การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการของโรค canine monocytic ehrlichiosis

กัญจน์ แก้วมงคล[1,] และ ศราวรรณ แก้วมงคล[2]*
[1]ภาควิชาเวชศาสตร์คลีนิกสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900
[2]ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900
**E-mail: fvetgunn@ku.ac.th*

บทคัดย่อ

Ehrlichia canis เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในกลุ่มของ α-Proteobacteria ในลำดับ *Rickettsiales* ซึ่งก่อโรค canine monocytic ehrlichiosis (CME) โรคติดต่อจากเห็บที่ร้ายแรงที่สุดในสุนัขในประเทศไทย การตรวจในห้องปฏิบัติการสำหรับ CME โดยวิธีมาตรฐานสามชนิดหลักคือ การตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์จากสเมียร์เลือด การตรวจหาเชื้อโดย PCR จากตัวอย่างเลือด และการตรวจหา IgG ที่จำเพาะโดยชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ โดยชุดทดสอบเชิงพาณิชย์นั้นถูกใช้ในการปฏิบัติงานประจำของสัตวแพทย์ โดยมี IgG ที่จำเพาะต่อเชื้อ E. canis เป็นเป้าหมายหลักของการทดสอบทางภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามการมีแอนติบอดีต่ำในระยะแรกของการติดเชื้ออาจพบผลลบจากการทดสอบทางซีรั่มวิทยา ในทางกลับกันแอนติบอดีอาจขึ้นสูงยาวนานหลังจากการติดเชื้อมากถึง 6-12 เดือน ผลบวกบวกยาวนานนี้ทำให้การวินิจฉัย CME เกิดความสับสน ในการตรวจหาเชื้อโดย PCR ตัวอย่างหลักคือเลือดจากหลอดเลือดดำ จากรายงานก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่พบว่าตัวอย่างจากหลอดเลือดดำส่วนปลายมีความไวต่ำกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างจากม้ามและไขกระดูก ทั้งในโรคระยะเฉียบพลันและเรื้อรัง อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างจากอวัยวะภายในเหล่านี้มีข้อจำกัดที่สำคัญ เนื่องจากสุนัขที่ป่วยมักพบภาวะเลือดออกผิดปกติที่เกิดจากเกล็ดเลือดต่ำรุนแรง ดังนั้นยังคงจำเป็นต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมอีกมากเกี่ยวกับการวินิจฉัย CME ทางห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะจากนักวิจัยไทย

คำสำคัญ : ชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ แอนติบอดี ตัวอย่างจากอวัยวะ

Laboratory Diagnosis of Canine Monocytic Ehrlichiosis

Gunn Kaewmongkol[1,] and Sarawan Kaewmongkol[2]*

[1]*Department of Companion Animal Clinical Sciences Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, 10900*

[2]*Department of Veterinary Technology, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Bangkok 10900*

**E-mail: fvetgunn@ku.ac.th*

Abstract

Ehrlichia canis is a gram negative bacteria within the α-Proteobacteria group in the order *Rickettsiales*. This organism is a cause of canine monocytic ehrlichiosis (CME) which is the deadliest tick-borne disease in dogs in Thailand. Laboratory tests for CME are regularly performed with three standard protocols, including microscopic findings on thin blood smear, antigen detection by PCR with whole blood specimens, and specific IgG detection by commercial test kits. Recently, commercial test kits have been used in routine practices of veterinary medicine. Although specific IgG of E. canis in suspected dog's sera or whole blood is a primary target of those serological tests, low antibody titer at the early phase of infections could be the causes of negative results of these serological tests. Conversely, prolong antibody titers could occur after infections approximately 6 to 12 months. These prolong positive serological tests could confuse the diagnosis of CME. Based on the antigen detection by PCR techniques, a clinical specimen is still whole blood samples. Most previous reports demonstrated that whole blood collected from peripheral vein has lower sensitivity comparing with invasive sampling such as spleen and bone marrow samples in both acute and chronic cases. Those invasive sample collection methods increase the sensitivity of the PCR in the research field. However, the invasive sample collection methods for E. canis detection have limitations for routine work due to bleeding disorder caused by severe thrombocytopenia. Therefore, more researches of CME diagnosis are still needed, particularly from Thai researchers.

Keyword : Ehrlichia canis, canine monocytic ehrlichiosis (CME), commercial test kits, antibody titers, clinical specimens

บทนำ

ปัจจุบันการวินิจฉัยทางเซรุ่มวิทยาของโรค canine monocytic ehrlichiosis ได้แก่ IFAT ELISA และชุดทดสอบเชิงพาณิชย์สำเร็จรูป (Commercial test kit) ซึ่งชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในงานตรวจวินิจฉัยหา IgG ที่เฉพาะเจาะจงของ *E. canis* ในสุนัขที่สงสัยว่าติดเชื้อ โดยจะใช้ซีรั่มหรือเลือดเป็นเป้าหมายสำคัญของการทดสอบทางเซรุ่มวิทยา (Cardenas et al., 2007, Baneth et al., 2009, Moroff et al., 2014) จากรายงานการเปรียบเทียบระหว่างจำนวนสำเนาดีเอ็นเอของ *E. canis* และจลนพลศาสตร์ของการตอบสนองแอนติบอดี ได้แสดงให้เห็นในการทดลองการติดเชื้อจาก Baneth et al., 2009 จากการตรวจพบเชื้อโดย PCR แบบเรียลไทม์ ตรวจพบ ehrlichial DNA ทั้งในเลือดและม้ามในวันที่ 7-10 หลังการฉีดเชื้อ ตรวจพบ IgG ที่จำเพาะต่อ *E. canis* โดย ELISA ที่ระดับ cutoff เร็วที่สุดในวันที่ 12 หลังการฉีดเชื้อ สุนัขที่ติดเชื้อในการทดลองแสดงอาการทางคลินิกตั้งแต่วันที่ 9-12 หลังการฉีดเชื้อ (Baneth et al., 2009) จากข้อมูลเหล่านี้จากการติดเชื้อในการทดลองมีความเป็นไปได้สูงที่การทดสอบทางเซรุ่มวิทยาอาจให้ผลลบในสุนัข ในช่วงต้นที่เริ่มแสดงอาการทางคลินิกในกรณีการติดเชื้อตามธรรมชาติ

นอกจากนี้ Moroff et al 2014 ได้ทำการทดสอบการติดเชื้อในสุนัข 8 ตัว โดยใช้ชุดทดสอบเชิงพาณิชย์คือชุดตรวจ SNAP 4Dx^{R} มาใช้ในการทดลองที่มีเป้าหมายคือ IgG จำเพาะ ชุดทดสอบให้ผลลัพธ์ที่เป็นบวกในวันที่ 17 หลังการติดเชื้อในสุนัข 1 ตัวจากสุนัขทั้งหมดแปดตัว สุนัขสามตัวให้ผลบวกในวันที่ 28 หลังติดเชื้อและให้ผลบวกในสุนัขทั้งหมดแปดตัว ในวันที่ 42 หลังติดเชื้อ Cardenas et al., 2007 ผลิต ELISA ชนิดใหม่ตรวจจับ IgG เฉพาะสำหรับแอนติเจน gp36 ของ *E. canis* ซึ่งโปรตีนรีคอมบิแนนต์ใหม่นี้ไม่เคยใช้มาก่อน อย่างไรก็ตามในการทดลองการติดเชื้อด้วยชุดตรวจ ELISA ที่คิดค้นขึ้นมาใหม่นี้ สามารถตรวจพบ IgG ที่เฉพาะเจาะจงอย่างรวดเร็วที่สุดในวันที่ 14 หลังการติดเชื้อ (Cardenas et al., 2007) ยิ่งไปกว่านั้นยังมีประสิทธิภาพในการตอบสนองของแอนติบอดีต่อแอนติเจน recombinant ที่แตกต่างกันถึงห้าชนิด โดยทดลองในสุนัขที่ติดเชื้อสามตัว และระดับ IgG ยังคงอยู่ในระดับสูงจนถึงวันที่ 42 หลังการติดเชื้อ และการตอบสนองต่อแอนติบอดีที่ยาวนานในสุนัขที่ติดเชื้อ สามารถดำเนินต่อไปได้ตลอด 6-15 เดือนในบางรายงาน (Perille et al., 1991, Waner et al., 1997) จากรายงานหลายฉบับก่อนหน้านี้พบว่ามี IgG ที่จำเพาะสูงต่อ *E. canis* ที่คงอยู่ในระดับสูงยาวนานทำให้ชุดตรวจให้ผลบวกตลอด ทั้งในช่วงการติดเชื้อเฉียบพลัน ระยะการฟื้นตัว ติดเชื้อเรื้อรัง ทั้งการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ และแสดงอาการ จากผลเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงข้อเสียเปรียบอย่างใหญ่หลวง แม้ว่าการทดสอบทางซีรัมวิทยาสำหรับการวินิจฉัย CME นั้นสะดวก ผลลัพธ์ที่รวดเร็วมีความจำเพาะและราคาถูก แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญคือให้ผลบวกยาวนานถึงแม้สัตว์ป่วยหายจากโรคแล้วก็ตาม

การรายงานก่อนหน้านี้แสดงถึงความหลากหลายของจีโนไทป์ของเชื้อ *E. canis* ซึ่งเผยให้เห็นความแปรปรวนของแอนติเจนของเชื้อ E. canis แต่ละจีโนไทป์หรือ serotypes ที่สัมพันธ์กับภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน (antigenic variability related to geographically distribution of E. canis strains, genotypes or serotypes) (Zhang et al., 2008, Huang et al., 2010, Hsieh et al., 2010) การแทนที่กรดอะมิโนในแอนติเจนที่อาจเกี่ยวข้องกับการสร้างภูมิต้านทานของสุนัข ได้ถูกรายงานก่อนหน้านี้ว่ามีบทบาทสำคัญสำหรับการสร้างภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันจากโปรตีนแอนติเจนที่ต่างกัน โดยจะไปกระตุ้นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่างกัน เมื่อเทียบกับแอนติบอดีที่เหมือนกันกับตัวแอนติเจนของเชื้อในแต่ละสายพันธุ์ (different immunoreactivity of the protein with heterologous antisera compared with homologous antisera) (Zhang et al., 2008, Huang et al., 2010)

การตรวจหา DNA ของแบคทีเรียในตัวอย่างต่างๆนั้นแนะนำให้ใช้ในการวินิจฉัยโรค CME โดยเฉพาะในระยะเริ่มต้นของการแสดงอาการแบบเฉียบพลัน (Iqbal et al., 1994, Baneth et al., 2009, Waner et al., 2014, Nair et al., 2016) นอกจากนี้การติดเชื้อ E. canis ยืนยันโดย PCR ยังได้รับการแนะนำให้ทำในสุนัขที่การตรวจทางซีรุ่มวิทยาให้ผลบวก แต่เป็นสุนัขที่มีสุขภาพดี (healthy seropositive dogs) โดยวิเคราะห์ร่วมกับผลทางโลหิตวิทยา (Hegarty et al., 2009) อย่างไรก็ตามสุนัขที่ให้ผลบวกทางซีรั่มวิทยาต่อเชื้อ E. canis (seropositive) ในสุนัขที่เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำแต่ PCR ให้ผลลบนั้น (E. canis seropositive results in thrombocytopenic PCR-negative dogs) อาจเกิดจากจำนวนของเชื้อในหลอดเลือดดำส่วนปลายมีปริมาณต่ำกว่าความไวของ PCRs เหล่านั้น

ความไวของ PCR ที่เพิ่มขึ้นนั้นมีรายงานในการตรวจด้วยวิธี PCR กับชนิดตัวอย่างแบบไขกระดูกและม้าม ที่แสดงให้เห็นชัดเจนเฉพาะในระดับงานวิจัยเท่านั้น (Harrus et al., 1998, Baneth et al., 2009, Theodorou et al ., 2013) อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญเช่นความผิดปกติของเลือดที่มีการแข็งตัวผิดปกติที่เกิดจากภาวะเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง ได้ทำให้วิธีการเก็บตัวอย่างแบบรุกราน (Invasive collection techniques; spleen and bone marrow aspiration) ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุนัขป่วยเหล่านั้น และการดมยาสลบเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับเทคนิคการเก็บตัวอย่างเหล่านั้น เพื่อเพิ่มความไวของ PCR ก็ยิ่งเพิ่มความเสี่ยงในการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่วย

ภาพรวมของโรค CME

รายงานฉบับแรกของสุนัขที่ป่วยด้วยโรค ehrlichiosis ถูกตีพิมพ์ครั้งแรกในประเทศแอลจีเรียในปี 1935 (Donatien et al., 1935) จากนั้นมีรายงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับโรคนี้ในภูมิภาคอื่น ๆ เช่นแอฟริกา ตะวันออกกลาง อเมริกาและเอเชีย (Ewing, 1963, 1969, Greene, 1990) เห็บ Rhipicephalus sanguineus เป็นสัตว์พาหะที่สำคัญของแบคทีเรียลบแกรมภายในกลุ่ม α-Proteobacteria ตามลำดับ Rickettsiales ความจำเพาะของสัตว์พาหะกับตัวเชื้อและสัตว์เจ้าบ้าน ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นกุญแจสำคัญสำหรับการกระจายโรคในประชากรสุนัขในแต่ละภูมิภาค (Moraes-Filhoet al., 2015) เทคนิค PCR ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีทดสอบที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงสำหรับระยะแรกของโรค ehrlichiosis แบบเฉียบพลัน Ehrlichia canis เป็นสาเหตุสำคัญของโรค canine monocytic ehrlichiosis (CME) ในภูมิภาค ซึ่งเป็นโรคที่แสดงอาการทางระบบหลายอย่างร่วมกัน และรวมถึงความผิดปกติทางโลหิตวิทยา ระบบทางเดินหายใจ ตา หรือระบบประสาทที่มีความผิดปกติ (de Castro et al., 2004) ภาวะเกล็ดเลือดต่ำและจำนวนเกล็ดเลือดถูกใช้เป็นเครื่องหมายทางโลหิตวิทยาที่สำคัญสำหรับการวินิจฉัยโรค CME (de Castro et al., 2004, Bulla et al., 2004)

ข้อมูลทางคลินิกของโรค ehrlichiosis ในสุนัขที่สำคัญในประเทศไทย

กลไกต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดภาวะโลหิตจางจากโรค canine monocytic ehrlichiosis ในระยะเฉียบพลันได้รับการอธิบาย โดยพบว่า CME ก่อให้เกิดภาวะโลหิตจางเพียงเล็กน้อยถึงปานกลาง และกลไกของความผิดปกติทางโลหิตวิทยานี้เรียกว่า “โรคโลหิตจางจากการอักเสบ”(anemia of inflammatory disease) (Waner et al., 2000) Normochromic, normocytic และ non-regenerative anemia เป็นเรื่องที่เกิดขึ้นได้บ่อยใน CME แบบเฉียบพลัน (Waner et al., 2000) ในระยะเรื้อรังของ CME มีรายงานการลดลงของ hemosiderin deposition ในไขกระดูกซึ่งมักจะเป็นหลักฐานของการขาดธาตุเหล็กและภาวะนี้เกิดจากการสูญเสียเลือดแบบช้าๆและต่อเนื่องที่พบใน CME แบบเรื้อรัง (Mylonakis et al., 2010) ผลของความผิดปกติที่ไขกระดูกควรจะเป็นทั้งภาวะโลหิตจางร่วมกับภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ซึ่งตรงกันข้ามกับการศึกษาในประเทศไทย (Kaewmongkol et al., 2017) ที่พบว่าการติดเชื้อ

E. canis สัมพันธ์กับภาวะโลหิตจางรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลับพบว่าความรุนแรงของภาวะเกล็ดเลือดต่ำที่แตกต่างกันนั้นไม่สัมพันธ์กับการติดเชื้อ E. canis (Kaewmongkol et al., 2017) แม้ว่าจำนวนเกล็ดเลือดเฉลี่ยในสุนัขที่ติดเชื้อ E. canis จะต่ำกว่าช่วงอ้างอิง (150,000-200,000 เซลล์ / µl) และต่ำกว่าสุนัขที่ไม่ได้ติดเชื้อ แต่กลับไม่มีความแตกต่างทางสถิติในการนับจำนวนเกล็ดเลือดระหว่างสุนัขที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ อย่างไรก็ตาม ภาวะเกล็ดเลือดต่ำนั้นเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปในการติดเชื้อ E. canis ว่ายังคงเป็นเครื่องหมายทางโลหิตวิทยาที่มีประโยชน์สำหรับการวินิจฉัยโรค CME ผลจากรายงานฉบับนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่สรุปว่า ภาวะเกล็ดเลือดต่ำเป็นภาวะผิดปกติทางโลหิตวิทยาที่สำคัญที่พบในทุกระยะของ CME (Harrus et al., 1999, de Castro et al., 2004, Bulla et al., 2004) แม้ว่าสาเหตุต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดโลหิตจางอาจเป็นการติดเชื้ออื่นๆ การรักษาด้วยยาบางชนิด สารพิษ หรือการฉายรังสีอาจนำไปสู่ภาวะโลหิตจางรุนแรงในสุนัขได้ แต่ผลการศึกษาในประเทศไทยชี้ให้เห็นว่าสุนัขที่มี PCV <15% ควรได้รับการทดสอบเฉพาะสำหรับการติดเชื้อ *E. canis*

กลไกที่พิจารณาว่าเชื่อมโยงกับโรคโลหิตจางโดยแบคทีเรียที่มีเห็บเป็นพาหะนำโรคในสุนัข ได้แก่ การกดไขกระดูกและภาวะโลหิตจาง hemolytic ที่เกิดจากการทำลายของภูมิคุ้มกันที่บกพร่อง (De Tommasi et al., 2014) มีรายงานกรณีที่ก่อโรคแบบซับซ้อนของ ehrlichiosis ในประเทศไทย (Kaewmongkol et al., 2016) กรณีอาการทางคลินิกของ meningoencephalitis โดยไม่พบภาวะเกล็ดเลือดต่ำ สุนัขได้รับการวินิจฉัยเบื้องต้นว่าเป็น meningoencephalitis โดยยังไม่ทราบชนิดของเชื้อสาเหตุ DNA ของเชื้อ E. canis ถูกตรวจพบในน้ำไขสันหลังโดยใช้วิธี PCR แสดงให้เห็นว่า PCR แบบดั้งเดิม และPCR แบบเรียลไทม์เชิงปริมาณที่ออกแบบมาจำเพาะสำหรับสายพันธ์เชื้อ E. canis ท้องถิ่นนั้นจำเป็นเป็นอย่างยิ่งสำหรับทั้งการวิจัยและการปฏิบัติตรวจวินิจฉัยทางคลินิกตามปกติ

ความสำคัญของ PCR แบบดั้งเดิมและ PCR แบบเรียลไทม์

เป็นเวลาหลายสิบปีที่มีการคิดค้นวิธีการ PCR ที่หลากหลายซึ่ง PCR เหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็นสองประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่ การอ่านผลที่จุดสิ้นสุดของปฏิกิริยาหรือ PCR แบบดั้งเดิม และ PCR แบบเรียลไทม์ (McBride และคณะ, 1996, Doyle และคณะ, 2005, Marsilio ., 2006, Vinasco et al., 2007, Peleg et al., 2009, Nakaghi et al., 2010, Michelet และคณะ, 2014, Thomson et al., 2018) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 PCR Primer ที่มีการรายงาน ขนาดผลิตภัณฑ์และวิธีการอ่านผล

Primer name	Target gene	Primer sequence (5′–3′)	Product size (bp)	Detection method	Reference
ECp28-F	p28	ATGAATTGCAAAAAAATTCTTATA	843	Gel electrophoresis	Nakaghi et al., 2010
ECp28-R		TTAGAAGTTAAATCTTCCTCC			
CANIS	16S	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA	413	Gel electrophoresis	Vinasco et al., 2007
GA1UR		GAGTTTGCCGGGACTTCTTCT			
16S-fwd	16S	TCGCTATTAGATGAGCCTACGT	125	qPCR-SYBR	Peleg et al., 2009
16S-rev		GAGTCTGGACCGTATCTCAGT			
EC1	16S	TTATAGCCTCTGGCTATAGG	501	Chemiluminescence	McBride et al., 1996
EC2		CACTTTTAACTTACTAGTCC			
DSB-321	Dsb	TTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA	350	TaqMan	Doyle et al., 2005
DSB-E.canis		AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA			
DSB-671		GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA			
Eh_ca_dsb_F	Dsb	AATACTTGGTGAGTCTTCACTCA	110	TaqMan	Michelet et al., 2014
Eh_ca_dsb_R		GTTGCTTGTAATGTAGTGCTGC			
Eh_ca_dsb_P		AAGTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTAC			
ECF	gltA	CAGGAGTATATGCCTCCTGA	509	Gel electrophoresis	Marsilio et al., 2006
ECR		GTTACTTGGTTTTTCAATTGCC			
gltA-For		TAG CAA CTT TAT GGG GGC CA	146	TaqMan	Thomson et al., 2018
gltA-Rev		TGA CCA AAA CCC ATT AGC CTC			
gltA-Probe		FAM-5′-AGT AAC GTA AAG CAG TTT ATT CAA-BHQ1-3′			

การอ่านผล PCR ที่จุดสิ้นสุดของปฏิกิริยา ต้องมีขั้นตอนเพิ่มคือการอ่านผลลัพธ์โดย agarose gel electrophoresis วิธี PCR แบบเรียลไทม์ขึ้นอยู่กับแทรกตัวของสารที่เปล่งแสง (intercalating dyes) ซึ่งสามารถอ่านผลได้ในตลอดวงรอบการเพิ่มจำนวน DNA ทั้งหมด ยิ่งไปกว่านั้นการใช้ probe-based assays สามารถเพิ่มความจำเพาะของการทดสอบให้มากขึ้น (Heid et al., 1996) การเปรียบเทียบระหว่าง PCR ดั้งเดิม และ PCR แบบเรียลไทม์ได้ถูกกล่าวถึงและยอมรับว่า PCR ทั้งสองนี้ได้ถูกนำไปใช้ในวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน (Thomson et al., 2018) แม้ว่ามีการชี้ให้เห็นข้อจำกัด PCR ดั้งเดิมหลายประการ แต่การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการของ CME โดย PCR นี้ยังคงใช้กันทั่วไป จนถือเป็นเครื่องมือตรวจวินิจฉัยตามปกติ การศึกษาวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในจีโนไทป์ท้องถิ่นของไทยนั้นได้รับการรายงานตลอดในช่วงสิบปีที่ผ่านมา (Pinyoowong et al., 2008,

Foongladda et al., 2011, Jirapattharasate et al., 2012, Kaewmongkol et al., 2016, 2017, Nambooppha et al., 2018) ซึ่งการศึกษาทางพันธุกรรมในประเทศไทยได้แสดงให้เห็นว่าการศึกษาทางพันธุกรรมยังต้องพึ่งพาการใช้ PCR แบบดั้งเดิม พร้อมการถอดรหัสพันธุกรรมแบบเดิมก่อนจึงจะสามารถทำการวิจัยต่อยอดขั้นสูงเพิ่มเติมต่อไปได้

Farias Rotondano et al., 2012 ทำการประเมินเปรียบเทียบผลการตรวจ PCR จากตัวอย่าง whole blood และ blood fractions อื่นๆ เพื่อใช้ในการเลือกตัวอย่างเลือดที่ดีที่สุดสำหรับการวินิจฉัย PCR ของ CME (Farias Rotondano et al., 2012) อย่างไรก็ตาม PCR แบบดั้งเดิมที่ใช้ สามารถวัดผลเชิงคุณภาพที่ในการศึกษาเท่านั้น คือให้ผลบวกหรือลบ การทำการวัดเชิงปริมาณโดยใช้ PCR แบบเรียลไทม์สำหรับการประเมินจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างเหล่านั้น จะมีประโยชน์เพิ่มขึ้นในการบอกชนิดตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อสูงสุด อีกทั้งการวัดปริมาณเชื้อโดย PCR แบบเรียลไทม์ ยังสามารถใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆที่ใช้สำหรับการรักษา CME เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบันได้อีกด้วย (Theodorou et al., 2013)

บทสรุป

อย่างไรก็ตามแม้จะนับเวลาตั้งแต่ช่วงสงครามเวียดนามจนถึงปัจจุบัน จะผ่านพ้นมาแล้วถึง 60 ปี แต่เมื่อทำการสืบค้นงานวิจัยจากฐานข้อมูล PubMed (ค้นเมื่อวันที่ 21 ก.ค. 62) จากงานวิจัยเกี่ยวกับ Ehrlichia canis ทั้งหมด 1,047 ชิ้น เมื่อใช้คำค้นว่า Ehrlichia canis และ Thailand กลับพบงานตีพิมพ์เพียง 21 ชิ้น โดยเป็นงานวิจัยจากนักวิจัยในประเทศไทย 17 ผลงาน ซึ่งสองในสิบเจ็ดผลงานตีพิมพ์เป็นของตัวผู้วิจัยเอง (Kaewmongkol et al., 2016, 2017) ปัจจุบันองค์ความรู้หลักที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย และรักษาโรคติดเชื้อชนิดนี้ จึงเป็นข้อมูลจากต่างประเทศเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งยังมีคำถามและปัญหาต่อสัตวแพทย์ในประเทศไทยเกี่ยวกับโรคนี้อีกมากที่ยังรอคำตอบ ซึ่งจำเป็นต้องพึ่งพางานวิจัยจากในประเทศไทยเอง เนื่องจากยังไม่มีรายงานติดต่อสู่มนุษย์ในประเทศไทย จึงมีความเป็นไปได้น้อยมากที่จะได้รับทุนสนับสนุนจากรัฐบาล อีกทั้งเป็นโรคในสัตว์เลี้ยง จึงไม่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยได้มากเท่ากับโรคในสัตว์เศรษฐกิจ จึงจำเป็นที่จะต้องได้รับการสนับสนุนจากองค์กรภายในมหาวิทยาลัย เพื่อเพิ่มองค์ความรู้ และพัฒนาศักยภาพการตรวจวินิจฉัยโรคในสัตว์เลี้ยง เพื่อนำไปสู่ความเป็นเลิศในสาขาสัตวแพทย์

เอกสารอ้างอิง

Baneth, G., Harrus, S., Ohnona, F.S., Schlesinger, Y. 2009. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. Vet Micro. 136: 321-325.

Bulla, C., Kiomi Takahira, R., Pessoa Araujo, Jr., AparecidaTrinca, L., Souza Lopes, R., Wiedmeyer, C.E. 2004. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. Vet Res. 35: 141-146.

Cardenas, A.M., Doyle, C.K., Zhang, X., Nethery, K., Corstvet, R.E., Walker, D.H., McBride, J.W. 2007. Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. Clin Vaccine Immunol 14: 123-128.

Donatien, A., Lestoquard, F.1935. Existence en Alg6rie d'une Rickettsia du chien. Bull. Soc. Pathol. Exot. 28: 418-419.

de Castro, M.B., Machado, R.Z., de Aquino, L.P., Alessi, A.C., Costa, M.T. 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. Vet Parasitol 119: 73-86.

Doyle, C.K., Labruna, M.B., Breitschwerdt, E.B., Tang, Y.W., Corstvet, R.E., Hegarty, B.C., Bloch, K.C., Li, P., Walker, D.H., McBride, J.W. 2005. Detection of medically important Ehrlichia by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. J Mol Diagn 7: 504-510.

Ewing, S. A. 1963. Observations on leukocytic inclusion bodies from dogs infected with *Babesia canis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 143:503-506.

Ewing, S. A. 1969. Canine ehrlichiosis. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 13: 331-354.

Foongladda, S., Inthawong, D., Kositanont, U., Gaywee, J. 2011. Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, and Bartonella in ticks and fleas from dogs and cats in Bangkok. Vector Borne Zoonotic Dis. 11: 1335-1341.

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. J Clin Microbiol. 36: 73-76.

Hegarty, B.C., de Paiva Diniz, P.P., Bradley, J.M., Lorentzen, L., Breitschwerdt, E. 2009. Clinical relevance of annual screening using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (SNAP 3Dx) for canine ehrlichiosis. J Am Anim Hosp Assoc. 45: 118-124.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6: 986-994.

Hsieh, Y.C., Lee, C.C., Tsang, C.L., Chung, Y.T. 2010. Detection and characterization of four novel genotypes of Ehrlichia canis from dogs. Vet Microbiol. 146: 70-75.

Huang, C.C., Hsieh, Y.C., Tsang, C.L., Chung, Y.T. 2010. Sequence and phylogenetic analysis of the gp200 protein of Ehrlichia canis from dogs in Taiwan. J Vet Sci. 11: 333-340.

Lqbal, Z., Chaichanasiriwithaya, W., Rikihisa, Y. 1994. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 32: 1658-1662.

Jirapattharasate, C., Chatsiriwech, J., Suksai, P., Changbunjong, T., Rawangchue, T., Moonarmart, W., Sungpradit, S., 2012. Identification of Ehrlichia spp. in canines in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 43: 964-968.

Moraes-FilhoJ, Krawczak FS, Costa FB, Soares JF, Labruna MB (2015) Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the Rhipicephalus sanguineus Group for the Bacterium Ehrlichia canis, the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. PLoS ONE10 (9):e0139386.doi:10.1371/journal. pone.0139386

Kaewmongkol, G., Lukkana, N., Yangtara, S., Kaewmongkol, S., Thengchaisri, N., Sirinarumitr, T., Jittapalapong, S., Fenwick, S.G. 2017. Association of Ehrlichia canis, Hemotropic Mycoplasma spp. and Anaplasma platys and severe anemia in dogs in Thailand. Vet Microbiol. 201: 195-200.

Kaewmongkol, G., Maneesaay, P., Suwanna, N, et al. 2016. First Detection of Ehrlichia canis in Cerebrospinal Fluid From a Nonthrombocytopenic Dog with Meningoencephalitis By Broad-Range PCR. J Vet Intern Med. 30: 255-259.

Marsilio, F., Di Martino, B., Meridiani, I., Bianciardi, P. 2006. Direct identification of Ehrlichia canis by a novel polymerase chain reaction method and molecular analysis of the citrate synthase (gltA) gene from various Italian strains. J Vet Diagn Invest. 18: 215-217.

McBride, J.W., Corstvet, R.E., Gaunt, S.D., Chinsangaram, J., Akita, G.Y., Osburn, B.I. 1996. PCR detection of acute Ehrlichia canis infection in dogs. J Vet Diagn Invest. 8: 441-447.

Michelet, L., Delannoy, S., Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M., Chirico, J., van der Wal, F.J., Sprong, H., Boye Pihl, T.P., Klitgaard, K., Bodker, R., Fach, P., Moutailler, S. 2014 High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. Front Cell Infect Microbiol. 4: 103.

Moroff, S., Sokolchik, I., Woodring, T., Woodruff, C., Atkinson, B., Lappin, M.R. 2014. Use of an automated system for detection of canine serum antibodies against Ehrlichia canisglycoprotein 36. J Vet Diagn Invest. 26: 558-562.

Mylonakis, M.E., Day, M.J., Siarkou, V., Vernau, W., Koutinas, A.F. 2010. Absence of myelofibrosis in dogs with myelosuppression induced by Ehrlichia canis infection. J Comp Pathol. 142: 328-331.

Nair, A.D., Cheng, C., Ganta, C.K., Sanderson, M.W., Alleman, A.R., Munderloh, U.G., Ganta, R.R. 2016. Comparative Experimental Infection Study in Dogs with Ehrlichia canis, E. chaffeensis, Anaplasma platys and A. phagocytophilum. PLoS One. 11: e0148239.

Nakaghi, A.C., Machado, R.Z., Ferro, J.A., Labruna, M.B., Chryssafidis, A.L., Andre, M.R., Baldani, C.D. 2010. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using Ehrlichia canis p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. Rev Bras Parasitol Vet. 19: 75-79.

Nambooppha, B., Rittipornlertrak, A., Tattiyapong, M., Tangtrongsup, S., Tiwananthagorn, S., Chung, Y.T., Sthitmatee, N. 2018. Two different genogroups of Ehrlichia canis from dogs in Thailand using immunodominant protein genes. Infect Genet Evol. 63: 116-125.

Peleg, O., Baneth, G., Eyal, O., Inbar, J., Harrus, S. 2009. Use of chimeric DNA-RNA primers in quantitative PCR for detection of Ehrlichia canis and Babesia canis. Appl Environ Microbiol. 75: 6393-6398.

Perille, A.L., Matus, R.E. 1991. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. J Vet Intern Med. 5: 195-198.

Pinyoowong, D., Jittapalapong, S., Suksawat, F., Stich, R.W., Thamchaipenet, A. 2008. Molecular characterization of Thai Ehrlichia canis and Anaplasma platys strains detected in dogs. Infect Genet Evol. 8: 433-438.

Rotondano, T.E., de Almeida, A.M., Lustosa, E.M., Cordeiro, A.A., Camboim, E.K., de Azevedo, S.S., de Andrade, P.P., de Melo, M.A. 2012. An assessment of whole blood and fractions by nested PCR as a DNA source for diagnosing canine ehrlichiosis and anaplasmosis. Scientific World Journal. 605743.

Theodorou, K., Mylonakis, M.E., Siarkou, V.I., Leontides, L., Koutinas, A.F., Koutinas, C.K., Kritsepi-Konstantinou, M., Batzias, G., Flouraki, E., Eyal, O., Kontos, V., Harrus, S. 2013. Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. J Antimicrob Chemother. 68: 1619-1626.

Thomson, K., Yaaran, T., Belshaw, A., Curson, L., Tisi, L., Maurice, S., Kiddle, G. 2018. A new TaqMan method for the reliable diagnosis of Ehrlichia spp. in canine whole blood. Parasit Vectors. 11: 350.