA amplification. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 25: 266-271.

Young, A.S.; and Morzaria, S.P. 1986. Biological of Babesia. Parasitol Today. 2: 211- 219.