



การตรวจหาความชุกของการติดเชื้อ *Toxoplasma gondii* ในโคนมและสุกร
ของจังหวัดเชียงราย โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

และ LATEX AGGLUTINATION TEST

PREVALENCE OF *Toxoplasma gondii* INFECTION IN DAIRY COWS AND
SWINES OF CHIANG RAI PROVINCE BY POLYMERASE CHAIN
REACTION AND LATEX AGGLUTINATION TEST

ไชนันรัตน์ สุนันตะ

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การตรวจหาความชุกของการติดเชื้อ *Toxoplasma gondii* ในโคนมและสุกร
ของจังหวัดเชียงราย โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

และ LATEX AGGLUTINATION TEST

PREVALENCE OF *Toxoplasma gondii* INFECTION IN DAIRY COWS AND
SWINES OF CHIANG RAI PROVINCE BY POLYMERASE CHAIN
REACTION AND LATEX AGGLUTINATION TEST

ไชยนิรันดร์ สุนันตะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การตรวจหาความชุกของการติดเชื้อ *Toxoplasma gondii* ในโคนมและสุกร
ของจังหวัดเชียงราย โดยเทคนิคปฏิกิริยาแล็กโซโพลีเมอเรส
และ LATEX AGGLUTINATION TEST

ไชยนิรันดร์ สุนันตะ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
2552

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน

(ดร. พนม วิญญายอง)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. สถาพร จิตตपालพงศ์)

.....กรรมการ

(ดร. ประภัศสร ดำรงกุล อึ้งวณิชยพันธ์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ยุทธนา สมิตะสิริ)

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือจาก รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สถาพร จิตตपालพงศ์ หัวหน้าภาควิชาปรสิตวิทยา และอาจารย์เทวินทร์ อินปันแก้ว และเจ้าหน้าที่ทุกคน ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อาจารย์ ดร.ประภัสสร คำรงกุล อึ้งวนิชยพันธ์ และรองศาสตราจารย์ ยุทธนา สมิตะสิริ และคณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงทุกท่าน ผู้ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจแก้ไขจนวิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณท่านนายสัตวแพทย์ศักดิ์ชัย ศรีบุญเชื้อ รองปลัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และนายวิทยา จินตนาวัฒน์ ปศุสัตว์จังหวัดเชียงราย ที่ได้ให้โอกาสในการศึกษาความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงแก่ผู้เขียน และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ ที่เกี่ยวข้องที่ข้าพเจ้าได้รับความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่าง ตลอดจนข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดี ทั้งกำลังใจจากเพื่อนร่วมงานและเพื่อนร่วมรุ่นทุกท่าน

ขอขอบพระคุณสำหรับกำลังใจที่ยิ่งใหญ่ ความสนับสนุน ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านจากคุณแม่ป๊อด สุนันต์๊ะ และสมาชิกครอบครัวคุณแพรวพรรณ สุนันต์๊ะ (ภรรยา) และลูกทั้งสองน้องแมงปอ (ด.ญ.บุญยาพร สุนันต์๊ะ) น้องดันปาล์ม (ด.ช.ธนดล สุนันต์๊ะ) คุณพ่อสิน คุณแม่บุญแทน มณีทิพย์ ตลอดจนคุณพ่อเหรียญ สุนันต์๊ะ (ผู้ล่วงลับ) ที่คอยเป็นแรงใจในการศึกษาครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วง และทุกแรงใจที่ผลักดันให้วิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์

ท้ายที่สุดนี้ ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลของการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรและผู้ที่เกี่ยวข้องทั่วไป หากมีสิ่งผิดพลาดหรือข้อบกพร่องประการใด ผู้เขียนขอน้อมรับและขอภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ไชยนิรันดร์ สุนันต์๊ะ

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การตรวจหาความชุกของการติดเชื้อ *Toxoplasma gondii*
ในโคนมและสุกรของจังหวัดเชียงรายโดยเทคนิคปฏิกิริยา
ลูกโซ่โพลิเมอร์ และ LATEX AGGLUTINATION TEST

ชื่อผู้เขียน

ไชยนิรันดร์ สุนันตะ

หลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. สถาพร จิตตपालพงศ์
ดร. ประภัสสร คำรงกุล อึ้งวนิชพันธ์
รองศาสตราจารย์ยุทธนา สมิตะสิริ

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์ในการวิจัยตรวจหาความชุกของแอนติบอดี เพื่อหาการแพร่กระจายของเชื้อโปรโตซัว *Toxoplasma gondii* ในโคนมและสุกร ในเขตจังหวัดเชียงรายเพื่อประเมินสถานการณ์ของโรค Toxoplasmosis ที่เป็นโรคสัตว์คู่คนที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุข ในจังหวัดเชียงราย วิธีการวิจัยโดยเก็บตัวอย่างเลือดของโคนม 462 ตัวอย่าง และของสุกร จำนวน 150 ตัวอย่าง ใน 9 อำเภอของจังหวัดเชียงราย ตรวจด้วยเทคนิค LATEX AGGLUTINATION TEST (LAT) และเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction -PCR) ผลการศึกษาพบว่าในโคนม ให้ผลบวกต่อ LAT คิดเป็นร้อยละ 9.1 (42/462) ขณะที่การตรวจโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์ ให้ผลลบทั้งหมด ในตัวอย่างเลือดสุกร ซึ่งตรวจโดยวิธี LAT ให้ผลบวกต่อเชื้อ *T. gondii* ร้อยละ 12.7 (19/150) และการตรวจโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์ ให้ผลลบทั้งหมด

สำหรับพื้นที่ที่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกในโคนม พบว่าเขตอำเภอแม่จัน มีความชุกสูงสุดที่ร้อยละ 20 และเขตที่ตรวจไม่พบ ได้แก่อำเภอแม่ลาวและอำเภอพญาเม็งราย โดยเมื่อคิดเป็นการติดเชื้อ *T. gondii* ทั้งหมดของสุกรในจังหวัดเชียงราย พบว่า เขตอำเภอแม่จัน มีความชุกสูงสุดร้อยละ 21.7 (18/83) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อ *T. gondii* ในโคนมและสุกรใน

จังหวัดเชียงราย ซึ่งที่อาจมีผลกระทบต่อสุขภาพของคนในพื้นที่ เนื่องจากสัตว์ทั้ง 2 ชนิด เป็นสัตว์ที่นิยมใช้เนื้อเป็นอาหาร

คำสำคัญ: *Toxoplasma gondii* / PCR / Latex Agglutination Test / โคนม / เชียงราย



Thesis Title	Prevalence of <i>Toxoplasma gondii</i> Infection in Dairy Cows and Swines of Chiang Rai Province by Polymerase Chain Reaction and Latex Agglutination Test
Author	Chainirun Sunanta
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Supervisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Sathaporn Jittapalapong Dr. Prapassorn Damrongkool Eungwanichayapant Assoc. Prof. Yuthana Smitasiri

ABSTRACT

The objective of this thesis was to determine the seroprevalence and distribution of *Toxoplasma gondii* infection in dairy cows and swines in Chiang Rai province. Toxoplasmosis is the important zoonosis in Thailand since this disease has an impact on public health. This study was done by collecting 462 dairy cows and 150 pig blood samples from 9 districts of Chiang Rai province. The blood samples were tested by Latex agglutination test (LAT) and polymerase chain reaction (PCR). In dairy cows, 9.1% (42/462) were found positives by LAT. In swine, 12.7% (19/150) were seropositives. None of these samples were found positives by PCR.

Mae Chan district had the highest prevalence (20%) in dairy cows while Mae Lao and Phraya Meng Rai district had all negatives. In pigs, Mae Chan had the highest number of positives (21.7%, 18/83). Chiang Rai was endemic for *T. gondii* infection since most district was *T. gondii*'s seropositive. This result indicated that *T. gondii* infection among food animals might have an effect on human health in Chiang Rai.

Keywords: *Toxoplasma gondii* / PCR / Latex Agglutination Test / Dairy cows / Chiang Rai

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(3)
บทคัดย่อภาษาไทย	(4)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(6)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 หลักการและเหตุผล	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ประวัติและถิ่นที่พบ	5
2.2 การจัดหมวดหมู่	5
2.3 รูปร่างลักษณะทางชีววิทยา	5
2.4 วงจรชีวิต	6
2.5 การก่อโรค	8
2.6 การติดต่อของโรค	9
2.7 การตรวจวินิจฉัยโรค Toxoplasmosis	10
2.8 การศึกษาโรค Toxoplasmosis ในประเทศไทย	14
2.9 ความหมายของความชุก (prevalence)	18

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่	
3 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและวิธีการ	21
3.1 ตัวอย่างสัตว์	21
3.2 วิธีการทดลอง	21
3.3 Latex Agglutination Test	22
3.4 การสกัด DNA	23
3.5 การเตรียม D – solution	24
3.6 การเพิ่มชิ้น DNA ของ genomic DNA โดย PCR	25
3.7 Gel electrophoresis	26
4 ผลและวิจารณ์การทดลอง	27
4.1 ผลการตรวจซีรัมจากเลือดโคนมและสุกร	27
4.2 ผลของการสกัด genomic DNA	30
4.3 ผลของการทำ PCR	34
4.4 การเปรียบเทียบผลของการตรวจโดยวิธี LAT และวิธี PCR	39
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	41
5.1 สรุปผลการทดลอง	41
5.2 ข้อเสนอแนะ	42
รายการอ้างอิง	43

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่	
ภาคผนวก	51
ภาคผนวก ก แบบสอบถามและเก็บตัวอย่าง	52
ภาคผนวก ข ผลงานวิจัยที่นำเสนอของผู้วิจัย	56
ประวัติผู้เขียน	64



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 การศึกษาเกี่ยวกับโรค Toxoplasmosis ในประเทศไทย	15
4.1 ผลการตรวจหาเชื้อ <i>T. gondii</i> ในโคนมโดยวิธี LAT	28
4.2 ผลการตรวจหาเชื้อ <i>T. gondii</i> ในสุกรโดยวิธี LAT	29
4.3 ผลการตรวจหาเชื้อ <i>T. gondii</i> ในโคนมโดยวิธี PCR	38
4.4 ผล การตรวจหาเชื้อ <i>T. gondii</i> ในสุกรโดยวิธี PCR	38
4.5 ผลการเปรียบเทียบผลการตรวจโดยวิธี LAT กับ PCR โคนม	39
4.6 ผลการเปรียบเทียบผลการตรวจโดยวิธี LATกับ PCR สุกร	40



สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 ลักษณะเชื้อ <i>T. gondii</i> ที่อยู่ภายนอกเซลล์ และอยู่ภายในเซลล์ macrophage	6
2.2 วงจรชีวิตของเชื้อ <i>T. gondii</i> ในแมว	7
2.3 วงจรชีวิตของเชื้อ <i>T. gondii</i>	9
2.4 การติดต่อของเชื้อ <i>T. gondii</i> จากแม่สู่ลูกขณะตั้งครรภ์ ทำให้เกิดพยาธิสภาพในลูกที่คลอดออกมา (Hydrocephalus)	10
2.5 ลักษณะการเกิด agglutination ในเทคนิค LAT	13
2.6 การอ่านผลของการจับตัวกันของ latex particle เกิด agglutination ในแต่ละระดับ	13
3.1 แผนผังแสดงขั้นตอนการดำเนินการทดลอง	22
3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>T. gondii</i> ขนาด 529 bp ที่ได้จากการทำ PCR	25
4.1 ผลให้เกิดการเกิด agglutinate ในแต่ละระดับโดยวิธี LAT	27
4.2 ผลการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดโคนม	30
4.3 ผลการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดโคนม	31
4.4 ผลการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดสุกร	32
4.5 ผลการตรวจ genomic DNA ที่สกัดได้จากเลือดสุกร	33
4.6 แสดงผลการตรวจ DNA จากตัวอย่างเลือดโคนมด้วยเทคนิค PCR	34
4.7 แสดงผลการตรวจ DNA จากตัวอย่างเลือดโคนมด้วยเทคนิค PCR	35
4.8 แสดงผลการตรวจ DNA จากตัวอย่างเลือดสุกรด้วยเทคนิค PCR	36
4.9 แสดงผลการตรวจ DNA จากตัวอย่างเลือดสุกรด้วยเทคนิค PCR	37

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

โรค Toxoplasmosis เกิดจากเชื้อโปรโตซัว *Toxoplasma gondii* ทำให้เกิดโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด รวมถึงมนุษย์ และพบโรคในเกือบทุกภูมิภาคของโลก (Dubey & Beattie, 1988) โรคนี้มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจในด้านการผลิตสัตว์ และมีความเกี่ยวข้องกับทางด้านสาธารณสุข เนื่องจากเป็นโรคสัตว์สู่คนที่สำคัญโดยเฉพาะทำให้เกิดการแท้งในคน และมีผลให้เกิดความผิดปกติในทารก (Alford & Foft, 1969) คนอาจได้รับเชื้อจากการกินอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อน oocyst ที่ปล่อยมาจากแมว การบริโภคเนื้อสัตว์ที่ปรุงไม่สุกที่ปนเปื้อน tissue cyst (Fayer, Dubey & Lindsay, 2004) รวมไปถึงการบริโภคน้ำนมที่ปนเปื้อนระยะติดตัวของเชื้อ *T.gondii* (Dubey & Beattie, 1998; Pettersen, 1984; Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000) ซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคทั้งแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการในมนุษย์ได้ (Jira & Rosicky, 1983)

สุกร แพะ โค และกระบือ สามารถติดเชื้อ *T. gondii* จากดิน หลุ่้า ที่ปนเปื้อน oocyst (Montoya & Liesenfeld, 2004) เกิดเป็น tissue cyst ในกล้ามเนื้อหรือปล่อยระยะติดต่อผ่านออกมาทางน้ำนม (Dubey & Beattie, 1998; Pettersen, 1984; Tenter et. al, 2000) เมื่อคนรับประทานผลิตภัณฑ์จากสัตว์เหล่านี้โดยผ่านความร้อนไม่เพียงพอที่จะฆ่าเชื้อ ได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย เชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ tachyzoites ในลำไส้เล็ก แล้วไชผ่านเยื่อบุผนังลำไส้เข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตและทำให้เกิด tissue cyst ในอวัยวะต่าง ๆ เช่น สมอง ตา หัวใจ รก กล้ามเนื้อและตัวอ่อน (Montoya & Liesenfeld, 2004) ซึ่ง cyst เหล่านี้ไม่ทำให้เกิดความรุนแรงในคนปกติแต่ก่อให้เกิดอันตรายในบุคคลที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องและในหญิงตั้งครรภ์ (Pinard, Leslie & Irvine, 2003)

โรคนี้อาจทำให้ถึงเสียชีวิตได้ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยเฉพาะผู้ป่วย HIV ระยะสุดท้าย พบว่าผู้ป่วยร้อยละ 25 เกิดภาวะ encephalitis (Luft, Brooks, Couley, McCabe & Remington, 1984; Lucas, Hounnou & Peacock, 1993) pneumonia และ chorioretinitis (Cantos, Prando, Siqueira & Teixeira, 2000) การติดเชื้อช่วงตั้งครรภ์ระยะแรกเชื้อจะผ่านรกเข้าสู่ตัวอ่อนและอาจทำให้เกิดการพัฒนาที่ผิดปกติ ได้แก่ retinochoroiditis, hydrocephalus, convulsion และ intracerebral calcification (Remington, McLeod, Thulliez & Desmonts, 2001)

แมวมิบบาทาสำคัญในการแพร่กระจายโรค Toxoplasmosis เนื่องจากแมวเป็นสัตว์ชนิดเดียวที่สามารถสร้าง oocyst ที่มีความทนทานออกสู่สภาพแวดล้อมได้ (Silva et al., 2001) โดยเฉพาะในแมวอายุน้อยจะมีความไวต่อการติดเชื้อสูงโดยการติดเชื้อเกิดจากการกินหนูและนกที่มีเชื้อในระยะ bradyzoite ที่อยู่ใน tissue cyst หรือจากการกิน oocyst ที่ออกมากับอุจจาระของแมวตัวอื่น (Montoya & Liesenfeld, 2004) ภายหลังการติดเชื้อ แมวจะปล่อย oocyst ออกมากับอุจจาระได้นาน 5-14 วัน ซึ่งมีความทนทานและสามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ยาวนานถึง 18 เดือน ขึ้นกับอุณหภูมิและความชื้น (Dubey & Beattie, 1988) นอกจากนี้ยังพบว่าสัตว์หลายชนิดมีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอด oocyst ของเชื้อ *T. gondii* ในรูปแบบที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิต (mechanical transmission) และทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมได้ เช่น สุนัข (Lindsay, Dubey & Blagburn, 1997) แมลงวัน แมลงสาบ และแมลงปีกแข็ง (Hill & Dubey, 2002)

การศึกษาและสำรวจเกี่ยวกับเชื้อ *T. gondii* ในประเทศไทยมีการศึกษาและสำรวจเกี่ยวกับเชื้อ *T. gondii* ไม่มากนัก ประชาชนขาดความรู้ในโรคนี้ทั้ง ๆ ที่เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน ซึ่งคนมีความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อจากสัตว์หลายชนิด การศึกษาเพื่อประเมินสภาวะโรคในพื้นที่ที่มีความจำเป็นเพื่อนำไปสู่การศึกษาและมาตรการควบคุมโรคต่อไป

การตรวจวินิจฉัยโรค Toxoplasmosis ทำได้หลายวิธี

1. การตรวจหาเชื้อ *T. gondii* ระยะที่เป็น cyst ซึ่งอยู่ในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ด้วยการบดชิ้นอวัยวะให้ละเอียดแล้วนำน้ำจากอวัยวะนั้นฉีดเข้าหนู (Hiroaki, Tuntasuwan & Triwanatham, 2532) และด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาจาก tissue section (จิรา วายุโชติ, สุพจน์ เมธิยพันธ์ และ อิโรเอกินิจิกาวา, 2534) ซึ่งวิธีดังกล่าวใช้เวลาหลายวันจึงจะทราบผลและหากสัตว์ติดเชื้อ *T. gondii* จำนวนน้อยก็อาจตรวจไม่พบเชื้อได้เช่นกัน

2. การตรวจโดยวิธีทางซีรั่มวิทยาเป็นการตรวจหา antibody ต่อเชื้อ *T. gondii* ด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ Haemagglutination test (พิบูลย์ ไชยอนันต์, ราพีง คิสสะมาน และเชื้อ ว่องส่งสาร, 2512)

วิธีการไม่ซับซ้อนแต่มีความไว (sensitivity) และความแม่นยำ (specificity) ต่ำกว่าวิธีอื่น ๆ วิธี Indirect fluorescent antibody test (นพพร ศรราชพันธุ์, ครุณี ทนตสุวรรณ, อิโรเอกิ นิชิคา และ วิจิตร สุขเพสสัน, 2534) วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ขั้นตอนการทำยุ่งยากซับซ้อนอีกทั้ง ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง วิธี LAT (ครุณี ทนตสุวรรณ, นพพร ศรราชพันธุ์, วิจิตร สุขเพสสัน, อิโรเอกิ นิชิคา, และ อติสร วงศ์สิมสวัสดิ์, 2533) วิธีการนี้มีความไวและความจำเพาะปานกลาง ขั้นตอนการทำไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายปานกลาง แต่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ในปัจจุบันวิธี Indirect ELISA มีความไวและความจำเพาะสูง วินิจฉัยได้แม่นยำ วิธีการไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาทดสอบสั้น (Takahashi & Kenishi, 1986) และค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้น แต่เป็นวิธีการที่ยังต้องมีการพัฒนาเพื่อใช้ในประเทศไทยอยู่ ดังนั้น เพื่อพัฒนาการตรวจสอบวิธีการที่จะวินิจฉัยโรค Toxoplasmosis ให้มีประสิทธิภาพและเหมาะสมจึงจำเป็นต้องหาวิธีการอื่น ๆ ควบคู่กับวิธี Indirect ELISA หรือ LAT ได้แก่ การใช้วิธีการทางอณูวิทยา โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) หรือที่รู้จักกันในชื่อ PCR

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อตรวจหาระดับความชุกของแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. gondii* ของโคนมและสุกรในเขตจังหวัดเชียงราย
- 1.2.2 เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *T. gondii* ของโคนมและสุกรในเขตจังหวัดเชียงราย
- 1.2.3 เพื่อศึกษาวิธีการตรวจหาเชื้อ *T. gondii* ในโคนมและสุกรโดยวิธี PCR
- 1.2.4 เปรียบเทียบวิธีตรวจวินิจฉัยที่เหมาะสมและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ในอนาคต
- 1.2.5 เพื่อให้ทราบสถานการณ์ของโรค Toxoplasmosis เพื่อใช้ในการวางแผนการควบคุมโรคที่สามารถติดต่อมาสู่คนได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 ทำการศึกษาเฉพาะในโคนม และสุกรในเขตจังหวัดเชียงราย
- 1.3.2 ใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ LAT ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *T. gondii*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบสถานการณ์การติดเชื้อ *T. gondii* ในโคนมและสุกรในเขตจังหวัดเชียงราย

1.4.2 สามารถนำผลที่ได้มาใช้ในการวางแผน และป้องกันการแพร่กระจายการระบาดได้อย่างถูกต้องและทันต่อเหตุการณ์

1.4.3 ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมและสุกรมีความรู้ และความเข้าใจอย่างถูกต้องเกี่ยวกับโรค Toxoplasmosis และหาวิธีการป้องกันได้อย่างถูกต้อง



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติและถิ่นที่พบ

เชื้อโปรโตซัว *Toxoplasma gondii* พบครั้งแรกโดย Nicolle และ Manceaux ในปี ค.ศ. 1908 ในสัตว์ฟันแทะ *Ctenodacty gondii* ในแอฟริกาเหนือ ต่อมาได้มีการพบเชื้อในถิ่นต่าง ๆ ทั่วโลก เชื้อ *T. gondii* มีแมวและสัตว์ตระกูลแมวเท่านั้นที่เป็นโฮสต์จำเพาะ (definitive host) ส่วนสัตว์เลือดอุ่นอื่น ๆ รวมทั้งคน สัตว์ปีก สัตว์แทะเป็นเพียงโฮสต์กึ่งกลาง (intermediate host) เท่านั้น

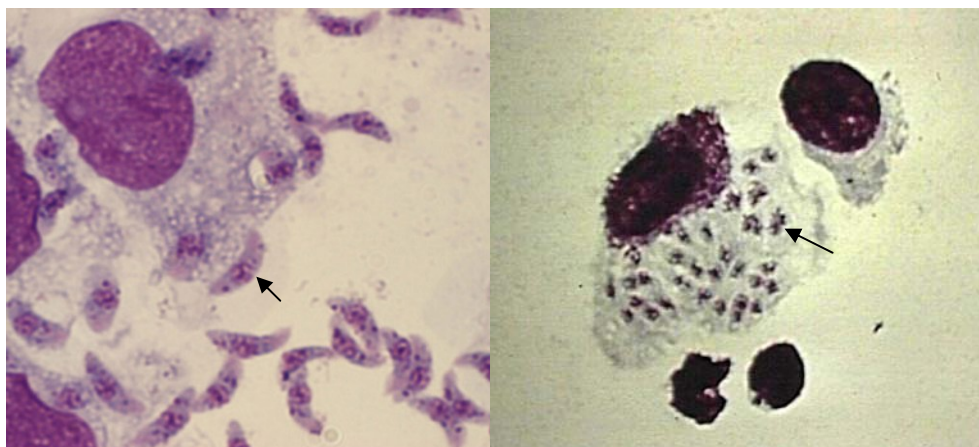
2.2 การจัดหมวดหมู่

T. gondii จัดหมวดหมู่อนุกรมวิธานได้ดังนี้

Phylum Apicomplexa, Class Sporozoea, Subclass Coccidia, Order Eucoccidiida, Suborder Eimeriina, Haemosporina, Genus *Toxoplasma*

2.3 รูปร่างลักษณะทางชีววิทยาของ *T. gondii*

รูปร่างและลักษณะของเชื้อ *T. gondii* มีรูปร่างคล้ายคันธนู หรือ crescent-shape ขนาดเล็ก กว้าง 2-3 และ ยาว 4-9 ไมโครเมตร ปลายข้างหนึ่งจะกว้างกว่าอีกข้างหนึ่งเล็กน้อย มีนิวเคลียสหนึ่งอันอยู่ตรงกลางเซลล์ก่อนมาทางปลายข้างที่กว้างกว่าเล็กน้อย หากย้อมด้วยสี Giemsa นิวเคลียสจะติดสีแดง cytoplasm ติดสีน้ำเงิน (ภาพที่ 2.1)

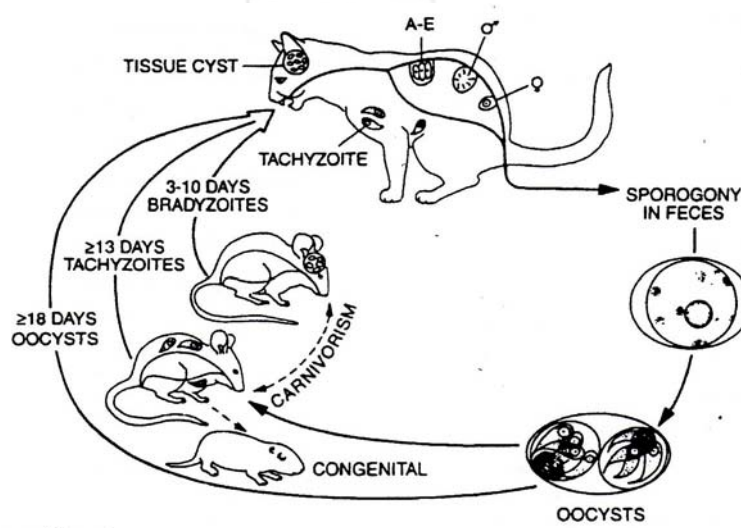


ภาพที่ 2.1 ลักษณะเชื้อ *T. gondii* ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (ซ้าย) (Afarensis, 2006: Online) และ อยู่ภายในเซลล์ macrophage (ขวา) (2005: Online)

2.4 วงจรชีวิต

แมวและสัตว์ตระกูลแมว เป็นโฮสต์จำเพาะของเชื้อ *T. gondii* ดังนั้น เชื้อ *T. gondii* จะมีระยะการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (sexual form) อยู่ในลำไส้ของแมวเท่านั้น แมวที่ติดเชื้อ *T. gondii* จะขับ oocysts ออกมากับอุจจาระ ซึ่ง oocysts มีรูปร่างเป็นวงรีขนาด 9x13 ไมโครเมตร ตอนที่ถูกขับออกมาใหม่ๆ จะยังไม่สามารถติดต่อกได้ เนื่องจากยังเจริญไม่สมบูรณ์ (immature oocysts) โดยจะใช้เวลาเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมอีก 5-10 วันจึงจะกลายเป็น mature oocyst ซึ่งภายในจะมี sporocysts อยู่ 2 อันและแต่ละ sporocyst จะมี sporozoites อยู่ภายใน 4 ตัว ซึ่งระยะนี้เป็นระยะติดต่อ (infective stage) ของเชื้อ นอกจาก oocysts ยังมีเชื้อระยะอื่นที่เป็นระยะติดต่อ คือระยะ tachyzoites (ระยะที่แบ่งตัวรวดเร็วหรือระยะ active) และ bradyzoites (ระยะที่แบ่งตัวช้าหรือระยะพักตัว) โดยทั้ง 2 ระยะจะอยู่ใน tissue cyst ที่มีผนังชีสต์ล้อมรอบชัดเจน ซึ่งเมื่อแมวกินอาหารหรือน้ำที่มีเชื้อระยะติดต่อปนเปื้อนเข้าไปเชื้อจะบุกรุกเข้าไปยังเซลล์ของลำไส้และเจริญแบบไม่มีเพศ (asexual cycle หรือ merogony) ได้ ระยะ trophozoite หลายตัวจนเต็มเซลล์ของโฮสต์ เมื่อโฮสต์เซลล์แตก trophozoites ก็จะเข้าสู่เซลล์ใหม่เรื่อยๆ และต่อมาจะพัฒนาเป็นการสืบพันธุ์แบบมีเพศ โดยจะเจริญเป็น macrogamete และ microgamete แล้วผสมพันธุ์กันกลายเป็น zygote และพัฒนาต่อกลายเป็น oocysts ปนออกมากับอุจจาระแมว เรียกการเจริญเติบโตแบบนี้ว่าวงจรสืบพันธุ์แบบใช้เพศ หรือ gametogony หรือ sporogony ซึ่งหากคนหรือโฮสต์ตัวกลางได้รับ oocyst เข้าไป ก็จะมีการเจริญแบบ merogony โดยเปลี่ยนเป็น trophozoites แบ่งตัวอยู่ในเซลล์ของโฮสต์ อย่างรวดเร็ว

(tachyzoites stage) จากนั้นจะหยุดแบ่งตัวและเข้าสู่ระยะพัก (bradyzoites stage) เกิดการสร้างซิสต์ผนังของซิสต์ (ภาพที่ 2.2) จะถูกสร้างขึ้นทั้งจากส่วนของโฮสต์และส่วนของพยาธิ โดยปกติระยะซิสต์จะพบได้ในเซลล์ทุกชนิดที่มีนิวเคลียส แต่โดยมากมักพบซิสต์อยู่ในกล้ามเนื้อหัวใจหรือในสมองโดยปกติระยะซิสต์ของเชื้อ *T. gondii* จะมีขนาดไม่เกิน 100 ไมโครเมตร และภายในซิสต์จะไม่มีผนังกันแบ่งเหมือนซิสต์ของ *Sarcocystis spp.* ที่มี septa หลายอันกันแบ่งซิสต์ออกเป็นส่วน ๆ (compartment) และจะมีขนาดใหญ่กว่าซิสต์ บางอันอาจมีขนาดใหญ่ถึง 5 เซนติเมตร เชื้อ *T. gondii* จะไม่สามารถเจริญครบวงจรชีวิตได้ในโฮสต์กึ่งกลางทั้งหลาย จะมีเพียงระยะซิสต์เท่านั้นที่อยู่ในตัวตลอดชีวิตและยังไม่มียาสชนิดใดที่สามารถทำลายซิสต์ออกจากร่างกายได้ โดยปกติซิสต์จะไม่มีอันตรายต่อโฮสต์เว้นแต่โฮสต์มีสภาพของภูมิคุ้มกันโรคต่ำลงจะทำให้ bradyzoites ที่อยู่ในระยะพักตัวเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ tachyzoites มีการแบ่งตัวเร็วขึ้นและก่อให้เกิดอาการของโรครุนแรงขึ้น



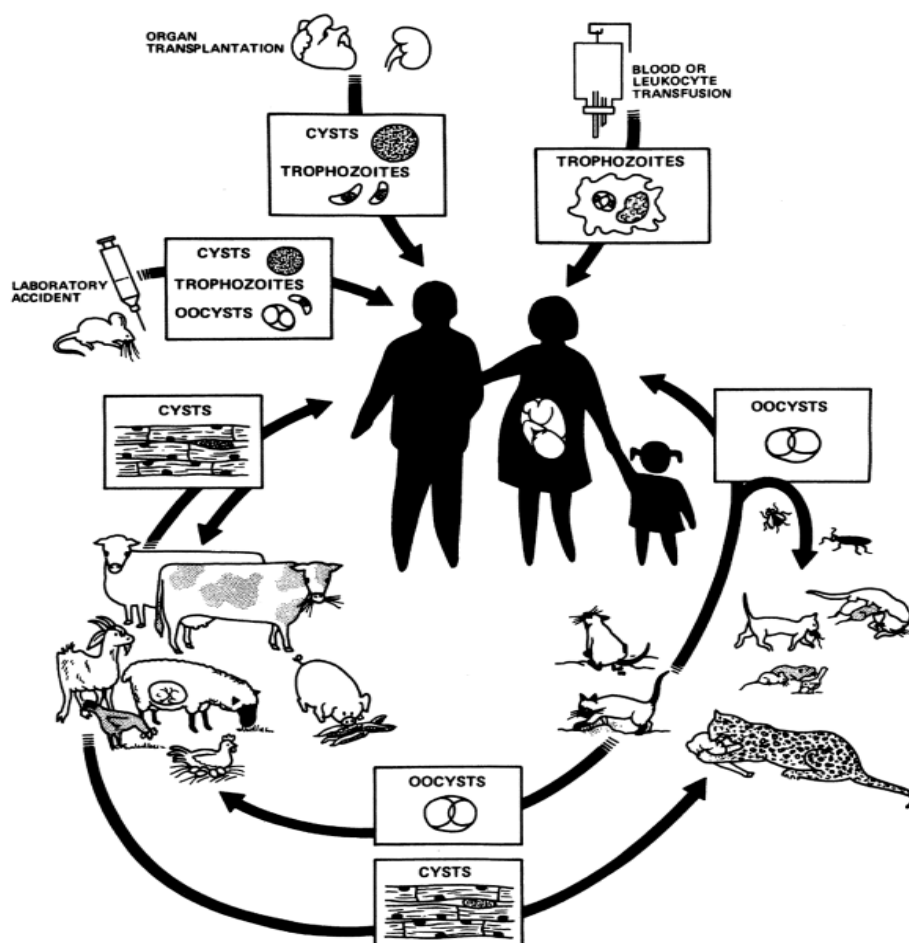
ที่มา: International Journal for Parasitology, 1998 (28), p.1020.

ภาพที่ 2.2 วงจรชีวิตของเชื้อ *T. gondii* ในแมว

T. gondii จะไม่สามารถเจริญครบวงจรชีวิตได้ในโฮสต์ตัวกลางทั้งหลาย ดังนั้นจะมีเพียงระยะซิสต์เท่านั้นที่อยู่ในตัวตลอดชีวิตและยังไม่มียาสชนิดใดที่สามารถกำจัดซิสต์ออกจากร่างกายได้ โดยปกติซิสต์จะไม่มีอันตรายต่อโฮสต์ ยกเว้นว่าเมื่อใดที่ภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่ำลง bradyzoites ที่อยู่ในระยะพักตัวจะกลายเป็นระยะที่มีการแบ่งตัวเร็วขึ้นและก่อให้เกิดอาการของโรครุนแรงขึ้นเช่น โรค toxoplasmic encephalitis ในคนไข้โรคเอดส์ เป็นต้น

2.5 การก่อโรค

เชื้อ *T. gondii* ทำให้เกิดโรค Toxoplasmosis ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด รวมถึงมนุษย์ ดังนั้นโรค Toxoplasmosis จึงจัดเป็นโรคหนึ่งที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขอย่างมาก เชื้อนี้มีรายงานพบในสัตว์ต่าง ๆ ทั่วโลก ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่า แมวหรือสัตว์ป่าในตระกูลแมว โดยเฉพาะ Genus *Lynx* เป็นโฮสต์ถาวรของเชื้อ *T. gondii* การเจริญของเชื้อ *T. gondii* ใน epithelial cell ของลำไส้เล็กของโฮสต์ถาวร จะผลิต Toxoplasma oocyst ปะปนออกมากับอุจจาระ ซึ่งเป็นระยะ sexual stage ของเชื้อ *T. gondii* จะเกิดใน epithelial cell ของลำไส้เล็กของแมวหรือสัตว์ในตระกูลแมวเท่านั้น สัตว์อื่นจะไม่พบ (Nancy, Frenkel & Dubey, 1972) Toxoplasma oocyst ที่ปะปนออกมากับอุจจาระหากอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมอาจมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 410 วัน (Solih & Swell, 1972) คนและสัตว์ติดเชื้อนี้ได้โดยการกินน้ำและอาหารที่มีการปนเปื้อน oocyst ของ *T. gondii* หรือติดมาแต่กำเนิด (Plant, Richardson & Moyle, 1974) ในคน (Peterson et al., 1974) รายงานว่าเจ้าของแมวมีโอกาสติดโรค Toxoplasmosis ได้มากกว่าคนจำพวกอื่น เจ้าของแมวหรือผู้เลี้ยงแมวไว้ในบ้านควรเพิ่มความระมัดระวังการติดเชื้อนี้แก่สมาชิกในครอบครัว โดยเฉพาะหญิงที่กำลังตั้งครรภ์ เนื่องจากมีรายงานว่าโรคนี้ทำให้เกิดการแท้ง (Kimball et al., 1971) หรือในทารกแรกเกิดจะตายหรือสมองพิการ (Alford & Foft, 1969) (ภาพที่ 2.3) โรค Toxoplasmosis ไม่มีลักษณะอาการเฉพาะของโรค ทำให้ยากในการจำแนกจากการติดเชื้ออื่น ๆ จึงทำให้ไม่สามารถวินิจฉัยโรค Toxoplasmosis โดยใช้อาการทางคลินิกแต่อย่างใด จำเป็นต้องอาศัยการตรวจอื่น ๆ มาประกอบการวินิจฉัยโรค Toxoplasmosis โดยสามารถทำได้หลายวิธีทั้งทางด้านชีววิทยา หรือด้านพยาธิวิทยา การตรวจทางพยาธิวิทยาจะรวมไปถึงตรวจจากชิ้นเนื้อที่ตัดออกมา (biopsy) เม็ดเลือดขาว น้ำไขสันหลัง หรือการแยกเลี้ยงเชื้อ *T. gondii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือในสัตว์ทดลอง ส่วนการตรวจหาเชื้อ *T. gondii* จากต่อมน้ำเหลืองทำได้ยากมาก ถึงแม้ว่าเชื่อกันว่าลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อนั้น จะมีลักษณะเฉพาะเมื่อมีเชื้ออยู่ แต่ก็มีข้อโต้แย้งว่าการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพนั้นไม่สามารถบอกได้ชัดเจนและไม่เฉพาะต่อการติดเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง อีกทั้งเมื่อแมวติดเชื้อแล้ว จะยังคงมีเชื้ออยู่ตลอดชีวิต เนื่องจากภูมิคุ้มกันไม่สามารถกำจัดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ และยังไม่มียาที่สามารถฆ่าเชื้อในระยะที่อยู่ในเนื้อเยื่อได้ ดังนั้น ด้วยเหตุนี้ การตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันวิทยาเช่น ELISA และ Latex Agglutination Test จึงมีส่วนช่วยในการยืนยันการติดเชื้อที่สามารถให้ผลที่แน่นอนกว่าวิธีอื่นที่ใช้กันอยู่ แต่ยังมีผลงานวิจัยของ Langgoni, Das Dore, Silva, Pezerico, Castro and Da Silva (2006) ได้ดำเนินการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *T. gondii* ในตัวอย่างเลือดของหนูทดลองที่มีการติดเชื้อ ซึ่งสามารถช่วยให้การวินิจฉัยโรคในการติดเชื้อแบบเฉียบพลันได้อย่างรวดเร็ว



ที่มา: http://www.medscape.com/viewarticle/472409_2

ภาพที่ 2.3 วงจรชีวิตของเชื้อ *T. gondii*

2.6 การติดต่อของโรค

โรค Toxoplasmosis ถ่ายทอดได้ 4 ทาง คือ

2.6.1 โดยการกิน oocysts ระยะติดต่อที่ปนเปื้อนอยู่ในสภาพแวดล้อมหรือใน เนื้อ นม และ น้ำ oocysts นี้จะมาจากสัตว์เพียงชนิดเดียว คือ สัตว์ในตระกูลแมว

2.6.2 โดยการกิน เนื้อเยื่อที่มีชีสต์ที่ภายในมีระยะ bradyzoites อยู่ โดยชีสต์จะอยู่ภายใน เนื้อ หรือเครื่องในของสัตว์ที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางที่นำมากินโดยไม่ได้ทำให้สุกพอที่จะฆ่าเชื้อนี้ได้

2.6.3 โดยผ่านทางรก ในขณะที่แม่ตั้งท้อง โดยระยะ tachyzoites จะผ่านจากแม่เข้าไปสู่ลูก โดยตรง โดยจะเข้าไปอยู่และทำให้เกิดชีสต์ที่สมอง หรือตา ทำให้เกิดความผิดปกติแรกคลอด ซึ่ง

การติดเชื้อขณะตั้งครรภ์อ่อน โอกาสที่เชื้อจะผ่านไปติดลูกได้ แต่น้อยกว่าการติดเชื้อขณะครรภ์แก่ ทำให้เกิดการแท้ง ตายคลอด มีความผิดปกติแต่กำเนิด เช่น ปัญญาอ่อน หัวบาตร (hydrocephalus) (ภาพที่ 2.4) มีหินปูนเกาะที่เนื้อสมอง (abnormal cerebral calcification) จอตอักเสบ ตับอักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบ ตับโต ม้ามโต ผื่นตามตัว หรือบางครั้งอาจไม่พบอาการใด เมื่อแรกคลอดทั้งที่มีการติดเชื้อ แต่อาการต่าง ๆ จะปรากฏในวัยหนุ่มสาวซึ่งทำให้จอตอักเสบ ในที่สุดทำให้ตาบอด

2.6.4 โดยผ่านทางน้ำนม โดยระยะ tachyzoites จะออกมากับน้ำนมของแม่ เมื่อลูกกินนมก็จะได้รับเชื้อเข้าไปแต่กรณีนี้จะไม่ทำอันตรายกับลูกได้มากเท่ากับการผ่านทางรก



ภาพที่ 2.4 การติดต่อของเชื้อ *T. gondii* จากแม่สู่ลูกขณะตั้งครรภ์ ทำให้เกิดพยาธิสภาพในลูกที่คลอดออกมา (Hydrocephalus) (ชูเกียรติ ศิริวิชัยกุล, ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ และ ประยงค์ ระดมยศ, 2549, หน้า 462)

2.7 การตรวจวินิจฉัยโรค Toxoplasmosis

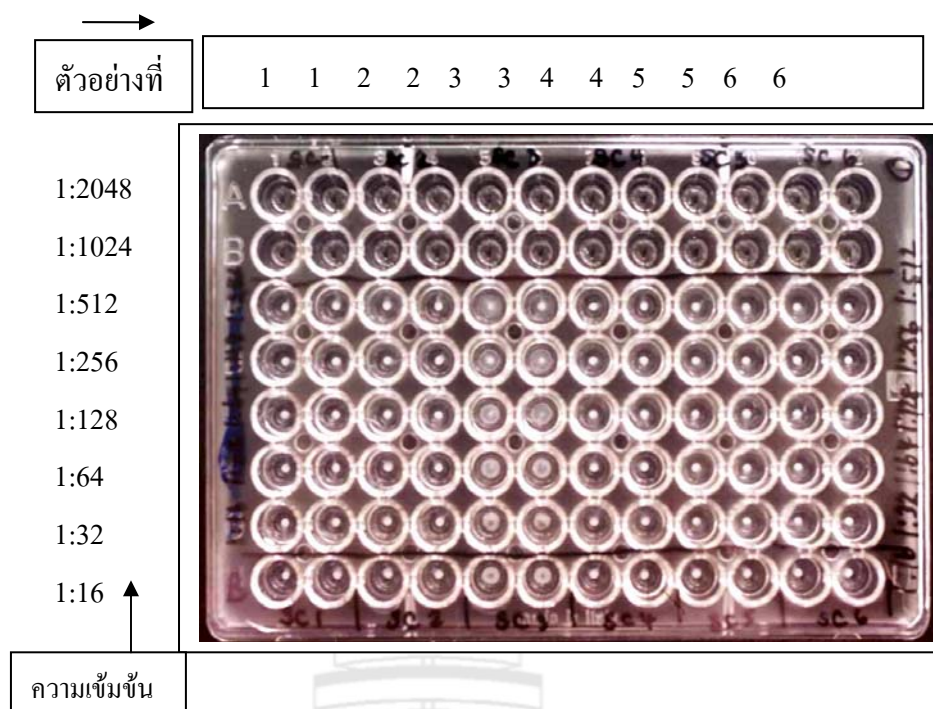
เนื่องจากโรค Toxoplasmosis เป็นโรคที่ไม่มีอาการและอาการที่แสดงอย่างเฉพาะเจาะจง และอาการของโรคที่แสดงออกโดยเฉพาะในคน จะมีความแตกต่างกัน ดังนั้นการวินิจฉัยโรคในคน จะใช้วิธีตรวจยืนยันผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นหลัก โดยเฉพาะกลุ่มคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรค Toxoplasmosis มีหลายวิธี

2.7.1 การหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *T. gondii* โดยวิธีการตรวจทางน้ำเหลือง ซึ่งเป็นวิธีที่นิยม และได้ผลดีและมีวิธีการตรวจอยู่หลายวิธีไม่ว่าจะเป็นวิธี dry test, direct agglutination test, fluorescent antibody test, enzyme-linked immunosorbent assay, latex agglutination test, indirect

haemagglutination assay ซึ่งวิธีการตรวจจะมีความไวและความจำเพาะค่อนข้างสูงและใกล้เคียงกัน และหลายวิธีปัจจุบันมีชุดตรวจสำเร็จจำหน่าย (commercial test kits) วิธีที่นิยมปัจจุบันมากที่สุดคือ ELISA (IgG, IgM) รองลงมาเป็นวิธี indirect haemagglutination, latex agglutination และ immunofluorescence ตามลำดับ (Sukthana, Chintana, Supathanapong, Siripanth, Lekkla & Chiabchalard, 2001) ได้ศึกษาวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการในประชากรไทย โดยเปรียบเทียบการตรวจด้วยวิธี Latex Agglutination และ Indirect Immunofluorescence กับวิธี Sabin-Feldman dye test พบว่าความไวของวิธี Latex Agglutination ดีมากแต่ความแม่นยำและ positive predictive value ไม่สูงนัก ส่วนการตรวจด้วยวิธี Indirect Immunofluorescence มีความจำเพาะสูงมีความไวปานกลาง นอกจากนี้การแยกหาเชื้อโดยการหา *Toxoplasma* nucleic acid โดยนำสารละลาย น้ำคร่ำ น้ำล้างหลอดลม น้ำไขสันหลัง เนื้อเยื่อต่าง ๆ มาผ่านกระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) ให้ผลเร็วและแม่นยำ แต่มีข้อระวังคือการปนเปื้อนของสิ่งส่งตรวจ ซึ่งการตรวจโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *T. gondii* จากอุจจาระหรือจากเนื้อเยื่อสัตว์ที่สงสัย เป็นวิธีใหม่ที่น่าสนใจในการตรวจที่มีประสิทธิภาพสูงและสามารถใช้ในการตรวจทางระบาดวิทยาได้ด้วยเทคนิค PCR มีข้อจำกัดตรงที่ราคาแพง ทำให้การใช้ไม่แพร่หลายมากนัก และ องค์ประกอบและภาวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในการทำ PCR มาตรฐานประสิทธิภาพ (Efficacy) ของการทำ PCR สามารถวัดได้จาก 3 ปัจจัย คือ ความจำเพาะ (Specificity) ประสิทธิภาพ (Efficiency) หรือผลผลิตที่ได้ (Yield) และความถูกต้อง (Accuracy) การทำ PCR ที่มีความจำเพาะสูงมากจะทำให้ได้ PCR product เกิดขึ้นจากส่วนของแม่พิมพ์ที่จำเพาะเท่านั้น ในขณะที่การทำ PCR ที่มีประสิทธิภาพสูง จะทำให้ได้ PCR product ในปริมาณที่สูงกว่า โดยใช้จำนวนรอบการทำน้อยกว่า ส่วนการทำ PCR ที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง ก็จะทำให้ได้ PCR product ที่มีความถูกต้องในลำดับเบสสูง หรือผิดพลาดน้อยมาก องค์ประกอบและภาวะต่าง ๆ จำนวนมากที่มีผลกระทบต่อปัจจัยในการทำ PCR มาตรฐานและผลกระทบต่อปัจจัยทั้งสามข้างต้น การปรับองค์ประกอบและภาวะต่าง ๆ ของปฏิกิริยา PCR เพื่อให้ได้ความจำเพาะหรือความถูกต้องแม่นยำสูงสุด มักจะมีผลให้ผลผลิตที่ได้ลดลง ดังนั้น ในการทำ PCR ระบบใดระบบหนึ่ง จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบว่า ปัจจัยใดเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดของงาน PCR นั้น แล้วจึงปรับองค์ประกอบและภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสมสอดคล้องที่สุด องค์ประกอบและภาวะต่างๆ ที่สำคัญ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการทำ PCR ได้แก่ DNA Template, Primers, thermostable DNA polymerases, บัฟเฟอร์สำหรับการทำ PCR, ความเข้มข้นของ MgCl₂, Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), โปรแกรมอุณหภูมิในการทำ PCR โดยในปัจจุบันมีวิธีการใหม่ในการเพิ่มปริมาณ DNA template ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณได้ใช้เวลาไม่นานก็สามารถได้ปริมาณของ DNA มากพอและง่ายต่อการตรวจหาการติดเชื้อของโรค โดยเทคนิคที่จะใช้ในการตรวจหาเชื้อ

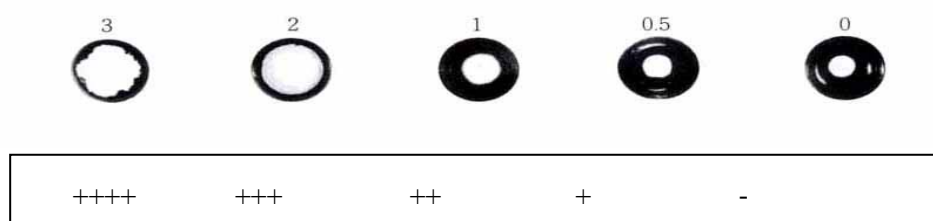
T. gondii ได้แก่ คือ LAMP ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธี amplification โดยใช้เอนไซม์ชนิดเดียวและ 4 Primer ภายใต้อุณหภูมิที่เท่ากันซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูงมาก เมื่อ ปี 2552 ไชยนิรันดร์ และคณะ ได้มีการเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *T. gondii* ในโคนมในประเทศไทย โดยใช้ตัวอย่างเลือดโคนม จำนวน 50 ตัวอย่างที่ให้ทั้งผลบวกและผลลบจากการตรวจโดยวิธี Indirect Fluorescence Antibody Test (IFAT) เปรียบเทียบกับ Enzyme Linked Immunosorbent (ELISA), Latex Agglutination Test (LAT), PCR และ Loop Mediated Isothermal Amplification Test (LAMP) ผลปรากฏว่าเทคนิค PCR ให้ความจำเพาะสูงสุด ร้อยละ 100 สำหรับสถานการณ์การรายงานความชุกของโรค *T. gondii* ที่มีการรายงานที่พบว่ามีรายงานความชุกของโรคในช่วงระยะเวลาหนึ่งกับอีกช่วงระยะเวลาหนึ่งมีความแตกต่างกัน อันเนื่องมาจากการใช้วิธีหรือเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจหาความชุกของการติดเชื้อที่แตกต่างกัน ซึ่งในปัจจุบันก็ยังไม่มียังมีวิธีการใดที่ดีที่สุดแต่วิธี IFAT ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานที่ยังเป็นวิธีการที่เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปอยู่

2.7.2 การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. gondii* โดยวิธี Latex Agglutination Test วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางระบาดวิทยา เนื่องจากตรวจได้ครั้งละจำนวนมาก และไม่ต้องใช้ประสบการณ์ความชำนาญพิเศษในการตรวจ ชุดตรวจหาแอนติบอดีของเชื้อ *T. gondii* ในท้องตลาด การอ่านผลจากการจัดเรียงตัวหรือจับตัวของ Latex particles โดยการอ่านผลจะให้ผลบวก (cut off point) เมื่อระดับแอนติบอดีมากกว่าหรือเท่ากับ 1 : 64 นอกจาก latex test แล้วยังมี Toxo-Screen DA (Biomérieux) ซึ่งเป็นปฏิกิริยา agglutination เช่นกัน (ภาพที่ 2.5) แต่ให้ผลบวกที่แอนติบอดีไตเตอร์ 1 :40 สรุปก็คือการใช้แอนติบอดี เคลือบกับ Latex particles ถ้ามีแอนติเจน จะทำปฏิกิริยา agglutinate กับ Latex particles กับลักษณะที่ทางบริษัทผู้ผลิตกำหนด



ภาพที่ 2.5 ลักษณะการเกิด agglutination ในเทคนิค LAT

ลักษณะของ latex particle ถ้าจับตัวกันแน่นและมีลักษณะเป็นวงกลมเล็ก ให้ถือว่าเป็นผลลบ (อาจดูเปรียบเทียบกับ negative control serum) ถ้า latex particle ในหลุม มีการจับตัวกันอย่างหลวม ๆ กระจายตัวเล็กน้อยถึงมาก ให้อ่านผล +1 ถึง +4 (ภาพที่ 2.6) เกณฑ์การตัดสินใจในการอ่านผลแอนติบอดีไคเตอร์ ให้ดู serum diluent สุดท้ายที่ทำให้ผลบวก ในการทดลองนี้ถ้าแอนติบอดีไคเตอร์มากกว่าหรือเท่ากับ 1:64 ถือว่าให้ผลบวก แต่ถ้าต่ำกว่า 1:64 ถือว่าเป็นลบ



ภาพที่ 2.6 การอ่านผลของการจับตัวกันของ latex particle เกิด agglutination ในแต่ละระดับ

ในการตรวจวินิจฉัยโรค Toxoplasmosis โดยการทำปฏิกิริยาจะต้องทั้งข้ามคืนและเปรียบเทียบการจัดเรียงตัวของ latex particles ไม่มีขายและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้มี

ข้อจำกัดที่จะต้องทำการตรวจครั้งละหลาย ๆ ตัวอย่างเพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจ ตัวอย่างของชุดการตรวจได้แก่ Latex agglutination test "Eiken" (ประเทศญี่ปุ่น)

2.8 การศึกษาโรค Toxoplasmosis ในประเทศไทย

จากการศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทยตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันพบว่าโรค Toxoplasmosis ในคนและสัตว์ในประเทศไทยมีการสำรวจครั้งแรก ตั้งแต่ปี 1963 โดยทดสอบในคนและเด็กปกติจำนวน 61 ราย โดยวิธี skin test พบว่าให้ผลลบเมื่อแมวเป็นสัตว์ที่นำโรค Toxoplasmosis เข้าของแมวจึงมีความเสี่ยงในการติดโรคมกกว่าคนในกลุ่มอื่น ๆ ข้อเสนอแนะสำหรับเจ้าของสัตว์ คือ การนำแมวไปตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *T. gondii* เพื่อตรวจหาแมวที่อาจเป็นพาหะของโรค ซึ่งอาจมีความจำเป็นโดยเฉพาะผู้หญิงที่ตั้งท้อง การตรวจหา oocysts จากอุจจาระอาจจะไม่ใช่วิธีที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยโรคนี้ เนื่องจากแมวส่วนใหญ่จะปล่อย oocysts ส่วนใหญ่เพียง 1-2 วัน ในช่วง 1-3 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะมีเพียง oocysts จำนวนน้อยในแต่ละวัน ซึ่งคงจะเป็นการยากที่จะตรวจอุจจาระของแมวทุกวันจนกว่าจะพบเนื่องจากแต่ละระยะของโรค มีการปล่อย oocysts ออกมาไม่แน่นอนวิธีป้องกันที่ดีที่สามารถแนะนำเจ้าของสัตว์ทั่ว ๆ ไป คือ การเก็บอุจจาระแมวทุกวัน การใช้ cat litter boxes และทำความสะอาดเป็นประจำด้วยน้ำร้อนหรือผงซักฟอก เจ้าของควรใส่ถุงมือเป็นประจำในขณะที่ทำความสะอาด ผู้หญิงที่ตั้งท้อง หรือผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ไม่ควรสัมผัสแมวหรืออยู่ร่วมกับแมว เพื่อป้องกันความเสี่ยงต่อการติดโรค นอกจากนี้ไม่ควรสัมผัสเนื้อสุกสดหรือถ้าจำเป็นต้องสัมผัสต้องล้างมือให้สะอาดทุกครั้งก่อนรับประทานอาหาร หรือสัมผัสอาหารอื่น ๆ ไม่ควรรับประทานนมดิบ หรือ อาหารที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้สุกอย่างสมบูรณ์

การป้องกันการติดโรคในแมว ทำได้โดยการเปลี่ยนจากอาหารสดมาเป็นอาหารเม็ด หรืออาหารกระป๋อง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของ oocysts ในอาหาร ควรควบคุมสภาพแวดล้อมให้สะอาดไม่สกปรกหรือรก ซึ่งอาจเป็นที่อยู่ของ แมลงสาบหรือหนู เนื่องจากอาจเป็นพาหะของโรคมาสู่แมวได้ นอกจากนี้การควบคุมแมวให้อยู่ในบ้านไม่ออกไปท่องเที่ยวตามวิกาล เป็นสิ่งจำเป็นเนื่องจากแมวอาจติดโรคในช่วงที่ไปรวมตัวกันอยู่เป็นจำนวนมาก ๆ ได้ โดยที่เจ้าของไม่ทราบ และไม่ได้สังเกต และอาจนำโรคหลายชนิดมาสู่คนในที่สุด

ตารางที่ 2.1 การศึกษาเกี่ยวกับโรค Toxoplasmosis ในประเทศไทย

ปี	รายละเอียดของการศึกษา	ผลของการศึกษา	ผู้ศึกษาวิจัย
พ.ศ. 2506	ทดสอบทางผิวหนังในคนไทย 61 ราย	พบว่าให้ผลลบทั้งหมด	อานนท์ ประทัดสุนทรสาร
พ.ศ. 2508	ตรวจหาการติดเชื้อ <i>T. gondii</i> ในตับหนู (<i>Rattus rattus</i>) จากเขาใหญ่ จ.นครราชสีมา	พบเชื้อ <i>T. gondii</i> ในสัตว์ (หนู) เป็นครั้งแรก	วิชัย สังฆสุวรรณ
พ.ศ. 2510	สำรวจการติดเชื้อในหมู	พบเชื้อ <i>T. gondii</i> 2 strains ในหมู	วิชัย สังฆสุวรรณ
พ.ศ. 2510	สำรวจคนในโรงฆ่าสัตว์ในกรุงเทพฯ 256 คน โดยวิธี IHA	ให้ผลบวก 1.5%	วิชัย สังฆสุวรรณ
พ.ศ. 2512	สำรวจโรคในสุกรที่บางเขนและทับกวาง	ไม่ระบุจำนวนที่พบ	พิบูลย์ และคณะ
พ.ศ. 2519	ศึกษาการติดเชื้อในคนโดยการตรวจทางน้ำเหลือง (immunofluorescent antibody test, FAT)	พบว่าร้อยละ 15 ของประชากรที่ศึกษา 4 กลุ่มให้ผลบวกต่อเชื้อ <i>T. gondii</i>	เดชา ตันไพจิตร และคณะ
พ.ศ. 2523	ตรวจผ่าพิสูจน์ผู้ป่วยที่เสียชีวิต จำนวน 3 ราย โดย liver biopsy	พบ Toxoplasmosis ที่ตับ	สุภูมิ บุญยรัตเวช และคณะ
พ.ศ. 2522	สำรวจโรค Toxoplasmosis ในแมวในภาคกลางของประเทศไทย	พบว่าแมวในภาคกลางเป็นโรค 45%	กระแสร์ และคณะ
พ.ศ. 2522	ทดสอบโรคในสุนัขที่กองควบคุมโรคสัตว์ดินแดง จำนวน 100 ตัวโดยวิธี IHA	พบว่าให้ผลบวก 12%	กระแสร์ และคณะ
พ.ศ. 2522	รายงานการตรวจโรคในกระบือปลักในประเทศไทย โดยวิธี IHA	พบว่าให้ผลบวก 9.4%	ภิรมย์ และคณะ
พ.ศ. 2523	รายงานโรคระบาด Toxoplasmosis ในสุกรอำเภอรัตนพิบูล และอำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช	ไม่ระบุจำนวนที่พบ	ประชา และคณะ

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ปี	รายละเอียดของการศึกษา	ผลของการศึกษา	ผู้ศึกษาวิจัย
พ.ศ. 2524	ทำการวิจัยโรค Toxoplasmosis ใน แมวเขตกรุงเทพมหานครที่มารักษาที่ โรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ โดยวิธี IHA 40 ตัวอย่าง	พบว่าให้ผลบวก 57.5%	ภิรมย์ และคณะ
พ.ศ. 2532	สำรวจโรค Toxoplasmosis ในสุนัข แมว และคน โดยวิธี LAT	พบว่า สุนัขให้ผลบวก 6.6% แมว ให้ผลบวก 3.5% คนให้ผลลบทั้งหมด	Hiroaki และคณะ
พ.ศ. 2533	สำรวจโรค Toxoplasmosis ในสุกร ในประเทศไทย 71 ฟาร์ม ใน 14 จังหวัด 1066 ตัวอย่าง	พบว่าให้ผลบวก 15.1%	ดรุณี และคณะ
พ.ศ. 2541	ศึกษาสถิติตั้งครรภ์ในประเทศไทย จำนวน 1,200 คน โดยการตรวจหา IgG ต่อเชื้อ <i>T. gondii</i> ในกระแสเลือด ด้วยวิธี Sabin-Feldman Dye Test	พบว่า มีอัตราความชุกของ โรคอยู่ที่ 13.2%	จินตนา และคณะ
พ.ศ. 2542	ศึกษาความชุกของโรคในโคนมใน เขตภาคกลาง จำนวน 119 ตัว	พบว่าให้ผลบวก 4 ตัว คิดเป็น 3.4%	Suteeraparp และ คณะ
พ.ศ. 2543	ศึกษาความชุกของโรคในคน	พบว่า ความชุกประมาณ 1.2-4.6%	Maruyama
พ.ศ. 2544	ศึกษาความชุกของโรค <i>T. gondii</i> ในช้าง	พบว่า ความชุกของโรค 25.6%	Tuntasuvan และ คณะ
พ.ศ. 2546	มีการสำรวจการติดเชื้อ <i>T. gondii</i> ในชาวจีนอพยพ ที่อยู่ในชนเผ่าอาข่า เย้าและประชาชนชาวฮั่น แนวชาว แดนของจังหวัดเชียงราย ซึ่งเป็น จังหวัดชายแดนภาคเหนือสุดของ ประเทศไทย โดยใช้วิธี LAT	พบว่า มีการติดเชื้อใน ชาวอาข่า 9.1%	Kwung และคณะ

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ปี	รายละเอียดของการศึกษา	ผลของการศึกษา	ผู้ศึกษาวิจัย
พ.ศ.2547	ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิต สุกรปลอดเชื้อโรคติดคน Toxoplasmosis ในฟาร์ม โดยวิธี LAT และ ELISA	พบว่า วิธี LAT ให้ความชุก 7% วิธี ELISA ให้ความชุก 0.2%	เลิศรัก และคณะ
พ.ศ.2548	ศึกษาความชุกของโรค Toxoplasmosis ในแพะในพื้นที่ จังหวัดสตูล จำนวน 631 ตัว โดยวิธี LAT	พบว่า ให้ผลบวก 176 ตัว คิด เป็น 27.9%	สถาพร และคณะ
พ.ศ.2549	ศึกษาความชุกของโรค <i>T. gondii</i> ใน สัตว์ป่าตระกูลแมวและเสือใน ประเทศไทย จำนวน 136 ตัว	พบว่า ให้ผลบวก 21 ตัว คิด เป็น 15.4%	Thiangtum และ คณะ
พ.ศ.2551	สำรวจแมว จำนวน 592 ตัว และสุนัข จรจัด จำนวน 472 ตัว ในเขต กรุงเทพมหานคร โดยวิธี LAT	พบว่า แมว ให้ผลบวก 65 ตัว สุนัข ให้ผลบวก 40 ตัว	สถาพร และคณะ
พ.ศ.2551	การศึกษาปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค Toxoplasmosis ในโคนมเขตภาค ตะวันตก จำนวน 300 ตัว 60 ฟาร์ม โดยวิธี LAT	พบว่า ให้ผลบวก 21 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุก 7%	พิพัฒน์ และคณะ
พ.ศ.2551	ศึกษาความชุกของแอนติบอดีต่อการ ติดเชื้อ <i>T. gondii</i> ในสุกรจากโรงฆ่า สัตว์ทางภาคเหนือของประเทศไทย เก็บตัวอย่างซีรัมสุกร 141 ตัวอย่าง จากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดสุโขทัย ลำพูน พิชณุโลก เชียงใหม่ และ เชียงราย โดยวิธี LAT	พบว่า ให้ผลบวก 11 ตัวอย่าง คิดเป็นความชุก 7.8%	สมักร และคณะ

2.9 ความหมายของ ความชุก (prevalence)

ภาวิน ผดุงเทศ (2550) ให้ความหมายของความชุกว่าเป็นสัดส่วนของสัตว์ป่วยในประชากรที่มีความเสี่ยงที่จะเกิดโรค ซึ่งสัดส่วนดังกล่าวสามารถใช้ประโยชน์เพื่อประมาณจำนวนสัตว์ที่มีอาการป่วยอยู่ทั้งหมด เพื่อการจัดการ ออกแบบการศึกษาวิจัย การควบคุมโรคในระยะยาว และการประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบ นอกจากนี้ ความชุกยังมีค่าเท่ากับความเสี่ยงที่จะเป็นสัตว์ตัวหนึ่ง ที่ถูกเลือกโดยการสุ่มจากประชากรที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคจะป่วยเป็นโรคอยู่ ระดับความชุกขึ้นอยู่กับระยะเวลาป่วยของสัตว์ตัวนั้น จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาสาเหตุของโรค แต่เหมาะสำหรับการประเมินผลของมาตรการจัดการสุขภาพในฝูงสัตว์ ความชุกยังสามารถใช้ในการศึกษาโรคที่ไม่สามารถระบุเวลาเริ่มต้นของการป่วยได้ โดยเฉพาะโรคที่เป็นมาตั้งแต่แรกเกิด (congenital disease) จะทำได้เฉพาะสัตว์ที่แสดงอาการป่วยแล้วเท่านั้น

ความชุก อาจแบ่งได้ 2 แบบ คือ

1. Point Prevalence คือ สัดส่วนของสัตว์ป่วย ณ จุดเวลาหนึ่ง
2. Period Prevalence คือ สัดส่วนของสัตว์ป่วยในช่วงเวลาหนึ่ง

ความชุก = จำนวนสัตว์ป่วย/จำนวนสัตว์ทั้งหมด

การกำหนดจำนวนตัวอย่าง สำหรับการสำรวจความชุกของโรคหรือลักษณะประชากร อาจดำเนินการได้ 2 ระดับขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการศึกษา ได้แก่

1. การสำรวจความชุกของโรคในระดับตัวสัตว์ (animal level prevalence) คือการใช้จำนวนตัวสัตว์ที่ป่วยหารด้วยจำนวนสัตว์ทั้งหมดในประชากรเป้าหมายซึ่งอาจหมายถึงจำนวนสัตว์ทั้งหมดในฟาร์ม หมู่บ้าน หรือประเทศ

2. ความชุกของโรคในระดับฟาร์ม (farm level prevalence) คือการใช้จำนวนฟาร์มหรือหน่วยอื่น ๆ อาทิ หมู่บ้าน ตำบล ที่พบสัตว์ป่วยหารด้วยจำนวนฟาร์มหรือหน่วยอื่น ทั้งหมดที่ทำการศึกษา ทั้งนี้ในแต่ละฟาร์มหรือหน่วยอื่นๆ ที่พบสัตว์ป่วย หมายถึงมีความชุกระดับตัวสัตว์ภายในฟาร์มหรือหน่วยอื่น ๆ (within farm prevalence) นั้น มากกว่า 0%ขึ้นไป หรือตรวจพบสัตว์ป่วยตั้งแต่ 1 ตัวขึ้นไป การคำนวณจำนวนตัวอย่างสำหรับความชุกระดับตัวสัตว์หรือระดับฟาร์มนั้น ใช้วิธีการหรือสูตรสำหรับคำนวณเหมือนกัน แตกต่างกันเพียงหน่วยที่ทำการศึกษา อย่างไรก็ตาม การสำรวจความชุกในระดับฟาร์ม นั้น จะต้องทำการคำนวณจำนวนตัวอย่างที่จะตรวจในแต่ละฟาร์มหรือหน่วยอื่นๆ ให้เพียงพอสำหรับการตรวจหาโรคในฟาร์มหรือหน่วยอื่น ๆ ด้วย

ตัวอย่าง

1. ในฟาร์มโคนมที่มีโคนม 600 ตัว ที่ความชุกของโรคในฟาร์มประมาณ 90 % หากต้องการสำรวจความชุกระดับตัวสัตว์ภายในฟาร์มที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และความคลาดเคลื่อนจากความชุกจริงไม่เกิน 5% จะต้องใช้ตัวอย่างจำนวน 113 ตัว แต่หากงบประมาณเพียงพอสำหรับการตรวจตัวอย่างเพียง 20 ตัว ความชุกที่วัดได้อาจมีความคลาดเคลื่อนจากความชุกจริง 12.9%

2. ในฟาร์มโคนมที่มีโคนม 600 ตัว ที่ความชุกของโรคในฟาร์มประมาณ 90 % หากต้องการตรวจหาโรคภายในฟาร์มที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จะต้องใช้ตัวอย่างจำนวน 2 ตัว จึงจะสามารถตรวจพบโคนมป่วยอย่างน้อย 1 ตัว แต่หากงบประมาณเพียงพอสำหรับการตรวจตัวอย่างเพียง 1 ตัว ในฟาร์ม ระดับความเชื่อมั่นที่จะตรวจพบโคนมในฟาร์มจะลดลงเหลือเพียง 80.5%

3. ในจังหวัดเชียงรายมีฟาร์มโคนม ประมาณ 5,000 ฟาร์ม ที่ความชุกของโรคระดับฟาร์มประมาณ 10 % หากต้องการสำรวจความชุกของโรคระดับฟาร์มในจังหวัดเชียงรายที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และความคลาดเคลื่อนจากความชุกจริงไม่เกิน 5% จะต้องใช้ตัวอย่างจำนวน 139 ฟาร์ม แต่หากงบประมาณเพียงพอสำหรับการตรวจตัวอย่างเพียง 100 ฟาร์ม ความชุกที่วัดได้อาจมีความคลาดเคลื่อนจากความชุกจริง 5.8 % ทั้งนี้ในแต่ละฟาร์มควรเก็บตัวอย่างจากโคนมอย่างน้อย 2 ตัว หากความชุกในฟาร์มเท่ากับ 90 % รวมจำนวนตัวอย่างที่ต้องตรวจทั้งสิ้น 139×2 เท่ากับ 278 ตัวอย่าง

4. ในจังหวัดเชียงรายมีโคนม รวมทั้งหมดประมาณ 75,000 ตัว ที่ความชุกของโรคในประชากร ประมาณ 90 % หากต้องการสำรวจความชุกระดับตัวสัตว์ในจังหวัดเชียงราย ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และความคลาดเคลื่อนจากความชุกจริงไม่เกิน 5% จะต้องใช้ตัวอย่างจำนวน 139 ตัว แต่หากงบประมาณเพียงพอสำหรับการตรวจตัวอย่างเพียง 100 ตัว ความชุกที่วัดได้อาจมีความคลาดเคลื่อนจากความชุกจริง 5.4%

จากตัวอย่างจะเห็นได้ว่าจำนวนตัวอย่าง สำหรับการสำรวจความชุกของโรคที่มีวัตถุประสงค์ต่างกันนั้นไม่เท่ากัน ผู้ศึกษาจึงควรกำหนดวัตถุประสงค์ของการศึกษาเพียงแบบใดแบบหนึ่ง เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยโรค แต่อย่างไรก็ตาม การสรุปผลการศึกษาโดยใช้จำนวนตัวอย่างที่ไม่เพียงพอ อาจนำไปสู่ความคลาดเคลื่อนของผลการศึกษาจากความจริง (Internal validity) ทำให้ผลการศึกษานำไปเชื่อถือหรือไม่เป็นจริง เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในประชากร เช่นจำนวนตัวอย่าง สำหรับการตรวจหาโรคในฟาร์มจะน้อยกว่าจำนวนตัวอย่างสำหรับสำรวจความชุกของโรคมก ดังนั้น หากใช้จำนวนตัวอย่างสำหรับตรวจหาโรคในฟาร์มในการประมาณความชุกของโรคจะได้ค่าความชุกที่คลาดเคลื่อนจากความจริงมาก นอกจากนี้ ในการสำรวจความชุกของโรคระดับฟาร์ม นั้นจะต้องเก็บตัวอย่างจากแต่ละฟาร์มให้เพียงพอสำหรับการตรวจหาโรคในฟาร์มด้วย

วิธีเลือกตัวอย่างสำหรับการสำรวจโรค ในการสำรวจความชุกของโรค ควรใช้วิธีการเลือกตัวอย่างแบบที่สามารถคำนวณความน่าจะเป็นของการถูกเลือกได้ (probability sampling) ทั้งนี้อาจเลือกใช้วิธีการเลือกแบบใดแบบหนึ่งขึ้นอยู่กับความเป็นไปได้ในการเก็บตัวอย่างและเทคนิคการเก็บรักษาและการตรวจตัวอย่าง เช่น การสุ่มอย่างง่าย (simple random sampling) อาจได้ตัวแทนที่ดีของประชากร แต่อาจต้องสูญเสียเวลาในการขนส่งตัวอย่างมาก ทำให้ได้ผลการตรวจที่ไม่น่าเชื่อถือในภายหลัง การเลือกตัวอย่างแบบกลุ่ม (cluster sampling) อาจดำเนินการได้สะดวกเนื่องจากสามารถเก็บตัวอย่างจำนวนมากจากแหล่งเดียวกัน แต่ตัวอย่างที่ได้อาจมีลักษณะเหมือนกันมากกว่าประชากรทั่วไป ทำให้ค่า Standard Error (SE) ที่แสดงความหลากหลายของหน่วยศึกษาในประชากรต่ำกว่าความเป็นจริง ส่งผลให้ค่าประมาณหรือผลการทดสอบสมมติฐานมีความถูกต้องตามความจริง (validity) ต่ำ



บทที่ 3

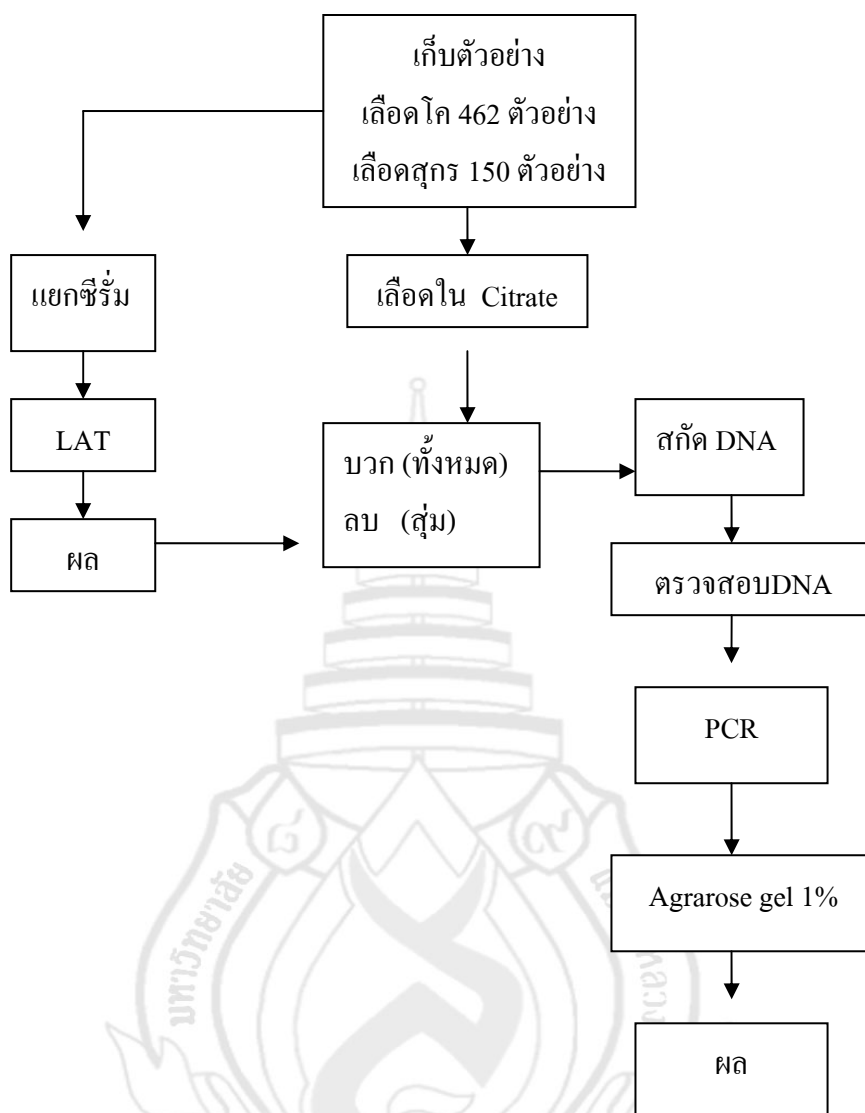
วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและวิธีการ

3.1 ตัวอย่างสัตว์

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเลือดโคนม 9 อำเภอ ในเขตจังหวัดเชียงราย ดังนี้ อำเภอเมือง 80 ตัว อำเภอแม่ลาว จำนวน 30 ตัว อำเภอพาน จำนวน 65 ตัว อำเภอเทิง จำนวน 100 ตัว อำเภอพญาเม็งราย จำนวน 28 ตัว อำเภอขุนตาล จำนวน 37 ตัว อำเภอแม่สาย จำนวน 52 ตัว อำเภอแม่ฟ้าหลวง จำนวน 35 ตัว และอำเภอแม่จัน จำนวน 35 ตัว รวมทั้งสิ้น 462 ตัว และใช้ตัวอย่างเลือดสุกร 2 อำเภอ ดังนี้ อำเภอแม่ฟ้าหลวง จำนวน 67 ตัว อำเภอแม่จัน จำนวน 83 ตัว รวมทั้งสิ้น 150 ตัว

3.2 วิธีการทดลอง

การดำเนินการตามขั้นตอน ภาพที่ 3.1 โดยการเก็บตัวอย่างเลือดโคนมและสุกรตามฟาร์มในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงโคนม โดยวิธี aseptic technique โดยใช้ไซริงค์ขนาด 10 มิลลิลิตรติดเข็มเบอร์ 18 ยาว 1 นิ้ว ใช้เจาะดูดเก็บเลือดจากเส้นเลือด jugular vein ของโคนม ตัวละประมาณ 7.5 มิลลิลิตร และใช้ไซริงค์ขนาด 10 มิลลิลิตรติดเข็มเบอร์ 18 ยาว 1.5 นิ้ว ใช้เจาะดูดเก็บเลือดจากเส้นเลือด jugular vein ของสุกร ตัวละประมาณ 7.5 มิลลิลิตร แบ่งตัวอย่างเลือด ใส่ลงในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด Citrate จำนวน 2.5 มิลลิลิตร เลือดที่เหลือใส่ลงในหลอดเก็บเลือดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัว นำตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดใส่ไว้ในกระติกที่มีน้ำแข็ง จากนั้นทำการส่งตัวอย่างเลือดที่ได้แช่เย็นในกระติกน้ำแข็งเพื่อส่งต่อมาเก็บไว้ยังภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ เพื่อทำการทดสอบทางห้องปฏิบัติการต่อไป โดยเก็บไว้ที่ -40 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3.1 แผนผังขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

3.3 Latex Agglutination Test

นำเลือดที่เก็บไว้ในหลอดทดลองที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวมาปั่นแยกเอาซีรัม โดยนำหลอดเลือดออกจากตู้แช่ - 40 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เพื่อให้เกิดการละลาย จากนั้นนำหลอดเลือดที่ละลายดีแล้วไปใส่ลงในเครื่อง Centrifuge ใช้ความเร็วรอบที่ 500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนที่เป็นซีรัมที่แยกได้หรือส่วนที่อยู่ด้านบน มาเก็บไว้ใน microtube ขนาด 2.5 มิลลิลิตร เพื่อนำมาใช้ตรวจหาการติดเชื้อด้วยวิธี LAT หรือนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้และนำมาทดสอบในภายหลัง ซึ่งการใช้วิธี Latex agglutination test (TOXOCHECK-

MT, Eiken[®], Japan) เพื่อหา antibody ต่อการติดเชื้อ *T. gondii* ดำเนินการดังนี้ นำตัวอย่างซีรัมที่แช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง เตรียม 96 – well microplate โดยแต่ละตัวอย่างของซีรัมจะทำซ้ำ (duplicate) ใช้ micropipette คูด latex agglutination buffer (Eiken[®], Japan) ลงไปในแถว H 75 μ l และหยด buffer ลงไปในแถว C, D, E, และ F หลุมละ 25 μ l โดยไม่ต้องหยด buffer ลงในหลุม G หยดซีรัมตัวอย่างลงไปในหลุม H 5 μ l และทำการผสมให้เข้ากันจะได้ความเข้มข้นของซีรัมเท่ากับ 1:16 ซึ่งหลุม H จะใช้เป็น stock solution คูดสารละลายที่ผสมในข้อ 4 จากหลุม H มา 25 μ l ใส่ลงไปในหลุม G ทำให้หลุม G มีความเข้มข้นของซีรัมเท่ากับ 1:16 ด้วย คูดสารละลายที่ผสมในข้อ 4 จากหลุม H มา 25 μ l ใส่ลงไปในหลุม F ทำให้หลุม F ที่มีสารละลายอยู่แล้ว 25 μ l รวมเป็น 50 μ l ทำให้ได้ความเข้มข้นของซีรัมเท่ากับ 1:32 คูดสารละลายจากหลุม F มา 25 μ l มาใส่ในหลุม E ที่มีสารละลายอยู่ 25 μ l รวมเป็น 50 μ l ทำให้ได้ความเข้มข้นของซีรัมเท่ากับ 1:64 คูดสารละลายจากหลุม E มา 25 μ l มาใส่ในหลุม D ที่มีสารละลายอยู่ 25 μ l รวมเป็น 50 μ l ทำให้ได้ความเข้มข้นของซีรัมเท่ากับ 1:128 คูดสารละลายจากหลุม D มา 25 μ l มาใส่ในหลุม E ที่มีสารละลายอยู่ 25 μ l รวมเป็น 50 μ l ทำให้ได้ความเข้มข้นของซีรัมเท่ากับ 1:256 และทำการคูดจากหลุม E ออกมา 25 μ l ทำให้หลุม E มีสารละลายอยู่ 25 μ l ดังเดิม หยด suspension ของ *T. gondii* antigen 25 μ l ลงทุกหลุมยกเว้นแถว H เพื่อดูผลของซีรัมที่ทดสอบ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน โดยต้องทำการปิดฝา plate เพื่อป้องกันการระเหย และอ่านผลในวันรุ่งขึ้นอ่านผลโดยดูลักษณะของ latex particle ถ้าจับตัวกันแน่นและมีลักษณะเป็นวงกลมเล็ก ให้ถือว่าเป็นผลบวก (อาจดูเปรียบเทียบกับ negative control serum) ถ้า latex particle ในหลุม มีการจับตัวกันอย่างหลวม ๆ กระจายตัวเล็กน้อยถึงมาก ให้อ่านผล +1 ถึง +4 เกณฑ์การตัดสินใจในการอ่านผลแอนติบอดีไคเตอร์ ให้ดู serum diluent สุดท้ายที่ให้ผลบวก ในการทดลองนี้ถ้าแอนติบอดีไคเตอร์มากกว่าหรือเท่ากับ 1:64 ถือว่าให้ผลบวก แต่ถ้าต่ำกว่า 1:64 ถือว่าเป็นลบ

3.4 การสกัด DNA

ในการทดลองจะใช้วิธีสกัด DNA โดยวิธี Phenol Chloroform 1:1 (Boom et al., 1990) โดยดำเนินการดังนี้ ผสมตัวอย่างเลือดที่เก็บในหลอดป้องกันการแข็งตัวใน Citrate ขนาด 2.5 มิลลิลิตร 3.2% (0.015 Molar, Sodium Citrate, Fushino[®], บริษัท ควอลิฟาย กรุป จำกัด) จำนวน 100 μ l กับ D-solution จำนวน 500 μ l เขย่านาน 5 นาที เติม Chloroform 150 μ l และ Phenol 150 μ l เขย่านาน 10 นาที นำไป Centrifuge ที่ 13000 รอบ นาน 5 นาที คูดส่วนใสส่วนบนซึ่งมี DNA อยู่ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 ml นำไปเติม Chloroform 150 μ l และ Phenol 150 μ l เขย่านาน 10 นาที นำไป

Centrifuge ที่ 13000 รอบ นาน 5 นาที ดูดส่วนใสส่วนบนซึ่งมี DNA อยู่ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 ml เติม Chloroform 150 μ l และ Phenol 150 μ l เขย่านาน 10 นาที นำไป Centrifuge ที่ 13000 รอบ นาน 5 นาที ดูดส่วนใสส่วนบนซึ่งมี DNA จำนวน 400 μ l อยู่ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 ml เติม Absolute EtOH 1000 μ l เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำไป Centrifuge ที่ 13000 รอบ นาน 10 นาที DNA อยู่ด้านล่างดูดสารละลายด้านบนทิ้งไประวัง DNA ที่อยู่ด้านล่างตกออกไปด้วย เติม 75% ETOH จำนวน 700 μ l เพื่อให้ไปละลายเกลือหรือสารที่ตกค้างออกจากตะกอนนานครั้งละ 5 นาที นำไป Centrifuge ที่ 13000 รอบ นาน 5 นาที เติม 75% ETOH จำนวน 700 μ l เพื่อให้ไปละลายเกลือหรือสารที่ตกค้างออกจากตะกอนนานครั้งละ 5 นาที นำไป Centrifuge ที่ 13000 รอบ นาน 5 นาที ดูดสารละลายออกแล้ว Air dry DNA pellet ประมาณ 2 ชั่วโมง เติม TE buffer pH 8.0 จำนวน 35 μ l เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ทำ PCR ต่อไป

3.5 การเตรียม D – solution

สารเคมีที่ใช้ Guanidine thiocyanate, Sodium citrate, Sodium lauryl sarcosine การเตรียม D – solution จำนวน 250 มิลลิลิตร ซึ่ง Guanidine thiocyanate จำนวน 125 กรัม ใส่บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำ (DW) จำนวน 146.5 มิลลิลิตร แล้วใส่ magnetic bar stirrer ที่อุณหภูมิ ประมาณ 65 – 70 องศาเซลเซียส จนกว่าสารเคมีจะละลาย เมื่อสารเคมีละลายเป็นสารละลายใส ปั่นต่อไปสักครู่ แล้วจึงเติม 0.75 M sodium citrate จำนวน 8.8 มิลลิลิตร (pH 7.0) stir ต่อสักครู่ (10 – 20 วินาที) ใช้ pipett ดูดสาร sodium citrate แล้วค่อย ๆ หยดลงในบีกเกอร์ที่ตั้งบน stirrer ไม่ต้องปิด stirrer ใส่ 10% Sodium lauryl sarcosine จำนวน 13.2 มิลลิลิตร (ใส่เหมือน Sodium citrate) จากนั้น stir ต่อประมาณ 5 นาที เทสารละลายใส่ขวดปรับปริมาตรสาร (250 / 500 / 1000 มิลลิลิตร) แล้วเติมน้ำ (Deionized) ให้ได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เอาฝาขวด Adjust สารปิดแล้ว check ขวดเบาๆ ให้สารละลายเข้ากัน เทสาร D – solution จากขวด Adjust ที่ปรับปริมาตรได้ 250 มิลลิลิตร มา stir บน stirrer อีกประมาณ 3 – 5 นาที เทสาร D – solution ที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยในขวดที่ห่อฟอยด์เพื่อป้องกันการถูกแสงเก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ ก่อนใช้ต้องเขย่าขวดก่อน

3.6 การเพิ่มขึ้น DNA ของ genomic DNA โดย PCR

การใช้วิธีตรวจสอบโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) ดำเนินการดังนี้ นำ DNA ที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพนำมาเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยกำหนด PCR condition ดังนี้ โดยใช้ Primer TOX4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) และ TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) ที่มีนิวคลีโอไทด์คู่สมกับ DNA แม่แบบ เพิ่มจำนวนในเครื่อง Thermocycler, Bio-Rad ยี่ห้อ MyCycler™ Thermal Cycler PCR สำหรับเชื้อ *T. gondii* ส่วนผสม ประกอบด้วย 14.2 µl dH₂O, 1 µl PCR buffer (50 mmol KCl, 10 mmol Tris-HCl), 1 µl dNTPs (Pharmacia Biotech) 60 mM Tris-HCl (pH 9.0), 15 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 0.8 µl Primer TOX4 0.5 µM, 0.8 µl Primer TOX5 0.5 µM, 0.2 µl TagDNA polymerase, (Invitrogen-Brazil) 1 unit, 2 µl (1 µg) DNA template รวมปริมาตรทั้งสิ้น 20 µl ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมให้ดำเนินการตามลำดับ โดยเริ่ม DNA synthesis 1 รอบที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้น PCR amplification 35 รอบ Denaturation 1 รอบ: 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing 1 รอบ: 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Extension 1 รอบ: 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สุดท้าย Final extension 1 รอบที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ผลผลิต PCR ที่ได้มาทำ Electrophoresis ใน 1% agarose gel ทำ Stain ด้วย Ethidium bromide 0.01% นาน 5 นาที และนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด นานประมาณ 15 นาที นำ Gel ที่ได้มาอ่านผลภายใต้ Ultraviolet จะเกิด band ขนาด 529 bp ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์

ภาพที่ 3.2

```
CTGCAGGGAG GAAGACGAAA GTTGTTTTTT TATTTTTTTT TCTTTTGTG TTTCTGATTT
TTGTTTTTTT TGA CTGGGC CCAGCTGCGT CTGTCGGGAT GAGACCGCGG AGCCGAAGTG
CGTTTTCTTT TTTTGACTTT TTTTGTGTTT TTCACAGGCA AGCTCGCCTG TGCTTGGAGC
CACAGAAGGG ACAGAAGTCG AAGGGGACTA CAGACGCGAT GCCGCTCCTC CAGCCGTCTT
GGAGGAGAGA TATCAGGACT GTAGATGAAG CCGAGGGTGA GGATGAGGGG GTGGCGTGGT
TGGGAAGCGA CGAGAGTCGG AGAGGGAGAA GATGTTTCCG GCTTGGCTGC TTTTCCTGGA
GGGTGGAAAA AGAGACACCG GAATGCGATC CAGACGAGAC GACGCTTTCC TCGTGGTGAT
GGCGGAGAGA ATTGAAGAGT GGAGAAGAGG GCGAGGGAGA CAGAGTCGGA GGCTTGGACG
AAGGGAGGAG GAGGGGTAGG AGAGGAATCC AGATGCACTG TGTCTGCAG
```

ภาพที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *T. gondii* ขนาด 529 bp ที่ได้จากการทำ PCR

3.7 Gel electrophoresis

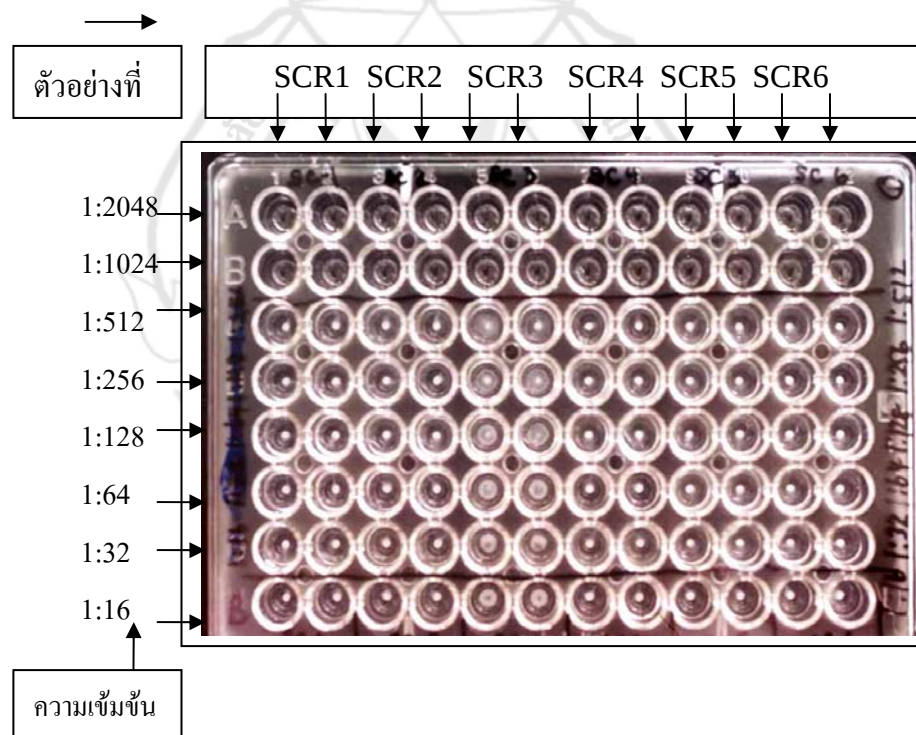
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ใช้สำหรับ agarose gel electrophoresis มีดังนี้ Gel chamber, Power supply, Gel Documentation System, Bio-Rad Microwave ยี่ห้อ LG เครื่องซัง UV transilluminator จำนวน 1 เครื่อง Pure™ Agarose, Bio – Rad, loading dye, Bio-Rad Tris-acetate (TAE) Bio-Rad, Ethidium bromide, Invitrogen การเตรียมเจล agarose 1% ใน 6XTAE ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปผสมกับ Deionized จำนวน 9 เท่าหรือ 450 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรทั้งหมด 500 มิลลิลิตร แบ่งมา 100 มิลลิลิตร มาผสมใน agarose 100 มิลลิกรัม ที่เตรียมไว้ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปอุ่นในตู้ไมโครเวฟ ยี่ห้อ LG จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน วางทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิ ลดลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเทลงในพิมพ์สำหรับเตรียมเจลแล้วเสียบ comb เพื่อให้เกิด หลุมสำหรับใส่สารตัวอย่างทิ้งไว้จน agarose แข็งตัว นำไปใส่ในชุด electrophoresis เดิม 1 X TAE จนท่วมผิวเจลนำ comb ออกจากเจล นำตัวอย่างจาก PCR product 3 ไมโครลิตร เดิม 6X loading dye จำนวน 2 μ l และน้ำกลั่น 1 μ l ผสมรวมกัน แล้วนำไปหยอดในหลุมเจล ทำการแยกโดยใช้กระแส ไฟฟ้า 100 โวลต์ผ่านเจลประมาณ 35-40 นาที จากนั้นนำเจลที่ได้ไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide (0.01 mg/ml) ประมาณ 5 – 15 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่น 15 นาที เพื่อกำจัด ethidium bromide ส่วนเกินออก จากนั้นดูแถบ DNA ที่ปรากฏภายใต้แสง UV

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์การทดลอง

4.1 การแยกซีรัมจากเลือดโคนมและสุกร

นำเลือด โคนมและสุกร ที่เก็บในหลอดเก็บเลือดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัว มาปั่นแยกซีรัมที่อยู่ชั้นบน นำออกมาใส่ไว้ในหลอด Microtube ขนาด 2.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดลองในการตรวจหาเชื้อ *T. gondii* โดยวิธี LAT ซึ่งได้ผล ภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ผลให้เห็นการเกิด agglutination ในแต่ละระดับโดยวิธี LAT

จากภาพจะเห็นว่า เกิด Latex particles ที่ช่องที่ 5 และ 6 ซึ่งเป็นช่องตัวอย่าง SCR 3 อธิบายผลได้ว่า SCR 3 พบปรากฏการแตกกระจายของ latex particle ในหลุมทั้งสองช่อง ในระดับ บวกสาม มีการจับตัวกันอย่างหลวมๆ กระจายตัวปานกลาง และเกิดการกระจายสุดท้ายที่ระดับความเข้มข้น 1 : 512 ถือว่า SCR 3 ให้ผลบวกที่ระดับ 1: 512 ส่วนช่องอื่น ๆ ไม่พบว่ามี การจับตัวกันในแต่ละระดับความเข้มข้น จึงถือว่าให้ผลลบ สำหรับการตรวจตัวอย่างอื่นๆ ปรากฏผลตรวจซีรัมจากตัวอย่างเลือดโคนม ให้ผลดังตารางที่ 4.1 และผลตรวจซีรัมจากตัวอย่างเลือดสุกร ให้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจหาเชื้อ *T. gondii* ในโคนมในจังหวัดเชียงราย โดยวิธี LAT

อำเภอ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนที่ให้ผลบวก 1: 64 ขึ้นไป	เปอร์เซ็นต์ความชุก
เมือง	80	11	13.75
แม่ลาว	30	0	0.00
พาน	65	3	4.60
เทิง	100	9	9.00
พญาเม็งราย	28	0	0.00
ขุนตาล	37	3	8.10
แม่สาย	52	3	5.76
แม่ฟ้าหลวง	35	6	17.14
แม่จัน	35	7	20.00
รวม 9 อำเภอ	462	42	9.10

จากตารางที่ 4.1 พบว่าโคนมในเขตอำเภอแม่จันมีความชุกมากที่สุด คือ ร้อยละ 20 รองลงมา ได้แก่อำเภอแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง อำเภอเทิง อำเภอขุนตาล อำเภอแม่สาย และอำเภอพาน มีความชุก ร้อยละ 17.14, 13.75, 9, 8.1, 5.76 และ 4.6 ตามลำดับ ส่วนอำเภอแม่ลาวและอำเภอพญาเม็งราย ไม่พบโรค โดยเมื่อคิดเป็นการติดเชื้อ *T.gondii* ในเขตจังหวัดเชียงราย ความชุกเฉลี่ย ร้อยละ 9.1

จากผลการทดลองโดยวิธี LAT ความชุกของเชื้อ โรค *T.gondii* ในโคนม จำนวน 9 อำเภอ จำนวนโคนม 462 ตัว พบความชุกของโรคร้อยละ 9.1 ซึ่งมากกว่ารายงานของพิพัฒน์ อรุณวิภาส, เทวินทร์ อินปิ่นแก้ว, และ สถาพร จิตตपालพงศ์ (2551) ที่พบความชุกของโรคในโคนม 60 ฟาร์ม

โคนม 300 ตัวในเขตภาคตะวันตกที่ให้ผลบวกจำนวน 21 ตัว คิดเป็นความชุก ร้อยละ 7 และรายงานของ Suteeraparp et al. (2542) ที่พบไคเตอร์ของเชื้อ *T.gondii* ในโคนมในเขตภาคกลางในโคนม 119 ตัว ที่ให้ผลบวก 4 ตัว คิดเป็นความชุกร้อยละ 3.4 จะเห็นได้ว่าการศึกษาในแต่ละพื้นที่ที่แตกต่างกัน ช่วงระยะเวลาที่ศึกษาที่แตกต่างกัน จนถึงปัจจุบัน จะพบว่า ความชุกของโรค Toxoplasmosis ในโคนมสูงขึ้น

ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจหาเชื้อ *T. gondii* ในสุกรในจังหวัดเชียงรายโดยวิธี LAT

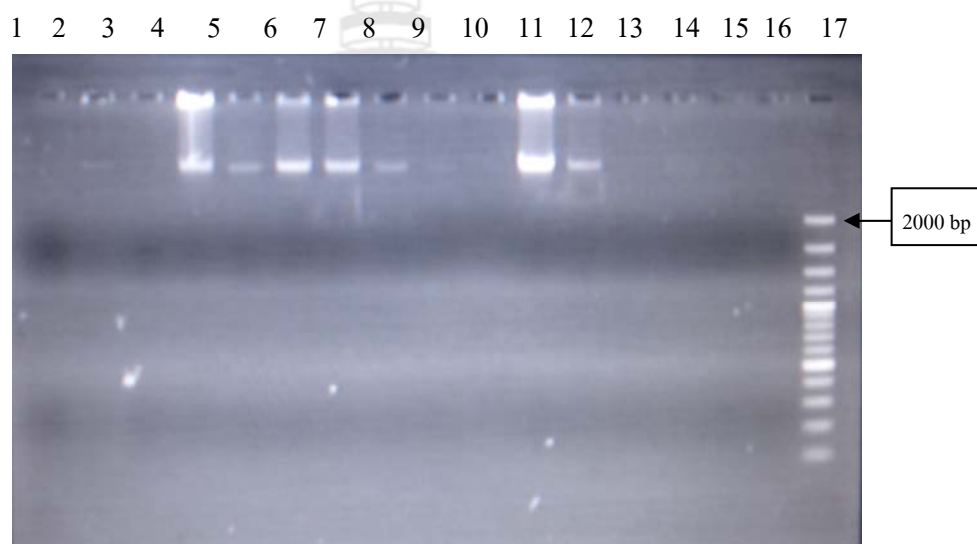
อำเภอ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนที่ให้ผลบวก 1: 64 ขึ้นไป	เปอร์เซ็นต์ความชุก
แม่ฟ้าหลวง	67	1	1.49
แม่จัน	83	18	21.68
รวม 2 อำเภอ	150	19	12.66

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสุกรในอำเภอแม่จันมีความชุกมากที่สุด คือร้อยละ 21.68 รองลงมาอำเภอแม่ฟ้าหลวง มีความชุกร้อยละ 1.49 โดยมีความชุกเฉลี่ยทั้งหมดร้อยละ 12.66

จากการทดลองโดยวิธี LAT ความชุกของเชื้อ *T.gondii* ในสุกร จำนวน 2 อำเภอ จำนวนสุกร 150 ตัว ให้ผลบวกต่อเชื้อ *T.gondii* จำนวน 19 ตัว คิดเป็นความชุกของโรคร้อยละ 12.66 ซึ่งมากกว่ารายงานของ เลิศรัก และคณะ, 2547 ที่พบความชุกของโรคร้อยละ 7 โดยวิธี LAT จะเห็นว่าในแต่ละพื้นที่ที่แตกต่างกันและระยะเวลาที่ศึกษาแตกต่างกันพบว่าความชุกของเชื้อ *T.gondii* ในสุกรสูงขึ้น

4.2 การสกัด DNA

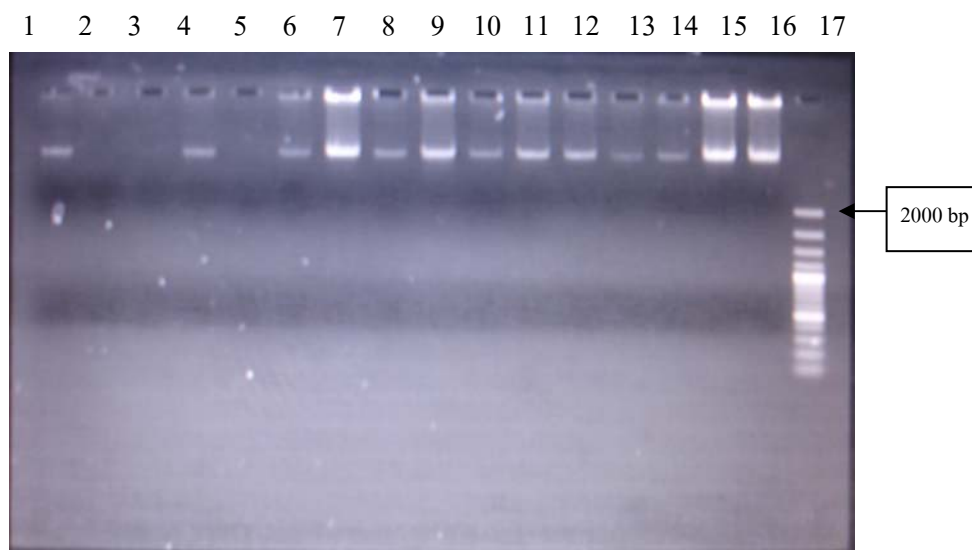
หลังจากสกัด DNA จากเลือดของโคนมและสุกรของจังหวัดเชียงราย ด้วยวิธี Phenol Chloroform และนำ DNA ที่ได้ไปทำ gel electrophoresis จะปรากฏแถบสัญญาณของ DNA ของโคนม ดังแสดงในภาพที่ 4.2 และ ภาพที่ 4.3 และเลือดสุกร ดังแสดงในภาพที่ 4.4 และ ภาพที่ 4.5 พบว่า DNA ที่สกัดได้ปรากฏเป็นแถบ DNA ขนาดมากกว่า 2 กิโลเบส และถือได้ว่ามี DNA อยู่ในเลือดที่สกัด เพื่อที่จะนำ DNA ไปใช้ในการทำ PCR ได้



ภาพที่ 4.2 ผลการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดโคนม

จากภาพที่ 4.2 ผลการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดโคนมโดย ช่องที่ 1 CR1 ช่องที่ 2 CR2 ช่องที่ 3 CR5 ช่องที่ 4 CR7 ช่องที่ 5 CR8 ช่องที่ 6 CR11 ช่องที่ 7 CR16 ช่องที่ 8 CR17 ช่องที่ 9 CR18 ช่องที่ 10 CR19 ช่องที่ 11 CR32 ช่องที่ 12 CR35 ช่องที่ 13 CR39 ช่องที่ 14 CR40 ช่องที่ 15 CR42 ช่องที่ 16 CR43 ช่องที่ 17 Marker โดยจะพบว่า ช่องที่ 4, 5, 6, 7, 8, 11, และ 12 ปรากฏแถบสัญญาณขนาดของ DNA มากกว่า 2000 bp

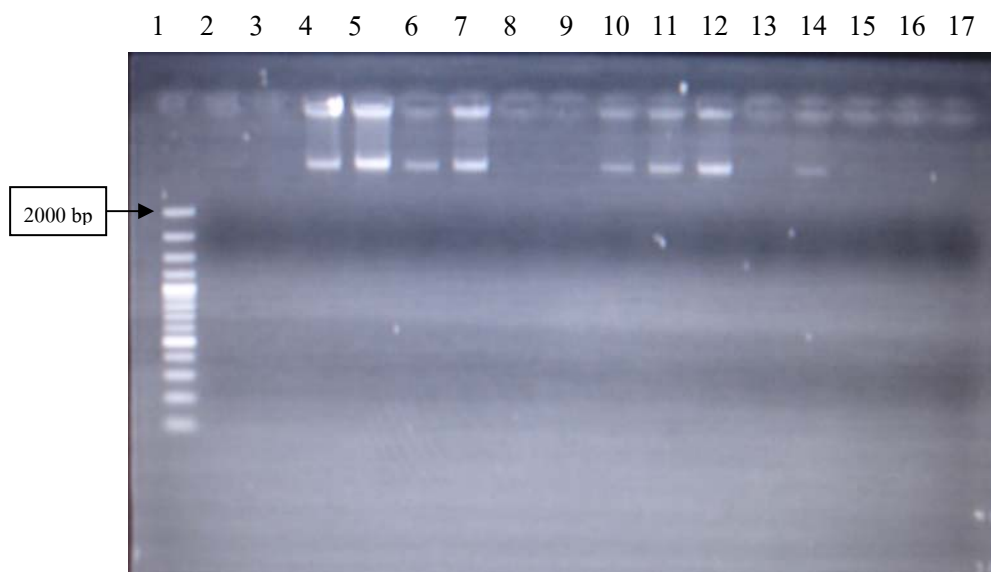
ผลที่ได้จากการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดโคนม พบว่าในบางช่องไม่ปรากฏแถบสัญญาณให้เห็น เนื่องจากปริมาณ DNA มีจำนวนน้อยมากหรืออาจมีการสูญเสียไปในระหว่างการสกัด ซึ่งในบางขั้นตอนของการสกัดต้องมีการเททิ้งสารละลาย แต่ก็ยังมีบางช่องที่มี DNA แต่มีปริมาณน้อยซึ่งไม่เพียงพอในการที่จะนำไปใช้ในการทำ PCR ได้



ภาพที่ 4.3 ผลการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดโคนม

จากภาพที่ 4.3 ผลการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดโคนมโดย ช่องที่ 1 CR41 ช่องที่ 2 CR100 ช่องที่ 3 CR220 ช่องที่ 4 CR239 ช่องที่ 5 CR240 ช่องที่ 6 CR269 ช่องที่ 7 CR290 ช่องที่ 8 CR296 ช่องที่ 9 CR297 ช่องที่ 10 CR299 ช่องที่ 11 CR302 ช่องที่ 12 CR309 ช่องที่ 13 CR320 ช่องที่ 14 CR337 ช่องที่ 15 CR341 ช่องที่ 16 CR349 ช่องที่ 17 Marker โดยจะพบว่า ช่องที่ 1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, และ 16 ปรากฏแถบสัญญาณขนาดของ DNA มากกว่า 2000 bp

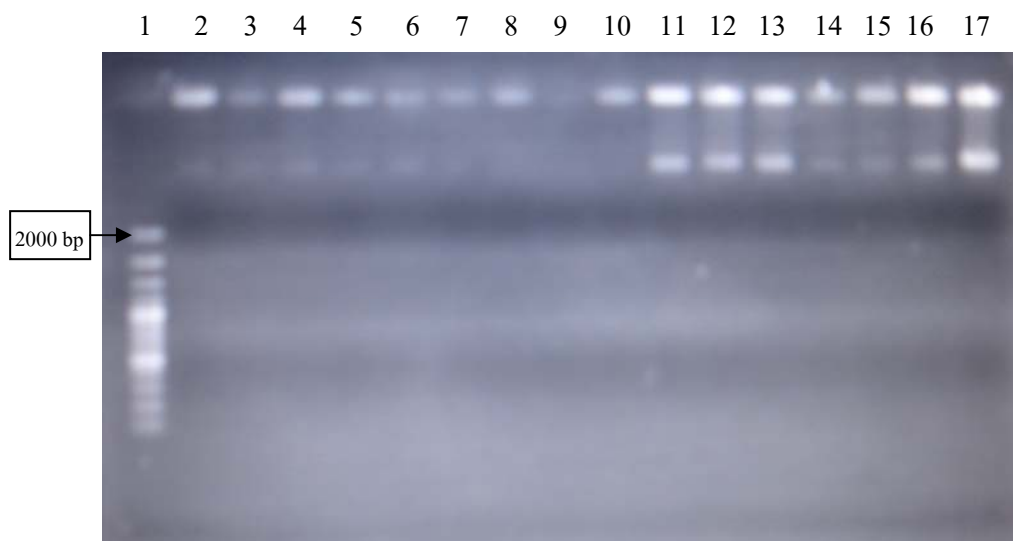
ผลที่ได้จากการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดโคนม พบว่าในหลายช่อง ปรากฏแถบสัญญาณให้เห็นอย่างชัดเจน เนื่องจากปริมาณ DNA มีจำนวนมาก แต่มีบางช่องที่ไม่ปรากฏ เนื่องจากไม่มี DNA ซึ่งอาจมีการสูญหายไปในช่วงการสกัด หรือมีการดูดทิ้งไปในบางขั้นตอนของการสกัด ดังนั้น DNA ที่ปรากฏชัดเจนนั้น สามารถนำมาเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ได้



ภาพที่ 4.4 ผลการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดสุกร

จากภาพที่ 4.4 ผลการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดสุกร โดย ช่องที่ 1 Marker ช่องที่ 2 SCR1 ช่องที่ 3 SCR2 ช่องที่ 4 SCR29 ช่องที่ 5 SCR67 ช่องที่ 6 SCR69 ช่องที่ 7 SCR72 ช่องที่ 8 SCR74 ช่องที่ 9 SCR77 ช่องที่ 10 SCR86 ช่องที่ 11 SCR124 ช่องที่ 12 SCR125 ช่องที่ 13 SCR140 ช่องที่ 14 SCR146 ช่องที่ 15 SCR147 ช่องที่ 16 SCR148 ช่องที่ 17 SCR149 โดยจะพบว่า ช่องที่ 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, และ 14 ปรากฏแถบสัญญาณขนาดของ DNA มากกว่า 2000 bp

ผลที่ได้จากการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดสุกร พบว่ามีหลายช่อง ไม่ปรากฏแถบสัญญาณให้เห็นหรือเห็นแต่ไม่ชัดเจน เนื่องจากปริมาณ DNA มี ปริมาณจํานวนน้อยหรือไม่มี DNA แต่มีบางช่องที่ปรากฏ เนื่องจากมี DNA ในปริมาณมาก DNA ที่ปรากฏชัดเจนนั้น สามารถนำมาเพิ่มปริมาณ โดยวิธี PCR ได้



ภาพที่ 4.5 ผลการตรวจ genomic DNA ที่สกัดได้จากเลือดสุกร

จากภาพที่ 4.5 ผลการตรวจ genomic DNA ที่สกัดได้จากเลือดสุกรโดย ช่องที่ 1 Marker ช่องที่ 2 SCR9 ช่องที่ 3 SCR10 ช่องที่ 4 SCR11 ช่องที่ 5 SCR12 ช่องที่ 6 SCR13 ช่องที่ 7 SCR14 ช่องที่ 8 SCR15 ช่องที่ 9 SCR16 ช่องที่ 10 SCR17 ช่องที่ 11 SCR52 ช่องที่ 12 SCR54 ช่องที่ 13 SCR55 ช่องที่ 14 SCR59 ช่องที่ 15 SCR73 ช่องที่ 16 SCR75 ช่องที่ 17 SCR76 โดยจะพบว่า ช่องที่ 11 12 13 14 15 16 ปรากฏแถบสัญญาณขนาดของ DNA มากกว่า 2000 bp

ผลที่ได้จากการสกัด DNA ที่ได้จากเลือดสุกร พบว่า มีแถบสัญญาณปรากฏในหลายช่อง แต่แถบสัญญาณที่ปรากฏให้เห็นไม่ชัดเจน เนื่องจากปริมาณ DNA มี ปริมาณน้อย หรือเนื่องจากไม่มี DNA ซึ่งอาจจะมีการสูญหายไปในช่วงสกัด เพราะมีการดูดทิ้งไปในบางขั้นตอนของการสกัด ดังนั้น DNA ที่ปรากฏชัดเจนนั้น สามารถนำมาเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ได้ต่อไป

4.3 ผลของการทำ PCR

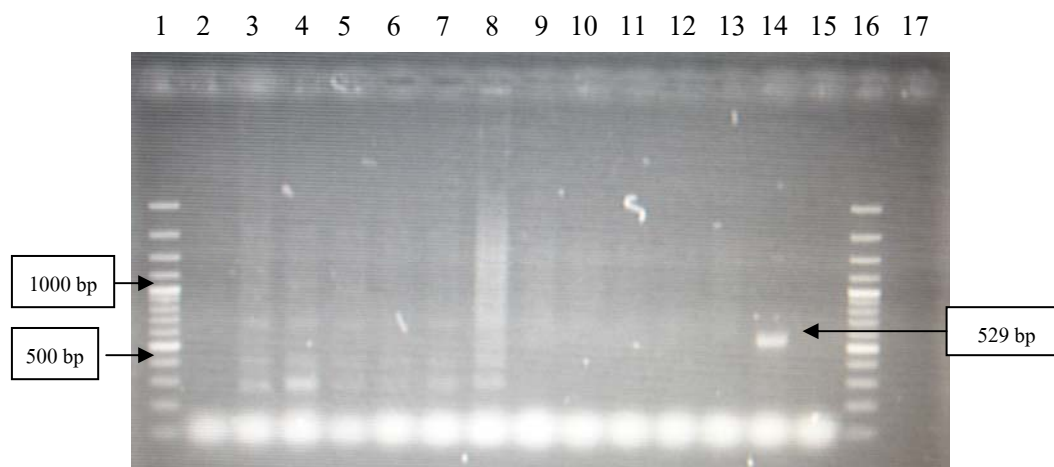
เมื่อนำ PCR product ของตัวอย่างเลือดโคนมที่ได้มาทำการ run gel ปรากฏผลดังภาพที่ 4.6 และภาพที่ 4.7 สำหรับ PCR product ของตัวอย่างเลือดสุกร ปรากฏผลดังภาพที่ 4.8 และภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.6 ผลการตรวจ DNA จากตัวอย่างเลือดโคนมด้วยเทคนิค PCR

จากภาพที่ 4.6 ผลการตรวจ DNA จากตัวอย่างเลือดโคนมด้วยเทคนิค PCR ช่องที่ 1 วางช่องที่ 2 Marker ช่องที่ 3 Negative control ช่องที่ 4 Toxo positive control (529 bp) ช่องที่ 5 CR130 ช่องที่ 6 CR80 ช่องที่ 7 CR67 ช่องที่ 8 CR44 ช่องที่ 9 CR41 ช่องที่ 10 CR35 ช่องที่ 11 CR32 ช่องที่ 12 CR17 ช่องที่ 13 CR16 ช่องที่ 14 CR11 ช่องที่ 15 CR8 ช่องที่ 16 CR7 ช่องที่ 17 Marker โดยจะพบว่าช่องที่ 4 ซึ่งเป็น Positive control จะปรากฏแถบสัญญาณที่ 529 bp ชัดเจน ส่วนในช่องอื่นไม่ปรากฏแถบสัญญาณให้เห็นแต่อย่างใด จึงให้ผลตรวจเป็นลบ

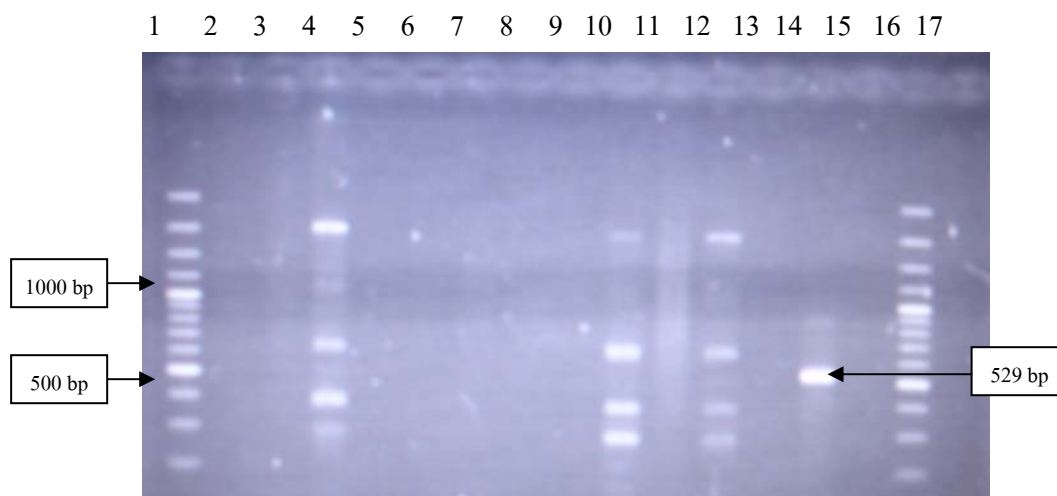
ผลที่ได้จากการทำ PCR เมื่อมีการนำ DNA ที่ได้จากเลือดโคนมที่ได้ตรวจสอบแล้วว่ามี DNA อยู่พบว่า ไม่ปรากฏแถบสัญญาณในช่องที่เป็น DNA ของตัวอย่างเลือดโคนมที่สกัดได้ และตรวจสอบแล้วว่ามี DNA อยู่แต่ไม่ปรากฏแถบสัญญาณในขนาด 529 bp ให้เห็น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DNA ของเชื้อ *T. gondii* ในเลือดที่ใช้สกัด DNA แต่อย่างใด



ภาพที่ 4.7 ผลการตรวจ DNA จากตัวอย่างเลือดโคนมด้วยเทคนิค PCR

จากภาพที่ 4.7 ผลการตรวจ DNA จากตัวอย่างเลือดโคนมด้วยเทคนิค PCR ช่องที่ 1 Marker ช่องที่ 2 CR239 ช่องที่ 3 CR269 ช่องที่ 4 CR290 ช่องที่ 5 CR296 ช่องที่ 6 CR297 ช่องที่ 7 CR299 ช่องที่ 8 CR302 ช่องที่ 9 CR309 ช่องที่ 10 CR320 ช่องที่ 11 CR337 ช่องที่ 12 CR341 ช่องที่ 13 CR349 ช่องที่ 14 Toxo positive control (529 bp) ช่องที่ 15 Toxo negative control ช่องที่ 16 Marker ช่องที่ 17 (ว่าง) โดยพบว่าช่องที่ 14 ซึ่งเป็น Positive control จะปรากฏแถบสัญญาณที่ 529 bp ชัดเจน ในช่องที่เหลือปรากฏแถบสัญญาณบางช่องแต่ไม่ปรากฏแถบที่ตรงกับ ช่องที่ 14 จึงให้ผลตรวจเป็นลบ

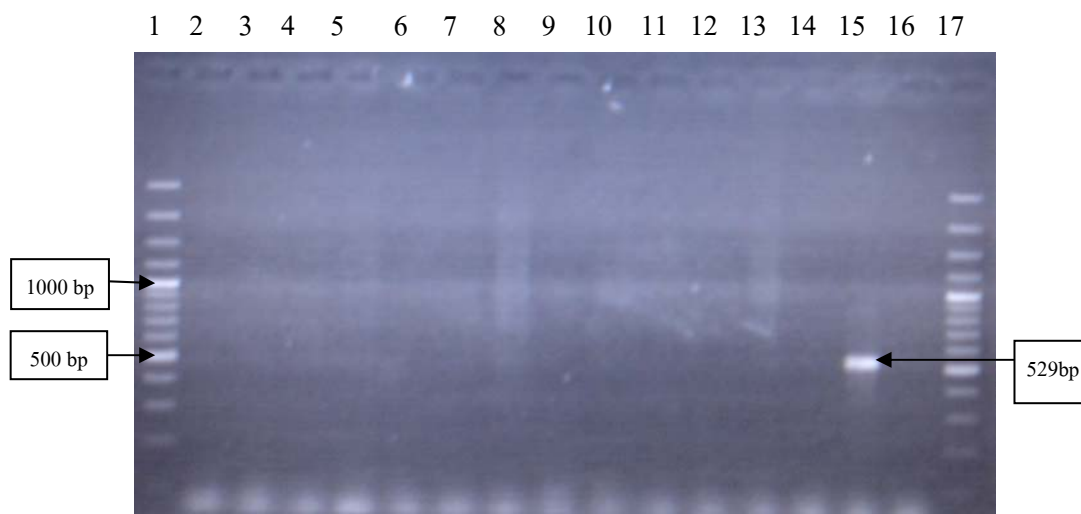
ผลที่ได้จากการทำ PCR เมื่อมีการนำ DNA ที่ได้จากเลือดโคนมที่ได้ตรวจสอบแล้วว่า มี DNA อยู่พบว่า ไม่ปรากฏแถบสัญญาณใดที่มีขนาด 529 bp ที่เป็น positive control แต่พบในบางช่องที่ปรากฏแถบสัญญาณ แต่มีขนาดไม่เท่ากับ 529 bp จึงถือว่าไม่พบสารพันธุกรรม ของโรค Toxoplasmosis



ภาพที่ 4.8 ผลการตรวจ DNA จากตัวอย่างเลือดสุกรด้วยเทคนิค PCR

จากภาพที่ 4.8 ผลการตรวจ DNA จากตัวอย่างเลือดสุกรด้วยเทคนิค PCR ช่องที่ 1 Marker ช่องที่ 2 SCR29 ช่องที่ 3 SCR52 ช่องที่ 4 SCR54 ช่องที่ 5 SCR55 ช่องที่ 6 SCR59 ช่องที่ 7 SCR67 ช่องที่ 8 SCR69 ช่องที่ 9 SCR72 ช่องที่ 10 SCR73 ช่องที่ 11 SCR75 ช่องที่ 12 SCR76 ช่องที่ 13 SCR86 ช่องที่ 14 Toxo positive control (529 bp) ช่องที่ 15 Toxo negative control ช่องที่ 16 Marker ช่องที่ 17 วาง จากรูป ช่องที่ 4, 11, 13 ปรากฏแถบสัญญาณแต่มีขนาดของแถบสัญญาณไม่ตรงกับ 529 bp จึงถือว่าไม่ใช่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *T. gondii* ส่วนช่องที่เหลือไม่ปรากฏแถบสัญญาณให้เห็นแต่อย่างใด จึงให้ผลตรวจเป็นลบ

ผลที่ได้จากการทำ PCR เมื่อมีการนำ DNA ที่ได้จากเลือดสุกรที่ได้ตรวจสอบแล้วว่า มี DNA อยู่พบว่า ปรากฏแถบสัญญาณในบางช่อง แต่มีขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งมีขนาดไม่เท่ากับ 529 bp ที่เป็น positive control และ ในบางช่องก็ไม่ปรากฏแถบสัญญาณให้เห็นแต่อย่างใด จึงถือว่าไม่พบเชื้อ *T. gondii* ในเลือดของสุกรในตัวอย่างนั้น



ภาพที่ 4.9 ผลการตรวจ DNA จากตัวอย่างเลือดสุกรด้วยเทคนิค PCR

จากภาพที่ 4.9 ผลการตรวจ DNA จากตัวอย่างเลือดสุกรด้วยเทคนิค PCR ช่องที่ 1 Marker ช่องที่ 2 SCR96 ช่องที่ 3 SCR100 ช่องที่ 4 SCR124 ช่องที่ 5 SCR125 ช่องที่ 6 SCR126 ช่องที่ 7 SCR147 ช่องที่ 8 SCR150 ช่องที่ 9 SCR1 ช่องที่ 10 SCR20 ช่องที่ 11 SCR42 ช่องที่ 12 SCR58 ช่องที่ 13 SCR111 ช่องที่ 14 SCR120 ช่องที่ 15 Toxo positive control (529 bp) ช่องที่ 16 Toxo negative contro; ช่องที่ 17 Marker จากรูปช่องที่15 ซึ่งเป็น Positive control จะปรากฏแถบสัญญาณที่ 529 bp ชัดเจน ในช่องที่เหลือไม่ปรากฏแถบสัญญาณให้เห็นแต่อย่างใด จึงให้ผลลบทั้งหมด

ผลที่ได้จากการทำ PCR เมื่อมีการนำ DNA ที่ได้จากเลือดสุกร ที่ได้ตรวจสอบแล้วว่า มี DNA อยู่ พบว่าไม่ปรากฏแถบสัญญาณในช่องที่เป็น DNA ของตัวอย่างเลือดสุกรที่สกัดได้ และตรวจสอบแล้วว่า มี DNA อยู่แต่ไม่ปรากฏแถบสัญญาณในขนาด 529 bp ให้เห็น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มี DNA ของเชื้อ *T. gondii* ในตัวอย่างเลือดสุกรที่ใช้สกัด DNA แต่อย่างใด

เมื่อทำการทดลองโดยวิธี PCR จากตัวอย่าง DNA ของโคนม ให้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 4.3 และ DNA ของสุกร ปรากฏว่าให้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 ผลการตรวจหาเชื้อ *T. gondii* ในโคนมในจังหวัดเชียงราย โดยวิธี PCR

อำเภอ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนที่ให้ผลบวก	เปอร์เซ็นต์ความชุก
เมือง	80	0	0
แม่ลาว	30	0	0
พาน	65	0	0
เทิง	100	0	0
พญาเม็งราย	28	0	0
ขุนตาล	37	0	0
แม่สาย	52	0	0
แม่ฟ้าหลวง	35	0	0
แม่จัน	35	0	0
รวม 9 อำเภอ	462	0	0

จากตารางที่ 4.3 พบว่าตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณโดย วิธี PCR ให้ผลลบทั้งหมด ผลการทดลองโดยวิธี PCR พบว่าความชุกของโรค *T. gondii* ในโคนมจำนวน 9 อำเภอ จำนวนโคนม 462 ตัว พบความชุกของโรคร้อยละ 0 ถือว่าไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ *T. gondii* ในเลือดของโคนมทั้ง 9 อำเภอของจังหวัดเชียงราย

ตารางที่ 4.4 ผลการตรวจหาเชื้อ *T. gondii* ในสุกรในจังหวัดเชียงราย โดยวิธี PCR

ชนิดสัตว์/อำเภอ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนที่ให้ผลบวก	เปอร์เซ็นต์ความชุก
แม่ฟ้าหลวง	67	0	0
แม่จัน	83	0	0
รวม 2 อำเภอ	150	0	0

จากตารางที่ 4.4 พบว่าตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณโดย วิธี PCR ให้ผลลบทั้งหมด ผลการทดลองโดยวิธี PCR พบว่าความชุกของโรค *T. gondii* ในสุกร จำนวน 2 อำเภอ จำนวนสุกร 150 ตัว พบความชุกของโรคร้อยละ 0 ถือว่าไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ *T. gondii* ในเลือดของสุกรทั้ง 2 อำเภอของจังหวัดเชียงราย

4.4 การเปรียบเทียบผลของการตรวจโดยวิธี LAT และวิธี PCR

จากผลการทดลองการตรวจตัวอย่างที่เก็บมาปรากฏผลดังข้างต้นที่แสดงมานำมาเปรียบเทียบผลทั้งผลการตรวจตัวอย่างของโคนม ตามตารางที่ 4.5 และตัวอย่างของสุกร ตามตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบระหว่างการตรวจโดยวิธี LAT กับ PCR ในโคนม

อำเภอ	จำนวนตัวอย่าง	ผล LAT		ผล PCR	
		ผลบวก	% Prevalence	ผลบวก	% Prevalence
เมือง	80	11	13.75	0	0
แม่ลาว	30	0	0	0	0
พาน	65	3	4.6	0	0
เทิง	100	9	9	0	0
พญาเม็งราย	28	0	0	0	0
ขุนตาล	37	3	8.1	0	0
แม่สาย	52	3	5.76	0	0
แม่ฟ้าหลวง	35	6	17.14	0	0
แม่จัน	35	7	20	0	0
รวม 9 อำเภอ	462	42	9.1	0	0

จากตารางที่ 4.5 พบว่า ความชุกของการตรวจโดยวิธี LAT ในโคนม คือร้อยละ 9.1 ส่วนความชุกของการตรวจโดยวิธี PCR ในโคนม คือร้อยละ 0

ผลการเปรียบเทียบระหว่างการตรวจโดยวิธี LAT และ PCR ในโคนม จำนวน 9 อำเภอ จำนวนโคนม 462 ตัว พบว่าการตรวจโดยวิธี LAT ให้ผลบวก จำนวน 42 ตัว คิดเป็นร้อยละ 9.1 ส่วนการตรวจโดยวิธี PCR ให้ผลลบทั้งหมด คิดเป็นความชุกร้อยละ 0 จะเห็นว่า การใช้วิธีการตรวจที่แตกต่างกัน จะทำให้ผลของความชุกที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.6 ผลการเปรียบเทียบระหว่างการตรวจโดยวิธี LAT กับ PCR ในสุกร

อำเภอ	จำนวนตัวอย่าง	ผล LAT		ผล PCR	
		ผลบวก	% Prevalence	ผลบวก	% Prevalence
แม่ฟ้าหลวง	67	1	1.49	0	0
แม่จัน	83	18	21.68	0	0
รวม 2 อำเภอ	150	19	12.66	0	0

จากตารางที่ 4.6 พบว่า ความชุกของการตรวจโดยวิธี LAT ในสุกร คือร้อยละ 12.66 ส่วนความชุกของการตรวจโดยวิธี PCR ในสุกร คือร้อยละ 0

ผลการเปรียบเทียบระหว่างการตรวจโดยวิธี LAT และ PCR ในสุกร จำนวน 2 อำเภอ จำนวนสุกร 150 ตัว พบว่าการตรวจโดยวิธี LAT ให้ผลบวก จำนวน 19 ตัว คิดเป็นร้อยละ 12.66 และการตรวจโดยวิธี PCR ให้ผลลบทั้งหมด คิดเป็นความชุกร้อยละ 0 จะเห็นว่า การใช้วิธีการตรวจที่แตกต่างกัน จะทำให้ผลของความชุกที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลของการศึกษาของ เลิศรัก ศรีกิจการ, วรางคณา ไชยชาวงษ์, โกษา ปัญญาโกษา, อนุชา ศิริมาลัยสุวรรณ และ ชุติพร ศักดิ์สว่างษ์ (2547) ที่พบว่า การตรวจโดยวิธี LAT ให้ค่าความชุกร้อยละ 7 และการตรวจโดยวิธี ELISA ให้ค่าความชุกที่ร้อยละ 0.2

ดังนั้น จะพบว่าค่าของความชุกที่ได้จากการศึกษา นอกจากความแตกต่างของพื้นที่ความแตกต่างของช่วงระยะเวลาที่ศึกษา จะทำให้ค่าความชุกมีความแตกต่างกันแล้ว วิธีการที่ใช้ในการตรวจที่แตกต่างกัน ผลที่ได้จะพบว่าค่าของความชุกของการติดเชื้อ *T. gondii* ที่แตกต่างกันด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษา พบว่าในโคนมให้ผลบวกต่อ LAT ร้อยละ 9.10 (42/462) ขณะที่การตรวจโดยวิธีปฏิกิริยาแล็กโซโพลีเมอเรส ให้ผลลบทั้งหมด ในตัวอย่างเลือดสุกร ซึ่งตรวจโดยวิธี LAT ให้ผลบวกต่อเชื้อ *T. gondii* ร้อยละ 12.66 (19/150) และการตรวจโดยวิธีปฏิกิริยาแล็กโซโพลีเมอเรส ให้ผลลบทั้งหมดเช่นเดียวกัน สำหรับพื้นที่ที่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกในโคนม พบว่าเขตอำเภอแม่จัน มีความชุกสูงสุดที่ร้อยละ 20 (7/35) และเขตที่ตรวจไม่พบตัวอย่างบวก ได้แก่ อำเภอแม่ลาว และพญาเม็งราย โดยเมื่อคิดเป็นการติดเชื้อ *T. gondii* ทั้งหมดของโคนมในจังหวัดเชียงรายพบว่า มีพื้นที่ที่ให้ผลบวก 7 อำเภอ สำหรับพื้นที่ที่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกในสุกร พบว่าเขตอำเภอแม่จัน มีความชุกสูงสุดร้อยละ 21.68 (18/83) โดยเมื่อคิดเป็นการติดเชื้อ *T. gondii* ทั้งหมดของสุกรจังหวัดเชียงราย พบว่ามีพื้นที่ที่ให้ผลบวกทั้งสองอำเภอ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อ *T. gondii* ในโคนมและสุกรในจังหวัดเชียงรายที่อาจมีผลต่อสุขภาพของคนในพื้นที่ จากผลการวิจัยพบว่า การตรวจโดยวิธี LAT ในโคนมและสุกรในเขตจังหวัดเชียงราย ที่พบความชุกของการติดเชื้อในโคนมและสุกรมากที่สุดในพื้นที่อำเภอแม่จัน แสดงว่าในพื้นที่ที่มีความเสี่ยงของโรคที่ที่จะทำให้คนในพื้นที่มีโอกาสที่จะติดเชื้อโรคหรือสัมผัสเอาเชื้อ *T. gondii* เข้าสู่ร่างกายได้มากกว่าพื้นที่อื่น ๆ ที่มีความชุกของการติดเชื้อน้อยหรือไม่มีการติดเชื้อ และการตรวจโดยวิธี PCR ในโคนมและสุกร ในเขตจังหวัดเชียงราย ไม่พบการติดเชื้อ *T. gondii* เนื่องจากไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ *T. gondii* ในเลือดของตัวอย่างที่ตรวจ ดังนั้นการตรวจทางซีรั่มวิทยาโดยวิธี LAT (Latex agglutination test) นั้น เป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็ว เสียค่าใช้จ่ายน้อย ไม่ควรใช้วิธีการทาง PCR ร่วมยืนยันผลด้วย เนื่องจากให้ผลที่ขัดแย้งกัน เนื่องจากให้ผลเป็นลบทุกตัวอย่าง การตรวจโดยวิธี LAT เป็นวิธีที่เป็นที่ยอมรับสามารถตรวจพบโรคอยู่และแสดงให้เห็นว่า โรค Toxoplasmosis ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Toxoplasma gondii* มีการแพร่กระจายในพื้นที่จังหวัดเชียงราย ทั้งในโคนม และในสุกร

นอกจากนี้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์อื่น ๆ หรือดำเนินการวิจัยอย่างต่อเนื่องรวมทั้งในคนจะทำให้ทราบสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรค หรือความชุกของโรคได้มากขึ้น สำหรับเทคนิค PCR สามารถนำมายืนยันผลร่วมกับ LAT ได้ในบางกรณีเท่านั้น เนื่องจากเชื้อ *T. gondii* ส่วนใหญ่ไม่ได้อาศัยอยู่ในเลือด ทำให้การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจากเลือดเป็นไปได้ยาก ทำให้การตรวจทางซีรัม มีความไวต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ และควรเปรียบเทียบผลที่กับที่มีรายงานในอดีต เพื่อดูสถานการณ์ของโรคว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการแพร่กระจายตัวของโรค Toxoplasmosis ในจังหวัดเชียงรายมีอะไรบ้าง ที่คาดว่าจะมีส่วนเกี่ยวข้อง ควรเปรียบเทียบอำเภอที่มีผลของสุกรกับโคนม สอดคล้องกันหรือไม่

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การตรวจโดยวิธี PCR ที่ให้ผลลบทั้งสองชนิดสัตว์โดยนำเลือดมาเป็นตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่า การนำตัวอย่างเลือดมาตรวจทางอนุวิทยา อาจทำให้ไม่พบเชื้อ อาจเป็นเพราะว่า เชื้อ *T. gondii* ส่วนใหญ่ จะพบอยู่ในสมอง และเนื้อเยื่ออื่นๆของสัตว์หลายชนิด ซึ่งทำให้การนำเอา DNA จากส่วนของเลือดมาตรวจทำให้มีโอกาสนำไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ *T. gondii*

5.2.2 การตรวจเพื่อหาเชื้อ *T. gondii* เพื่อให้ทราบผลว่าสัตว์ชนิดที่ตรวจเป็นโรค Toxoplasmosis หรือไม่ เป็นวิธีการตรวจเพื่อให้ทราบผลในทางระบาดวิทยาหรือเพื่อให้ทราบสถานการณ์การความชุกและการกระจายของโรค เป็นสิ่งที่จำเป็น แต่หากผลการตรวจพบเราจะดำเนินการกับสัตว์นั้นหรือฝูงสัตว์นั้นอย่างไร เพื่อควบคุมหรือป้องกันการแพร่กระจายของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้นมีความสำคัญกว่า ซึ่งเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ในจังหวัดเชียงราย ยังไม่รู้จักโรคชนิดนี้มากนัก ตลอดจนเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ที่ปฏิบัติงานในพื้นที่บางท่านไม่ทราบหรือรู้จักโรคนี้มากพอ ดังนั้น ควรมีการจัดฝึกอบรมให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และถ่ายทอดความรู้เรื่องโรค Toxoplasmosis ให้กับเจ้าหน้าที่ที่ปฏิบัติงาน เพื่อป้องกันและสามารถถ่ายทอดความรู้สู่เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ต่อไป

5.2.3 ควรมีการศึกษาในเรื่องของความสัมพันธ์ระหว่างการบริโภคนมโคกับการติดเชื้อ *T. gondii* ในคน โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HIV ในจังหวัดเชียงรายและในพื้นที่อื่น ๆ ที่มีการเลี้ยงโคนมและมีการบริโภคนมสดจากโคนมกันมาก ว่ามีความสัมพันธ์กันมากน้อยเพียงใด หรือมีความสัมพันธ์กันอย่างน้อยมีนัยสำคัญหรือไม่

5.2.4 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อเนื่องในสัตว์ชนิดอื่นๆในอนาคตได้แก่ในสุนัข แมว หนู แพะ เป็นต้น



รายการอ้างอิง

รายการอ้างอิง

กระแสรู้น แบนเนียน, ภาวัน สุนทรสมัย, วิชัย สังข์สุวรรณ, และวันเพ็ญ ชัยคำภา. (2522).

Serological study on Toxoplasmosis in Central part of Thailand. ใน รายงานการประชุม
วิชาการของคณะเวชศาสตร์เขตร้อน ครั้งที่ 2/2522. 28 พฤศจิกายน 2522, กรุงเทพฯ:
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน.

จิรา วายุโชติ, สุพจน์ เมธิพันธ์, และ อีโรเอกิ นิชิเกวา. (2534). การแท้งลูกในแม่สุกรเนื่องจาก
เชื้อ *Toxoplasma gondii* : รายงานสัตว์ป่วย. วารสารวิทยาศาสตร์การแพทย์, 5(2).
หน้า 131-135.

ชูเกียรติ ศิริวิชัยกุล, ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ, และประยงค์ ระดมยศ (บรรณาธิการ). (2549). ตำรา
ปรสิตวิทยาทางการแพทย์ (พิมพ์ครั้งที่2). กรุงเทพฯ: เมดิคัล มีเดีย.

ไชยนิรันดร์ สุนันตะ, เทวินทร์ อินปันแก้ว, นงนุช ภิญโญภาณุวัฒน์, วิญญวัฒน์ ฉิมน้อย, ชัญญา
เก่งระดมกิจ, พิพัฒน์ อรุณวิภาส, โชอิชิ มารูยามา, และสถาพร จิตตपालพงศ์. (2552).
การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *Toxoplasma gondii* ในโคนมในประเทศ
ไทย. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. (หน้า
123 – 129). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อ *T. gondii* ที่อยู่ภายนอกเซลล์ macrophage. (2005). สืบค้นเมื่อ 4 เมษายน 2552, จาก
<http://www.pathguy.com/sol/08277.jpg>

ภิรมย์ ศรีวรรณารด, จำเียร สัตยาพันธุ์, วีระพล จันทรรวรรค์, เจริญ ทองมา, กัญจนะ มากวิจิตร,
และมานิตย์ วิมลรัตน์. (2522). รายงานการวิจัยการสำรวจโรคท็อกโซพลาสโมซิสของ
กระบือปลักในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สภาวิจัยแห่งชาติ.

ภิรมย์ ศรีวรรณารด, วีระพล จันทรรวรรค์, และจำเียร สัตยาพันธุ์. (2524). การวินิจฉัยโรคท็อก
โซพลาสโมซิสในแมวทางชีววิทยา. วารสารสัตวแพทย์, 2(1), หน้า 20-26.

- ประชา อัสวเมธา, อีโรเอกิ นิชิคาว่า, สันฐุ ชุมณี, สุจินต์ ตั้งใจตรง, และสุพจน์ ทองพัฒน์. (2523). การสำรวจโรคที่ก่อโมซิสของสัตว์ทางภาคใต้และภาคเหนือของประเทศไทย. ใน **ประมวลการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 18**, (หน้า 23), กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ครุณี ทันทสุวรรณ, นพพร ศราษพันธุ์, วิจิตร สุขเพส่น, อีโรเอกิ นิชิคาว่า, และอดิสร วงศ์ลิ้มสวัสดิ์. (2533). โรคที่ก่อโซพลาสโมซิสในสุกรในประเทศไทย. **สัตวแพทยสาร**, **41**, หน้า 167-172.
- ภาวิน ผดุงทศ. (2550). **ระบาดวิทยาทางสัตวแพทย์**. กรุงเทพฯ: หมอชาวบ้าน.
- นพพร ศราษพันธุ์, ครุณี ทันทสุวรรณ, อีโรเอกิ นิชิคา, และวิจิตร สุขเพส่น. (2534). เปรียบเทียบการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อที่ก่อโซพลาสมาคอนดิไอในสุกรโดยวิธี Indirect fluorescent antibody test กับ latex agglutination test. ใน **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการด้านการปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ครั้งที่ 10**, (หน้า 416-428), กรุงเทพฯ: กรมปศุสัตว์.
- พิบูลย์ ไชยอนันต์, ราพีง ดิสสะมาน, และเชื้อ ว่องส่งสาร. (2512). การทดสอบโรคที่ก่อโซพลาสโมซิสของสุกรในประเทศไทย. ใน **รายงานประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ครั้งที่ 8**. (หน้า 224-231), กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พิพัฒน์ อรุณวิภาส, เทวินทร์ อินปันแก้ว, และสถาพร จิตตपालพงศ์. (2551). การศึกษาปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค Toxoplasmosis ในโคนมเขตภาคตะวันตก. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46**, (หน้า 384-388), กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เลิศรัก ศรีกิจการ, วรางคณา ไชยชาวงษ์, โกษา ปัญญาโกษา, อนุชา สิริมาลัยสุวรรณ, และชุลีพร ศักดิ์สง่างษ์. (2547). **ความเป็นไปได้ในการผลิตสุกรปลอดเชื้อโรคติดคน *Toxoplasma gondii* ในฟาร์มเพื่อการค้า**. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วิชัย สังขสุวรรณ. (2510). รายงานเบื้องต้นในการสำรวจโรคที่ก่อโซพลาสโมซิสแรกของการพบที่ก่อโซพลาสโมซิสจากสัตว์ในประเทศไทย. **Journal of The Medical Association of Thailand**, **50**(9), หน้า 606-613.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมักร สุจิต, ณัฐนรี อินทอง, พีระ อารีศรีสม, จงรัก มงกุฏ, วรุฒิ ฤกษ์อำนาจโชค, นงนุช ภิญโญภาณุวัฒน์, ชัญญา เก่งระดมกิจ, และสถาพร จิตตपालพงศ์. (2551). ความชุกของแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ *Toxoplasma gondii* ในสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ทางภาคเหนือของประเทศไทย. ใน เอกสารงานวิชาการภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Afarensis. (2006). **The Effect of Toxoplasma gondii on Human Culture**. Retrieved April 4, 2009, from http://scienceblogs.com/afarensis/2006/08/04/the_effect_of_toxoplasma_gondi/.

Alford, C.A. & Foft, J.W. (1969). Subclinical central nervous system disease of meonates. A prospective study of infants born with increased level of Igm. **Journal of Pediatrics**, 75, p. 1167.

Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim van Dillen P.M.E., & Noorda van der J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acid. **Journal of Clinical Microbiology**, 28, pp. 4395-4503.

Bunyaratvej, S., Chaimuangraj, S., Pairojkul, C., and Tanphaichitra, D. (1980). Toxoplasmosis in adults: Report of three fatal cases by serological, light and electron microscopic studies. **Journal of The Medical Association of Thailand**, 63, 568-578.

Cantos, G.A., Prando, M.D., Siqueira, M.V., & Teixeira, R.M. (2000). Toxoplasmosis: occurrence of antibodies anti-*Toxoplasma gondii* and diagnosis. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 46, pp. 335–341.

Chintana, T., Sukthana, Y., Bunyakai, B., and Lekkla, A. (2543). *Toxoplasma gondii* antibody in pregnant woman with and without HIV infection. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 29, pp. 383 – 386.

- Dubey, J.P. (1998). Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. **Journal of Parasitology**, **116**, pp. 43–50.
- Dubey, J.P. & Beattie, C.P. (1988). **Toxoplasmosis of Animals and Man**. Florida: CRC Press.
- Fayer, R., Dubey, J.P. & Lindsay, D.S. (2004). Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitol**, **20**, pp. 531 - 536.
- Hill, D., & Dubey, J.P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, **8**, pp. 634-640.
- Hiroaki, N., Tuntasuwan, D., & Triwanatham, N. (2532). Preliminary survey of Toxoplasmosis in dog, cat and human. **Journal of Tropical Medicine and Parasitology**, **12**(2), pp. 53-59.
- Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., and Verschueren. (2000). Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, **30**, pp. 69-75.
- Jira, J., & Rosicky, B. (1983). Imunodiagnostika a epidemiologie toxoplasmosy (in Czech). **Academia Prague**, pp 251.
- Jittapalapong, S., Sangvaranond, A., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Khachaeram, W., Koizumi, S., & Maruyama, S. (2005). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. **Veterinary Parasitology**, **127**, pp. 17-22.
- Jittapalapong, S., Nimsupan, B., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Kabeya, H., & Maruyama, S. (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats and dogs in the Bangkok metropolitan area, Thailand. **Veterinary Parasitology**, **145**, pp. 138-141.
- Kimball, A.C., Kean, B.H., and Fuchs, F. (1971). The role of Toxoplasmosis in abortion. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, **111**, p. 219.

- Kwung, F.C., Wei, L.C., Shuan, W.M., Eyre, S.K., & Cheng, H.B. (2003). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection among Chinese aboriginal and Han people residing in mountainous areas of northern Thailand. **Journal of parasitology**, **89**, pp. 1239 -1242.
- Langoni, H., Das Dores, C.B., Silva, R.C., Pezerico, S.B., Castro, A.P.B., and Da Silva, A.V. (2006). Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in Sera samples of Mice experimentally infected. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, **12**, pp. 202-214.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., & Blagburn, B.L. (1997). Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, **73**, pp. 27–33.
- Lucas, S.B., Hounnou, A., & Peacock, C. (1993). The mortality and pathology in West African city. **AIDS** **7**, pp. 1569–1579.
- Luft, B.J., Brooks, R.J., Couley, F.K., McCabe, R.E., & Remington, J.S. (1984). *Toxoplasmic encephalitis* in patients with acquired immune deficiency syndrome. **Journal Of the American Medical Association**, **252**, pp. 913–917.
- Maruyama, S., Boonmar, S., Morita, Y., Sakai, T., Tanaka, S., Yamaguchi, F., Kabeya, H., & Katsube, Y., (2000). Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* among healthy individuals in Thailand. **Journal of Veterinary Medical Science**, **62**, pp. 635–637.
- Montoya, J.G., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. **Lancet**, **363**, pp. 1965 - 1976.
- Morakote, N., Thamasonthi, W., Charuchinda, K., & Khamboonruang, C. (1984). Prevalence of toxoplasmosis antibodies in Chiang Mai population. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, **15**, pp. 80–85.
- Nancy, L.M., Frenkel, J.K., and Dubey, J.P. (1972). Oral infections with *Toxoplasma* cyst and oocyst in Feline, other Mammals, and in Birds. **Journal of Parasitology**, **58**, pp. 928-937.

- Nishikawa, H., Tuntasuvan, D., & Triwanatham, N. (1989). Preliminary survey of toxoplasmosis in dog, cat and human. **Journal of Tropical Medicine and Parasitology**, **12**, pp. 53–59.
- Pradatsundarasar, A. (1963). Preliminary study on the prevalence of toxoplasmosis in cats. **Med J Chulalongkron Hosp Med Sch**, **10**, pp. 1-3.
- Pettersen, E.K. (1984). Transmission of toxoplasmosis via milk from lactating mice. **Acta Patho Microbiol Immunol Scand**, **92**, pp. 175–176.
- Pinard, J.A., Leslie, N.S., & Irvine, P.J. (2003). Maternal serologic screening for toxoplasmosis. **Journal of Midwifery & Women's Health**, **48**, pp. 308–316.
- Plant, J.W., Richardson, N., & Moyle, G.G. (1974) Toxoplasma infection and abortion in sheep associated with feeding of grain contaminated with cat faeces. **Australian Veterinary Journal**, **50**, pp. 19-21.
- Remington, J.S., McLeod, R., Thulliez, P., & Desmonts, G. (2001). Toxoplasmosis. In: Remington, J.S., & Klein, J.O. (Eds.). **Infectious Diseases of the Fetus and the Newborn Infant**. 5th ed. Philadelphia: Saunders.
- Sangkasuwan, V. (1965). The first report of toxoplasmosis in animal in Thailand. **Journal of The Medical Association of Thailand**, **48**, pp. 793-798.
- Sangkasuwan, V. (1967). Preliminary study of toxoplasmosis. **Journal of The Medical Association of Thailand**, **50**, pp. 606-613.
- Silva, J.C.R., Ogassawara, S., Adania, C.H., Ferreira, F., Gennari, S.M., Dubey, J.P., & Ferreira-Neto, J.S. (2001). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, **102**, pp. 217–224.
- Solih, M.Y., and Swell, H.H. (1972). Effect of different conditions on duration of infectivity of Toxoplasma gondii . **Journal of Parasitology**, **58**, pp. 938-939.

- Suteeraparp, P., Pholpark, S., Pholpark, M., Charoenchai, A., Chompoochan, T., Yamane, I., &Kashiwazaki, Y. (1999). Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and associated abortion in dairy cattle from central Thailand. **Veterinary Parasitology** **86**, pp. 49–57.
- Sukthana, Y., Chintana, T., Supathanapong, W., Siripanth, C., Lekkla, A., &Chiabchalard, R. (2001). Predictive value of latex agglutination test in screening of toxoplasmosis. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, **32**, pp. 314-318.
- Sukthana, Y., Kaewkungwal, J., Jantanavivat, C., Lekkla, A., Chiabchalard, R., &Aumarm, W. (2003). *Toxoplasma gondii* antibody in Thai cats and their owners. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** **h, 34**, pp. 733–738.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., &Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, **30**, pp. 1217–1258.
- Takahashi, J. & Kenishi, E. (1986). Quantitation of antibodies to *Toxoplasma gondii* in swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Immunoassay**, **7**, pp. 257-272.
- Tanphaichitra, D., Limsuwarn, A., &Tanphaichitra, V. (1976). Toxoplasmosis, a not uncommon inapparent infectious disease in Thai community-risk of con-suming raw meat. **Journal of The Medical Association of Thailand**, **59**, pp. 431-432.
- Thiangtum, K., Nimsuphun, B., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Tongthainan, D., Jittapalapong, S., Rukkwamsuk, T., &Maruyama, S. (2006). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive felids in Thailand. **Veterinary Parasitology**, **136**, pp. 351-355.
- Tuntasuvan, D., Mohkaew, K., &Dubey, J.P. (2543). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in elephants (*Elephas maximus indicus*) in Thailand. **Journal of Parasitology**, **87**, pp. 229 - 230.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

แบบสอบถามงานวิจัยและเก็บตัวอย่าง



แบบสอบถามงานวิจัยเรื่อง

การตรวจหาความชุกของการติดเชื้อ *Toxoplasma gondii* ในโคนมและสุกร ของจังหวัดเชียงราย

โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสและLatex agglutination test

.....

วันที่.....

1. ข้อมูลเกษตรกรเจ้าของสัตว์

ชื่อ – สกุล.....อายุ.....ปี เพศ.....

ที่อยู่บ้านเลขที่.....หมู่ที่.....ชื่อบ้าน.....ตำบล.....

อำเภอ.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์.....

เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้.....

2. การศึกษาของเกษตรกร.....

3. ประสบการณ์การเลี้ยงสัตว์ โคนม.....ปี สุกร.....ปี

4. เคยได้รับการฝึกอบรมการเลี้ยงสัตว์มานาน โคนม.....ปี สุกร.....ปี

5. หน่วยงานที่เคยใช้บริการ.....

6. จำนวนสัตว์ที่เลี้ยง โคนมทั้งหมด.....ตัว เพศผู้.....ตัว เพศเมีย.....ตัว

โครีดินม.....ตัว โคนสาว.....ตัว โคนพักท้อง.....ตัว ลูกโคน.....ตัว

สุกร ทั้งหมด.....ตัว เพศผู้.....ตัว เพศเมีย.....ตัว

สุกร พ่อพันธุ์.....ตัว แม่พันธุ์.....ตัว สุกรขุน.....ตัว ลูกสุกร.....ตัว

7. ลักษณะการเลี้ยง โคนม ☐ ยืนโรงตลอด ☐ ยืนโรงและปล่อยแปลงหญ้า ☐ ปล่อยแปลงหญ้า

สุกร ☐ ระบบโรงเรือนปิด ☐ ระบบโรงเรือนเปิด/ใต้ถุน ☐ เลี้ยงปล่อย

8. การจัดการเกี่ยวกับสุขภาพสัตว์ ☐ ทำวัคซีนสม่ำเสมอ ☐ ทำวัคซีนเป็นบางครั้ง ☐ ไม่เคยทำ

9. ปัญหาที่เคยพบในฟาร์ม ☐ โรคระบาด ☐ การแท้ง ☐ ขาดแคลนอาหาร ☐ ระบบสืบพันธุ์

☐ อื่นๆระบุ.....

10. การเลี้ยงสัตว์อื่นนอกจากโคนมหรือสุกรคือ ☐ กระบือ.....ตัว ☐ โค.....ตัว ☐ สุนัข.....ตัว

☐ แมว.....ตัว ☐ แพะ.....ตัว ☐ แกะ.....ตัว ☐ สัตว์ปีกอื่นระบุ.....ตัว

11. ปัญหาของสัตว์อื่นที่เลี้ยง ☐ โรคระบาด ☐ การแท้ง ☐ ขาดแคลนอาหาร ☐ ระบบสืบพันธุ์

☐ อื่นๆระบุ.....

12. ประวัติการป่วยตายในฟาร์ม ☐ มีป่วย ☐ ไม่มีป่วย ☐ มีตาย ☐ ไม่มีตาย

13. พบสัตว์ต่อไปนี้ในฟาร์ม ☐ หนู ☐ พบ ☐ ไม่พบ

ขอขอบคุณครับที่ให้ข้อมูล

แบบเก็บตัวอย่างโคนม

เลขที่.....

ชื่อฟาร์ม.....ชื่อเจ้าของ.....

เลขที่.....หมู่ที่.....ตำบล.....อำเภอ.....จังหวัด.....

หมายเลข ตัวอย่าง	ชนิด ตัวอย่าง	ชื่อสัตว์/ หมายเลข	อายุ (ปี)	เพศ	แลคเตชันที่	ปริมาณ น้ำนมที่ให้	หมายเหตุ

(ลงชื่อ).....ผู้เก็บตัวอย่าง

แบบเก็บตัวอย่างสุกร

เลขที่.....

ชื่อฟาร์ม.....ชื่อเจ้าของ.....

เลขที่.....หมู่ที่.....ตำบล.....อำเภอ.....จังหวัด.....

หมายเลข ตัวอย่าง	ชนิด ตัวอย่าง	ชื่อสัตว์/ หมายเลข	อายุ (ปี)	เพศ	แลคเตชันที่	ปริมาณ น้ำนมที่ให้	หมายเหตุ

(ลงชื่อ).....ผู้เก็บตัวอย่าง

ภาคผนวก ข

ผลงานวิจัยที่นำเสนอของผู้วิจัย



การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *Toxoplasma gondii* ในโคนม ในประเทศไทย

Comparison of Diagnostic Techniques for Detection of *Toxoplasma gondii* Infections among Dairy Cows in Thailand

ไชยนิรันดร์ สุบันตะ¹ เทวินทร์ อินปันแก้ว² นงนุช ภิญโญภาณุวัฒน์² วิษณุวัฒน์ จิมน้อย²

ชัยยุธา เก่งระดมกิจ² พิพัฒน์ อรุณวิภาส³ โซอิชิ มารูยามา⁴ และ สถาพร จิตตपालพงศ^{2*}

Chainirun Sunanta¹ Tawin Inpankaew,² Nongnuch Pinyopanuwat,² Wissanuwat Chimnoi,²

Chanya Kengradomkij,² Pipat Arunwipas,³ Soichi Maruyama,⁴ and Sathaporn Jittapalapong^{2*}

บทคัดย่อ

การติดเชื้อโปรโตซัว *Toxoplasma gondii* ในสัตว์มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจและสาธารณสุข เนื่องจากเชื้อ *T. gondii* ทำให้เกิดอาการแท้งในโคนม ในขณะที่เดียวกันเชื้อ *T. gondii* ทำให้เกิดโรคสัตว์สู่คนที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุข การตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ จึงมีความจำเป็นในด้านการค้นหาสัตว์ที่ติดเชื้อ เพื่อยับยั้งและลดจำนวนสัตว์ที่ติดเชื้อ ลดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจและสาธารณสุข จุดประสงค์ของการวิจัย คือ การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *T. gondii* ที่มีประสิทธิภาพที่เหมาะสมจะนำมาใช้ตรวจในโคนมในประเทศไทย การวิจัยดำเนินการโดยใช้ตัวอย่างเลือดโคนม จำนวน 50 ตัวอย่างที่ให้ทั้งผลบวกและผลลบจากการตรวจด้วยวิธี indirect fluorescence antibody test (IFAT) เปรียบเทียบกับ enzyme linked immunosorbent (ELISA), latex agglutination test (LAT), polymerase chain reaction (PCR) และ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test ผลการศึกษาพบว่าเมื่อนำวิธีอื่นๆ มาเปรียบเทียบกับเทคนิค IFAT ที่เป็น gold standard พบว่าเทคนิค Latex Agglutination ให้ความไว ร้อยละ 100 และ positive predictive value สูงสุดที่ร้อยละ 91.3 ในขณะที่เทคนิค PCR ให้ความจำเพาะสูงสุด ร้อยละ 100 สรุปได้ว่า Latex agglutination เป็นวิธีที่เหมาะสมและควรนำมาใช้ในการตรวจค้นหาการติดเชื้อ เบื้องต้นแต่ควรยืนยันผล การตรวจด้วยวิธี อื่นๆ ได้แก่ PCR หรือ IFAT เพื่อให้ผลตรงต่อความเป็นจริงมากที่สุด

ABSTRACT

Toxoplasma gondii infections in food animals have an impact on economic and public health since this pathogen is the causative agent of abortion and is able to transmit to humans. The efficiency of diagnosis is needed for identification of infected animals to reduce the economic

Key words: *T. gondii*, IFAT, ELISA, LAT, PCR, LAMP

*Corresponding author: Sathaporn Jittapalapong (fvetspj@ku.ac.th)

¹สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดเชียงราย อ.เมือง จ.เชียงราย

¹Chiang Rai Provincial Office, Department of Livestock Development, Chiang Rai.

²ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

²Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, 10903, Thailand.

³ห้องปฏิบัติการสัตวแพทยสาธารณสุข คณะวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร คานาคาวา ประเทศญี่ปุ่น

³Laboratory of Veterinary Public Health, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Kanagawa, Japan.

⁴ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

⁴Department of Animal Resources and Exotic Animal, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaengsan, Thailand.

damages and to lower the risk of infection in humans. The objective of this study is to evaluate the practical diagnostic tools to use as a routine diagnosis for veterinary clinicians. Serum samples from 50 dairy cows were evaluated by indirect fluorescence antibody test (IFAT). Four tests for the diagnosis of toxoplasmosis, such as enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), latex agglutination test (LAT), polymerase chain reaction (PCR), and loop mediated amplification (LAMP) were compared to indirect fluorescence antibody test (IFAT). The highest sensitivity rates were LAT (100%). The specificity varied from 82.6% (LAMP), 91.3% (LAT), and 100% (PCR). The result demonstrated that LAT had the high sensitivity and specificity compared to IFAT as a gold standard for diagnosis of *T. gondii* infections and indicated that LAT should be used as routine diagnostic tests for detection of *T. gondii* infections of dairy cows in Thailand.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is a zoonotic protozoan parasite of medical and veterinary importances with worldwide distribution. It is capable of infecting all warm-blooded animals and is estimated to infect 4 to 77 % of human population (Tenter *et al.*, 2000). While *T. gondii* can be transmitted directly by animal-human contact or through contact with contaminated feces, soil and herbage, it can also be transmitted through contaminated food and water. In animals, infection is not only results in significantly reproductive and hence economic losses, but also has implications for public health since consumption of infected meat or milk can facilitate zoonotic transmission.

Serological studies in Thailand have been found evidences of widespread in humans (Pradatsundaraser & Papasarathorn, 1966; Chintana *et al.*, 1998; Sukthana *et al.*, 2001; Maruyama *et al.*, 2003), dogs and cats (Jittapalapong *et al.*, 2007), swine (Sriwaranard *et al.*, 1981; Nishikawa *et al.*, 1989), goats (Jittapalapong *et al.*, 2005), dairy cows (Jittapalapong *et al.*, 2008), tigers (Thiangtham *et al.*, 2006), elephants (Tuntasuvan *et al.*, 2001), and rodents (Jittapalapong *et al.*, 2006).

The diagnosis of toxoplasmosis classically relies on serology and the demonstration of the pathogens in animal samples. Sabin and Feldman (1948) first described the dye test for the detection of Toxoplasma-specific antibodies. It is highly specific and sensitive test and is still used as the reference method for the serodiagnosis of toxoplasmosis. Alternative methods which are highly sensitive, easy to perform and non time-consuming are therefore needed. Latex agglutination, indirect haemagglutination and indirect immunofluorescence test have been employed. Though latex agglutination test was found to be highly sensitive in previous studies from areas with high prevalence of Toxoplasma infection, it has never been assessed among population with comparatively low prevalence such as in Thailand. PCR technique for the detection of *Toxoplasma* has been described and evaluated by different groups (Burg *et al.*, 1989).

This study evaluated the results of IFAT, ELISA, LAT, PCR, and LAMP as laboratory test for diagnosis of anti-*T. gondii* antibodies in paired sera and whole blood samples for molecular assays.

MATERIALS AND METHODS

Diagnosis of *T. gondii* infection

1. LAMP (loop-mediated isothermal amplification)

The LAMP reaction was conducted according to original reports described by Notomi *et al.*, 2000. LAMP was carried out in a total 25- μ L reaction mixture. The primer mix (0.9 μ L) contains 40 pmol of FIP and BIP each, 5 pmol of F3 and B3 each, 20 pmol of LB and FB each, 12.5 μ L of reaction buffer (1.6 mol betaine, 40 mmol Tris-HCl [pH 8.8], 20 mmol KCl, 20 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.8 mmol each deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), 0.2% Tween 20, 16 mmol MgSO_4), 1 μ L (8 U) of *Bst* DNA polymerase (Eiken Chemical, Japan), 1 μ L of DNA, and 8.7 μ L of distilled water. The mixture was incubated at 63 °C for 1 h and then performed electrophoresis with 2% agarose gel.

2. PCR (polymerase chain reaction)

The PCR was performed essentially as described by Homan *et al.*, 2000. Briefly, the 529 bp gene was amplified from each sample by conventional PCR using primers TOX4(CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) and TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT). Each PCR consisted of 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min: an initial denaturation step consisting of incubation at 94°C for 5 min and a final extension step consisting of incubation at 72°C for 10 min were also included. After PCR amplification, the PCR products were run with 1% agarose gel electrophoresis and were stained with ethidium bromide (10 μ g/ml) for visualize.

3. LAT (latex agglutination test)

The presence of *T. gondii* antibodies was analyzed by LAT kit (Toxocheck-MT, Japan) following the protocol of Tsubota *et al.*, (1977 a and b). The procedure described in a previous report (Jittapalapong *et al.*, 2005; 2007) was followed accurately. According to the kit instructions, the cut-off titer for this test was at 1:64. The results obtained were analyzed by chi-square test, and the level of significance was set at $p < 0.05$.

4. IFAT (indirect fluorescence antibody test)

Antigen slides were incubated with cow sera diluted 1:100 in 5% bovine serum albumin (BSA) with PBS for 1 h at 37°C and then with a fluorescein isothiocyanate-labeled goat anti-bovine IgG diluted 1:200 in 5% BSA with PBS. Positive and negative control sera were included in each slide. Slides were examined under fluorescence microscopy and only a bright, linear peripheral fluorescence of the tachyzoites was considered positive.

5. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

The ELISA was performed in flat-bottom 96-well microplates (Nunc, Denmark). The purified GST-TgSAG1t was diluted to an optimal concentration (2 µg/ml) in a 50 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6), of which 50 µl was added separately to duplicate wells for each sample. Coated plates were incubated at 4°C overnight. After unabsorbed antigen was discarded, wells were blocked with PBS containing 3% skim milk (blocking solution, 100 µl / well) at 37°C for 1 h. Then, plates were washed once with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). Fifty microliters of serum diluted in the blocking solution (1:100) was added to each well and incubated at 37°C for 1 h. After incubation, wells were washed six times with PBS-T and subsequently incubated with 50 µl of goat anti-bovine IgG- horseradish peroxidase conjugate (ICN Biochemical, USA) (1:4,000) at 37°C for 1 h. After six washes, 100 µl of substrate solution [0.05% 2,2'-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid), 0.2 M sodium phosphate, 0.1 M citric acid, 0.003% H₂O₂] was added to each well. After 1 h reaction at room temperature, the optimal density (OD) was read at 415 nm by using an MTP-120 ELISA reader (Corona Electric, Japan). The ELISA titer was expressed as the reciprocal of maximum dilution that showed an ELISA value equal to or greater than 0.1, which is difference in absorbance between that for the antigen (GST-TgSAG1t) well and that for the control antigen (GST) well. The cut-off point of 0.1 was the mean OD for negative sera plus three standard deviations.

RESULTS

1. Serological examination for detection of *T. gondii* antibodies

Examination of 50 serum samples from dairy cows through IFAT, LAT and ELISA revealed that 27 (54%), 27 (54%) and 18 (36%), respectively, had antibodies against *T. gondii* (Table 1).

2. Comparative studies of different diagnostic tests for detection of *T. gondii* DNA

Sensitivity and specificity calculations of the molecular technique revealed that LAT had the highest sensitivity (100%), followed by ELISA (55.5%), LAMP (14.8%), and PCR, which demonstrated the lowest sensitivity (0%). For specificity, PCR had the highest specificity (100%) compared to LAT (91.3%), LAMP (82.6%), and ELISA (65.2%).

DISCUSSION

The variation between the results obtained from the same cow sera using different diagnostic tests might be due to differences in the sensitivity and specificity of the tests. IFAT approved by OIE (OIE, 2004), a highly specific test, is a complicated test requiring fluorescently labeled conjugated and special equipment (Shaapan *et al.*, 2008). LAT demonstrated great sensitivity (100%), was quantitative, low cost and may be easily to adopt but requires further confirmed tests due to its less specificity.

Dubey and Beattie (1988) suggested that dye test was the most specific test for *T. gondii* and was considered as the gold standard by which all other tests should be judged. However, OIE recommended IFAT in the standard test for diagnosis in animal since dye test has the major disadvantage of requiring the use of living organisms and human sera from healthy individuals as an accessory factor. Therefore, dye test had been replaced with other tests such as IFAT.

Molecular technique for detection of *T. gondii* infections is likely less sensitive since *T. gondii* is not normally appeared in blood circulation as part of its life cycle. Therefore, chances of *T. gondii*'s DNA existed in blood is low and will result of more fault negatives. da Silva and Langoni (2001) mentioned that the small size of samples analyzed by PCR as a relevant factor for different results between PCR and serology.

The results of the present work demonstrated the benefits of using the more sensitive and somewhat specific LAT for detection of *T. gondii* antibodies in cow sera. In addition, the used serological tests depended on antigen prepared from locally isolated *T. gondii*, which were much cheaper when compared with the expensive commercial kits.

Table 1 Sensitivity, specificity, and prevalence of *T. gondii* infections using different diagnostic tests compared with the IFAT

Test	+ve	-ve	Sensitivity (%)	Specificity (%)	+predictive value	Prevalence
IFAT	27	23	100	100	100	54
LAT	29	21	100	91.3	92.9	54
ELISA	18	32	55.5	65.2	65.2	46
LAMP	8	42	14.8	82.6	50	16
PCR	0	50	0	100	0	0

REFERENCES

- Burg, J. L., C. M. Grover, P. Pouletty, and J. C. Boothroyd, 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27: 1878-1792.
- Chintana, T., Y. Sukthana, B. Bunyakai, A. Lekkla, 1998. *Toxoplasma gondii* antibody in pregnant woman with and without HIV infection. Southeast Asian J. Trop Med. Public Health. 29:383-386.
- Dubey, J. P., C. P. Beattie, 1988. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA. 350pp.

- Jittapalapong, S., A. Sangvaranond, N. Pinyopanuwat, W. Chimnoi, W. Khachaeram, S. Koizumi, S. Maruyama, 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats in Satun Province, Thailand. *Vet. Parasitol.* 127:17-22.
- Jittapalapong, S., N. Pinyopanuwat, W. Chimnoi, C. Kengradomkij, C. Nithikathkul, N. Sarataphan, S. Maruyama, V. Herbreteau J. P. Hugot. 2006. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*. Infections of rodents in Thailand. The 5th Seminar on Food- and Water-borne Parasitic Zoonoses. Bangkok, Thailand. (Nov 28-30, 2006).
- Jittapalapong, S., B. Nimsupan, N. Pinyopanuwat, W. Chimnoi, H. Kabeya, S. Maruyama, 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats and dogs in the Bangkok Metropolitan area, Thailand. *Vet. Parasitol.* 145: 138-141.
- Jittapalapong, S., T. Inpankaew, A. Sangvaranond, C. Phasuk, N. Pinyopanuwat, W. Chimnoi, C. Kengradomkij, S. Saebgow, P. Pumhom, P. Arunwipat, T. Anakewit and I. D. Robertson 2008. Seroprevalence of *Neospora caninum* Infections of Dairy Cows in the North-east of Thailand. The 46th Kasetsart University Annual Conference (29 Jan-1 Feb, 2008).
- Homan, W. L., M. Vercammen, J. Braekeleer, H. Verschueren, 2000. Identification of a 200 to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30: 69-74
- Maruyama, S., H. Kabeya, R. Nakao, S. Tanaka, T. Sakai, Y. Katsube, T. Mikami, 2003. Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiol. Immunol.* 47: 147-153.
- Nhotomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28: e63
- Nishikawa, H., D. Tuntasuvan, N. Triwanatham, 1989. Preliminary survey of toxoplasmosis in dog, cat and human. *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, 12: 53-59.
- OIE 2004. *Terrestrial Manual*, 1120-1126
- Pradatsundarasa, A., T. Papasarathorn, 1966. Investigations on Toxoplasmosis in Thailand. The 2nd Conference on Parasitic Diseases. Bangkok.
- Shaapan, R. M., F. A. El-Nawawi, M. A. A. Tawfik, 2008. Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 153: 359-362.
- Sriwaranard P, Jansawan W, Satayapunt C. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in domestic cats. *Kaset. Vet. J.* , 1981: 2: 20-26.

- Sukthana, Y., T. Chintana, W. Spatanapong, C. Siriphan, A. Lekkla, R. Cheabchalrad. 2001. Predictive value of latex agglutination test in serological screening for *Toxoplasma gondii*. Southeast Asian J. Trop Med. Public Health, 32: 314-318.
- Tenter, A. M, A. R. Heckerroth, L. M. Weiss, 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol, 30: 1217-1258.
- Thiangtum, K, B. Nimsuphun , N. Pinyopanuwat , W. Chimnoi , W. Tunwattana , D. Tongthainan , S. Jittapalapong , T. Rukkwamsuk , S. Maruyama, 2006. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive felids in Thailand. Vet. Parasitol.136: 351-355.
- Tsubota, N., K. Hiraoka, Y. Sawada, T. Watanabe, S. Ohshima, 1977a. Studies on latex agglutination test for Toxoplasmosis. Jap. J. Parasitol. 26: 286-290.
- Tsubota, N., K. Hiraoka, Y. Sawada, M. Oshino, 1977b. Studies on latex agglutination test for toxoplasmosis. III. Evaluation of the microtiter test as a serologic test for toxoplasmosis in some animals. Jpn. J. Vet. Sci. 26: 291-298.
- Tuntasuvan, D., H. Nishikawa, N. Sarathapan, V. Sukhapesana, A. Wonglimasawatt, 1989. Toxoplasmosis in swine in Thailand.; The 8th Annual Livestock Conferences (June 7-9, 1989).
- Tuntasuvan, D., K. Mohkaew, J. P. Dubey, 2001. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in elephants (*Elephas maximus indicus*) in Thailand. J. Parasitol. 87: 229-230.





ประวัติผู้เขียน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายไชนันต์ร์ สุนันตะ
วัน เดือน ปี เกิด	24 มกราคม 2512
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	407/1 หมู่ที่ 16 ตำบลรอบเวียง อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย
ประวัติการศึกษา	2536 ปริญญาตรีเทคโนโลยีการเกษตรบัณฑิต (ส่งเสริมการเกษตร) สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้เชียงใหม่ 2546 ปริญญาโทเกษตรศาสตรมหาบัณฑิต (ส่งเสริมการเกษตร) มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2533 - ปัจจุบัน สัตวแพทย์ ชำนาญงาน สำนักงานปศุสัตว์อำเภอแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย