

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร



# CMVJ

Chiang Mai Veterinary Journal

Volume : 15

Number : 3 (Sep-Dec)

Year : 2560

ISSN; 1685-9502 (print)  
2465-4604 (online)



## เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

ปีที่ 15 ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม 2560  
ISSN 1685-9502 (print), 2465-4604 (online)  
<http://www.vet.cmu.ac.th/cmvmj/>

เจ้าของ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### วัตถุประสงค์

“เชียงใหม่สัตวแพทยสาร” เป็นวารสารเพื่อการเผยแพร่เผยแพร่ผลงานทางวิชาการที่มีคุณภาพในลักษณะต่างๆ เช่น บทความต้นฉบับ บทความปริทัศน์ รายงานฉบับย่อ และรายงานสัตว์ป่วย ที่เกี่ยวข้องกับทางด้านสัตวแพทยศาสตร์ (Veterinary Science) และวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีการสัตว (Animal Science and Technology) ได้แก่ ชีววิทยา สรีรวิทยา จุลชีววิทยา พยาธิวิทยา โภชนาการศาสตร์ วิทยาศาสตร์กายวิภาคศาสตร์ พันธุศาสตร์ อายุรศาสตร์ ศัลยศาสตร์ สัตวศาสตร์ วิทยาศาสตร์ทางชีวภาพวิทยาศาสตร์พื้นฐาน ระบาดวิทยาและแนวทางสุขภาพหนึ่งเดียว

บทความที่ได้รับการเผยแพร่ในเชียงใหม่สัตวแพทยสาร เป็นวารสารที่ผ่านการตรวจคุณภาพ โดยผู้ทรงคุณวุฒิอย่างน้อย 2 ท่าน ที่ไม่ทราบชื่อผู้แต่งและผู้แต่งไม่ทราบชื่อผู้ทรงคุณวุฒิ (Double-blind peer review) ความคิดเห็นของผู้เขียนแต่ละท่าน ทางกองบรรณาธิการไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป กรณีผู้ประสงค์จะนำบทความ หรือส่วนใดส่วนหนึ่ง (รูป ตาราง ฯลฯ) ที่มีการเผยแพร่ไปแล้ว ต้องได้รับอนุญาตจากกองบรรณาธิการวารสาร “เชียงใหม่สัตวแพทยสาร” คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แม้ว่าจะเป็นผลงานจากงานของผู้เขียนเองผู้แจ้งให้

### ที่ปรึกษา

คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
รองคณบดีด้านวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### บรรณาธิการ

รศ.น.สพ.ดร.กรกฎ งานวงศ์พานิชย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย

### รองบรรณาธิการ

ผศ.น.สพ.ดร.อนุชา สรณรงค์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย

### กองบรรณาธิการ

ศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์	ธนาพงษ์นุเวช	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
ศ.น.สพ.ดร.เผด็จ	ธรรมรักษ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
ศ.พญ.ผาสุก	มหรธรรณูเคราะห์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
รศ.น.สพ.ดร.ประภาส	พัชนี	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.กัมปนาท	สุนทรวิภาต	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.ปิยนันท์	ทวีลาภสวัสดิ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.วิรัชพล	ทวันนง	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.วิน	สุรเชษฐพงษ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.ภูolik	วงศ์เสถียร	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.ฉัตรโชติ	ทิตาราม	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
ผศ.น.สพ.ดร.พงศกร	เชิ่อมไมตรี	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
อ.สพ.ดร.นิธิตล	บูรณพิมพ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
อ.สพ.ญ.ดร.จารุณลักษณ์	จิรภัทรเศรษฐ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย
อ.ดร.กิตติศักดิ์	พุทธชาติ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ประเทศไทย
สพ.ญ.ดร.ปิยพร	คงเมศิ	องค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ประเทศไทย
สพ.ญ.ดร.พัชราภรณ์	แก้วไม่ง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอันดามัน ประเทศไทย
Prof. Dr. Kazuyoshi	Taya	Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan
Assoc. Prof. Dr. Ashraf	Abd El-Halim El-Sayed	Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt
Assoc. Prof. Dr. Nguyen Trong Ngu		College of Agriculture & Applied Biology, Can Tho University, Vietnam
Assoc. Prof. Dr. Ayona	Silva-Fletcher	Department of Clinical Sciences and Services, The Royal Veterinary College, University of London, UK
Dr. Janine	L. Brown	Smithsonian Conservation Biology Institute, USA
Dr. Edward	Peter Smelling	School of Physiology, University of the Witwatersrand, South Africa
Dr. Andrew	Paul Shinn	Fish Vet Group Asia Limited, Thailand

### เจ้าหน้าที่ฝ่ายจัดการวารสาร

นายธนะพันธุ์	การคนชื่อ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นางสาวสุลัดดา	เอี่ยมมาก	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นางจตุรรัตน์	โฆชนสันติ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นายธรรนินทร์	เจริญสุข	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นางสาวเดือนนภา	ดาอินทุ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### สำนักงาน

กองบรรณาธิการ “เชียงใหม่สัตวแพทยสาร”  
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
ถนนเลียบคลองชลประทาน ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100  
จดหมายอิเล็กทรอนิกส์ : [cmuvetj@gmail.com](mailto:cmuvetj@gmail.com)  
โทรศัพท์. (66)-5394-8057, 8070  
โทรสาร. (66)-5327-4710

# Chiang Mai Veterinary Medicine Journal

Volume 15 No.3 September-December 2017

ISSN 1685-9502 (print), 2465-4604 (online)

<http://www.vet.cmu.ac.th/cmuj/>

**Owner** Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University

## About journal

“Chiang Mai Veterinary Journal” aims to be a publisher of a wide range of high quality academic journals such as original articles, review article, short communication, and case report in the field of veterinary science and animal science and technology, including biology, physiology, microbiology, pathology, nutrition, anatomy, genetics, internal medicine, surgery, obstetrics, biological science, basic science, and one health.

Articles that are published under our journal are double-blind peer reviewed by at least two experts. The opinions of each author might not be agreed upon by the editorial board. Any republication of a published article, or any part of published article (figure, table, etc.) must acquire permission from the editorial board of the Chiang Mai Veterinary Journal, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University even though the individual who submits the request is the author himself/herself.

## Executive editor

Dean, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand

Associate Dean for Research Affairs, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand

## Editor-in chief

Assoc. Prof. Dr.Korakkot      Nganvongpanit      Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand

## Associate editor

Assist. Prof. Dr.Anucha      Sathanawongs      Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand

## Editor board

Prof. Dr. Roongroje	Thanawongnuwech	Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University, Thailand
Prof. Dr. Padet	Tummaruk	Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University, Thailand
Prof. Dr. Pasuk	Mahaknaukrauh	Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Assoc. Prof. Dr. Prapas	Patchanee	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Kumpanart	Sootornvipart	Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Piyanan	Taweethavonsawat	Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Weerapol	Taweenan	Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Win	Surachetpong	Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Dilok	Wongsathein	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Chatchote	Thitaram	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Phongsakorn	Chuammitri	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Lect. Dr. Nithidol	Buranapim	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Lect. Dr. Charoonluk	Jirapattharasate	Faculty of Veterinary Medicine, Mahidol University, Thailand
Lect. Dr. Kittisak	Buddhachat	Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Thailand
Dr. Piyaporn	Kongmakee	The Zoological Park Organization under the Royal Patronage of His Majesty the King, Thailand
Dr. Patcharaporn	Keawmong	Phuket Marine Biological Center, Thailand
Prof. Dr. Kazuyoshi	Taya	Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan
Assoc. Prof. Dr. Ashraf	Abd El-Halim El-Sayed	Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt
Assoc. Prof. Dr. Nguyen	Trong Ngu	College of Agriculture & Applied Biology, Can Tho University, Vietnam
Assoc. Prof. Dr. Ayona	Silva-Fletcher	Department of Clinical Sciences and Services, The Royal Veterinary College, University of London, UK
Dr. Janine	L. Brown	Smithsonian Conservation Biology Institute, USA
Dr. Edward	Peter Snelling	School of Physiology, University of the Witwatersrand, South Africa
Dr. Andrew	Paul Shinn	Fish Vet Group Asia Limited, Thailand

## Managing editor

Mr. Thanapun	Kankonsue	Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Miss Suludda	Aimmak	Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Mrs. Thitirat	Kosanasanti	Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Mr.Toranin	Charungsuk	Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Miss Duannapa	Ta-Inthu	Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand

## Address

Edit-in chief Chiang Mai Veterinary Medicine Journal  
Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University  
Chonpratan Road, Maehia, Muang, Chiang Mai 50100 Thailand  
E-mail : [cmuvetj@gmail.com](mailto:cmuvetj@gmail.com)  
Tel. (66)-5394-8057, 8070  
Fax. (66)-5327-4710



สารบัญ

เชื้อก่อโรคที่นาโดยเห็บและโอกาสในการติดต่อสู่คนในประเทศไทย ชาทะนันท์ เอี่ยมอุดมกาล	127
สัตว์เลี้ยงช่วยส่งเสริมพัฒนาการทางสังคมและอารมณ์ของเด็กได้หรือไม่ แสงเดือน ยอดอัญมณีวงศ์	137
ปัจจัยระดับตัวสัตว์ที่ส่งผลต่อการทดสอบวินิจฉัยโรคด้วยการฉีดแอนติเจนครั้งเดียวทางผิวหนัง ในลูกโคนม ในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย ธวัชชัย สิงห์หล้า, ศุภรัตน์ บุญยยาตรา, สก๊อต เจ เวลส์	147
ความชุกและปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อปรสิตในเลือดไก่หลังบ้าน ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ พัชรภรณ์ ทาแกง, สุรัชย์ พิกุลแก้ว, ณัฐกานต์ อวยวานนท์, สุวีรัตน์ หนูมี	157
ผลของพาราคอต่อการทำงานของเอนไซม์อะลานีน อะมิโนทรานส์เฟอเรส และ แอสพาเทท อะมิโนทรานส์เฟอเรส และการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ ในปลาตะเพียนขาว ( <i>Barbonymus gonionotus</i> ) ศิริรัตน์ ศรีบาลแจ่ม, ศิริภาวี เจริญวิวัฒน์ศักดิ์, ธงชัย จาปาศรี, ชไมพร จาปาศรี, บัณฑิต ยวงสร้อย	169
ความชุกและความหลากหลายพันธุกรรมของเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 จากสุกร ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ประยุทธ แซ่โค้ว, วัฒนา จูเปี้ย	179
จุลกายวิภาคของทอยูรินีเฟอร์สในงูปากกว้างน้ำเค็ม ( <i>Cerberus rynchops</i> ) จากประเทศไทย: หน่วยพื้นฐานของไต ละม้าย ทองบุญ, ศิลปชัย เสนารัตน์, เจษฎ์ เกษตระทัต, อภิญญา หัสกุล, วรรณีย์ จีระงูรสกุล, พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ, วรณพ สุขภารังษี, ณัฐรินทร์ วงศ์ธรรมวานิช	189
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และผลการต้านไวรัสของสารเคอร์คูมินอยด์ จากการสกัดจากขมิ้นชันต่อเชื้อพาร์อาร์เอสไวรัส เบมิกา อนันธิกุลชัย, ภัญชิวา เอมพรหม, กฤษฎาภรณ์ พริ้งเพระ, ภาณุวัฒน์ แยมสกุล	199
ข้อมูลทันสมัยของตัวชี้วัดทางชีวภาพของโรคไตเรื้อรังในแมว คคนางค์ ปิยะรังษี	207

---



---

 CONTENTS
 

---



---

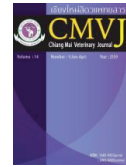
Tick-borne pathogens and their zoonotic potential for human infection In Thailand <i>Chatanun Eamudomkarn</i>	127
Do companion animals enhance social and emotional development in children? <i>Saengduean Yotanyamaneewong</i>	137
Animal-level factors affecting the results of the first single intradermal test for bovine tuberculosis in dairy calves in Chiang Mai, Thailand <i>Tawatchai Singhla, Sukolrat Boonyayatra, Scott J. Wells</i>	147
Prevalence and risk factors of blood parasites infection in backyard chickens in Chiang Mai <i>Patcharaporn Takang, Surachai Pikulkaew, Nattakarn Awaiwanont, Sureerat Numee</i>	157
Effects of paraquat on alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities and liver histopathological changes in Silver barb ( <i>Barbonymus gonionotus</i> ) <i>Sirorat Sribanjam, Siripavee Charoenwattanasak, Thongchai Champasri, Chamaiporn Champasri, Bundit Yuangsoi</i>	169
Prevalence and genetic diversity of ungulate tetraparvovirus 3 in swine in Chiang Mai province <i>Prayuth Saekhow, Vena Chupia</i>	179
Microanatomical structure of the dog-faced water snake ( <i>Cerberus rynchops</i> ) from Thailand: A functional unit of the kidney <i>Lamai Thongboon, Sinlapachai Senarat, Jes Ketratad, Apinya Huskul, Wannee Jiraungkoorskul, Pisit Poolprasert, Woranop Sukparangsi, Nattarin Wongthamwanich</i>	189
<i>In vitro</i> cytotoxicity test and antiviral activity of curcuminoids from turmeric extract against PRRS virus <i>Pemika Anantikulchai, Pandhira Emprom, Kidsadagon Pringproa, Panuwat Yamsakul</i>	199
Update on biomarkers in feline chronic kidney disease <i>Kakanang Piyarungsri</i>	207



เชียงใหม่สัตวแพทยสาร  
**Chiang Mai Veterinary Journal**

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; [www.vet.cmu.ac.th/cmvej](http://www.vet.cmu.ac.th/cmvej)



Review Article

Tick-borne pathogens and their zoonotic potential for human infection  
In Thailand

Chatanun Eamudomkarn

*Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002*

**Abstract** Ticks are one of the important vectors for transmitting various types of pathogens in humans and animals, causing a wide range of diseases. There has been a rise in the emergence of tick-borne diseases in new regions and increased incidence in many endemic areas where they are considered to be a serious public health problem. Recently, evidence of tick-borne pathogens in Thailand has been reported. This review focuses on the types of tick-borne pathogens found in ticks, animals, and humans in Thailand, with emphasis on the zoonotic potential of tick-borne diseases, i.e. their transmission from animals to humans. Further studies and future research approaches on tick-borne pathogens in Thailand are also discussed.

**Keywords:** ticks, tick-borne pathogens, tick-borne diseases, zoonosis

\*Corresponding author: Chatanun Eamudomkarn *Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002.*

Tel: 6643363246; email: [chatea@kku.ac.th](mailto:chatea@kku.ac.th)

*Article history; received manuscript: 12 June 2017, accepted manuscript: 22 August 2017, published online: 1 September 2017*



## บทความปริทัศน์

# เชื้อก่อโรคที่นำโดยเห็บและโอกาสในการติดต่อสู่คนในประเทศไทย

ชาเทนันท์ เอี่ยมอุดมกาล

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

**บทคัดย่อ** เห็บจัดเป็นพาหะที่สำคัญชนิดหนึ่งในการแพร่กระจายของเชื้อโรคและยังนำเชื้อก่อโรคได้หลากหลายชนิดทั้งในคนและในสัตว์ ซึ่งในปัจจุบันมีอุบัติการณ์ของการเกิดโรคที่นำโดยเห็บเพิ่มมากขึ้นในพื้นที่ใหม่และในพื้นที่ที่เคยมีการระบาดอยู่ก่อนเดิมก็พบว่ามี การติดเชื่อเพิ่มมากขึ้นซึ่งจัดเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขทั่วโลก สำหรับในประเทศไทยนั้นก็พบว่ามีการรายงานเชื้อก่อโรคที่นำโดยเห็บ ซึ่งในบทความปริทัศน์นี้จะมุ่งเน้นไปที่ชนิดของเชื้อก่อโรคที่นำโดยเห็บที่พบในเห็บ สัตว์ และคนในประเทศไทย และเน้นในประเด็นของโรคที่นำโดยเห็บจากสัตว์สู่คน รวมถึงการศึกษาและงานวิจัยที่ต้องการเพิ่มเติมสำหรับอนาคตเกี่ยวกับเชื้อก่อโรคที่นำโดยเห็บในประเทศไทย

**คำสำคัญ** เห็บ เชื้อก่อโรคที่นำโดยเห็บ โรคที่นำโดยเห็บ โรคติดต่อจากสัตว์สู่คน

\* ผู้รับผิดชอบบทความ ชาเทนันท์ เอี่ยมอุดมกาล ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002 โทรศัพท์ 6643363246 อีเมล chatea@kku.ac.th

**ข้อมูลบทความ** วันที่ได้รับบทความ 12 มิถุนายน พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 22 สิงหาคม พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 1 กันยายน พ.ศ.2560





## Introduction

Ticks are one of the blood-feeding vectors which can transmit various types of pathogens in humans and animals; they are second to mosquitoes as a vector for human diseases (Brites-Neto et al., 2015; de la Fuente et al., 2008; Parola and Raoult, 2001) and are the major vectors of animal diseases (Chomel, 2011; Irwin and Jefferies, 2004). Tick-borne pathogens include a wide range of viruses, protozoa, bacteria, and rickettsia. Each year, more than 100,000 cases of human symptoms worldwide are caused by tick-borne pathogens (de la Fuente et al., 2008). One tick can often transmit more than one pathogen, including tick-borne diseases (TBDs) which are illnesses transmitted to humans and animals by ticks. Most TBDs are zoonotic and are considered an important public health problem. The importance of vector-borne diseases has been emphasized by the World Health Organization (WHO), which launched a global campaign in 2014 against vector-borne diseases with the quote "small bite: big threat." In recent years, TBDs and emerging vector-borne diseases have been of increasing concern in many regions of the world, e.g. the USA, Europe, and China. In Thailand, however, TBDs have often been misdiagnosed, and their prevalence underestimated because of inadequate surveillance networks and lack of up-to-date information.

We reviewed the available literature on the various types of tick-borne pathogens found in animals especially in dogs and humans in

Thailand. Moreover, this review considered the zoonotic potential of TBDs and their transmission from animals to humans in Thailand.

## Tick species in Thailand

Ticks are found worldwide but major in countries with warm and humid climates with the number more than 850 species (Munderloh, 2011). The record from fossil shows that ticks are originated 65–146 million years ago (Munderloh, 2011). Tick belongs to the Phylum *Arthropoda* and the Class *Arachnida* Subclass *Acari* with consist of three families: *Ixodidae*, *Argasidae*, and *Nuttalliellidae* (Schwan, 2011). Hard ticks, *Ixodidae*, including 702 described species covering most of the medical and veterinary importance, containing ticks of the genus *Ixodes*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Cosmiomma*, *Aponomma*, *Margaropus*, *Rhipicentor* and *Hyalomma* (Brites-Neto et al., 2015). Soft ticks, *Argasidae*, including 193 described species from the genus *Argas*, *Ornithodoros*, *Otobius*, *Antricola*, *Nothoaspis* and *Carios* (Brites-Neto et al., 2015). The family *Nuttalliellidae* has only one species, *Nuttalliella namaqua* that found only in South Africa and Tanzania (Brites-Neto et al., 2015). The biology of soft ticks and hard ticks are the difference in biology. The hard ticks or ixodids has three stages: larva, nymphal, and adult while soft ticks, argasids, has multiple stages: larval, multiple nymphal stages, and mature adult (Schwan, 2011). Moreover, an adult of hard tick feeds only once while soft tick adult can feed multiple times



(Schwan, 2011). The first known record of ticks in Thailand was performed at the end of the 19<sup>th</sup> century by Neuman then during the 20<sup>th</sup> century; there were 53 species of ticks were identified in Thailand by collecting ticks on domestic and wild animals in different areas of Thailand (Cornet et al., 2009). Based on the study of Nithikathkul (2002), there were only 2 species of ixodid ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*, were found in 50 domestic animals (dogs, cattle and buffalo) in Samut prakan Province and the main species of tick was *R. sanguineus*. This result is in concordance with a study of Poolkhetkit (2015) that collected ticks in the buffer zone of Sai Yok National Park, Thailand, found that total of 85 ticks from cattle was identified as *R. microplus*. *R. microplus* is the only one species that found in cattle in Southeast Asia, including Thailand (Cornet et al., 2009; Poolkhetkit et al., 2015). Moreover, *R. microplus* was also found in humans in Thailand and represents as a potential vector for zoonosis of Seletar and Wad Medani viruses (Cornet et al., 2009). Recently, the study of wild animals and tick species in Thailand performed by Sumrandee and coworkers (Sumrandee et al., 2016), found that ticks belonging to 4 genera and 8 species from a total of 79 ticks that collected from wild boar, sambar deer and barking deer. The 4 tick genera consists of the genus *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* and *Amblyomma*.

Infected with large numbers of ticks in domestic animals and wild animals causes health problems. However, the main problems caused by

ticks are due to the capability of transmission of tick-borne pathogens, which are of great public health problem globally.

### Tick-borne pathogens in small companion animals

Small companion animals are very close to humans. Therefore, the transmission of TBDs from companion animals to humans is of great concern. The most common TBDs of companion animals found in Southeast Asia are babesiosis, ehrlichiosis, hepatozoonosis and bartonellosis (Baneth et al., 2007; de la Fuente et al., 2008; Irwin and Jefferies, 2004). Many species of dog ticks have been identified; among these, the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, is the most abundant and the main cause of TBDs in Southeast Asia (Irwin and Jefferies, 2004). In Thailand, these diseases also found as the most common TBDs. However different regions of Thailand have different survey data of diseases.

Canine babesiosis is caused by *Babesia canis*, which is endemic in dogs in Thailand. In a study of 303 domestic dogs in Khon Kaen province using PCR technique, 19.5% were found to be infected with *B. canis*, compared with single infection with *Ehrlichia canis* (3.0%) and co-infection with *Hepatozoon canis* and *E. canis* (0.3%) (Laummanwai et al., 2014). Another study also found that babesiosis was the most common TBD in dogs in Khon Kaen Province (Juasook et al., 2016). Moreover, that study showed that in 280 leftover blood samples from domestic dogs that were negative for parasites by microscopic



examination, 80 (28.57%) were positive for tick-borne pathogen DNA (Juasook et al., 2016). This result indicates that PCR-based technique has high sensitivity and specificity for the diagnosis of TBDs.

Babesiosis is not only important in dogs, but also in humans. Human babesiosis has been reported in other Asian countries, for example Taiwan, Japan, China, and Korea (Kim et al., 2007; Shih et al., 1997; Wang and Huang, 2014; Wei et al., 2001; Zhou et al., 2014). Even though human babesiosis has never been reported in Thailand, there is strong evidence that cases have somehow been initially diagnosed as malaria because of the similarity between the two pathogens (Zhou et al., 2013). Therefore, cases of human babesiosis in malaria-endemic countries like Thailand might have overlooked or been misdiagnosed as malaria. This emphasizes that more surveillance of TBDs is needed in Thailand. Moreover, the finding of rodent babesia in Chiang Mai province which resembled *Babesia microti*, the most common strain associated with human babesiosis, indicates that careful monitoring is needed (Dantrakool et al., 2004).

Another TBDs in humans that is well known in many parts of the world is Lyme disease, which is caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi*. This disease is endemic in North America and Europe, and is also found in some parts of Asia, e.g. China, Taiwan and Japan (D'Arco et al., 2017; Liu et al., 2000; Shih et al.,

1998; Steere et al., 2016). The skin lesion erythema migrans is commonly found in early infection. If left untreated, the infection can affect joints, the heart and the nervous system (D'Arco et al., 2017; Steere et al., 2016). Nevertheless, Lyme disease has never been reported in Thai populations. Interestingly, a recent study of blood samples and ticks from Chiang Mai and Phuket provinces found that one dog (0.3%) from Chiang Mai was positive for *B. burgdorferi* (Sthitmatee et al., 2016). This strain has 97% to 100% genetic identity when compared to strains from the USA. This finding confirms that TBDs in Thailand should be carefully monitored and that more data surveys of emerging zoonotic diseases are needed.

As mentioned above, humans can become infected by many tick-borne pathogens of dogs, and therefore TBDs in dogs are of great concern as the dog is the most common household companion animal. Furthermore, dogs have often been considered for use as effective indicator animals to assess the risk of human infection (Andersson et al., 2017; Pérez Vera et al., 2014). As there is a large population of stray dogs throughout Thailand, a much higher rate of TBDs is expected because of their greater exposure to ticks. But to date there is little data on the surveillance of TBDs in dogs, and the prevalence in humans is underestimated. Therefore, further studies could provide better knowledge for the prevention of zoonotic infections.



## Spotted fever group rickettsial species in animals associated with human diseases

Tick-borne pathogens are thought to be accountable for more than 100,000 cases of infection in humans worldwide and are the most important causes of diseases in domestic and wild animals (de la Fuente et al., 2008). Febrile illness in patients throughout the world is often linked to rickettsial infections, also called typhus (Ahantarig et al., 2008; Rathi and Rathi, 2010). The types of typhus fever are louse-borne, flea-borne, mite-borne scrub typhus, and tick-borne spotted fever. To date, about 20 spotted fever group rickettsial species (SFG), which are transmitted by ticks, have been identified throughout the world, and many of them are emerging human pathogens (Wood and Artsob, 2012). The Thai tick typhus isolate of SFG, TT-118, was first obtained from a mixed pool of *Ixodes* sp. and *Rhipicephalus* sp. larval ticks collected from *Rattus rattus* in Chiang Mai province in 1962 (Ahantarig et al., 2008; Jiang et al., 2005; Robertson and Wisseman, 1973). Later, the isolate TT-118 was determined to be a strain of *Rickettsia honei*, which is the agent of Flinders Island spotted fever in Australia (Stenos et al., 1998). The first three clinical cases of SFG rickettsiosis in Thailand were reported in 1994 in Chiang Mai province (Sirisanthana et al., 1994). These cases were confirmed by serological methods, but the causative agent of the disease was not isolated and could not be specified. Subsequently, several SFG rickettsiosis cases have been reported in Thailand: 8 cases in Kancharaburi province, 3 in Chiang Mai province,

1 in Bangkok and 9 in the north and northeastern regions (Bhengsrri et al., 2016; Fournier et al., 2004; Jiang et al., 2005; Parola et al., 2003b; Sangkasuwan et al., 2007). The first molecular detection and confirmation of *R. honei* TT-118 in a clinical sample from a Thai patient was performed by polymerase chain reaction (PCR) in 2005 (Jiang et al., 2005).

Not only humans in Thailand have been infected with SFG, but also animals. The first study of SFG rickettsiosis in Thai animals was conducted in 1996 (Okabayashi et al., 1996). They studied the seroepidemiology of SFG infection in many species of wild rats captured in Kancharaburi and Chanthaburi provinces in 1976 and 1977. The results found that 62.2% were positive for SFG by antibody detection. The species of rat which had the highest positive rate was *Bandicota indica*, indicating that it is an important reservoir of SFG in Thailand. Moreover, the results of this study indicated that wild rats were infected throughout Thailand in the 1970s, before the first report of human cases in the country in 1994. There is much available evidence on the molecular detection of *Rickettsia* spp. in ticks in Thailand. As mentioned above, the first discovery of Thai tick typhus was from a pool of *Ixodes* sp. and *Rhipicephalus* sp. larva. Subsequently, among ticks collected at Sangkhalaburi, near the Thai–Myanmar border, *Rickettsia* sp. strains RDa420 and RDla440 were detected in *Dermacentor auratus* collected from a bear and *Dermacentor* sp. collected from a wild pig nest, respectively (Parola et al., 2003a). More molecular evidence for *Rickettsia* spp. was found



in ticks collected from plants in Khao Yai National Park, Nakhon Nayok province, and Khao Ang Rue Nai Wildlife Sanctuary, Chachoengsao province (Hirunkanokpun et al., 2003). The study of four hard tick species (*Haemaphysalis lagrangei*, *H. bispinosa*, *Amblyomma testudinarium* and *A. integrum*) along tourist nature trails at ten locations in Thailand found that they harbored *Rickettsia* spp. Phylogenetic analysis showed that rickettsia genotypes were closely related to the species which caused diseases in human (Malaisri et al., 2015). Recently, four species of *Rickettsia* were found in ticks collected from sambar deer (Sumrandee et al., 2016). Remarkably, most species of ticks in that study were found on humans in Thailand.

The above literature review shows that all tick species harboring *Rickettsia* spp. are potential vectors for transmitting diseases to humans. Nevertheless, a knowledge gap exists in that updated surveys of reservoirs of SFG and an estimation of the degree of zoonotic potential are not available.

## Conclusions

Tick-borne diseases are considered to be of medical and veterinary importance throughout the world. This review presents an updated history of tick-borne pathogens that have been identified, both in ticks and hosts, in Thailand. It shows that tick-borne pathogens are common in animals and the environment in Thailand. Furthermore, there is much evidence showing that tick-borne pathogens can cause severe infection in humans

and animals. In the past two decades, there has been a rise in the emergence of vector-borne diseases in new regions, and many endemic areas have seen increased incidence (Kilpatrick and Randolph, 2012). Several factors account for the increased number of emerging diseases, including TBDs. People are participating in more outdoor activities, which results in more contact with ticks and tick-borne pathogens (Parola and Raoult, 2001). The movement of pathogens may arise from trade and travel worldwide (Kilpatrick and Randolph, 2012). Importing of animals from TBDs endemic areas has increased. Therefore, proper quarantine of imported animals and animal products will prevent the spread of tick-borne pathogens. An awareness of tick-borne pathogens in animals and humans and their distribution will allow for the development of better plans for the prevention and control of zoonotic TBDs. However, the significance of these pathogens and the zoonotic potential remain mostly unknown in Thailand. Therefore, the vectors and animal reservoirs should be studied to provide essential information about zoonosis. Moreover, there are still many knowledge gaps on TBDs in Southeast Asia, including Thailand. Insufficient information on the epidemiology of TBDs is of great concern. The laboratory is of critical importance in the diagnosis of TBDs to provide data to facilitate control strategies.

In conclusion, TBDs should be of more concern in Thailand as there is evidence showing that tick-borne pathogens affect both humans and animals. Moreover, further studies are needed on the pathogens in tick populations and their role in



diseases of humans and animals, their geographical distribution, the relationships between hosts and vectors, the reservoir hosts and the degree of zoonotic potential in humans.

## Acknowledgement

I would like to thanks Dr. Christopher Salisbury for English editing, the Neglected, Zoonosis and Vector Borne Disease Research Group, Research and Diagnostic Center for Emerging Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Khon Kaen University for supporting and Prof. Thidarut Boonmars for scientific guidance.

## References

- Ahantarig, A., Trinachartvanit, W., Milne, J.R., 2008. Tick-borne pathogens and diseases of animals and humans in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 39, 1015-1032.
- Andersson, M.O., Tolf, C., Tamba, P., Stefanache, M., Waldenstrom, J., Dobler, G., Chitimia-Dobler, L., 2017. Canine tick-borne diseases in pet dogs from Romania. *Parasit Vector* 10, 155.
- Baneth, G., Samish, M., Shkap, V., 2007. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J. Parasitol.* 93, 283-299.
- Bhengsri, S., Baggett, H.C., Edouard, S., Dowell, S.F., Dasch, G.A., Fisk, T.L., Raoult, D., Parola, P., 2016. Sennetsu Neorickettsiosis, Spotted Fever Group, and Typhus Group Rickettsioses in Three Provinces in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95, 43-49.
- Brites-Neto, J., Duarte, K.M., Martins, T.F., 2015. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. *Vet World* 8, 301-315.
- Chomel, B., 2011. Tick-borne infections in dogs-an emerging infectious threat. *Vet. Parasitol.* 179, 294-301.
- Cornet, J.-P., Demoraes, F., Souris, M., Kittayapong, P., Gonzalez, J.-P., 2009. Spatial distribution of ticks in Thailand: a discussion basis for tick-borne virus spread assessment. *Int. J. Geo-Inf.* 5, 57-62.
- D'Arco, C., Dattwyler, R.J., Arnaboldi, P.M., 2017. *Borrelia burgdorferi*-specific IgA in Lyme Disease. *EBioMedicine.* 19, 91-97.
- Dantrakool, A., Somboon, P., Hashimoto, T., Saito-Ito, A., 2004. Identification of a new type of *Babesia* species in wild rats (*Bandicota indica*) in Chiang Mai Province, Thailand. *J. Med. Microbiol.* 42, 850-854.
- de la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E., 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci.* 13, 6938-6946.
- Fournier, P.E., Allombert, C., Supputamongkol, Y., Caruso, G., Brouqui, P., Raoult, D., 2004. Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J. Med. Microbiol.* 42, 816-818.
- Hirunkanokpun, S., Kittayapong, P., Cornet, J.P., Gonzalez, J.P., 2003. Molecular evidence for novel tick-associated spotted fever group rickettsiae from Thailand. *J. Med. Entomol.* 40, 230-237.
- Irwin, P.J., Jefferies, R., 2004. Arthropod-transmitted diseases of companion animals in Southeast Asia. *Trends Parasitol.* 20, 27-34.
- Jiang, J., Sangkasuwan, V., Lerdthusnee, K., Sukwit, S., Chuenchitra, T., Rozmajzl, P.J., Eamsila, C., Jones, J.W., Richards, A.L., 2005. Human



- Infection with *Rickettsia honei*, Thailand. *Emerging Infect. Dis.* 11, 1473-1475.
- Juasook, A., Boonmars, T., Sriraj, P., Aukkanimart, R., Sudsan, P., Wonkchalee, N., Boonjaraspinyo, S., Laummaunwai, P., Maleewong, W., Ployngam, T., Jitasombuti, P., Ratanasuwan, P., 2016. Misdiagnose tick-borne pathogens in domestic dogs in Khon Kaen province, demonstrated using molecular identification. *Chiang Mai V J.* 14, 13-22.
- Kilpatrick, A.M., Randolph, S.E., 2012. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet.* 380, 1946-1955.
- Kim, J.Y., Cho, S.H., Joo, H.N., Tsuji, M., Cho, S.R., Park, I.J., Chung, G.T., Ju, J.W., Cheun, H.I., Lee, H.W., Lee, Y.H., Kim, T.S., 2007. First case of human babesiosis in Korea: detection and characterization of a novel type of *Babesia* sp. (KO1) similar to ovine babesia. *J. Med. Microbiol.* 45, 2084-2087.
- Laummaunwai, P., Sriraj, P., Aukkanimart, R., Boonmars, T., Boonjaraspinyo, S., Sangmaneedet, S., Potchimlee, P., Khianman, P., Maleewong, W., 2014. Molecular detection and treatment of tick-borne pathogens in domestic dogs in Khon Kaen, northeastern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 45, 1157-1166.
- Liu, X., Sheng, R., Wang, A., Qin, S., 2000. The diagnosis and treatment of Lyme disease: a report of six cases. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 22, 398-399.
- Malaisri, P., Hirunkanokpun, S., Baimai, V., Trinachartvanit, W., Ahantarig, A., 2015. Detection of *Rickettsia* and *Anaplasma* from hard ticks in Thailand. *J. Vector Ecol.* 40, 262-268.
- Munderloh, U.G. 2011. Emerging and reemerging tick-borne infections: genetic manipulation of intracellular tick-borne pathogens, In: KING, L.J. (Ed.) *Critical needs and gaps in understanding Prevention, amelioration, and Resolution of lyme and Other tick-borne diseases* The short-term and long-term outcomes. The national academies press, 38-41.
- Nithikathkul, C., Polseela, P., Changsap, B., Leemingsawat, S., 2002. Ixodid ticks on domestic animals in Samut Prakan Province, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 33 Suppl. 3, 41-44.
- Okabayashi, T., Tsutiya, K., Muramatsu, Y., Ueno, H., Morita, C., 1996. Serological survey of spotted fever group rickettsia in wild rats in Thailand in the 1970s. *Microbiol Immuno.* 40, 895-898.
- Parola, P., Cornet, J.P., Sanogo, Y.O., Miller, R.S., Thien, H.V., Gonzalez, J.P., Raoult, D., Telford, I.S., Wongsrichanalai, C., 2003a. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1600-1608.
- Parola, P., Miller, R.S., McDaniel, P., Telford, S.R., 3rd, Rolain, J.M., Wongsrichanalai, C., Raoult, D., 2003b. Emerging rickettsioses of the Thai-Myanmar border. *Emerging Infect. Dis.* 9, 592-595.
- Parola, P., Raoult, D., 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect. Dis.* 32, 897-928.
- Perez Vera, C., Kapiainen, S., Junnikkala, S., Aaltonen, K., Spillmann, T., Vapalahti, O., 2014. Survey of selected tick-borne diseases in dogs in Finland. *Parasit Vector.* 7, 285.
- Poolkhetkit, S., Chowattanapon, W., Sungpradit, S., Changbunjong, T., 2015. Molecular Detection of Blood Protozoa in Ticks Collected from Cattle in The Buffer Zone of Sai Yok National Park, Thailand. *Wetchasan Sattawaphaet.* 45, 7.
- Rathi, N., Rathi, A., 2010. Rickettsial infections: Indian perspective. *Indian Pediatr.* 47, 157-164.
- Robertson, R.G., Wisseman, C.L., Jr., 1973. Tick-borne rickettsiae of the spotted fever group in West Pakistan. II. Serological classification of isolates



- from West Pakistan and Thailand: evidence for two new species. *Am. J. Epidemiol.* 97, 55-64.
- Sangkasuwan, V., Chatyingmongkol, T., Sukwit, S., Eamsila, C., Chuenchitra, T., Rodkvamtook, W., Jiang, J., Richards, A.L., Lerdthusnee, K., Jones, J.W., 2007. Description of the first reported human case of spotted fever group rickettsiosis in urban Bangkok. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 891-892.
- Schwan, T.G. 2011. Natural history of ticks: evolution, adaptation, and biology, In: KING, L.J. (Ed.) Critical needs and gaps in understanding Prevention, amelioration, and Resolution of Lyme and Other tick-borne diseases The short-term and long-term outcomes. The national academies press, 41-43.
- Shih, C.M., Liu, L.P., Chung, W.C., Ong, S.J., Wang, C.C., 1997. Human babesiosis in Taiwan: asymptomatic infection with a *Babesia microti*-like organism in a Taiwanese woman. *J. Clin. Microbiol.* 35, 450-454.
- Shih, C.M., Wang, J.C., Chao, L.L., Wu, T.N., 1998. Lyme disease in Taiwan: first human patient with characteristic erythema chronicum migrans skin lesion. *J. Clin. Microbiol.* 36, 807-808.
- Sirisanthana, T., Pinyopompanit, V., Sirisanthana, V., Strickman, D., Kelly, D.J., Dasch, G.A., 1994. First cases of spotted fever group rickettsiosis in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 682-686.
- Steere, A.C., Strle, F., Wormser, G.P., Hu, L.T., Branda, J.A., Hovius, J.W., Li, X., Mead, P.S., 2016. Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primers*, 16090.
- Stenos, J., Roux, V., Walker, D., Raoult, D., 1998. *Rickettsia honei* sp. nov., the aetiological agent of Flinders Island spotted fever in Australia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 4, 1399-1404.
- Sthitmatee, N., Jinawan, W., Jaisan, N., Tangjitjaroen, W., Chailangkarn, S., Sodarat, C., Ekgatat, M., Padungtod, P., 2016. Genetic and Immunological Evidences of *Borrelia burgdorferi* in Dog in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 47, 71-77.
- Sumrandee, C., Baimai, V., Trinachartvanit, W., Ahantari, A., 2016. Molecular detection of *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Coxiella* and *Francisella* bacteria in ticks collected from Artiodactyla in Thailand. *Ticks Tick Borne Dis.* 7, 678-689.
- Wang, H., Huang, F., 2014. Babesia infection in the southwest of china, a case report. *Jundishapur J Microbiol.* 7, e13504.
- Wei, Q., Tsuji, M., Zamoto, A., Kohsaki, M., Matsui, T., Shiota, T., Telford, S.R., 3rd, Ishihara, C., 2001. Human babesiosis in Japan: isolation of *Babesia microti*-like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2178-2183.
- Wood, H., Artsob, H., 2012. Spotted fever group rickettsiae: a brief review and a Canadian perspective. *Zoonoses Public Health* 59 Suppl 2, 65-79.
- Zhou, X., Li, S.G., Chen, S.B., Wang, J.Z., Xu, B., Zhou, H.J., Ge, H.X., Chen, J.H., Hu, W., 2013. Co-infections with *Babesia microti* and *Plasmodium* parasites along the China-Myanmar border. *Infect Dis Poverty.* 2, 24.
- Zhou, X., Li, S.G., Wang, J.Z., Huang, J.L., Zhou, H.J., Chen, J.H., Zhou, X.N., 2014. Emergence of human babesiosis along the border of China with Myanmar: detection by PCR and confirmation by sequencing. *Emerg Microbes Infect.* 3, e55.







เชียงใหม่สัตวแพทยสาร  
**Chiang Mai Veterinary Journal**

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; [www.vet.cmu.ac.th/cmvej](http://www.vet.cmu.ac.th/cmvej)



**บทความปริทัศน์**

**สัตว์เลี้ยงช่วยส่งเสริมพัฒนาการทางสังคมและอารมณ์ของเด็กได้หรือไม่**

แสงเดือน ยอดอัญมณีวงศ์

ภาควิชาจิตวิทยา คณะมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.สุเทพ อ.เมืองเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

**บทคัดย่อ** พ่อแม่จำนวนมากมีความเชื่อว่าสัตว์เลี้ยงสามารถส่งเสริมพัฒนาการของเด็ก โดยเฉพาะพัฒนาการทางสังคมและอารมณ์ ความคิดนี้แม้ได้รับการสนับสนุนจากงานวิจัยหลายชิ้น แต่มีข้อสงสัยเช่นกัน บทความนี้อภิปรายว่าพ่อแม่ควรมีบทบาทอย่างไร หากต้องการใช้สัตว์เลี้ยงช่วยส่งเสริมพัฒนาการทางสังคมและอารมณ์ให้กับบุตร โดยส่วนใหญ่ งานวิจัยแสดงให้เห็นว่า สัตว์เลี้ยงจะส่งผลทางบวกต่อพัฒนาการเด็กภายใต้เงื่อนไขคือ พ่อและแม่ต้องเข้ามาร่วมในกิจกรรมด้วย และยังคงควรมีการศึกษาวิจัยในประเด็นอื่นต่อ

**คำสำคัญ** สัตว์เลี้ยง เด็ก การส่งเสริมพัฒนาการทางสังคมและอารมณ์

\* ผู้รับผิดชอบบทความ แสงเดือน ยอดอัญมณีวงศ์ ภาควิชาจิตวิทยา คณะมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200 โทรศัพท์ 08-8142-9792  
อีเมลล์ [saengduean.y@cmu.ac.th](mailto:saengduean.y@cmu.ac.th)

**ข้อมูลบทความ** วันที่ได้รับบทความ 18 สิงหาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 6 กันยายน พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 12 กันยายน พ.ศ.2560



Review Article

## Do companion animals enhance social and emotional development in children?

Saengduean Yotanyamaneewong

*Department of Psychology, Faculty of Humanities, Chiang Mai University, Suthep, Muang,  
Chiang Mai 50200*

---

**Abstract** Many parents believe that companion animals enhance their children development, especially social and emotional development. While some research supported this idea, there are still criticisms. This article discusses about parents' roles if they want to use companion animal as an assistance to enhance their children's social and emotional development. The article concludes that companion animals may have positively influence on children's development under the condition of parent's involvement. Also, there is an empathy room in this area to be filled.

**Keywords:** companion animals, children, social and emotional development.

---

Corresponding author: Saengduen Yotanyamaneewong *Department of Psychology, Faculty of Humanities, Chiang Mai University, Suthep, Muang, Chiang mai, 50200* Tel: 08-8142-9792; email: saengduean.y@cmu.ac.th

---

*Article history; received manuscript: 18 August 2017, accepted manuscript: 6 September 2017, published online: 12 September 2017*



## บทนำ

สัมพันธภาพระหว่างมนุษย์และสัตว์เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นมานาน อดีตมนุษย์เลี้ยงสัตว์เพื่อใช้ในการดำรงชีวิต เป็นการเลี้ยงเพื่อการบริโภคและใช้งาน เช่น การแกะรอย ช่วยในการล่าสัตว์ หรือเฝ้ายาม (O'Haire, 2010; Cirulli et al., 2011) ดังนั้นความผูกพันที่เกิดขึ้นจึงไม่ลึกซึ้ง ต่อมาสัตว์หลายสายชนิดมีบทบาทที่เปลี่ยนไป ทำให้สัตว์ได้รับการปฏิบัติที่แตกต่างจากเดิม เช่น มีการตั้งชื่อ ได้รับการดูแลที่นอกเหนือจากการให้อาหาร เช่น การอาศัยอยู่ร่วมในชายคาเดียวกันกับมนุษย์ มีฐานะเป็นสัตว์เลี้ยงที่เป็นเพื่อน (companion animal) มากกว่าเป็นเพียงแค่วัวเลี้ยง (pet) จนเปรียบเสมือนสมาชิกในครอบครัวมากกว่าสัตว์เลี้ยง ทำให้มนุษย์มีความผูกพันกับสัตว์เลี้ยงอย่างลึกซึ้งมากขึ้น (O'Haire, 2010)

ในประเทศไทยมีครอบครัวจำนวนมากที่มีสัตว์เลี้ยง จากการสำรวจของสำนักงานปศุสัตว์เขต 1-9 ในโครงการณรงค์ป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า ปี พ.ศ.2559 พบจำนวนสุนัขและแมวที่มีเจ้าของรวมจำนวน 9,163,373 ตัว (Bureau of Disease Control and Veterinary Service. 2017) และหากนับแมว ปลา นก กระต่าย และสัตว์ชนิดอื่นด้วย น่าจะมีจำนวนสัตว์เลี้ยงที่อาศัยอยู่ร่วมกับมนุษย์มากกว่าสี่ล้านตัว นั่นหมายถึงในสังคมไทยเองก็มีโอกาสไม่น้อยที่มนุษย์ (ทั้งเด็กหรือผู้ใหญ่) และสัตว์เลี้ยงได้อยู่ใกล้ชิดและเกิดความผูกพันกัน

บทความนี้มีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบายให้เห็นถึงความสัมพันธ์และประโยชน์ของสัตว์เลี้ยงที่ส่งผลต่อพัฒนาการทางอารมณ์และสังคมของเด็ก โดยในเนื้อหาจะพูดถึงสัตว์ในบริบทของสัตว์เลี้ยงที่อยู่ในลักษณะของสัตว์เลี้ยงที่เป็นเพื่อน ว่าส่งผลอย่างไรต่อพัฒนาการทางอารมณ์และสังคมของเด็ก

## งานวิจัยเกี่ยวกับประโยชน์ของสัตว์เลี้ยง

ประโยชน์ของการที่เด็กได้มีปฏิสัมพันธ์กับสัตว์หรือได้เลี้ยงสัตว์ด้วยตนเองนั้น มีการศึกษาวิจัยตั้งแต่ช่วงปี พ.ศ.2523 เป็นต้นมาจนถึงปัจจุบัน (Beck and Katcher, 1984; Brodie and Biley, 1999; Barker and Wolen, 2008; Endenburg and Lith, 2011; Jalongo, 2015) จากรายงานผลการศึกษาและการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับสัมพันธภาพระหว่างเด็กและสัตว์เลี้ยง ได้ชี้ให้เห็นถึงผลของการเลี้ยงสัตว์ที่ส่งผลทางบวกต่อพัฒนาการหลายด้านต่างของเด็ก ทั้งด้านอารมณ์และด้านสังคม

ด้านอารมณ์ เช่น การเลี้ยงสัตว์จะพัฒนาความเห็นอกเห็นใจ (empathy) การมีอัตมโนทัศน์ (self-concept) และความเชื่อมั่นในตนเอง (self-esteem) (Poresky, 1990; Taylor and Kuo, 2006; Daly and Morton, 2006, 2009; Esposito et al., 2011)

ด้านสังคม เช่น งานวิจัยของ Linder et al. (2017) ที่ศึกษาในเด็กและสุนัข ได้นำเสนอว่าเด็กที่น้ำหนักเกินเกณฑ์และมีเพื่อนน้อย จะมีความผูกพันกับสุนัขของตัวเองมากกว่าเด็กน้ำหนักตัวปกติ ทั้งสุนัขยังสามารถเปรียบเสมือนแหล่งพึ่งพิงทางสังคม (social support) แทนเพื่อนได้อีก นอกจากนั้นการเลี้ยงสัตว์ยังช่วยพัฒนาทักษะการเข้าสังคม (social skills) ลดปัญหาพฤติกรรมก้าวร้าวและเพิ่มปฏิสัมพันธ์ในการเข้าสังคมและการสื่อสารของเด็กที่มีภาวะออทิสติก (O'Haire, 2010, 2013; Lasa et al., 2013; Chutimon I and Piyanan 2016) ประกอบกับสื่อมวลชนที่ได้เสนอภาพประโยชน์ของสัตว์เลี้ยง ทำให้ผู้ปกครองจำนวนมากมีความเชื่อและกระตือรือร้นที่จะเปิดประสบการณ์การให้ลูกของตนเองได้อยู่กับสัตว์เลี้ยง เพราะคาดหวังว่าเด็กจะได้เรียนรู้เรื่องความรับผิดชอบ การเห็นอกเห็นใจผู้อื่นผ่านการเลี้ยงสัตว์ แม้จะมีความกังวลว่าการเลี้ยงสัตว์จะส่งผลกระทบต่อสุขภาพทางร่างกายอยู่บ้าง



เช่น เป็นตัวกระตุ้นโรคหอบหืด ความไม่สะอาดหรือแมลงที่มาจากสัตว์แต่หากสามารถจัดการดูแลความสะอาดและสุขภาพของสัตว์ได้ดี ก็จะไม่ส่งผลกระทบต่อมากนัก (Nichanun et al., 2010) นอกจากนี้ อภาววรรณและคณะ (Apwan et al., 2012) เสนอว่าแม้ว่าการเลี้ยงสัตว์อาจก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับเด็กที่เป็นหอบหืด แต่พบว่าปัญหาที่เกิดจากสัตว์เลี้ยงก็มีน้ำหนักไม่ต่างกับปัญหาที่เกิดจากปัจจัยอื่นในบ้านที่ไม่ได้มาจากสัตว์เลี้ยง เช่น ไรฝุ่น ความสะอาดในบ้านและสมาชิกในบ้าน และการสูบบุหรี่ของสมาชิกครอบครัวภายในบ้าน

แม้ความคิดเรื่องประโยชน์ของสัตว์เลี้ยงที่มีต่อมนุษย์นั้นจะมีการศึกษาเป็นจำนวนมากและอย่างต่อเนื่อง แต่ผลของงานวิจัยยังมีความไม่แน่นอนและเป็นที่ยกเถียงกันอยู่เนื่องจากการวิจัยเกี่ยวกับสัมพันธภาพของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงที่มีความซับซ้อนและมีปัญหาการออกแบบงานวิจัยที่ไม่รัดกุมเพราะการวิจัยส่วนใหญ่จะเป็นการวิจัยเชิงบรรยาย มีกลุ่มตัวอย่างน้อย และไม่ได้มาจากการสุ่มตัวอย่างที่เหมาะสม การเก็บข้อมูลมักใช้การรายงานตนเอง หรือการสัมภาษณ์ซึ่งผลที่ได้มีความเป็นอัตวิสัยสูง (subjective) จึงอาจก่อให้เกิดความลำเอียงได้ และมักเป็นการวิจัยแบบตัดขวาง (cross-sectional study) มากกว่าการวิจัยระยะยาว (longitudinal study) นอกจากนี้สัตว์เลี้ยงที่ใช้ในการศึกษาก็ยังมีความแตกต่างกันอีกด้วย เช่น สุนัข แมว ปลาและสัตว์ชนิดอื่น (Brodie and Biley, 1999; Wells, 2009; Herzog, 2011) จนทำให้มีการสรุปว่า การศึกษาทั้งหมดยังไม่สามารถชี้ชัดเจนเพียงพอที่จะบอกว่า มนุษย์ที่เลี้ยงสัตว์เลี้ยงเป็นเพื่อนจะมีสุขภาพทางจิตดีกว่าที่ไม่ได้เลี้ยง (Paul, 2000; Daly and Morton, 2003; Herzog, 2011) แต่อย่างไรก็ตามผลการวิจัยส่วนใหญ่ก็ยังมีรายงานในแง่บวก ผลการศึกษาล่าสุดในการทบทวนการวิจัยอย่างเป็นระบบ (systematic review) โดย Purewal et al. (2017) สรุปว่า การมีปฏิสัมพันธ์กันระหว่างมนุษย์และสัตว์ส่งผลทางบวกต่อสุขภาพของ

มนุษย์ เช่น ส่งเสริมสุขภาพทางกาย ลดความเสี่ยงในโรค และส่งเสริมสุขภาพทางจิตใจ ดังนั้นจึงควรมีการทำวิจัยเพื่อหาข้อมูลเพิ่มเติม

### ประโยชน์ของสัตว์เลี้ยงในการส่งเสริมพัฒนาการทางสังคม

การส่งเสริมพัฒนาการทางสังคมในเด็ก เป็นพัฒนาการอีกด้านหนึ่งที่ผู้ดูแลให้ความสำคัญอย่างมาก เริ่มตั้งแต่ Erikson (1963) นักจิตวิทยาจากประเทศสวีเดนได้เน้นว่า รากฐานของพัฒนาการทางสังคมเริ่มตั้งแต่เด็กเล็ก โดยแบ่งพัฒนาการทางจิตสังคมของมนุษย์ไว้เป็น 8 ขั้น โดยมี 4 ขั้นที่เกี่ยวข้องกับวัยเด็ก โดย Erikson ให้ความสำคัญกับขั้นที่ 1 มากที่สุด คือขั้นไว้วางใจและขั้นไม่ไว้วางใจ (trust vs mistrust) ซึ่งเริ่มตั้งแต่แรกเกิดจนถึงอายุ 1 ปี 6 เดือน ถือว่าเป็นขั้นที่มีความสำคัญของพัฒนาการทางสังคมเพราะทารกมนุษย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถอยู่รอดได้ด้วยตนเอง ทารกจำเป็นต้องอยู่ในสังคมมีความจำเป็นที่จะต้องมีความไว้วางใจ หากทารกได้รับการดูแลเอาใจใส่อย่างเหมาะสมจะทำให้กลายเป็นเด็กที่สามารถไว้วางใจคนใกล้ชิดและพัฒนาต่อเป็นสามารถไว้วางใจโลก รู้สึกว่าโลกปลอดภัยและปลอดภัยมากพอที่เด็กจะพัฒนาต่อไป

ในขั้นนี้เด็กจะต้องเรียนรู้ความไว้วางใจกับบุคคลใกล้ชิดก่อน จึงจะขยายไปสู่สิ่งแวดล้อมใกล้เคียง เช่น สัตว์เลี้ยงได้ แม้ทฤษฎีความผูกพัน (attachment theory) ของ Bowlby (1984) จะกล่าวถึงความผูกพันที่เน้นระหว่างมนุษย์กับมนุษย์โดยเริ่มจากการสร้างความผูกพันกับคนใกล้ชิดก่อน เช่น แม่หรือคนเลี้ยงดู จากนั้นก็จะเรียนรู้ที่จะสร้างความผูกพันไปสู่สิ่งแวดล้อมถัดไปได้ ดังนั้นเด็กเล็กก็สามารถสร้างความผูกพันกับสัตว์ได้เช่นกัน (Jalongo, 2015) การที่เด็กจะได้ประโยชน์จากการมีสัมพันธภาพกับสัตว์เลี้ยงได้นั้น เด็กจะต้องมีสัมพันธภาพที่ดีกับบุคคลใกล้ชิดก่อน ในงานวิจัยของ Poresky and Hendrix (1989) พบว่า เด็กที่สามารถใช้



สัตว์เลี้ยงเป็นเสมือนสิ่งพึ่งพิงทางอารมณ์และสังคมนั้น มักจะมีพ่อแม่เป็นแหล่งพึ่งพิงทางอารมณ์และสังคมมาก่อน คือมีพื้นฐานทางครอบครัวที่ดีมาก่อนนั้น ซึ่งจะช่วยให้เด็กสามารถซึมซับและรับรู้ที่สัตว์เลี้ยงเป็นแหล่งพึ่งพิงทางสังคมได้เช่นกัน แม้ในงานวิจัยของ Daly and Morton (2003) ที่พบว่าเด็กที่มีสัตว์เลี้ยงหรือไม่มีสัตว์เลี้ยงมีคะแนนความเห็นอกเห็นใจไม่แตกต่างกัน งานวิจัยชิ้นนี้ให้ข้อคิดเห็นว่า ความเห็นอกเห็นใจมีความซับซ้อน การศึกษาเพียงตัวแปร การเป็นเจ้าของสัตว์เลี้ยง (pet ownership) และประเภทของสัตว์เลี้ยง (pet preference) อาจไม่เพียงพอ เพราะอาจมีตัวแปรภายนอกอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ชนิดของสัตว์เลี้ยง บุคลิกภาพและการเลี้ยงดูจากพ่อแม่ เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย แต่เมื่อทั้งคู่ทำวิจัยในเรื่องนี้อีกครั้งในอีก 3 ปีต่อมาพบว่า เด็กที่มีสัตว์เลี้ยงและมีความผูกพันกับสัตว์เลี้ยงสูง จะมีคะแนนความเห็นอกเห็นใจสูงกว่าเด็กที่เลี้ยงสัตว์แต่ความผูกพันน้อย และที่สำคัญคือเด็กที่เลี้ยงสัตว์และมีความผูกพันสูงจะให้คะแนนสิ่งแวดล้อมที่บ้านดีกว่าเด็กที่มีความผูกพันกับสัตว์เลี้ยงน้อยด้วย (Daly and Morton, 2006)

ดังนั้นสัตว์เลี้ยงจะเอื้อประโยชน์ต่อพัฒนาการทางสังคมกับเด็กหรือไม่ ส่วนหนึ่งก็ขึ้นอยู่กับสัมพันธภาพดั้งเดิมของคนเลี้ยงดูกับเด็กมาก่อน หากไม่มีสัมพันธภาพหรือไม่มีการสร้างความไว้วางใจกับคนใกล้ชิดมาก่อน จะเป็นการยากที่เด็กจะขยายความไว้วางใจนั้นไปสู่สัตว์เลี้ยง

### ประโยชน์ของสัตว์เลี้ยงในการพัฒนาการทางอารมณ์

นอกเหนือจากสัตว์เลี้ยงจะช่วยส่งเสริมพัฒนาการทางสังคมแล้ว สัตว์เลี้ยงยังสามารถช่วยส่งเสริมพัฒนาการทางอารมณ์ได้อีกด้วย แม้ว่าสัตว์เลี้ยงจะไม่มืบทบาทในการส่งเสริมพัฒนาการเด็กโดยตรงเหมือนพ่อแม่ แต่เมื่อมีสัตว์เลี้ยงอยู่ในบ้าน และ

ภายใต้เงื่อนไขเดียวกับการส่งเสริมพัฒนาการทางสังคม คือ การมีสิ่งแวดล้อมภายในครอบครัวที่ดี จะทำให้เด็กได้รับประโยชน์จากการมีปฏิสัมพันธ์กับสัตว์เลี้ยงเช่นกัน โดยในแต่ละช่วงอายุของเด็ก สัตว์เลี้ยงมีบทบาทที่จะช่วยส่งเสริมพัฒนาการทางอารมณ์ของเด็กได้แตกต่างกัน โดยในช่วงปฐมวัย (อายุแรกเกิด ถึง 6 ปี) เป็นช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว และการเปลี่ยนแปลงในช่วงนี้จะยังผลต่อช่วงชีวิตอื่น ทำให้ทฤษฎีพัฒนาการต่างจำนวนมากที่ให้ความสำคัญกับช่วงอายุนี้ ไม่ว่าจะเป็น ทฤษฎีบุคลิกภาพของ Psychosexual Development ของ Freud, ทฤษฎีทางความคิดและสติปัญญา Cognitive Development ของ Piaget (Nara and Songkhrum, 2009) และทฤษฎีว่าด้วยพัฒนาการทางจิตสังคม Psychosocial Development ของ Erikson (1963)

Greenspan et al. (1998) แบ่งพัฒนาการทางอารมณ์ เป็น 6 ชั้น และให้ความสำคัญอย่างมากกับช่วงอายุ 4 ปีแรกของชีวิตเด็ก ไม่ต่างจากทฤษฎีพัฒนาการด้านอื่น โดยทั้งหกชั้นของพัฒนาการนี้สามารถพัฒนาผ่านการมีปฏิสัมพันธ์กับผู้อื่นและเป็นไปอย่างมีลำดับขั้นตอน เมื่อเด็กมีปฏิสัมพันธ์ที่ดีกับพ่อแม่แล้ว สัตว์เลี้ยงก็สามารถส่งเสริมพัฒนาการทางอารมณ์ของเด็ก โดยแยกตามขั้นของพัฒนาการทางอารมณ์ได้ ดังนี้ (Greenspan et al, 1998; Greenspan and Wieder, 2006; Kingkaew, 2012)

### พัฒนาการขั้นที่ 1 การมีความสงบและความสนใจต่อโลกภายนอก (regulation and interest in the world)

เริ่มพัฒนาได้ตั้งแต่แรกเกิด ถึง 3 เดือน คือการที่เด็กเริ่มสนใจสิ่งแวดล้อม จดจ่อและสงบเพียงพอที่จะรับรู้สิ่งที่เกิดขึ้นรอบตัว ขั้นนี้เด็กจะมีเริ่มมีความสนใจร่วมกับผู้อื่น เรียนรู้การมีปฏิสัมพันธ์กับผู้อื่น สัตว์เลี้ยงจะเป็นตัวช่วยที่ดี ในงานวิจัยของ Beetz et al. (2012) เด็กชายที่มีปัญหาเรื่องความผูกพัน มีแนวโน้มจะเข้าหาสัตว์เลี้ยงมากกว่าคนที่เป็นคนครุหรือตึกตา



สัตว์เลี้ยงที่เคลื่อนที่ได้ เช่นสุนัข ที่อยู่คลอเคลียใกล้ชิดกับเด็กสามารถเป็นสิ่งกระตุ้นให้เด็กคงความสนใจได้นาน และถ้าสัตว์เลี้ยงมีการเคลื่อนไหวที่คาดเดาได้ ไม่คุกคามเด็ก จะทำให้เด็กสามารถจดจ่ออยู่กับสัตว์เลี้ยงได้นานด้วยอารมณ์สงบ ไม่ตื่นกลัว ไม่กังวลมากเกินไป ในขั้นนี้หากเป็นไปได้ด้วยดี เด็กจะมีความสงบ มีสมาธิจดจ่อกับสิ่งที่สนใจ และสนใจโลกภายนอกได้มากขึ้น

### **พัฒนาการขั้นที่ 2 การมีปฏิสัมพันธ์และความผูกพันกับผู้ดูแลใกล้ชิดโดยมีอารมณ์เชื่อมต่อกันมากขึ้น (engaging and relating)**

เริ่มมีพัฒนาการขั้นนี้ได้ตั้งแต่อายุ 2 ถึง 5 เดือน ในขั้นนี้เด็กจะมีความต้องการที่จะเป็นส่วนหนึ่งของสัมพันธ์ภาพกับผู้ดูแลใกล้ชิด และเชื่อมโยงไปสู่สัตว์เลี้ยง ข้อดีที่เด็กอาจจะเชื่อมต่อกับสัตว์เลี้ยงได้มากขึ้นหนึ่งเกิดจากการที่สัตว์เลี้ยงจะอยู่ใกล้เด็กตลอดเวลา สิ่งนี้ทำให้เด็กเกิดความไว้วางใจ มีความผูกพัน รวมถึงเด็กสามารถจับ ชู้มสัตว์ได้ทุกเมื่อที่ต้องการ ทำให้เด็กรู้สึกว่าคุณสามารถควบคุมสถานการณ์ได้ ยิ่งทำให้เด็กเกิดความผูกพันกับสัตว์เลี้ยง (Jalongo, 2015) ในขั้นนี้หากพัฒนาได้ดี เด็กจะเรียนรู้ที่รักคนอื่น และจากความรักที่แสดงออกสม่ำเสมอ เด็กจะพัฒนามาเป็นความไว้วางใจในผู้อื่น พัฒนาการขั้นนี้มีความสำคัญมาก ในเด็กที่มีความวิตกกังวลสูงและไม่หันเข้าสิ่งแวดล้อม ไม่มีปฏิสัมพันธ์ เช่น กรณีของเด็กที่มีภาวะออทิสติกที่มักหันเข้าหาโลกส่วนตัว และขาดการมีปฏิสัมพันธ์ที่เหมาะสมกับโลกภายนอก ถ้าสามารถทำให้เด็กเกิดความสนใจและไว้วางใจ จะเป็นบันไดขั้นสำคัญที่จะพาเด็กไปสู่พัฒนาการที่เหมาะสมด้านการสื่อสาร ลดปัญหาการแยกตัวของเด็กได้ (Daranee et al., 2013)

พัฒนาการในขั้นที่ 1 และ 2 ของ Greenspan et al. (1998) นี้ เทียบได้กับทฤษฎีทางจิตสังคมของ Erikson (1963) ที่เน้นถึงความสำคัญของความไว้วางใจจากคนใกล้ชิด แล้วขยายไปสู่โลกภายนอก หากเด็กได้รับการส่งเสริมพัฒนาการในช่วงนี้ดีไม่ว่าจะจากคนใกล้ชิดหรือสัตว์เลี้ยงที่ใกล้ชิด ทำให้เด็กไว้วางใจ

ตนเองและโลกภายนอก มีความมั่นใจว่าโลกภายนอกปลอดภัยพอที่เด็กจะสำรวจโลกออกไปอีก ส่งผลทางอารมณ์ให้เป็นคนที่เชื่อมั่นในตนเอง เชื่อมมั่นในสิ่งแวดล้อม และพร้อมจะเรียนรู้ต่อไป

### **พัฒนาการขั้นที่ 3 การสื่อสารด้วยภาษาท่าทางกลับไปมา (intentionality and two-way communication)**

เริ่มมีพัฒนาการขั้นนี้ได้ตั้งแต่อายุ 4 ถึง 9 เดือน เด็กจะตอบสนองกับคนใกล้ชิดที่เล่นด้วย มีการสื่อสารเองเมื่ออยากได้สิ่งที่ต้องการ เด็กสามารถแสดงอารมณ์และความรู้สึกทางสีหน้าได้ ได้ตอบกลับไปมาได้ในอารมณ์ที่แตกต่างกันได้มากขึ้น การอยู่กับสัตว์เลี้ยงมักมีการเชื่อมต่อทางอารมณ์ด้วยเสมอ ไม่ว่าจะเป็นสุนัข ล้อเล่น หงุดหงิดในบางครั้ง เด็กจะได้พัฒนาทักษะการสังเกตทั้งสีหน้าหรือท่าทางของสัตว์เลี้ยง เพื่อที่จะตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเด็กสามารถสังเกตสัตว์เลี้ยงได้แล้ว การสังเกตผู้อื่นก็จะทำได้ง่ายขึ้น ในขั้นนี้จะทำให้เด็กเรียนรู้ที่จะรับรู้และแสดงออกทางอารมณ์ผ่านภาษากายได้อย่างตรงอารมณ์ เมื่อสามารถรับรู้และแสดงออกทางอารมณ์ของตนเองได้ จะเป็นพื้นฐานของการรับรู้อารมณ์ผู้อื่นผ่านการสังเกต

### **พัฒนาการระดับที่ 4 การแก้ปัญหา (social problem-solving) การกำกับอารมณ์ (mood regulation) และการสร้างตัวตน (formation of a sense of self)**

เริ่มมีพัฒนาการขั้นนี้ได้ตั้งแต่อายุ 9 ถึง 18 เดือน เด็กจะเริ่มสนใจผู้ดูแลและขอให้ช่วยแก้ปัญหาเพื่อสิ่งที่ตนเองต้องการ มีการกำกับอารมณ์ของตนเองเพื่อจะแสดงออกได้ ในการเลี้ยงสัตว์เด็กจะต้องรับผิดชอบมากขึ้นในการดูแลสัตว์เลี้ยงของตนเอง (Endenburg and van Lith, 2011) และย่อมมีปัญหาคู่ปรวนเกิดขึ้นเป็นเรื่องธรรมดา เช่น เมื่ออาหารหมดจะทำอย่างไร จะไปต่างจังหวัดต้องจัดการอย่างไร เมื่อเกิดปัญหาเหล่านี้ขึ้น หากพ่อแม่กระตุ้นให้เด็กได้คิดแก้ปัญหา รวมทั้ง



วางแผนป้องกันปัญหาที่อาจเกิดขึ้นอีก จะเป็นการพัฒนาเด็กให้แก้ปัญหาได้ เมื่อเด็กแก้ปัญหาได้สำเร็จ เด็กจะมีความมั่นใจในความสามารถของตนเอง

### **พัฒนาการระดับที่ 5 การสื่อภาษาสัญลักษณ์ (creative symbols and using words and ideas)**

เริ่มพัฒนาปลายปีแรกถึงต้นปีที่สองของอายุ เด็กเริ่มใช้ภาษาในการบอกการกระทำ ความรู้สึกทางร่างกาย รวมทั้งความรู้สึกของตนเอง โดยการบอกความรู้สึกนั้นสามารถบอกระดับความแตกต่าง ปริมาณ ความรู้สึกได้ Enderburg and van Lith (2011) ให้ข้อเสนอแนะว่า เมื่อเด็กผูกพันกับสัตว์แล้วเกิดความไว้วางใจ จะกระตุ้นให้เด็กพูดหรือสื่อสารกับสัตว์มากขึ้น เช่น การพูดคุย การออกคำสั่ง การให้กำลังใจสัตว์หรือแม้กระทั่งการดูแลเพื่อทำโทษ และเมื่อสัตว์ทำตาม จะทำให้เด็กมั่นใจในการพูดสื่อสารของตัวเอง ดังนั้นการเลี้ยงสัตว์สามารถช่วยกระตุ้นการสื่อสารของเด็กได้ สัตว์เลี้ยงที่อยู่ใกล้ชิดกับเด็ก เด็กมักจะพูดสื่อสารซ้ำเด็กไม่ต้องกลัวเสียหน้าเมื่อพูดผิดกับสัตว์เลี้ยง และสัตว์เลี้ยงก็มักตอบสนองเวลาเด็กพูดทุกครั้งในชั้นนี้หากพัฒนาได้ดี เด็กจะสามารถสื่อสารผ่านภาษาพูดได้คล่องแคล่วและตรงกับความต้องการมากขึ้น

### **พัฒนาการระดับที่ 6 ความคิดเชิงอารมณ์ (emotional thinking) เหตุผล (logic) และตัวตน (a sense of self)**

เริ่มพัฒนาได้ตั้งแต่อายุ 2 ปี ในเด็กทั่วไปจะมีพัฒนาการระดับ 6 เต็มขั้น เมื่ออายุประมาณ 4 ถึง 5 ปี (Kingkaew, 2012) ในชั้นนี้เด็กสามารถเชื่อมโยงเหตุและผล บอกสาเหตุของการกระทำและความรู้สึกของตนเองได้ รวมทั้งรู้จักได้เถียง ตอรอง ตัดสินใจที่จะเลือกทำอะไรหรือไม่ทำอะไรได้เอง ในชั้นนี้เป็นชั้นที่เด็กใช้ศักยภาพทางสติปัญญาได้อย่างลึกซึ้งและกว้างขวางมากขึ้น เป็นชั้นที่เด็กสามารถแสดงความคิดเห็นนอกเหนือใจได้อย่างเป็นรูปธรรมมากขึ้น การได้เลี้ยงสัตว์และมีความผูกพันที่ลึกซึ้ง ทำให้เด็กเกิดความเห็นอกเห็นใจ

สัตว์เลี้ยง (Poresky and Hendrix, 1989; Poresky, 1990; Daly and Morton, 2006, 2009) นำไปสู่การดูแลและการให้ความรัก เด็กสามารถคิดเปรียบเทียบได้ระหว่างยอมเสียสละความสะดวกสบายบางอย่างเพื่อดูแลสัตว์เลี้ยงที่เจ็บป่วย เป็นการคิดที่ใช้ทางสติปัญญาและอารมณ์เข้าตัดสินใจ ไม่ใช่เป็นการคิดหรือกระทำภายใต้เงื่อนไขที่ผู้ใหญ่แนะนำ ในชั้นนี้แม้สัตว์เลี้ยงจะไม่สามารถช่วยเด็กคิดหรือตัดสินใจได้ แต่มักจะคอยอยู่ใกล้ เสมือนเป็นแหล่งสนับสนุนทางจิตใจให้กับเด็ก ซึ่งเป็นการกระตุ้นให้เด็กพยายามแก้ปัญหาและพึ่งพิงตนเองมากขึ้น ในชั้นนี้ความสามารถทางสติปัญญา โดยเฉพาะการเชื่อมโยงเหตุผลของเด็กจะดีขึ้น เด็กจะสามารถตอบคำถามว่า “ทำไม” ได้อย่างแท้จริง มิใช่การท่องจำ ซึ่งความสามารถชั้นนี้เป็นความสามารถพื้นฐานที่เด็กควรมีก่อนเข้าโรงเรียน

พัฒนาการทางอารมณ์ในเด็กสามารถส่งเสริมได้ตั้งแต่ในวัยทารก โดยการส่งเสริมนั้นต้องมีสัมพันธภาพที่ดีเป็นพื้นฐาน เด็กเล็กจะเรียนรู้ผ่านคนใกล้ตัวคือพ่อแม่หรือผู้ดูแลก่อน เด็กจึงจะเรียนรู้ผ่านสัตว์เลี้ยงได้ สัตว์เลี้ยงจึงจะสามารถทำหน้าที่เป็นผู้ช่วยให้เกิดพัฒนาการทางอารมณ์ที่เหมาะสมตามมา

### **บทสรุป**

จากการทบทวนวรรณกรรม แม้จะมีข้อถกเถียงกันถึงประโยชน์ของสัตว์เลี้ยงที่มีต่อการส่งเสริมพัฒนาการในเด็ก อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่ยังมีแนวโน้มไปในทิศทางว่าสัตว์เลี้ยงมีประโยชน์ต่อการส่งเสริมพัฒนาการเด็ก โดยธรรมชาติของพัฒนาการทางสังคมและอารมณ์ จะพัฒนาอยู่บนฐานของสัมพันธภาพระหว่างบุคคล ดังนั้นการที่สัตว์เลี้ยงจะช่วยส่งเสริมพัฒนาการสองด้านนี้ได้ ก็ขึ้นอยู่กับสัมพันธภาพดั้งเดิมของครอบครัวเป็นฐาน หากสัมพันธภาพในครอบครัวไม่ดี หรือไม่มีตัวแบบที่ดี เด็กก็จะได้รับประโยชน์จากการเลี้ยงสัตว์ไม่เต็มที่ ดังนั้นเมื่อ



พ่อแม่คาดหวังว่าเด็กจะได้ประโยชน์จากการเลี้ยงสัตว์ พ่อแม่จึงมีบทบาทในการสร้างความผูกพันและสัมพันธ์ภาพที่ดีกับเด็กก่อน เพื่อเตรียมความพร้อมให้เด็กสามารถรับประสบการณ์ที่ดีจากสัตว์เลี้ยง ทำให้เด็กมีพัฒนาการทางสังคมและอารมณ์ที่ดีต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- Apwan Nookong, Sudaporn Payakkaraung, Yuwadee Pongsaranuntakul, and Siriwan Chudapongse. 2012. Caregiver's management for children with Astma. *J Nurs Sci*, 30(1): 49-60.(in Thai)
- Areegamler, N., Wichiencharoen, K., Sriussadapom., P and Piboonpocau, Orathai. 2010. Caregiver management of Asthma triggers within the home environment. *J Nurs Sci*, 28(4): 76-85. (in Thai)
- Barker, S.B. and Wolen, A.R. 2008. The benefits of human-companion animal interaction: a review. *J Vet Med Educ*, 35(4): 487-495.
- Beck, A.M. and Katcher, A.H. 1984. A new look at pet facilitated therapy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184(4): 411-421.
- Beetz, A., Julius, H., Tumer, D. and Kotrschal, K. (2012). Effects of social support by a dog on stress modulation in male children with insecure attachment. *Front Psychol*, 3: 1-9.
- Bowlby, J., 1980. Attachment and loss, Harper colophon books. Basic Books, New York.
- Brodie, S.J. and Biley, F.C. 1999. An exploration of potential benefits of pet-facilitated therapy. *J Clin Nurs*. 8: 329-337.
- Bureau of Disease Control and Veterinary Service. 2017. Dog and cat population in 2016. Retrieved July 27, 2017 from <http://dcontrol.dld.go.th/dcontrol/index.php/rabies/747-%20dogpop2016> (in Thai)
- Chutimon Kwankijbavonkul and Piyanan Hirunchalothorn. 2016. The study of social skills in young children with autism through Hippotherapy. *Academic Services Journal, Prince of Songkla University*, 27(2): 51-60. (in Thai)
- Cirulli, F., Borgi, M., Berry, A., Francia, N., and Alleva, E. 2011. Animal-assisted interventions as innovative tools for mental health. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 47(4): 341 - 348.
- Darane Janla, Saowarot Kaewhiran and Saengduean Yotanyamaneewong. 2013. A pilot study of the impact on DIR/Floortime intervention towards emotional and social development for children with Autistic Spectrum Disorder (ASD). *Journal of Clinical Psychology*, 44(1): 27-34. (in Thai)
- Daly, B. and Morton, L.L. 2003. Children with pets do not show higher empathy: a challenge to current views. *Anthrozoös*, 16(4): 298-314.
- Daly, B. and Morton, L.L. 2006. An investigation of human-animal interactions and empathy as related to pet preference, ownership, attachment, and attitudes in children. *Anthrozoös*, 19(2): 113-127.
- Daly, B. and Morton, L.L. 2009. Empathic differences in adults as a function of childhood and adult pet ownership and pet type. *Anthrozoös*, 22(4): 371-382.
- Endenburg, N. and van Lith, H.A. 2011. The influence of animals on the development of children. *Vet. J.*, 190(2): 208-214.
- Erikson, E.H., 1963. *Childhood and society*, 2nd ed. rev. and enl. ed. W.W. Norton, New York.
- Esposito, L., McCune, S., Griffin, J.A. and Maholmes, V. 2011. Directions in human-animal interaction research: child development, health, and therapeutic interventions. *Child Dev Perspect*, 5(3): 205-211.
- Janla, D., Kaewhiran, S., and Yotanyamaneewong, S. 2013. A pilot study of the impact on DIR/Floortime intervention towards emotional and social development for children with Autistic Spectrum Disorder (ASD). *J Clin Psychol*, 44(1): 27-34. (in Thai)
- Jalongo, M.R. 2015. An attachment perspective on the child-dog bond: interdisciplinary and





- international research findings. *Early Child Educ.* 43: 395-405.
- Greenspan, S.I., Wieder, S., Simons, R., 1998. *The Child With Special Needs: Encouraging Intellectual and Emotional Growth.* Perseus Books, Reading, Mass.
- Greenspan, S. I., and Wieder, S. 2006. *Engaging Autism: Using Floortime Approach to Help Children Relate, Communicate, and Think.* Da Capo, Philadelphia. 43-51.
- Herzog, H. 2011. The impact of pets on human health and psychological well-being: fact, fiction, or hypothesis?. *Curr Dir Psychol Sci*, 20(4): 236-239.
- Kingkaew Pajaree. 2012. *A Handbook for Enhancing Children with Autistic Spectrum Disorder's development with DIR/Floortime Model.* Pimsee, Bangkok, 87-166. (in Thai)
- Lasa, S.M., Bocanegra, N.M., Alcaide, R.V., Arratibel, A.M. A., Donoso, V.E. and Ferriero, G. 2013. Animal assisted interventions in neurorehabilitation: a review of the most recent literature. *Neurologia*, 30(1): 1-7.
- Linder, D.E., Sacheck, J.M., Noubary, F., Nelson, M.E. and Freeman, L.M. 2017. Dog attachment and perceived social support in overweight/obese and healthy weight children. *Preventive Medicine Report*, 6: 352-354.
- Nara Theeranat and Songkhram Chaosin. 2009. Development of humanity behaviors, In: Sangsuee Samangkul (Eds.), *General Psychology*. Chiang Mai: Chiang Mai University, pp.49-86. (in Thai)
- Nichanun Areegamlert, Kaimook Wichiencharoen, Pomsri Sriussadaporn and Orathai Piboonpocaun. 2010. Caregiver management of Asthma triggers within the home environment. *Journal of Nursing Science*, 28(4): 76-85. (in Thai)
- O'Haire, M.E. 2010. Companion animals and human health: benefits, challenges, and the road ahead. *J Vet Behav*, 5: 226-234.
- O'Haire, M.E. 2013. Animal-assisted intervention or Autism Spectrum Disorder: a systematic literature review. *J Autism Dev Disord*, 43: 1606-1622.
- Purewal, R., Christley, R., Kordas, K., Joinson, C., Meints, K., Gee, N. and Westgarth, C. 2017. Companion animals and child/adolescent development: a systematic review of the evidence. *Int J Environ Res Public Health*, 14: 234-258.
- Paul, E.S. 2000. Empathy with animals and with humans: are they linked? *Anthrozoös*, 13(4): 194-202.
- Poresky, R.H. 1990. The young children's empathy measure: reliability, validity, and effects of companion animal bonding. *Psychological Reports*, 66, 931-936.
- Poresky, R.H. and Hendrix, C. 1989. Companion animal bonding, children's home environments and young children's social development. Paper presented at the Biennial Meeting of the Society for Research in Child Development, Kansas City, MI, USA.
- Taylor, A.F. & Kuo, F.E. 2006. Is contact with nature important for healthy child development? State of the evidence. In: Spencer, C. & Blades, M. (Eds.), *Children and Their Environments*. Cambridge, Cambridge University Press. 124-140.
- Theeranat, N., and Cholsin, S. (2552). Development of humanity behaviors, In: Samangkul, s. (Eds.), *General Psychology*. Chiang Mai: Chiang Mai University, 49-86. (in Thai)
- Wells, D.L. 2009. The effects of animals on human health and well-being. *J Soc Issues*, 65(3): 523-543.







เชียงใหม่สัตวแพทยสาร  
**Chiang Mai Veterinary Journal**

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; [www.vet.cmu.ac.th/cmjv](http://www.vet.cmu.ac.th/cmjv)**Original Article****Animal-level factors affecting the results of the first single intradermal test for bovine tuberculosis in dairy calves in Chiang Mai, Thailand.**Tawatchai Singhla<sup>1</sup>, Sukolrat Boonyayatra<sup>1\*</sup> and Scott J. Wells<sup>2</sup><sup>1</sup> Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Maehia, Muang, Chiang Mai 50100<sup>2</sup> Department of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, United States of America, 1365 Gortner Avenue St. Paul, MN 55108 USA

**Abstract** The objective of this study was to identify animal-level factors affecting bovine tuberculosis (bTB) status as determined by the single intradermal tuberculin (SIT) test firstly applied to 1 year-old dairy cattle in Chiang Mai, Thailand. A total of 137 6-month-old calves were randomly selected from 28 small-holder dairy farms in Chiang Mai province, Thailand. Individual data of calves including history of bTB of the farms, bTB status of the dams, general farm management, average dairy gain (ADG) of the calves, occurrence of other diseases, and contacts with other animal species, were collected monthly for 6 months. At  $\geq 12$  months of age, calves were firstly tested for bTB using the SIT test. Firth penalized logistic regression was used to analyze the associations of factors affecting bTB status of calves. The result showed that more SIT reactors were detected among selected calves from farms with a history of bTB (11.5%, 7/61) compared to those farms with no history of bTB (1.3%, 1/76) ( $p < 0.05$ ). From the logistic regression analysis, we found that calves with high ADG were less likely to become SIT reactors at their first SIT test compared to those with low ADG ( $p < 0.01$ ). To control bTB in dairy cattle, farm practices to limit contact between adult cattle and young calves, together with proper nutritional management for calves are recommended.

**Keywords:** bovine tuberculosis, animal-level factors, Thailand, single intradermal tuberculin test

\*Corresponding author: Sukolrat Boonyayatra Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Maehia, Muang, Chiang Mai 50100 Tel: 053-948-023 FaX: 053-948-062 E-mail address: [sukolrat.b@cmu.ac.th](mailto:sukolrat.b@cmu.ac.th)

**Article history:** received manuscript: 11 August 2017, accepted manuscript: 8 September 2017, published online: 13 September 2017



## บทความต้นฉบับ

# ปัจจัยระดับตัวสัตว์ที่ส่งผลต่อการทดสอบวินิจฉัยโรคด้วยการฉีดแอนติเจนครั้งเดียวทางผิวหนัง ในลูกโคนมในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

ธวัชชัย สิงห์หล้า<sup>1</sup>, ศุภรัตน์ บุญยยาตรา<sup>1\*</sup> และสก๊อต เจ เวลส์<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100

<sup>2</sup> ภาควิชาสัตวแพทย์ประชากร วิทยาลัยการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยมินเนโซตา เซนต์พอล มินเนโซตา สหรัฐอเมริกา 1365 กอทเนอร์ อเวนิว เซนต์พอล มินเนโซตา 55108 สหรัฐอเมริกา

**บทคัดย่อ** การศึกษาระดับตัวสัตว์ที่มีวัตถุประสงค์ เพื่อหาปัจจัยในระดับตัวสัตว์ที่ส่งผลต่อสถานะของวินิจฉัยโรคโคในโคนม จากการตรวจด้วยวิธีการทดสอบโรคทางผิวหนังโดยใช้การฉีดแอนติเจนครั้งเดียว ซึ่งปกติจะทำการทดสอบในโคนมที่อายุ 1 ปีขึ้นไป ในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย ลูกโคนมอายุ 6 เดือน จำนวนทั้งหมด 137 ตัวถูกสุ่มเลือกจากฟาร์มโคนมจำนวน 28 ฟาร์มในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย ข้อมูลในระดับตัวโค ได้แก่ ประวัติการพบวินิจฉัยโรคโคของฟาร์ม สถานะของวินิจฉัยโรคโคของแม่โค การจัดการลูกโค อัตราการเจริญเติบโตของลูกโค ประวัติการป่วยด้วยโรคอื่นๆ ของลูกโค และการสัมผัสกับสัตว์ชนิดอื่นของลูกโค เป็นต้น เมื่อลูกโคอายุได้ 12 เดือนจึงดำเนินการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธีการทดสอบโรคทางผิวหนังโดยการฉีดแอนติเจนครั้งเดียวทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ส่งผลต่อสถานะวินิจฉัยโรคโคในลูกโคด้วยสมการถดถอยโลจิสติกแบบวิธีการของเฟิร์ท (Firth penalized logistic regression) ผลของการศึกษาแสดงให้เห็นว่า พบจำนวนลูกโคที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบโรคในฟาร์มที่มีประวัติของวินิจฉัยโรคโคคิดเป็นร้อยละ 11.5 (7/61) ซึ่งมากกว่าในฟาร์มที่ไม่มีประวัติของวินิจฉัยโรคโคคิดเป็นร้อยละ 1.3 (1/76) อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) จากการวิเคราะห์ด้วยสมการถดถอยโลจิสติกพบว่าลูกโคที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงมีแนวโน้มที่จะเป็นโคที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบโรคครั้งแรก มากกว่าลูกโคที่มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ ( $P < 0.01$ ) ดังนั้น การปฏิบัติการในฟาร์มเพื่อจำกัดการสัมผัสระหว่างโคโตเต็มวัยกับลูกโค และมีการจัดการด้านโภชนาการอย่างเหมาะสมสำหรับลูกโค จึงเป็นข้อแนะนำสำคัญเพื่อควบคุมวินิจฉัยโรคโคในโคนมต่อไป

**คำสำคัญ** วินิจฉัยโรคโค ปัจจัยระดับตัวสัตว์ ประเทศไทย การทดสอบโรคทางผิวหนังโดยการฉีดแอนติเจนครั้งเดียว

\* ผู้รับผิดชอบบทความ ศุภรัตน์ บุญยยาตรา ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100

โทรศัพท์ 053-948-023 โทรสาร 053-948-062 อีเมล: sukokrat.b@cmu.ac.th

**ข้อมูลบทความ** วันที่ได้รับบทความ 18 สิงหาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 8 กันยายน พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 13 กันยายน พ.ศ.2560



## Introduction

Bovine tuberculosis (bTB), caused by *Mycobacterium bovis*, is a chronic disease with slowly progressive development of clinical signs (Ayele et al., 2004). Cattle are susceptible to the pathogen. However, it can affect many species of mammals, especially human as a zoonotic disease by inhalation of contaminated aerosols or ingestion of unpasteurized milk (Thoen et al., 1995). Therefore, disease controlling program by detecting and eradicating infected animals has been applied in many countries worldwide to limit the transmission within animals, and between animals and human (Alvarez et al., 2012; Sheridan, 2011).

Various factors at different levels have been identified to be associated with the outbreak of bTB (Humblet et al., 2009). Animal-level risk factors such as age, gender, breed, body condition score, immune status, genetic resistant or susceptible to bTB, vertical and pseudo-vertical transmission and auto contamination, have been previously reported in several countries (Zanini et al., 1998; Phillips et al., 2003; Ozyigit et al., 2007). The age of animals is one of major individual factors that have been identified in both developed and developing countries (Griffin et al., 1996; Cleaveland et al., 2007). The duration of exposure is positively associated with age. The study in Ireland in 1996 found that adult cattle were more likely to be infected animals than younger calves (Griffin et al., 1996). Animals might be infected at a young age and consequently express the clinical signs when they are adults

(Griffin et al., 1996). In 2007, a study in Turkey described a congenital infection of bTB from an infected dam to her calf (Ozyigit et al., 2007). Another study suggested that the calves had high risk to be infected with *M. bovis* by ingestion of contaminated colostrum or milk (Zanini et al., 1998). Close contact between a dam and its calf, such as grooming, has been identified as pseudo-vertical transmission (Phillips et al., 2003).

In Thailand, the control program using the single intradermal tuberculin (SIT) test at caudal fold has been implemented to test and eradicate infected dairy cattle annually. The SIT tests apply to adult dairy cattle at the age of 1 year and older. Even though the transmission of *M. bovis* to the young calves may have already occurred in the farm, young animals will not be diagnosed and removed from the farm. Moreover, undetected and infected calves may shed *M. bovis* to healthy cattle before the next eradication program (Kao et al., 2006), which can impede the success of the bTB eradication program.

Therefore, identifying animal-level factors affecting the bTB status of dairy calves based on the results of the first SIT test can be of benefit to the bTB controlling program in the country. Dairy farmers in regions where bTB is regularly detected may be able to prevent and control the transmission of bTB between animals in their farms. The objective of this study was to identify animal-level factors affecting bovine tuberculosis (bTB) status as determined by the single intradermal tuberculin (SIT) test firstly applied to 1-year-old dairy calves in Chiang Mai, Thailand.



## Materials and Methods

### Study population

A study was performed to identify the animal-level factors associated with bTB in calves to be subsequently identified as bTB reactors. We utilized the bTB status of dairy farms in 4 districts of Chiang Mai province, including Mae Wang, Sanpatong, Doi-Loh and Sansai districts. Infected herds were defined as dairy farms with a history of at least one caudal fold SIT-reactor during 2011 to 2015. Non-infected herds were selected from the population of dairy farms in these districts with no detected or reported SIT-reactor during the same period. Twenty-eight infected and non-infected dairy herds were randomly selected for this study. In each herd, 2-6 calves from 6-8 months of age were randomly selected to be enrolled in the study. A total of 137 calves from these herds were included in the study. All research protocols with animals accorded with protocols approved by the Animal Care and Use Committee, the Laboratory Animal Center, Chiang Mai University, Thailand (Protocol No. 2558/AG-0001).

### Data collection

Data including the previous bTB status of the farms, bTB history of dams, general management practices, another disease occurrence, and contacts with other animal species of all calves were collected and monitored monthly until the end of the study. An average daily gain (ADG) was calculated for each animal by recording the weight gain of each calf monthly from the age at enrollment (6-8 months

old) until the calf was tested with SIT test (12 months of age).

### Single intradermal tuberculin test

At the end of the study, all 137 calves were tested with the caudal fold SIT test using bovine purified protein derivative (PPD) (Bovituber® PPD, Lyon, France). The calves were intradermally injected with 0.1 mL of bovine PPD (2000 IU) on the right side of the caudal fold of the tail. The skin thickness of the inoculation site was measured using a caliper before injection. Test results were determined by the same researcher at 72 h after injection by measuring the increase of skinfold thickness. Interpretations of test results were made according to the Thai agricultural standard for diagnostic testing of bovine tuberculosis (Ministry of Agricultural and Cooperatives, 2004). The results were defined as positive when the increase of the skinfold thickness at the inoculation site was 5 mm or more, or when signs of swelling, edema, exudation, necrosis and inflammation were observed. The results were defined as inconclusive when the increase of the skinfold thickness was between 2-5 mm and clinical signs at the inoculation site were not observed. The results were defined as negative when the skinfold thickness increased less than 2 mm and clinical lesions at the injection site were not observed.

### Statistical analysis

Prevalence of bTB among selected calves was calculated in percentages. The ratio of SIT-reactors in herds with previous history of bTB



and ratio of SIT-reactors in herds without previous history of bTB were compared using Z-test in R version 3.2.2 (R Core Team, 2016)

According to low animal-level prevalence of bTB reported in this region (Nuamjit and Rodtjan, 2012), data were analyzed by Firth type penalized logistic regression which is suitable for analysis of risk factors for rare disease or events. This method corrected the bias from rare events by penalizing the likelihood function (Firth, 1993). The analyses were divided into 2 stages using R version 3.2.2 (R Core Team, 2016). In the first stage, categorical and continuous variables were primarily screened using univariate penalized logistic regressions with the variable of bTB herd status to be analyzed as a random effect. The Firth's method was implemented in R version 3.2.2 (R Core Team, 2016) by the *logistf* package (Heinze et al., 2016). Evaluation of multicollinearity among predictor variables was assessed using chi-square test for categorical variables ( $P < 0.05$ ) and Pearson product-moment correlation of continuous variables ( $\text{cor} \geq 0.5$ ). In case of multicollinearity (i.e.  $P < 0.05$  or  $\text{cor} \geq 0.5$ ), the variable with higher biological plausibility was retained for multivariate analysis.

After univariate analysis, variables with  $P \leq 0.2$  and without marked multicollinearity among the other variables were included in the multivariate penalized logistic regression. A backward selection approach was used for model selection using the *logistf* package (Heinze et al., 2016) in R version 3.2.2 (R Core Team, 2016).

## Results

### Descriptive data of enrolled animals

All 137 calves from 28 herds in the study were mixed Holstein-Friesian breed and grown by small-holder dairy farms. Almost half of enrolled calves (61/137, 44.5%) were from infected herds, while another half (76/137, 55.5%) were from non-infected herds. The calves were usually separated from dams at day one after calving and fed with milk twice a day. Most calves (>90%) were not individual raised, and were co-mingled with other calves and/or adult cattle. Most calves were weaned at 3 to 4 months of ages.

### Single intradermal tuberculin test

When all calves were  $\geq 12$  months old and tested with SIT test, 8 out of 137 calves (5.84%) were identified as SIT reactors. Seven out of 8 SIT reactors were from 5 infected herds, while 1 SIT reactor was from a non-infected herd. Animal-level prevalence of bTB from infected herds (7/61, 11.5%) was significantly higher than the animal-level prevalence of bTB from non-infected herds (1/76, 1.3%) ( $P < 0.05$ ).

### Factors affecting bTB status of calves

Regarding univariate analysis, 2 variables, including ADG of calves and calves supplemented with trace mineral were significantly associated with the bTB status of calves with  $P \leq 0.2$ , and no multicollinearity among variables was observed (Table 1). These 2 variables were included in the multivariate logistic regression model by the Firth's method.

In the multivariate logistic regression analysis, the ADG of calves was the only variable



remaining in the final model. The ADG of calves was negatively associated with bTB infection in

animal-level of dairy calves at  $P < 0.01$ , as shown in Table 2.

**Table 1** Univariate analysis of variables as  $P \leq 0.2$  considered for multivariate analysis.

Variable	Mean $\pm$ SE or Percentage		Coefficient	P-value
	Positive	Negative		
Average daily gain (ADG in kg/day)	0.50 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.02	-2.41	0.0003
Calf was supplemented with trace mineral	60.0%	44.96%	-1.38	0.158

**Table 2** Final multiple logistic regression models to find factors affecting bTB in 1-year old calves in Chiang Mai, Thailand

Variable	Coefficient	95% CI	Likelihood ratio test	P -value
ADG	-2.28	-8.97-5.95	6.89	0.009

\*95% CI = 95% confident interval

## Discussion

Cattle herds with a history of bTB are more likely to have a bTB breakdown (Bessell et al., 2012). Moreover, the prevalence of a current bTB in a cattle herd with a history of bTB can be used to predict the severity of future outbreaks (Olea-Popelka et al., 2004). In the current study, we found that the animal-level prevalence of bTB in dairy herds with a history of bTB was significantly higher than that in herds without a history of bTB. Persistent infection of bTB in herds with a history of infection could be associated with the reduced performance of the SIT test, delayed testing, or the reintroduction of infection. The sensitivity of the SIT test has been reported on 75.0–95.5% (de la Rúa-Domenech et al., 2006). A lower sensitivity of the SIT test can lead to the failure to detect and remove infected animals, which can potentially create within-herd

persistence and onward transmission (Clegg et al., 2011).

In Thailand, the test and eradication program using the SIT test has been implemented to control bTB problem in dairy cattle. The SIT tests are applied to only adult animals at the age of 12 months and older (Nuamjit and Rodtian, 2012). If animals have become SIT-reactors at their first tests, it can be implied that these animals may have been infected with *M. bovis* before they reach their maturity, in other words, the transmission may have initiated since their calthood. In general, the management systems for adult cattle and young calves are usually different (Andrews et al., 1991). Certain factors involving the calf raising and some characteristics of the calves may allow or prevent the transmission of *M. bovis* from infected cows to calves (Humblet et al., 2009).





In the present study, we found that calves with high ADG are less likely to become SIT reactors at their first SIT test, compared to those with low ADG. Several studies also confirm the relationship between body conditions of animals and bTB status. The study in Ethiopia demonstrated that cattle with poor body condition had a higher chance of positive tuberculin test results (Dejene et al., 2016). A cross-sectional study in Zambia suggested that cattle with low body condition score (BCS) had a higher risk of positive SIT results (Cook et al., 1996). A matched case-control study in Ireland suggested that the nutrition factors were associated with the recurrent bTB outbreak because the unbalanced diet of cattle could reduce an animal's resistance to bTB (Griffin et al., 1993). In contrast, the experimental study of the transmission of bTB has reported that dietary restriction did not affect the transmission of the disease (Costello et al., 1998). However, this dietary restriction was performed only in a short duration which may not significantly impair the body condition and the immune status of animals. However, it could not be concluded in the current study that low ADG is the cause or the effect of bTB due to the limitation to confirm the status of *M. bovis* infection of calves at enrollment. Therefore, the direction of the association between ADG and bTB status in calves should be further investigated.

## Conclusion

In this study, we confirmed that transmission of *M. bovis* to the calves is more

common in farms with a history of bTB compared to non-infected farms. Farm practices to limit contacts between adult cattle and young calves should be highly concerned in farms with a history of bTB. Moreover, farmers should focus on management practices of young cattle such as feeding and colostrum management to make young calves getting proper weight gain or staying healthy and to reduce *M. bovis* exposure to the susceptible young stock, especially on bTB positive farms. However, the number of the SIT positive calves in this study was quite low. Therefore, further study need to be performed in larger populations or larger areas. Moreover, an identification of bTB infection needs to be confirmed by other techniques such as histopathological examination or bacterial culture because SIT test results can be confounded with cross-immune reactions of other mycobacteria. These may provide a further understanding of bTB epidemiology and control. Ultimately, it may help eradicate bTB in Thailand.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the Department of Livestock Development of Thailand for providing access to study farms and the World Organization for Animal Health (OIE) Veterinary Educational Twinning Grant as well as the Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University and the College of Veterinary Medicine, University of Minnesota for providing partial funding support for this study.



## References

- Alvarez J., Perez A.M. Bezos, J., Casal, C., Romero, B., Rodriguez-Campos, S., Saez-Llorente, J.L., Diaz, R., Carpintero, J., de Juan, L., Dominguez, L., 2012. Eradication of bovine tuberculosis at a herd-level in Madrid, Spain: study of within-herd transmission dynamics over a 12 year period. *BMC Vet. Res.* 8, 100.
- Andrews, A.H., Blowey, R.W., Boyd, H., Eddy, R.G., 1991. *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. Second edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 3-7, 22-54.
- Ayele, W.Y., Neill, S.D., Zinsstag, J., Weiss, M.G., Pavlik, I., 2004. Bovine tuberculosis: An old disease but a new threat to Africa. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8, 924-937.
- Bessell, P.R., Ortan, R., White, P.C.L., Hutchings, M.R., Kao, R.R., 2012. Risk factors for bovine Tuberculosis at the national level in Great Britain. *BMC Vet. Res.* 8, 1-9.
- Costello, E., Doherty, M.L., Monaghan, M.L., Quigley, F.C., O'Reilly, P.F., 1998. A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. J.* 155(3), 245-250.
- Cleaveland, S., Shaw, D.J., Mfinanga, S.G., Shirima, G., Kazwala, R.R., Eblate, E., Sharp, M., 2007. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: risk factors for infection in human and cattle populations. *Tuberculosis.* 87, 30-43.
- Clegg, T.A., Duignan, A., Whelan, C., Gormley, E., Good, M., Clarke, J., Toft, N., More, S.J., 2011. Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the  $\gamma$ -interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Vet. Microbiol.* 151, 68–76.
- Cook, A.J.C., Tuchili, L.M., Buve, A., Foster, S.D., Godfrey-Faussett, P., Pandey, G.S., McAdam, K.P.W.J., 1996. Human and bovine tuberculosis in the Monze district of Zambia a cross-sectional study. *Br. Vet. J.* 152, 37-46.
- Daborn C.J., Grange J.M., 1993. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *Br. Vet. J.* 149, 405-417.
- Daumas, R.P., Passos, S.R., Oliveira, R.V., Nogueira, R.M., Georg, I., Marzochi, K.B., Brasil, P., 2013. Clinical and laboratory features that discriminate dengue from other febrile illnesses: a diagnostic accuracy study in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect. Dis.* 13(1), 77.
- de la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81, 190–210.
- Dejene, S.W., Heitkönig, I.M.A., Prins, H.H.T., Lemma, F. A., Mekonnen, D.A., Alemu, Z.E., Kelkay T.Z., de Boer, W.F., 2016. Risk Factors for Bovine Tuberculosis (bTB) in Cattle in Ethiopia. *PLoS ONE.* 11(7), e0159083.
- Elias, K., Hussein, D., Asseged, B., Wondwossen, T., Gebeyehu, M., 2008. Status of bovine tuberculosis in Addis Ababa dairy farms, *Rev. Sci. Tech.* 27, 915-923.
- Evangelista, T.B.R., De Anda, J.H., 1995. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium spp.* exposure associated with management of colostrum and milk. *Prev. Vet. Med.* 27, 23-27.
- Firth, D., 1993. Bias reduction of maximum likelihood estimates. *Biometrika.* 80(1), 27-38.
- Griffin, J.M., Martin, S.W., Thorburn, M.A., Eves, J.A., Hammond, R.F., 1996. A case-control study on the association of selected risk factors with the occurrence of bovine tuberculosis in the Republic of Ireland. *Prev. Vet. Med.* 27, 217-229.
- Griffin, J.M., Hahey, T., Lynch, K., Salman, M.D., McCarthy, J., Hurley, T., 1993. The association of cattle husbandry characteristics, environmental



- factors and farmer characteristics with the occurrence of chronic bovine tuberculosis in dairy herds in the Republic of Ireland. *Prev. Vet. Med.* 17, 145-160.
- Heinze, G., Ploner, M., Dunker, D., Southworth, H., 2016. Package 'logistf': Firth's Bias- Reduced Logistic Regression. [online]. Retrieve From <https://cran.rproject.org/web/packages/logistf/logistf.pdf>.
- Humblett, M.F., Boschiroli, M.L., Saegerman, C., 2009. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *BMC Vet. Res.* 40, 50.
- Kao, R.R., Gravenor, M.B., Charleston, B., Hope, J.C., Martin, M., Howard, C.J., 2006. *Mycobacterium bovis* shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus. *J R Soc Interface.* 4, 545-551.
- Kazwala, R.R., Kambarage, D.M., Daborn, C.J., Nyange, J., Jiwa, S.F.H., Sharp, J.M., 2001. Risk factors associated with the occurrence of bovine tuberculosis in cattle in the Southern Highlands of Tanzania. *Vet. Res. Commun.* 25, 609-614.
- Ministry of Agricultural and Cooperatives, 2004. Diagnosis of bovine tuberculosis. the Royal Gazette, Bangkok, 1-3.
- Neill, S.D., Hanna, J., O'Brien, J.J., McCracken, R.M., 1988. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet. Rec.* 123, 340-343.
- Nuamjit, M., Rodtjan, P., 2012. Prevalence of bovine tuberculosis in upper northern Thailand from December 2010 to May 2011. *Northern Animal Health News*, 19-25.
- Olea-Popelka, F.J., White, P.W., Collins, J.D., O'Keeffe, J., Kelton, D.F., Martin, S.W., 2004. Breakdown severity during a bovine tuberculosis episode as a predictor of future herd breakdowns in Ireland. *Prev. Vet. Med.* 63, 163-172.
- Ozyigit, M.O., Senturk, S., Akkoc, A., 2007. Suspected congenital generalised tuberculosis in a newborn calf. *Vet. Rec.* 160, 307-308.
- Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A., Teverson, R., 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Res. Vet. Sci.* 74, 1-15.
- R Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-90005107-0. [online]. Retrieve From <http://www.R-project.org>.
- Reilly, L.A., Courtenay, O., 2007. Husbandry practices, badger sett density and habitat composition as risk factors for transient and persistent bovine tuberculosis on UK cattle farms. *Prev. Vet. Med.* 80, 129-142.
- Sheridan, M., 2011. Progress in tuberculosis eradication in Ireland. *Vet. Microbiol.* 151, 160-169.
- Thoen C.O., Steele J.H., Gilsdorf, M.J., 1995. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. In: Ritacco, V., Sequeira, M.D., de Kantor, I.N., (Eds.), *Human Tuberculosis Caused by Mycobacterium bovis in Latin America and the Caribbean*, Iowa State University Press, Ames, 13-17.
- Thoen, C.O., LoBue, P., de Kantor, I.N., 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet. Microbiol.* 112, 339-345.
- Waters, W.R., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Bannantine, J.P., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Greenwald, R., Esfandiari, J., McNair, J., Pollock, J.M., Andersen, P., Lyashchenko, K.P., 2006. Early Antibody Responses to Experimental *Mycobacterium bovis* Infection of Cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 648-654.
- Zanini, M.S., Moreira, E., Lopes, M.T., Mota, P., Salas, C.E., 1998. Detection of *Mycobacterium bovis* in milk by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 45, 473-479.





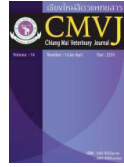


# เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

## Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN: 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvej



### บทความต้นฉบับ

## ความชุกและปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อปรสิตในเลือดไก่หลังบ้าน ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่

พัชราภรณ์ ทาแกง<sup>1</sup>, สุรัชย์ พิกุลแก้ว<sup>2</sup>, ณัฐกานต์ อวัยยานนท์<sup>1</sup>, สุรรัตน์ หนูมี<sup>\*</sup>

<sup>1</sup> บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 239 ถนนห้วยแก้ว ตำบลสุเทพ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

<sup>2</sup> ภาควิชาคลินิกสัตว์บริบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100

**บทคัดย่อ** ปรสิตที่พบในเลือดไก่เป็นหนึ่งในโรคที่มีความสำคัญเป็นสาเหตุของการสูญเสียรายได้ทางเศรษฐกิจ และส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ปีก การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกและปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ การทดลองนี้ทำการเก็บตัวอย่าง 856 ตัวอย่างจากเลือดไก่หลังบ้าน ในพื้นที่ 15 อำเภอของจังหวัดเชียงใหม่ นำเลือดมาป้ายสไลด์ย้อมสไลด์ด้วยสี Giemsa วิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้ได้จัดทำแบบสอบถามเพื่อสัมภาษณ์เกษตรกรผู้เลี้ยงไก่หลังบ้าน ผลการศึกษาพบความชุกของปรสิตในเลือดไก่หลังบ้านร้อยละ 73.95 (633/856) และไก่ทุกตัวไม่แสดงอาการป่วย อุบัติการณ์ดังกล่าวพบมากในพื้นที่อำเภอแม่แตงและอมก๋อย ผลการศึกษาพบปรสิตในเลือดไก่หลังบ้าน 3 ชนิด ได้แก่ *Leucocytozoon sabrazesi* ร้อยละ 72.66, *Leucocytozoon caulleryi* ร้อยละ 0.47 และ *Microfilaria* ร้อยละ 4.56 โดยสามารถพบการติดเชื้อปรสิตร่วมในเลือดไก่หลังบ้านมากกว่าหนึ่งชนิดในไก่ตัวเดียวกัน พบร้อยละ 4.67 นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่าความชุกของการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านมีความสัมพันธ์กับปัจจัยฤดูกาลอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) โดยผลรวมค่าความชุกของการติดเชื้อช่วงฤดูร้อนพบร้อยละ 78.57 ในขณะที่การติดเชื้อช่วงฤดูฝนพบร้อยละ 68.52 สรุปได้ว่าการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่พบการติดเชื้อสูง ดังนั้นเกษตรกรและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรมีการวางแผนควบคุมและเฝ้าระวังการเกิดโรคระบาดในช่วงเวลาที่เหมาะสม การให้ความรู้และคำแนะนำแก่เกษตรกรให้มีระบบการเลี้ยงและการจัดการที่ถูกต้องเป็นแนวทางหนึ่งซึ่งช่วยลดการอุบัติของโรคในไก่หลังบ้านต่อไปในอนาคต

**คำสำคัญ** ปรสิตในเลือดไก่, ไก่หลังบ้าน, ลิวโคไซโตซูน

\* ผู้รับผิดชอบบทความ สุรรัตน์ หนูมี ภาควิชาคลินิกสัตว์บริบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50100 โทรศัพท์ 0-5394-8023

อีเมล [supertaans@gmail.com](mailto:supertaans@gmail.com)

**ข้อมูลบทความ** วันที่ได้รับบทความ 22 สิงหาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 6 กันยายน พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 15 กันยายน พ.ศ.2560



Original Article

## Prevalence and risk factors of blood parasites infection in backyard chickens in Chiang Mai

Patcharaporn Takang<sup>1</sup>, Surachai Pikulkaew<sup>2</sup>, Nattakarn Awaiwanont<sup>2</sup>, Sureerat Numeee<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate School, Chiang Mai University, 239 Huay Kaew Road, Suthep, Muang, Chiang Mai, 50200

<sup>2</sup> Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Mae Hia, Muang, Chiang Mai 50100.

**Abstract** The avian blood parasite is one of the most important diseases that causes of economic loss and impact of the poultry production.–The objective of this study was aimed to determine the prevalence and risk factors of blood parasites of backyard chickens in Chiang Mai. This experiment was collected 856 blood samples from backyard chickens in 15 district areas of Chiang Mai. Then, the thin blood smear slides were prepared with Giemsa stain and were analyzed under light microscope. Moreover, the farmers who have raised the backyard chicken were interviewed using a questionnaire. The results showed the prevalence of blood parasites infection in backyard chickens was 73.95% (633/856) and chickens show no symptoms. The incidence of the most common areas in Maetang and Omkoi district. The results showed that chickens were infected with three kinds of blood parasites which comprised of *Leucocytozoon sabraezesi* (72.66%), *Leucocytozoon caulleryi* (0.47%) and *Microfilaria* (4.56%). It is possible that co-infections were found in backyard chicken (4.67%). In addition, the studies showed that the blood parasite infection in backyard chickens significantly related to the seasons ( $P < 0.05$ ). The analysis of data on the prevalence of blood parasites infection of backyard chickens in Chiang Mai, Thailand, showed an overall prevalence of summer season infection was found to be 78.57% whereas only 68.52% in rainy season had the blood parasitic infection. Conclusions that blood parasites infection in backyard chickens in Chiang Mai, Thailand were highly infections. Therefore, farmers and related agencies should plan, control, and monitor outbreaks at the appropriate time. However, educating and advising services farmers on production system and management will be way to reduce the incidence of disease in backyard chickens in the future.

**Keywords:** avian blood parasites, backyard chickens, *Leucocytozoon* spp.

\*Corresponding author: Sureerat Numeee Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Mae Hia, Muang, Chiang Mai, 50100 Tel: 8023-5394-0; email: supertaans@gmail.com

**Article history:** received manuscript: 22 August 2017, accepted manuscript: 6 September 2017, published online: 15 August 2017



## บทนำ

ปรสิตในเลือดที่มักก่อโรคกับสัตว์ปีกมีหลายชนิด ได้แก่ *Plasmodium* spp., *Leucocytozoon* spp., *Haemoproteus* spp., *Aegyptinella* spp., *Trypanosoma* spp. และ *Microfilaria* (Permin and Hansen, 1998) ซึ่งพบการระบาดได้มากในเขตอบอุ่นทั่วโลก การก่อโรคของปรสิตในเลือดและอาการที่แสดงออกจะแตกต่างกันไป โดยไก่ที่ติดเชื้อ *Leucocytozoon* spp. เป็นสาเหตุของโรคลิโคไซโตซูโนซิส ในประเทศไทยชนิดที่พบก่อโรค ได้แก่ *Leucocytozoon sabrazezi* (*L. sabrazezi*) และ *L. caulleryi* โดยมีรีน (*Culicoides* spp.) และริ้นดำ (*Simulium* spp.) เป็นพาหะนำโรค ไก่ที่ติดเชื้อปรสิตจะไม่แสดงอาการป่วยชัดเจน หรือแสดงอาการแบบเฉียบพลัน เช่น โลหิตจาง ซึม ท้องเสีย อุจจาระเป็นสีเขียว หงอนและเหนียงซีด อาจแสดงอาการทางระบบประสาท (Krimahakim et al., 1975; Nakamura et al., 1990; Wongwatcharadamrong et al., 1980) มีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 40 ในการเลี้ยงไก่พื้นเมือง (Prasittirat et al., 1997) และส่งผลกระทบต่อทางเศรษฐกิจในฟาร์มไก่ไข่ โดยอัตราการผลิตไข่ลดลงร้อยละ 40 อัตราการป่วยร้อยละ 10 และอัตราการตายร้อยละ 1.5 ซึ่งเป็นการเกิดโรคร่วมกับเชื้อมาลาเรียในไก่ (Worasing et al., 2000) ส่วนเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Haemoproteus* spp. เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในไก่ มีแมลงดูดเลือด เช่น ยุงลาย (*Aedes* spp.) ยุงรำคาญ (*Culex* spp.) และยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะนำโรค ในประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อ *Plasmodium gallinaceum* (*P. gallinaceum*) ทำให้มีอัตราการป่วยและตายสูงถึงร้อยละ 90 (Chumpoochan et al., 1995) ไก่ที่ติดเชื้อจะแสดงอาการแบบเฉียบพลัน หงอนและเหนียงจะมีสีแดงจัด และตายอย่างรวดเร็ว ส่วนไก่ที่เป็นแบบเรื้อรังจะมีอาการซบเซา ท้องเสีย อุจจาระมีสีเขียว และมีสภาวะ

โลหิตจาง (Akiba, 1960; Muangyai, 2002; Sasipreeyajan, 2010; Skidmore, 1931) นอกจากนี้พบการระบาดตามมาอีกในหลายพื้นที่ เช่น ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี ชลบุรี สระบุรี และอยุธยา โดยพบอัตราการตายสูง และอัตราการผลิตไข่ลดลงจากเดิมร้อยละ 10 ถึง 30 (Prasittirat, 1998) สำหรับไก่ที่ติดเชื้อ *Aegyptinella* spp. ทำให้ไก่ขนยุ่ง ไม่กินอาหาร ซึมและมีอาการท้องเสีย (Permin and Hansen, 1998) ส่วนเชื้อ *Trypanosoma* spp. ยังไม่ทราบการก่อโรคในไก่ที่แน่ชัด (Sehgal et al., 2006) การติดเชื้อ *Microfilaria* ในสัตว์ปีกมักก่อโรคแบบไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการ ในรายที่แสดงอาการพบการบวมบริเวณที่ข้อเท้า หรือนิ้วเท้า (Dhama et al., 1985)

ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาวิจัยเพื่อรักษาโรคปรสิตในเลือดไก่จำนวนมาก เช่น การใช้สารคลอโรควินเพื่อควบคุมโรคมาลาเรียในไก่ (Sasipreeyajan, 2010; Worasing et al., 2000) หรือการทดลองใช้ยาซัลฟาโดเมทท็อกซินในการรักษาโรคลิโคไซโตซูโนซิสจากเชื้อ *L. caulleryi* แต่ไม่สามารถควบคุมเชื้อ *L. sabrazezi* ได้ (Prasittirat et al., 1997; Worasing et al., 2000) ทำให้ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาโรคที่ได้ผลแน่ชัดและดีที่สุด ดังนั้นการเฝ้าระวังเพื่อลดการอุบัติของโรคจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

วิถีชีวิตของชาวชนบทในไทยตั้งแต่อดีต มักนิยมเลี้ยงไก่พื้นเมืองหรือที่เรียกว่า ไก่หลังบ้าน (backyard chicken) ไว้ตามบ้านเพื่อใช้เป็นอาหาร หรือเพาะขยายพันธุ์จำหน่ายในตลาดชุมชนก่อนเป็นรายได้เสริม การเลี้ยงไก่หลังบ้านมักเป็นระบบการเลี้ยงแบบปล่อย ไก่หากินเองตามธรรมชาติ ทำให้ไก่หลังบ้านมีโอกาสสัมผัสโรคจากสิ่งแวดล้อมได้ง่ายเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในระบบปิด ดังนั้นการศึกษาค้นคว้า จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความชุกและปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการติดเชื้อปรสิตในเลือดไก่หลังบ้านในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อให้ทราบถึงสถานการณ์ของการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านและปัจจัยเสี่ยง อันจะ

นำมาซึ่งข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการวางแผน ป้องกัน การระบาดของโรค หรือแนวทางในการรักษาโรค ทั้งนี้ เพื่อลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและรายได้อันจะเกิดขึ้นกับเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่หลังบ้าน

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเลือกพื้นที่ศึกษาและกลุ่มตัวอย่าง

ศึกษาในพื้นที่ 30 หมู่บ้าน ใน 15 อำเภอ จังหวัดเชียงใหม่ คำนวณจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาด้วยโปรแกรม R (package epiR) จากจำนวนไก่พื้นเมืองที่มีการเลี้ยงในจังหวัดเชียงใหม่ ทั้งหมด 2,482,984 ตัว (Chiang Mai Provincial Livestock Office, 2015) โดยประมาณค่าความชุกของการพบเชื้อปรสิตในเลือดไก่หลังบ้านร้อยละ 48 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ร้อยละ 10 จะได้จำนวนไก่พื้นเมืองที่เป็นตัวแทนของไก่หลังบ้านจำนวน 416 ตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่าง 2 ช่วงเวลา (Overgaard et al., 2003) ได้แก่ เดือนตุลาคม ถึง เมษายน เป็นช่วงที่มีปริมาณน้ำฝนน้อย หรือ ฤดูแล้ง (dry season) และเดือนพฤษภาคม ถึง กันยายน ซึ่งเป็นช่วงที่มีปริมาณน้ำฝนมากหรือฤดูฝน (wet season) เพื่อศึกษาผลของฤดูกาลที่มีความสัมพันธ์ต่อการพบเชื้อปรสิตในเลือดไก่หลังบ้าน

### การเก็บตัวอย่างและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่างเลือดไก่จากเส้นเลือดบริเวณใต้ปีก (wing vein) เจาะเลือดปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร ใส่หลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) นำมาตรวจวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการด้วยการป้ายเลือดบาง (thin blood smear) บนกระจกสไลด์และย้อมด้วยสี Giemsa (Nemi, 1986) จากนั้นศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาเชื้อ *Plasmodium* spp., *Leucocytozoon* spp., *Haemoproteus* spp., *Aegyptinella* spp., *Trypanosoma* spp. และ

*Microfilaria* แล้วบันทึกผลการทดลอง งานวิจัยนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยบรรณ สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (เลขที่หนังสืออนุญาต S33/2559 วันที่ 29 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2559)

### การเก็บข้อมูลเพื่อศึกษาปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรค

ทำการเก็บข้อมูลทั่วไปของเกษตรกร รูปแบบ การเลี้ยงและการจัดการ โดยการจัดทำแบบสอบถาม แล้วนำข้อมูลที่ได้อาวิเคราะห์หาปัจจัยเสี่ยงในการพบเชื้อปรสิตในเลือดไก่หลังบ้าน

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้สถิติเชิงพรรณนาในการหาค่าความชุกของการตรวจพบพยาธิเม็ดเลือดในไก่ วิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงของการพบเชื้อที่ก่อโรคในไก่ ด้วยวิธี Chi-Square test (Vanichbuncha, 2008) และคำนวณค่า Odds Ratio (OR) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ EpiCalc 2000 (version 1.02)

## ผลการศึกษา

จากการย้อมฟิล์มเลือดบาง พบความชุกของการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านร้อยละ 73.95 (633/856) โดยเชื้อที่พบในเลือด คือ *Leucocytozoon* spp. และ *Microfilaria* (รูปที่ 1) ซึ่งอาจเป็นการติดเชื้อเพียงชนิดเดียวหรือเป็นการติดเชื้อปรสิตตัวมากกว่าหนึ่งชนิด อย่างไรก็ตามไม่พบปรสิตชนิด *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp., *Aegyptinella* spp. และ *Trypanosoma* spp. ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 1

ผลของความสัมพันธ์ของฤดูกาล (ตารางที่ 2) พบว่าในช่วง dry season ตรวจพบการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับช่วง wet season





นอกจากนี้ในแต่ละฤดูกาลพบความชุกของการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านของแต่ละอำเภอแตกต่างกัน คือ ช่วง dry season พบความชุกของการติดเชื้อปรสิตร้อยละ 46.3 ถึง 100 และช่วง wet season พบความชุกของการติดเชื้อปรสิตร้อยละ 22.2 ถึง 100 โดยอำเภอที่พบความชุกของการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านมากที่สุดคือ อำเภอแม่แตง และอำเภออมก๋อย พบการติดเชื้อสูงทั้งในช่วง wet season และ dry season (รูปที่ 2)

เมื่อทำการวิเคราะห์ถึงปัจจัยเสี่ยงจากแบบสอบถามด้านรูปแบบการเลี้ยงและการจัดการ เช่น การป้องกันไก่จากพาหะนำโรคด้วยมุ้ง การทำความสะอาดเล้าไก่ และการกำจัดของเสีย ต่อการตรวจพบเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้าน ไม่พบปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการติดเชื้อปรสิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

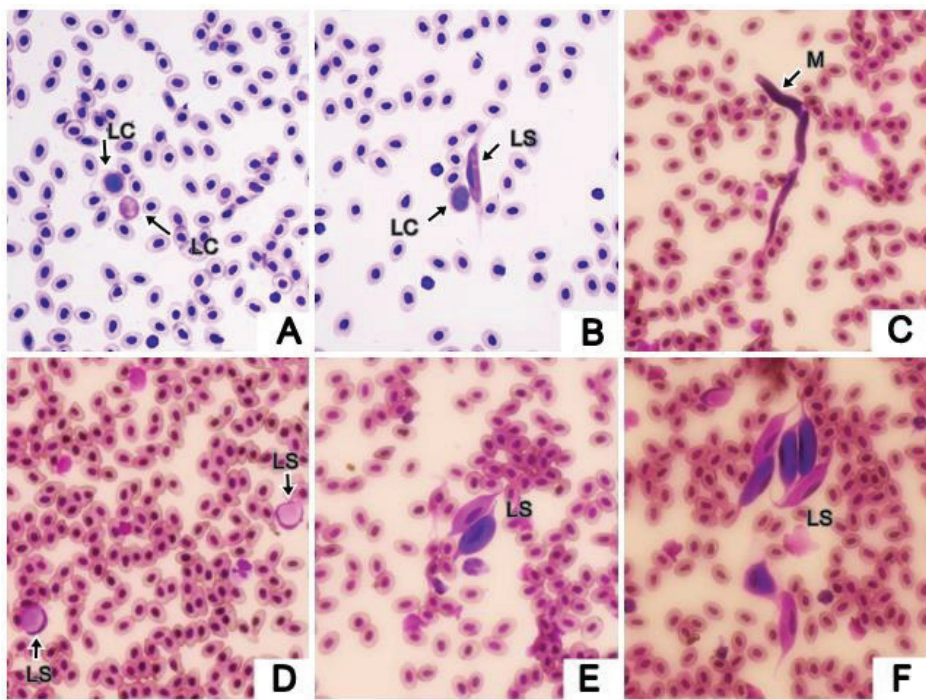


Figure 1 Images of host blood cells infected with *Leucocytozoon* spp. gametocytes found in backyard chickens in Chiang Mai, Thailand. (LC: *L. caulleryi*; LS: *L. sabrazesi*; M: *Microfilaria*) A: Male and female gametocytes of *L. caulleryi*. B: An image of blood smear showing coinfection with *L. caulleryi* and *L. sabrazesi*. C: An image of blood smear showing *Microfilaria*. D: Male and female gametocytes of *L. sabrazesi* in round form. E-F: Male and female gametocytes of *L. sabrazesi* in elongate form.

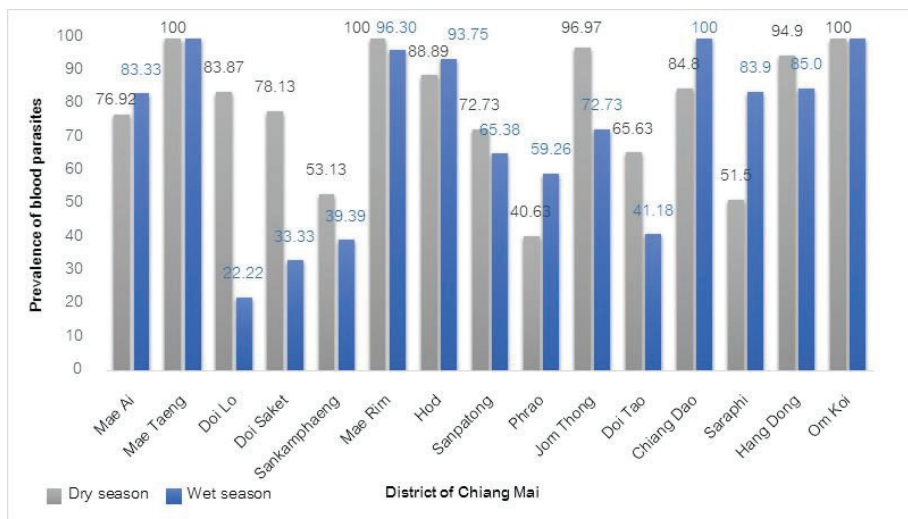


Figure 2 Prevalence of blood parasites found in backyard chicken in Chiang Mai, Thailand.

Table 1 Type and prevalence of blood parasites in backyard chickens (n= 856) in Chiang Mai, Thailand during May 2015 to April 2016.

Type of blood parasites	Number of positive samples	Percentage prevalence rate
Single species		
- <i>L. sabrazesi</i>	622	72.66
- <i>L. caulleryi</i>	4	0.47
- Microfilaria	39	4.56
Two species (Mix infections)		
- <i>L. sabrazesi</i> + <i>L. caulleryi</i>	3	0.35
- <i>L. sabrazesi</i> + Microfilaria	37	4.32

Table 2 Seasonal relationships that affect the detection of blood parasites in backyard chickens in Chiang Mai, Thailand.

Season*	Number of chickens	Number of positive chickens	Percentage prevalence rate
Wet season (May - September)	462	363	68.53 <sup>a</sup>
Dry season (October - April)	394	270	78.57 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>856</b>	<b>633</b>	<b>73.95</b>

\* Overgaard et al., 2003

<sup>a</sup> and <sup>b</sup> are the difference statistically significant (P <0.05)



**Table 3** Relationship of risk factors to blood parasites in backyard chickens Chiang Mai. (n=58)

Factors	Found		Not found		Odds (95% CI)	P-value
	blood parasites		blood parasites			
	Yes	No	Yes	No		
1. Cage and net	13	38	1	5	0.34 [0.06, 1.91]	0.33
2. Free range and open housing	39	12	3	3	3.25 [0.58, 18.26]	0.16
3. Co-area chicken raising	25	26	1	5	4.8 [0.52, 44.10]	0.21
4. Raising area close to the water source	21	30	1	5	3.50 [0.38, 32.17]	0.40
5. Free range and coop	8	49	3	3	0.19 [0.03, 1.10]	0.08
6. Free range and fence of owner house	28	23	5	1	0.24 [0.27, 2.24]	0.38
7. Waste disposal	37	14	5	1	0.53 [0.06, 4.93]	1.0
8. Chicken house sanitation	43	8	4	2	2.69 [0.42, 17.22]	0.28
9. Insect vectors; mosquitos	42	9	4	2	2.33 [0.37, 14.45]	0.32
Insect vectors; blackflies	0	51	1	5	0.10	
10. Quarantine before raising	13	38	0	6	0.32	
11. Carry chicken in/out the farm	20	31	2	4	1.3 [0.22, 7.71]	1.0

### วิจารณ์

การศึกษาความชุกของปรสิตในเลือดสัตว์ปีกมีอยู่มาก แต่ส่วนใหญ่เป็นศึกษาในไก่ที่เลี้ยงเชิงอุตสาหกรรมเนื่องจากมูลค่าทางเศรษฐกิจ แต่การศึกษาความชุกของการติดเชื้อปรสิตในเลือดในสัตว์ปีกที่เลี้ยงในระบบเปิดซึ่งไม่มีการควบคุมที่ดีเท่ากับการเลี้ยงในระดับ

อุตสาหกรรมนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นแหล่งการระบาดของโรคปรสิตในอนาคต ผลการศึกษาพบความชุกของการติดเชื้อปรสิตในเลือดชนิด *Leucocytozoon* spp. ของไก่หลังบ้านในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ในระดับสูง โดยพบร้อยละ 73.6 ซึ่งใกล้เคียงกับการรายงานของ Jaijan et al. (2012) ที่พบความชุกของการติดเชื้อ *Leucocytozoon* spp. ในไก่พื้นเมืองในพื้นที่จังหวัดน่านร้อยละ 74.66 อย่างไรก็ตาม



เมื่อเทียบกับการรายงานก่อนหน้าของไก่ที่เลี้ยงหลังบ้านในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ พบความชุกของการติดเชื้อเพียงร้อยละ 44.58 (Yano et al., 2005) การพบความชุกของเชื้อดังกล่าวที่เพิ่มขึ้น อาจเกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ตัวสัตว์ ปัจจัยของเชื้อโรค ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม และปัจจัยด้านการจัดการ (Ishtiaq et al., 2007) การเปลี่ยนแปลงสภาพสิ่งแวดล้อมในปัจจุบันส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของพาหะนำโรคปรสิตในเม็ดเลือดของสัตว์หลายชนิด ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิโลกมีผลทำให้วงจรชีวิตของแมลงสั้นลงและสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว (Srisuka et al., 2015; Takaoka et al., 2003)

นอกจากนี้จากการรายงานของ (Choochote, 2016) พบว่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527 ถึง 2555 มีการเพิ่มจำนวนสายพันธุ์ (species) ของริ้น (midge และ black flies) ในพื้นที่ 34 จังหวัดของประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าไก่หลังบ้านมีการติดเชื้อ *L. sabrazesi* สูงกว่า *L. caulleryi* ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของโรคลิโวไซโคซูโนซิส แต่ไก่หลังบ้านจะไม่แสดงอาการทางคลินิกอย่างชัดเจน ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงละเลยความสำคัญของการติดเชื้อปรสิตในเลือด เป็นที่ทราบกันว่าสัตว์ปีกที่มีเชื้อปรสิตในกระแสเลือดสามารถเป็นตัวถูกเบียนเก็บเชื้อ (reservoir host) (Gimba et al., 2014) อันจะนำไปสู่การระบาดของโรคในการเลี้ยงไก่หลังบ้านพื้นที่ใกล้เคียง หรือการเลี้ยงสัตว์ปีกในภาคอุตสาหกรรมได้

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ยังเป็นรายงานการศึกษาแรกที่มีการตรวจพบความชุกของเชื้อ *Microfilaria* ในไก่หลังบ้านของพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ถึงแม้ว่าจะยังไม่มีรายงานการระบาดของรุนแรงของเชื้อ *Microfilaria* ในการเลี้ยงสัตว์ปีกของประเทศไทย แต่มีการศึกษาพบว่าเชื้อ *Microfilaria* ชนิดตัวเต็มวัยสามารถเข้าเจริญเติบโตในสมอง ผนังหลอดเลือด และเจริญในเนื้อเยื่อตามข้อ ทำให้เกิดอาการข้อบวมในสัตว์ปีก โดยที่สัตว์ปีกที่ติดเชื้ออาจแสดงอาการหรือไม่ก็ได้ ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต

และระบบภูมิคุ้มกัน อันส่งผลต่อสุขภาพในสัตว์ปีก (Dhama et al., 1985; Worasing et al., 2004)

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาไม่พบการติดเชื้อปรสิต ชนิด *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp., *Aegyptinella* spp. และ *Trypanosoma* spp. ทั้งนี้ประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Trypanosoma* spp. ในไก่พื้นเมืองค่อนข้างน้อย (Jaijan et al., 2012) แต่มักพบการติดเชื้อของ *Plasmodium* spp. ในไก่ที่เลี้ยงเชิงอุตสาหกรรมในระดับสูง (Chumpoochan et al., 1995; Prasittirat, 1998; Worasing et al., 2000) สำหรับการติดเชื้อ *Haemoproteus* spp. มักพบในนกมากกว่าสัตว์ปีกชนิดอื่น (Bishop and Bennett, 1992; Garnham, 1996; Valkunas et al., 2005) ส่วนเชื้อ *Aegyptinella* spp. ยังไม่มีรายงานพาหะนำโรคที่แน่ชัดและยังไม่เคยพบรายการตรวจพบเชื้อปรสิตชนิดนี้ในประเทศไทย

ผลการศึกษาปัจจัยเสี่ยงพบว่า ฤดูกาลมีผลต่อการพบการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้าน โดยช่วงเดือนตุลาคม - เมษายน พบความชุกของการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านสูงกว่าช่วงเดือนพฤษภาคม - กันยายน ซึ่งต่างจากรายงานที่พบว่า ช่วง wet season เป็นช่วงที่มีการติดเชื้อปรสิตในเลือดของสัตว์ปีกสูง (Awa II et al., 2014; Zamora-Vilchis et al., 2012; Zhao et al., 2016) ทั้งนี้ในช่วง dry season (เดือนตุลาคม - เมษายน) ของการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างระหว่าง เดือนมกราคม - มีนาคม เป็นช่วงที่ยังมีการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและมีฝนตกชุก ซึ่งอาจมีผลต่ออุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของแมลงพาหะและการก่อโรค (Srisuka et al., 2015) ประกอบกับไก่มีภูมิคุ้มกันต่ำลงเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมดังกล่าว ทำให้ไก่สามารถรับเชื้อได้ง่ายขึ้นส่งผลต่อการตรวจพบเชื้อที่สูงขึ้น ด้วยเหตุนี้ ผลจากการศึกษาถึงฤดูกาลจึงมีประโยชน์อย่างมากต่อการเลือกช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับควบคุมและป้องกันการติดเชื้อปรสิตในเลือดไก่



หลังบ้าน โดยเฉพาะช่วงระหว่างเดือนตุลาคม ถึง เมษายน ที่พบอัตราการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านที่ก่อให้เกิดโรคในระดับสูง ทั้งนี้ ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของฤดูกาลกับการติดเชื้อปรสิตในเลือดไก่หลังบ้าน จากการศึกษาในหลายอำเภอพบความชุกของปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านตลอดทั้งปี มีเฉพาะบางอำเภอเท่านั้นที่ความชุกของการตรวจเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านมีความแตกต่างกัน เช่น ดอยหล่อ หรือดอยสะเก็ด อาจด้วยปัจจัยทางด้านการเลี้ยงและการจัดการของเกษตรกร ทั้งนี้เกษตรกรในพื้นที่ดังกล่าวเกษตรกรส่วนใหญ่เลี้ยงไก่ชนซึ่งเป็นไก่ที่มีมูลค่า เกษตรกรจึงมีความสนใจในการเลี้ยงและการจัดการที่ดี เช่น มีการทำความสะอาดเล้า การแยกเลี้ยง การให้ยา วิตามิน และวัคซีน ไก่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีโอกาสที่จะช่วยลดการติดเชื้อจากปรสิตในเลือดไก่ที่เลี้ยงได้

ผลการศึกษาข้อมูลของเกษตรกรเกี่ยวกับรูปแบบเลี้ยงและการจัดการ ไม่พบปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้าน ทั้งนี้เกษตรกรในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่มีรูปแบบการเลี้ยงที่หลากหลาย มีระดับการจัดการไม่เท่ากัน อาจเนื่องมาจากเกษตรกรขาดองค์ความรู้และความใส่ใจในการเลี้ยง นอกจากนี้เกษตรกรส่วนใหญ่อาจยังไม่มีความรู้เรื่องโรคที่เกิดจากการติดเชื้อปรสิตในเลือดของสัตว์ปีก เนื่องด้วยความรุนแรงของโรคยังไม่เคยมีอุบัติการณ์ในพื้นที่จึงทำให้ความสำคัญของโรคถูกมองข้ามไป ดังนั้นการให้องค์ความรู้และคำแนะนำแก่เกษตรกรให้มีระบบการเลี้ยงและการจัดการที่ถูกต้องมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ที่จะเป็นส่วนหนึ่งในการลดการแพร่กระจายของการติดเชื้อปรสิตในเลือดของสัตว์ปีก

## สรุป

การศึกษาค้นคว้าความชุกของการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้านในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ พบปรสิต

ในเลือดของไก่หลังบ้านชนิดที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *L. sabrazesi* และ *L. caulleryi* โดยพบได้ทุกพื้นที่ของจังหวัดเชียงใหม่ บางพื้นที่พบอัตราการติดเชื้อสูง การศึกษาครั้งนี้ยังพบความชุกของเชื้อ *Microfilaria* ถึงแม้ยังไม่มียางานการระบาดที่รุนแรง แต่เชื้อสามารถส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ปีกได้ นอกจากนี้การศึกษาความสัมพันธ์ของฤดูกาลที่มีผลต่อการติดเชื้อปรสิตในเลือดของไก่หลังบ้าน พบความชุกของการติดเชื้อปรสิตในระดับสูงช่วงเดือนตุลาคม - เมษายน ด้วยเหตุนี้จึงควรมีการวางแผนป้องกัน ควบคุม และเฝ้าระวังการเกิดโรคระบาดทั้งโรคที่เกิดจากการติดเชื้อปรสิตในเลือดและโรคแทรกซ้อนอื่น อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาวิจัยเพื่อเป็นแนวทางในการเลี้ยงและการจัดการที่ถูกต้องเพื่อลดการติดเชื้อของปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดเชียงใหม่ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่อำนวยความสะดวกในการเข้าพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างและตอบแบบสอบถาม ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อำนวยความสะดวกพื้นที่ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณโครงการระบบเฝ้าระวังสุขภาพหนึ่งเดียวของชุมชน (ผอ.ดีดี) และมูลนิธิ Skoll Global Threats Fund ผู้สนับสนุนงบประมาณการทำวิจัยในครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

Akiba, K., 1960. Studies on the Leucocytozoon found in the Chicken, in Japan: II. on the transmission of *L. caulleryi* by *Culicoides arakawae*. JJVS, 309-317.



- Awa II, T., Khan, P.V., Tamungang Simon, A., Marcel, D., 2014. Effects of seasonal and site variations on the prevalence of parasites on Black-crowned waxbill (*Estrilda nonnula*) in Dschang and its environs, Cameroon. *J App Biol Biotech.* 2, 012-016.
- Bishop, M.A., Bennett, G.F. 1992. Host-parasite Catalogue of the Avian Haematozoa, Occasional Papers in Biology, In: Newfoundland., Memorial University of Newfoundland.
- Chiang Mai Provincial Livestock Office 2015. Provincial Animal Information Report Data processing as of November 12, 2015. (in Thai)
- Choochote, W. 2016. Black-fly Fauna of Thailand: Vector Importance and Species Diversity (Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University).
- Chumpoochan, T., Prasitirat, P., Mahantachaisakul, C., 1995. Outbreak of Avian Malaria in Broilers National Institutes of Health Newsletters 4. (in Thai)
- Dhama, D.N., Darmadi, P., Arsana, I.B., 1985. Filariasis and Microfilariasis in Parrots in The Eastern Island of Indonesia. *Avian Dis.* 29, 881-885.
- Garnham, P.C.C., 1996. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia.* United Kingdom, Oxford
- Gimba, F., Zakaria, A., Mugok, L.B., Siong, H.C., Jaafar, N., Moktar, M.A., Abdul Rashid, A.R., Amlizawaty, A., Abu, J., Sani, R.A., Amin-Babjee, S.M., Sharma, R.S., 2014. Haemoparasites Of Domestic Poultry And Wild Birds In Selangor, Malaysia. *MJVR.* 5, 43-51.
- Ishtiaq, F., Gering, E., Rappole, J.H., Rahmani, A.R., Jhala, Y.V., Dove, C.J., Milensky, C., Olson, S.L., Peirce, M.A., Fleischer, R.C., 2007. Prevalence and Diversity of Avian Hematozoan Parasites in Asia: a Regional Survey. *J. Wildl. Dis.* 43, 382-398.
- Jaijan, A., Posuya, W., Saenbuaphan, N., 2012. Prevalence and Risk Factors of Blood Parasites in Indigenous Thai Chickens in Nan Province During November 2011 to August 2012. Nan Provincial Livestock Office. (in Thai)
- Krimahakim, S., Ratanasethakul, C., Klaynil, P., 1975. Pathological Study of Leucocytozoonosis in Chickens. *TJVM.* 5, 746-760. (in Thai)
- Muangyai, M., 2002. *Veterinary Protozoology* Chulalongkorn University, Bangkok, 218 p. (in Thai)
- Nakamura, K., Prasitiratna, P., Chompoochan, T. 1990. Prevalence and distribution of chicken Leucocytozoonosis in Thailand. In: Proceedings of 7th FAVA Congress., Pattaya Thailand.
- Nemi, C.J., 1986. *Schalms Veterinary hematology.* 4th Edition. Lea and Febiger, Philadelphia. P 21-62.
- Overgaard, H.J., Ekbohm, B., Suwonkerd, W., Takagi, M., 2003. Effect of Landscape Structure on Anopheline Mosquito Diversity and Density in Northern Thailand: Implications for Malaria Transmission and Control. *Landsc. Ecol.* 18, 605-619.
- Permin, A., Hansen, J.W. 1998. *The Epidemiology, Diagnosis and Control of Poultry Parasites.*, 4, ed. (Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nation).
- Prasitirat, M., Intarachote, U., Vongpakorn, M., Chompoochan, T., Moekaeuw, K., Sookruen, A., 1997. Treatment of Leucocytozoonosis in Native Chickens by Sulfadimethoxine and Mosquito Nets. Symposium of the 39<sup>th</sup> Kasetsart University veterinary field., 394-402. (in Thai)
- Prasitirat, P. 1998. Avian Malaria in layer chicken. In Documentation of the chicken farmers seminar. Look at the corner chicken egg problem. What is causing the yield to fall. (At Tai-Pan Room, Royal Plaza Hotel, Chachoengsao). (in Thai)
- Sasipreeyajan, J., 2010. *Disease of Poultry.* Thana Press Ltd., Bangkok. (in Thai)
- Sehgal, R.N.M., Gediminas, V., Tatjana, A.L., Smith, T.B., 2006. Blood Parasites of Chickens in Uganda and Cameroon with Molecular Descriptions of



- Leucocytozoon schoutendeni* and *Trypanosoma gallinarum*. *Journal Parasitol* 92, 1336-1343.
- Skidmore, L.V., 1931. *Leucocytozoon smithi* Infection in Turkeys and Its Transmission by *Simulium occidentale* Townsend. *Journal Parasitol*, 130.
- Srisuka, W., Takaoka, H., Otsuka, Y., Fukuda, M., Thongsahuan, S., Taai, K., Choochote, W., Saeung, A., 2015. Seasonal Biodiversity of Black flies (Diptera: Simuliidae) and Evaluation of Ecological Factors Influencing Species Distribution at Doi Pha Hom Pok National Park, Thailand. *Acta Trop.* 149, 212-219.
- Takaoka, H., Choochote, W., Aoki, C., Fukuda, M., Bain, O., 2003. Black flies (Diptera: Simuliidae) Attracted to Humans and Water Buffalos and Natural Infections with Filarial Larvae, Probably *Onchocerca sp.*, in Northern Thailand. *Parasite.* 10, 3-8.
- Valkiunas, G., Sehgal, R.N., Iezhova, T.A., Smith, T.B., 2005. Further Observations on the Blood Parasites of Birds in Uganda. *JWD*, 41, 580-587.
- Vanichbuncha, K., 2008. Logistic Regression Analysis in : Multivariate Data Analysis. Tummasarn Company Limited, Bangkok. (in Thai)
- Wongwatcharadamrong, W., Atsawamehta, P., Yuadyong, R., 1980. Preliminary Report on *Leucocytozoon sabrazesi* in Blackyard Chickens of Southern Thailand. *TJVM*, 10. (in Thai)
- Worasing, R., Kongkeaw, W., Nithiuthai, S., Sihamart, N. 2004. Preliminary Report of Microfilaria from Chicken in Southern Thailand. In: National Conference on Agriculture / Animal Science, khonkaen University, 470-479. (in Thai)
- Worasing, R., Kongkeaw, W., Tiptara, A., Anant, S., 2000. Leucocytozoonosis with Avian Malaria in Layer Chicken and Treatmen. *Epidemiological Surveillance Report* 10. (in Thai)
- Yano, T., Chotinun, S., Numees, S., 2005. Prevalence of *Leucocytozoon spp.* in Native Chickens in Chiang Mai. (in Thai)
- Zamora-Vilchis, I., Williams, S.E., Johnson, C.N., 2012. Environmental Temperature Affects Prevalence of Blood Parasites of Birds on an Elevation Gradient: Implications for Disease in a Warming Climate. *PLoS One* 7, e39208.
- Zhao, W., Pang, Q., Xu, R., Liu, J., Liu, S., Li, J., Su, X.Z., 2016. Monitoring the Prevalence of *Leucocytozoon sabrazesi* in Southern China and Testing Tricyclic Compounds Against Gametocytes. *PLoS One* 11.









เชียงใหม่สัตวแพทยสาร  
Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvi



บทความต้นฉบับ

ผลของพาราควอทต่อการทำงานของเอนไซม์อะลานิน อะมิโนทรานส์เฟอเรส และ แอสพาเทท อะมิโนทรานส์เฟอเรส และการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับในปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*)

ศิริรัตน์ ศรีบาลแจ่ม<sup>1</sup>, ศิริภาวี เจริญวัฒน์ศักดิ์<sup>1</sup>, ธงชัย จำปาศรี<sup>1</sup>, ชไมพร จำปาศรี<sup>2</sup> และ บัณฑิต ยวงสร้อย<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

<sup>2</sup> ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

**บทคัดย่อ** สารกำจัดวัชพืชพาราควอท เป็นสารเคมีทางการเกษตรที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทยและมีสารปนเปื้อนสูงแหล่งน้ำก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชพาราควอทต่อการทำงานของเอนไซม์อะลานิน อะมิโนทรานส์เฟอเรส (alanine aminotransferase; ALT) และแอสพาเทท อะมิโนทรานส์เฟอเรส (aspartate aminotransferase; AST) และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับในปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) โดยศึกษาความเป็นพิษของพาราควอทในปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ย  $32.60 \pm 1.62$  กรัม สัมผัสกับพาราควอทที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4, 6 และ 8 วัน ผลการศึกษาพบว่าพาราควอทมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST มีค่าสูงขึ้นในวันที่ 4 6 และ 8 อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ ระยะแรก (4 วันหลังสัมผัสสารพิษ) พบการรวมของเซลล์ตับรวมทั้งมีการเพิ่มจำนวนและขนาดของเซลล์ ระยะต่อมา (6 วันหลังสัมผัสสารพิษ) พบเลือดคั่งในเส้นเลือดดำ และเส้นเลือดฝอย อยู่ทั่วไปภายในเซลล์ตับ และในระยะที่รุนแรงสุด (8 วันหลังสัมผัสสารพิษ) พบเซลล์ตับเสื่อมสลายแบบมีแควิวโอล จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าพาราควอทที่ปนเปื้อนปริมาณน้อยในแหล่งน้ำมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST ในเนื้อเยื่อตับ และมีความสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับที่แตกต่างกันเมื่อระยะเวลาการได้รับสารพิษเพิ่มขึ้น

**คำสำคัญ** พาราควอท, ปลาน้ำจืด, ความเป็นพิษ, มิชูวิทยา, อะลานิน อะมิโนทรานส์เฟอเรส, แอสพาเทท อะมิโนทรานส์เฟอเรส

\* ผู้รับผิดชอบบทความ บัณฑิต ยวงสร้อย ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002 โทรศัพท์ 0-4320-2360 โทรสาร 0-4320-2360 อีเมล bundyu@kku.ac.th

**ข้อมูลบทความ** วันที่ได้รับบทความ 26 กรกฎาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 8 กันยายน พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 25 กันยายน พ.ศ.2560



Original Article

Effects of paraquat on alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities and liver histopathological changes in Silver barb (*Barbonymus gonionotus*)

Sirorat Sribanjam<sup>1</sup>, Siripavee Charoenwattanasak<sup>1</sup>, Thongchai Champasri<sup>1</sup>, Chamaipom Champasri<sup>2</sup> and Bundit Yuangsoi<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

**Abstract** Paraquat herbicide is an agricultural chemical has a widely used in Thailand and contaminated into the aquatic systems causing toxicity to aquatic animals. The purpose of the present study was to investigate toxic effects of Paraquat on alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities and histopathological alteration of liver tissue in Silver barb (*Barbonymus gonionotus*). Toxicity of paraquat was studied in fish with mean wet weight  $32.60 \pm 1.62$  g exposed to concentration 15 mg/L of paraquat for 4, 6 and 8 days. The results found that paraquat has effects on the enzymes activities of ALT and AST were increased at 4, 6 and 8 days ( $P < 0.05$ ) when compared with control group. Histopathological alteration in the liver, the cloudy swelling, hyperplasia and hypertrophy were found at Day4. The congregation in central vein and sinusoid was found in liver cells at Day6. Finally, the highest stage was found vacuoles degeneration at Day8. The results indicated that very low contamination of paraquat in aquatic systems can affect ALT and AST activities in liver and related to the different pathological alteration of the liver when the duration of exposure to the toxic substances increased.

**Keywords:** paraquat, freshwater fish, toxicity, histopathology, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase

\*Corresponding author: Bundit Yuangsoi Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002.

Tel: 2360-4320-0; Fax: 2360-4320-0; email: bundiyu@kku.ac.th

**Article history:** received manuscript: 26 July 2017, accepted manuscript: 8 September 2017, published online: 25 September 2017



## บทนำ

สารกำจัดวัชพืชพาราควอท (1, 1-dimethyl-4, 4-bipyridylium dichloride) เป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Bipyridinium เป็นสารประเภทสัมผัสทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (contacts-membrane disrupters) ชนิดไม่เลือกทำลาย (non-selective) ใช้ควบคุมวัชพืชได้เกือบทุกชนิดและตายทันที (broad spectrum weed knockdown) (Pornprom, 2011) เป็นสารเคมีทางการเกษตรที่นำมาใช้เพื่อการจัดการทางเกษตรอย่างแพร่หลาย และใช้ในการควบคุมการแพร่ระบาดของวัชพืชในแหล่งน้ำ จึงเป็นสาเหตุให้สารกำจัดวัชพืชพาราควอทปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำได้ การศึกษาของ Pimentel (1995) รายงานว่าจากปริมาณการใช้สารเคมีทั้งหมดในการจัดการทางการเกษตร พบว่ามีเพียงร้อยละ 0.1 เท่านั้นที่สารเคมีดังกล่าวสามารถทำงานได้ตามวัตถุประสงค์ ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 99.9 เชื่อว่ามีการปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อม และส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศวิทยา รวมถึงส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์ด้วย สารกำจัดวัชพืชพาราควอทมีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อสิ่งมีชีวิตในระดับปานกลาง (moderately hazardous) แต่มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์น้ำ (WHO, 2002) Babatunde et al., (2001) รายงานผลการศึกษาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารกำจัดวัชพืชพาราควอท ต่อลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเพียง 11.84 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลากระดี่หม้อ (*Trichogaster trichopterus*) เท่ากับ 1.41 มิลลิกรัมต่อลิตร (Banaee et al., 2013) และปลาตุกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*) เท่ากับ 27.46 มิลลิกรัมต่อลิตร (Nwanil et al., 2014)

กลไกการเกิดพิษของสารกำจัดวัชพืชพาราควอท เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ NADPH ไปเป็นรีดิวซ์พาราควอท และถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนไปเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) และถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide

dismutase) เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีฤทธิ์กัดกร่อน ทำลายเซลล์ของอวัยวะในร่างกาย ส่งผลให้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนั้นมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (Akinwande et al., 2013; Leadprathom, 2013) และถ้ามีมากเกินไปจะทำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) (Yangthong, 2015) ทำให้การทำงานของเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส เอนไซม์แคแทเลส (catalase) และกลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ ที่มีหน้าที่ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย และยังก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในแต่ละอวัยวะที่สำคัญที่ได้รับผลกระทบโดยตรง เช่น ตับ เหงือก ไต และระบบสืบพันธุ์ ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงาน (Langiano & Martinez 2008; Ogamba et al., 2011; Banaee et al., 2013; Rezaee et al., 2013) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kori-Siakpere and Theresa (2007) ในปลาตุกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*) พบว่าสารกำจัดวัชพืชพาราควอทมีผลต่อเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์แอสพาเทท อะมิโนทรานส์เฟอเรส (aspartate aminotransferase; AST) และอะลานิน อะมิโนทรานส์เฟอเรส (alanine aminotransferase; ALT) ที่อยู่ในอวัยวะ เช่น เหงือก ไต กล้ามเนื้อ ตับ ม้าม ลำไส้ และสมอง เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) และยังพบว่าตับเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอวัยวะอื่น สอดคล้องกับการศึกษาของ Banaee et al., (2013) ในปลาคาร์ป (*Cyprinus carpio*) พบว่าสารกำจัดวัชพืชพาราควอทมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าชีวเคมีในเลือด โดยสารพิษส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ AST, ALT, แลคเตส ดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase; LDH), ครีเอทีน ฟอสโฟไคเนส (creatine phosphokinase; CPK), อัลคาไล ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase; ALP) ที่เพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) นอกจากนั้น Edori et al., (2013)



พบว่าสารกำจัดวัชพืชพาราควอตส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าชีวเคมีทั้งในตับ และในเลือดของปลาตุ๊กตาฟริกกัน (*Clarias Gariepinus*) ประกอบด้วยระดับของ AST, ALT, ALP, โซเดียม (sodium) และโพแทสเซียม (potassium) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) จากการรายงานชี้ให้เห็นว่า มีเอนไซม์หลายชนิดที่มีหน้าที่ และบทบาทสำคัญในกระบวนการทำงานของร่างกายเมื่อได้รับสารกำจัดวัชพืชพาราควอตเข้าสู่ร่างกายสัตว์น้ำ

การศึกษานี้เป็นการประเมินค่าความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชพาราควอต ต่อการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST ในตับ และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับปลาตะเพียนขาว Silver barb (*B. gonionotus*) เมื่อได้รับสารพิษในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### การเตรียมสัตว์ทดลอง

เตรียมตัวอย่างปลาตะเพียนขาว (*B. gonionotus*) อายุ 4 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย  $32.60 \pm 1.62$  กรัม และความหนาเฉลี่ย  $16.93 \pm 1.06$  เซนติเมตร จากการเพาะพันธุ์และอนุบาล ในหมวดประมง ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำมาพักในตู้กระจกที่มีระบบให้อากาศเป็นเวลา 7 วัน อุณหภูมิเฉลี่ย  $29.50 \pm 0.44$  องศาเซลเซียส ให้อาหารปริมาณร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้ง ในช่วงเช้า (9.00 น.) และช่วงเย็น (16.00 น.) ของทุกวัน เพื่อปรับสภาพระบบการทำงานของตับปลาให้อยู่ในสภาพที่ปราศจากการปนเปื้อนของสารพิษ

### การวางแผนการวิจัย

ออกแบบการทดลองแบบ Completely randomize design (CRD) โดยให้ระยะเวลาที่ใช้ศึกษาทดลองเป็นปัจจัยหลัก (Factor) เปรียบเทียบกับกลุ่ม

ควบคุมที่ไม่ได้รับสารพิษ โดยเตรียมผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชพาราควอต (Gramoxone® 27.6%) ที่จะใช้แค่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่อยู่ในช่วง  $LC_{50}$  ที่ 96 ชั่วโมง (Babatunde et al., 2001) ที่ระยะเวลา 4, 6 และ 8 วัน โดยใช้วิธีจัดกลุ่มปลาแบบสุ่ม เพื่อให้มีการกระจายของปลาอย่างสม่ำเสมอในแต่ละตู้ ระหว่างการทดลองให้อากาศในตู้ทดลองตลอดเวลา ให้อาหาร 3% ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้ง ในช่วงเช้า (9.00 น.) และช่วงเย็น (16.00 น.) ของทุกวัน เก็บตัวอย่างปลาทั้งหมด 3 ชั่วโมง ได้แก่ ที่ 4, 6 และ 8 วัน ตามแผนการทดลอง เก็บข้อมูลด้านคุณภาพน้ำ ประกอบด้วย ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ (temperature) และ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen; DO)

### การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองหลังจากได้รับสารกำจัดวัชพืชพาราควอต ตามช่วงระยะเวลาที่กำหนดที่ 4, 6 และ 8 วัน โดยเก็บตัวอย่างปลากลุ่มละ 6 ตัว จากนั้นสลบปลาด้วยน้ำแข็งทันทีที่นำปลาขึ้นจากน้ำ แล้วผ่าเก็บเนื้อเยื่อตับปลาตะเพียนขาว ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปลาต้องทำบนถาดน้ำแข็ง (on ice) ตลอดเวลา จากนั้นนำตับไปชั่งน้ำหนักรวมทั้งหมด แล้วทำการแบ่งเนื้อเยื่อตับออกเป็นสองส่วน เนื้อเยื่อตับส่วนแรกนำไปสกัดเอนไซม์ เก็บรักษาตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส ส่วนที่เหลือก็นำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพต่อไป

### การเตรียมตัวอย่างตับเพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์

นำตัวอย่างที่เก็บในตู้ -20 องศาเซลเซียส มาละลายบนน้ำแข็ง (on ice) แล้วใช้กรรไกรตัดย่อยให้เป็นชิ้นเล็ก จากนั้นเติม homogenization buffer (50 mM  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ; 50 mM  $Na_2HPO_4$ , pH 7.4) ที่เย็นจัดในปริมาณ 3 เท่าของน้ำหนักเนื้อเยื่อ นำไปปั่นละเอียด



ด้วยเครื่อง Homogenizer (Ultra-Turrax® T18, IKA, Germany) ที่ความเร็วประมาณ 2,000 รอบต่อนาที (rpm) หรือจนละเอียด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (Rotina 35 R, Hettich, Germany) ที่ความเร็วรอบ 15,400 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดเก็บส่วนใส (supernatant) ได้ส่วนที่เป็นไซโทซอล (cytosol) เพื่อนำไปศึกษา AST และ ALT นำโปรตีนที่ได้มาตรวจวัดความเข้มข้นด้วยวิธี Bradford assay ก่อนที่จะหากิจกรรมการทำงานของ เอนไซม์ (enzyme activity) โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Sinaei and Rahmanpour, (2013)

### การศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ AST

การตรวจกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ของ AST อธิบายโดยย่อคือ ใช้สารละลาย 54.3 mM imidazole pH 7.4 (Sigma-Aldrich, USA), 7 mM  $\alpha$ -ketoglutarate (Sigma-Aldrich, USA), 7 mM L-aspartic acid (Acros organics, USA), 0.2 mM  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Sigma-Aldrich, USA), 0.025 mM pyridoxal phosphate (Acros organics, USA), 1 U malate dehydrogenates (MDH) (Sigma-Aldrich, USA) และ 100 ไมโครลิตรของตัวอย่าง (serum และ cytosolic liver) ในปริมาตรทั้งหมด 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Libra S50 UV/Vis, Biochrom, UK) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร วัดค่าทุก 30 วินาที นาน 5 นาที จากนั้นนำไปคำนวณหาค่าผลต่างของค่าดูดกลืนแสง แล้วนำไปคำนวณจากสมการที่ได้จากกราฟสารละลายมาตรฐาน NADH แล้วหาค่าการทำงานของเอนไซม์ (ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Singer et al., 1990)

### การศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALT

การตรวจกิจกรรมการทำงานของ ALT อธิบายโดยย่อคือ โดยใช้สารละลาย 59.1 mM imidazole pH 7.4, 10.5 mM  $\alpha$ -ketoglutarate, 200 mM L-alanine (Acros organics, USA), 0.2 mM NADH , 0.025 mM pyridoxal phosphate, 1 U lactate dehydrogenates (LDH) (Acros organics, USA) และ 100 ไมโครลิตรของตัวอย่าง (serum และ cytosolic liver) ในปริมาตรทั้งหมด 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Libra S50 UV/Vis, Biochrom, UK) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร วัดค่าทุก 30 วินาที นาน 5 นาที จากนั้นนำไปคำนวณหาค่าผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ได้ โดยนำไปคำนวณจากสมการที่ได้จากกราฟสารละลายมาตรฐาน NADH แล้วหาค่าการทำงานของเอนไซม์ (ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Singer et al., 1990)

### การศึกษาทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อของเนื้อเยื่อตับ

ล้างเนื้อเยื่อตับด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่เย็น แล้วแช่ในน้ำยาคงสภาพเนื้อเยื่อ buffered formalin (Acros organics, USA) ร้อยละ 10 อย่างน้อย 24 ชั่วโมง จึงนำชิ้นเนื้อเยื่อมาล้างด้วยน้ำประปาคงสภาพอย่างน้อย 1 นาที แล้วตัดแยกเป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำตัวอย่างเข้าสู่ขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อ โดยเริ่มจาก ขบวนการขจัดน้ำโดยแช่ในสารเอทานอล (ethanol) (Merck Schuchardt, Germany) ความเข้มข้นร้อยละ 70, 80, 95 และ 100 ตามลำดับ ต่อไปนำตัวอย่างเนื้อเยื่อมาแช่ในไซลีน (xylene) (Polysciences, USA) แล้วนำไปแช่ใน paraplant เหลว (Leica biosystem, Germany) ขั้นตอนละ 2 ชั่วโมงตามลำดับ เพื่อให้ paraplant เหลวเข้าไปแทนที่เอทานอล เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนดังกล่าว ทำการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding) โดยเครื่อง Embedding



station (Leica EG 1150 H, Leica biosystem, Germany) โดยลดอุณหภูมิลงจนพาราฟินเหลวแข็งตัว นำเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการ embedding แล้วมาตัดเนื้อเยื่อ (section) ด้วยเครื่อง Rotary microtome (Leica RM 2255, Leica biosystem, Germany) ให้มีความหนา 4-5 ไมโครเมตร แล้วคัดเลือกแผ่นเนื้อเยื่อที่มีสภาพสมบูรณ์ที่สุดมาติดบนกระจกสไลด์ เพื่อนำไปย้อมสี (stain) ด้วย Hematoxylin and eosin (H&E) (Sigma Aldrich, USA) สังเกตโครงสร้างในระดับเซลล์และเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และถ่ายภาพตามวิธีการของ (ตัดแปลงมาจากวิธีการของ Humason, 1979)

### การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อหาความแปรปรวนระหว่างชุดการทดลอง (treatment) โดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลอง โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test วิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างชุดควบคุม และชุดทดลองที่แอสสารกำจัดศัตรูพืชในระยะเวลาที่เท่ากันแต่ละคู่โดยวิธี Dependent t-test (paired sample t-test) ด้วยโปรแกรม SPSS version 16 for windows

## ผลการศึกษา

### การศึกษาความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชพาราควอตต่อการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST

จากรูปที่ 1 พบว่าระดับเอนไซม์ ALT ในเนื้อเยื่อตับปลาตะเพียนขาวในกลุ่มควบคุม ทั้ง 4 ช่วงเวลาไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ ) โดยมีค่าเท่ากับ  $8.36 \pm 2.30$ ,  $7.81 \pm 1.13$ ,  $6.68 \pm 0.72$  และ  $6.66 \pm 1.02$  นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ สำหรับปลากลุ่มทดลองที่ได้รับสารกำจัดวัชพืชพาราควอตความ

เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการทำงานของเอนไซม์ ALT ในกลุ่มที่ได้รับสารพิษมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 4, 6 และ 8 ( $P < 0.05$ ) มีค่าเท่ากับ  $16.16 \pm 2.01$ ,  $21.64 \pm 2.28$  และ  $48.47 \pm 5.19$  นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

ในปลากลุ่มควบคุมพบว่าการทำงานเฉลี่ยของเอนไซม์ AST ไม่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ ( $P > 0.05$ ) มีค่าเท่ากับ  $148.87 \pm 50.91$ ,  $130.38 \pm 8.78$ ,  $149.50 \pm 14.55$ ,  $145.63 \pm 14.30$  นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ สำหรับปลากลุ่มทดลองที่ได้รับสารกำจัดวัชพืชพาราควอตความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การทำงานของเอนไซม์ AST ในกลุ่มที่ได้รับสารพิษมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 4, 6 และ 8 ( $P < 0.05$ ) มีค่าเท่ากับ  $356.33 \pm 62.75$ ,  $325.30 \pm 12.90$  และ  $377.76 \pm 41.34$  นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (รูปที่ 1)

### การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับ

ในกลุ่มที่ไม่ได้รับกำจัดศัตรูพืช ปลาทุกตัวไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ เซลล์ตับปกติยังคงมีรูปร่างหลายเหลี่ยมมองเห็นขอบเขตเซลล์ชัดเจน มีนิวเคลียสกลมอยู่ตรงกลาง หรือค่อนข้างด้านใดด้านหนึ่ง พบเส้นเลือดฝอย (sinusoid) แทรกกระจายอยู่ระหว่างเซลล์ตับ อาจพบเซลล์ตับมีการเสื่อมสภาพ และตาย เพียงบางเซลล์ซึ่งพบน้อยมากในทุกตัวอย่าง (รูปที่ 2A) กลุ่มทดลองวันที่ 4 พบว่าเซลล์ตับขยายตัวเนื่องจากการเพิ่มขนาดของเซลล์ (hypertrophy) และเพิ่มจำนวนของเซลล์ (hyperplasia) ในเนื้อเยื่อและอวัยวะทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบเส้นเลือดฝอยแทรกในเนื้อเยื่อตับมีจำนวนเพิ่มขึ้น และพบเลือดคั่งในไซนุซอยด์กระจายอยู่ทั่วไป และมี melanomacrophage สีเหลืองแทรกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อย กลุ่มทดลองวันที่ 6 พบเซลล์ตับมีการเสื่อมสภาพ (vacuolar degeneration) มองเห็นเป็นช่องว่างเกิดขึ้นในไซ



โทพลาสซึม หลอดเลือดในตับขยายใหญ่ขึ้นเห็นได้ชัดเจน พบเลือดคั่งอยู่ภายในไซโทพลาสม์ทำให้มองเห็นได้ชัดเจนขึ้น กลุ่มทดลองวันที่ 8 พบการมีการเสื่อมสภาพของเซลล์ (vacuolar degeneration) และพบการตาย

ของเซลล์ (cell necrosis) มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในบางบริเวณพบเยื่อหุ้มเซลล์แตกออกจนไม่เห็นโครงสร้างเดิม (รูปที่ 2)

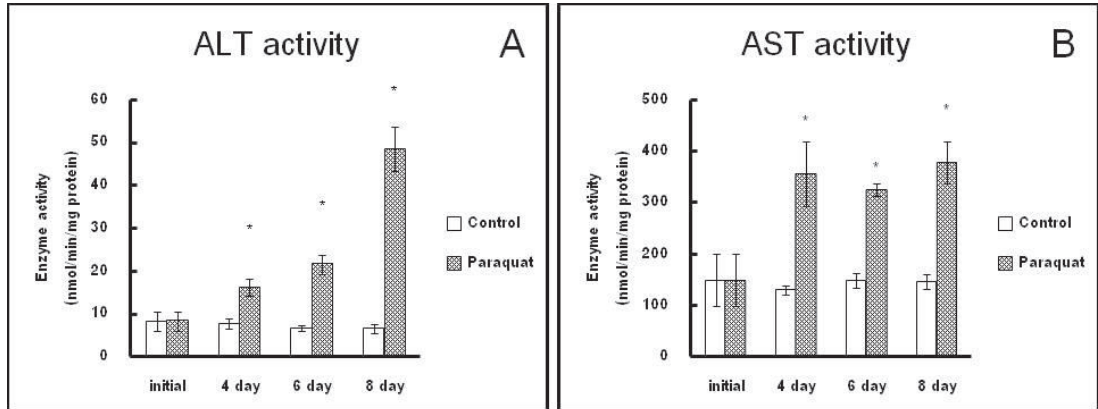


Figure1. Hepatic activity Alanine aminotransferase (ALT) and Aspartate aminotransferase (AST) in *B. gonionotus* exposed to paraquat for initial, 4, 6 and 8 days. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=6). \*Indicates significant difference in relation to control at the same time of exposure ( $P < 0.05$ )

## วิจารณ์

สารกำจัดวัชพืชพาราควอตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระให้เกิดขึ้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมากกว่าในสภาวะปกติ ซึ่งส่งผลต่อระบบกลไกในการป้องกันตัวเองของสิ่งมีชีวิต เช่น การสร้างเอนไซม์และสารที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ (Leadprathom, 2013) จากการทดลองในครั้งนี้ เมื่อปลาสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืชพาราควอต ปลาจะรับสารพิษเข้าสู่ร่างกายทั้ง ทางผิวหนัง การกินผ่านทางระบบทางเดินอาหาร (alimentary cannal) และการหายใจผ่านทางเหงือก (gill) จากนั้นสารพิษจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้อย่างรวดเร็วเข้าสู่เส้นเลือดดำส่งผ่านไปยังตับที่เป็นอวัยวะหลักที่มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษ (biotransformation) เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารกำจัดวัชพืชพาราควอต ให้อยู่ในรูปแบบเอโกลิต

(metabolite) ของสารที่สามารถถูกขับออกจากร่างกายได้ (Figueiredo-Fernandes et al., 2006)

การศึกษานี้พบว่าสารกำจัดวัชพืชพาราควอตที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST ในตับเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ อันเนื่องมาจากการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย หรือเซลล์ตับถูกทำลาย (Chimela et al., 2014) และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของสารกำจัดวัชพืชพาราควอตที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในปลาอีกหลายชนิด (Kori-Siakpere et al., 2007) ทำการศึกษาผลของสารกำจัดวัชพืชพาราควอตในปลาตุกรัสเซียต่อการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST ใน เหงือก ไต เนื้อเยื่อ ตับ ม้าม ลำไส้ และสมอง เพื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในอวัยวะต่าง ๆ หลังจากที่ได้รับสารพิษ พบว่าตับเป็นอวัยวะที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST สูงสุด ( $P < 0.05$ )

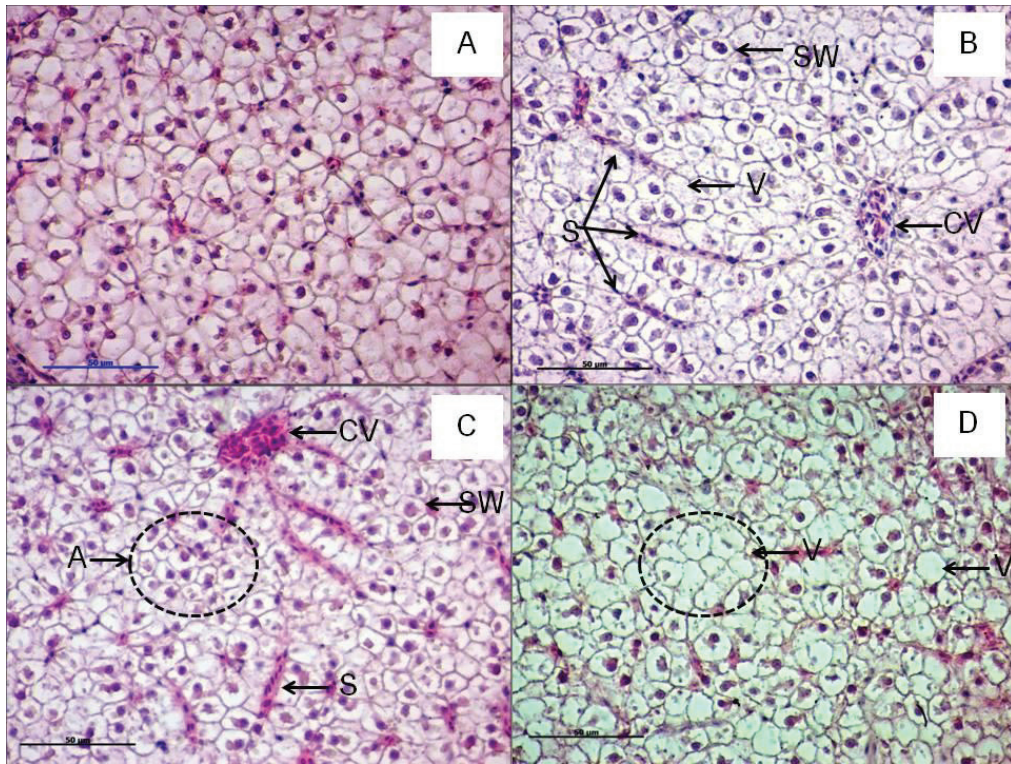


Figure 2 Light micrographs transverse sections of Sliver barb in initial and exposed to the paraquat concentration of 15 mg/L at 4 6 and 8 day, scale bar replacement 50 µm(x40).

- (A) Non-exposed fish showing, normal histological structure of hepatocytes with central spherical nucleus.
- (B) Fish exposed to paraquat for 4 day, where a hydropic swelling (SW), enlargement of the sinusoid (S), congestion of central vein (CV) and vacuole (V).
- (C) Fish exposed to paraquat for 6 day, where atrophy (A), hydropic swelling (SW), enlargement of the sinusoid (S) and congestion of central vein (CV).
- (D) Fish exposed to paraquat for 8 day, where vacuoles degeneration (V).

มีการศึกษาในปลาคาร์ปและปลาดุกกรัสเซียพบว่าสารกำจัดวัชพืชพาราควอตมีผลการทำงานของเอนไซม์ AST, ALT, LDH, CPK และ ALP ในเลือดที่เพิ่มสูงขึ้น ( $P < 0.05$ ) (Banaee et al., 2013; Ayanda et al., 2015)

สำหรับการศึกษาทางการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับเมื่อปลาได้รับสารกำจัดวัชพืชพาราควอตในระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบเซลล์เกิดการฝ่อลีบ การเพิ่มขนาดของเซลล์ และจำนวนของเซลล์ มีเลือดคั่งในเส้นเลือดฝอย (sinusoid)

melanomacrophage สีเหลืองแทรกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อ และพบการเสื่อมของเซลล์แบบมีแวคิวโอลเกิดขึ้นภายในไซโทพลาสซึม การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากสารกำจัดวัชพืชพาราควอตเป็นสารพิษที่มีฤทธิ์กัดกร่อน และสัมผัสทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Pomprom, 2011) จึงมีผลทำให้เซลล์ระคายเคือง และเกิดการบาดเจ็บของเซลล์ นอกจากนั้นสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มออร์แกเนล โดยจับกับไขมันเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด (lipid peroxidation) ทำให้เซลล์



สูญเสียสมมติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน และสามารถจับกับสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีมีผลทำให้เซลล์เกิดอันตรายจนนำไปสู่ภาวะเซลล์ตายได้ในที่สุด (Akcha et al., 2000; Wessel et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับ พบว่าเมื่อปลาสัมผัสสารกำจัดวัชพืชในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์ต่อระดับความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ตับที่รุนแรงขึ้นเช่นกัน และเป็นไปในทิศทางเดียวกัน การศึกษาของ Figueiredo-Fernandes et al., (2007) พบว่าเมื่อแช่ปลานิลในสารพิษ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 45 วัน เซลล์ตับจะเพิ่มระดับความเสียหายมากขึ้นตามระยะเวลาที่แช่สารพิษ ส่วนในปลาตู้ดำ (*Colossoma macropomum*) ที่ได้รับสารกำจัดวัชพืชพาราควอท ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 21 วัน พบว่า โครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์ตับถูกย่อยสลาย (karyolysis) (Salazar-Lugoa et al., 2011)

## สรุป

จากการศึกษาความเป็นพิษสารกำจัดวัชพืชพาราควอทต่อปลาตะเพียนขาว ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 4, 6 และ 8 วัน เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST ในตับ และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ พบการรวมของเซลล์ตับ การเพิ่มจำนวนและขยายขนาดของเซลล์ มีเลือดคั่งอยู่ภายในไซนัสชอยด์ทำให้หลอดเลือดขยายใหญ่ขึ้น และมีจำนวนเพิ่มขึ้นเห็นได้ชัดเจน เซลล์ตับเสื่อมสภาพแบบมีแควิวโอล

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาค้างต่อไป ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการศึกษากการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของอวัยวะที่สำคัญอื่น เช่น เหนือก ไต และ ม้าม เนื่องจากเป็นอวัยวะที่สำคัญ และมีความสัมพันธ์กับพิษวิทยาจุลศาสตร์ในปลา (toxicokinetic in fish)

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา ปีงบประมาณ 2558 (เพิ่มเติม) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2559 รวมถึงภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.F., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo [a] pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 49, 269–287.
- Akinwande, A. A., Abdulkadiri, J.O., Adesina, B.T., 2013. Oxidative Stress and Antioxidant Response in the Giant African Catfish (*Heterobranchus bidorsalis* Geoffroy Saint-Hilaire, 1809) under Chronic Paraquat Exposure. *Nig. J. Fish. Aqua.* 4, 30-37.
- Ayanda, O.I., Oniye, S.J., Auta, J., Ajibola, V.O., 2015. Acute toxicity of glyphosate and paraquat to the African catfish (*Clarias gariepinus*, Teugels 1986) using some biochemical indicators. *Trop. Zool. J.* 28, 152–162.
- Babatunde, M.M., Oladimeji, A.A., Balogun, J.K., 2001. Acute toxicity of gramoxone to *Oreochromis niloticus* (Trewavas) in Nigeria. *Water Air Soil Poll.* 131, 1-10.
- Banaee, M., Davoodi, M.H., Zoheiri, F., 2013. Histopathological changes induced by paraquat on some tissues of gourami fish (*Trichogaster trichopterus*). *Vet. J.* 3, 36–42.
- Chimela, W., Mesua, N., Abdurraheem, B.A., 2014.



- Aspartate transaminase (AST) activity in selected tissues & organs of *Clarias Gariepinus* exposed to different levels of paraquat. *J. Anal. Toxicol.* 4, 3–4.
- Edori, O., Edori, K., Okpara, E., 2013. Chronic toxicity of paraquat on liver and gill electrolyte in the catfish *Clarias Gariepinus*. (IOSR-JESTFT). 7, 1–4.
- Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas- Fernandes, E.R., Reis-Henriques, M. A., 2006. The Effect of paraquat on hepatic EROD activity, liver, and gonadal histology in males and females of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed at different temperatures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 626–632.
- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J. V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S. M., Carrola, J., Matos, P., 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesqui. Vet. Bras.* 27, 103–109.
- Humason, G. L., 1979. *Animal tissue techniques*, 4<sup>th</sup> ed. Freeman. Sanfrancisco.
- Kori-Siakpere, A.K.M., Theresa, M.I., 2007. Acute haematological effects of sublethal levels of paraquat on the african catfish, *Clarias Gariepinus* (Osteichthyes: Clariidae). *J. Environ. Sci.* 1, 331–335.
- Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 147, 222–231.
- Leadprathom, N., 2013. Toxicity of paraquat to aquatic animal. *King Mongkut's Agricultural Journal.* 31, 95-101. (in Thai)
- Nwanil, C.D., Ekwuemel, H.I., Ejere, V.C., Onyeke, C.C., Chukwukal, C.O., Peacel, O.S., Nwadinigwe, A.O., 2014. Physiological effects of paraquat in juvenile african Catfish *Clarias gariepinus* (Burchel 1822). *J. Coast. Life. Med.* 3, 35-43.
- Ogamba, E.N., Inyang, I.R., Azuma, I.K., 2011. Effect of paraquat dichloride on some metabolic and enzyme parameters of *Clarias gariepinus*. *J. Biol. Sci.* 3, 186–190.
- Pimentel, D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *J. Agric. Environ. Ethics.* 8,17–29.
- Pomprom, T., 2011. *Herbicides: principles and mode of action*. Chulalongkorn university press. (in Thai)
- Sinaei, M., Rahmanpour. S., 2013. Evaluation of Glutathione S-Transferase activity as a biomarker of PAH pollution in Mudskipper, *Boleophthalmus Dussumieri*, Persian Gulf. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 369-374.
- Singer, T. D., Mahadevappa, V. G., Ballantyne, J. S., 1990. Aspects of the energy metabolism of lake sturgeon *Acipenser fulvescens* with special emphasis on lipid and ketone body metabolism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 873-881.
- Rezaee, J., Vahid. N., Tukmechi. A., Hasanzadehs. S., 2013. Histopathological effects of experimental paraquat on spleen and pronephros of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Clin Pathol.* 22, 491–495.
- Salazar-Lugoa, R., Estrellaa. A., Oliverosa. A., Rojas-Villarrob. E., Villalobos. L., Lemusd. M., 2009. Paraquat and temperature affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 321-326.
- Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H., Akcha, F., 2010. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Mar. Environ. Res.* 69, 71–73.
- WHO. 2002. *The World Health Organization Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2000-2002* (WHO/IPCS/01.5).
- Yangthong, M., 2015. Oxidative stress in fish. *King Mongkut's Agricultural Journal.* 32, 66-75. (in Thai)





เชียงใหม่สัตวแพทยสาร  
**Chiang Mai Veterinary Journal**

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvej



**บทความต้นฉบับ**

**ความชุกและความหลากหลายพันธุกรรมของเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 จากสุกรในเขตจังหวัดเชียงใหม่**

ประยุทธ แซ่ไคว่\* และ วินา จูเปีย

ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100

**บทคัดย่อ** ungulate tetraparvovirus 3 เป็นเชื้อไวรัสที่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมจากสุกรในหลายภูมิภาคทั่วโลก ถึงแม้ว่าการก่อโรคของเชื้อไวรัสในสุกรยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด แต่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 ได้ในหลายภูมิภาค ในการศึกษาความชุกของการติดเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 จากสุกรในเขตจังหวัดเชียงใหม่ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสพบความชุกร้อยละ 41 (41/100) เมื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 จำนวน 18 ตัวอย่าง ด้วยวิธีทางสายวิวัฒนาการสามารถจัดกลุ่มได้จำนวน 5 กลุ่มโดยมี 2 กลุ่มที่พบความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เคยมีรายงานจากเขตจังหวัดเชียงใหม่ ในขณะที่ 3 กลุ่มไม่พบความสัมพันธ์ แสดงให้เห็นว่ายังคงมีการติดเชื้อนี้ อีกทั้งยังมีการคงอยู่ของสารพันธุกรรมของเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 จากสุกรในเขตจังหวัดเชียงใหม่

**คำสำคัญ** พาร์โวไวรัส พีซีอาร์ สุกร เชียงใหม่

\* ผู้รับผิดชอบบทความ ประยุทธ แซ่ไคว่ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหียะ อ.

เมือง จ.เชียงใหม่ 50100 โทรศัพท์ 053-948-046 โทรสาร 053-948-065 อีเมล: Prayuth.saekhow@cmu.ac.th, Prayuth\_saekhow101@yahoo.co.th

**ข้อมูลบทความ** วันที่ได้รับบทความ 18 สิงหาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 27 กันยายน พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 2 ตุลาคม พ.ศ.2560



Original Article

## Prevalence and genetic diversity of ungulate tetraparvovirus 3 in swine in Chiang Mai province.

Prayuth Saekhow<sup>\*</sup> and Vena Chupia

*Department of Veterinary Bioscience and Veterinary Public Health Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University,  
Mae Hia, Muang, Chiang Mai, 50100*

---

**Abstract** The ungulate tetraparvovirus 3 has been detected in various parts of the world. Although pathogenesis of ungulate tetraparvovirus 3 is still unclear, previous study showed that there was a genetic diversity of ungulate tetraparvovirus3. In this study, the prevalence of ungulate tetraparvovirus 3 in Chiang Mai was 41% (41/100) using polymerase chain reaction. The phylogenetic analysis was used to investigate genetic diversity of ungulate tetraparvovirus3 using 18 nucleotide sequences of VP1 gene which was from Chiang Mai. This found that there were five groups distributed by the phylogenetic analysis. Two of five groups have related with previous report nucleotide sequences and the other three have not related with previous study. The result of this study evoked that ungulate tetraparvovirus 3 in Chiang Mai has still existed.

**Keywords:** parvovirus, PCR, porcine, Chiang Mai

---

**Corresponding author:** Prayute Saekhow Department of Veterinary Bioscience and Veterinary Public Health Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Maehia, Muang, Chiang Mai 50100 Tel: 053-948-046 Fax : 053-948-065 E-mail address: Prayuth.saekhow@cmu.ac.th, Prayuth\_saekhow101@yahoo.co.th

---

**Article history:** received manuscript: 11 August 2017, accepted manuscript: 27 September 2017, published online: 2 October 2017



## บทนำ

Ungulate tetraparvovirus 3 เป็นสมาชิกของวงศ์ *Parvoviridae* คุณสมบัติโดยทั่วไปของสมาชิกในกลุ่ม parvoviruses เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวและมีความยาวของสารพันธุกรรมตั้งแต่ 5 ถึง 6 กิโลเบส ประกอบด้วย open reading frame 1 เป็นบริเวณที่กำหนดการสร้างโปรตีน NS1 และ NS2 ในขณะที่ open reading frame 2 เป็นบริเวณที่กำหนดการสร้างโปรตีน VP1 และ VP2 (Liu et al., 2017) การจัดจำแนกสมาชิกภายในวงศ์ *Parvoviridae* แบ่งเป็น 2 วงศ์ย่อยคือวงศ์ย่อย *Densovirinae* ตรวจพบในแมลง และวงศ์ย่อย *Parvovirinae* ตรวจพบการติดเชื้อในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ภายในวงศ์ย่อย *Parvovirinae* สามารถแบ่งเป็น 8 สกุล ได้แก่ *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Protoparvovirus*, และ *Tetraparvovirus* (Cotmore et al., 2014) สำหรับสมาชิกกลุ่ม parvoviruses ที่มีรายงานการตรวจพบในสุกรชนิดแรกคือ ungulate protoparvovirus 1 หรือ porcine parvovirus 1 ซึ่งอยู่ในสกุล *Protoparvovirus* สำหรับ ungulate tetraparvovirus 3 หรือ porcine parvovirus 2 นั้นเป็นเชื้อไวรัสลำดับที่สองของ parvoviruses ที่ตรวจพบการติดเชื้อในสุกร ซึ่งมีการรายงานการตรวจพบครั้งแรกเป็นการค้นพบสารพันธุกรรมของ ungulate tetraparvovirus 3 จากซีรัมของสุกรจากประเทศเมียนมาโดยที่สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสนั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กำหนดการสร้าง phospholipase A2 อันเป็นคุณลักษณะสำหรับเชื้อในวงศ์ *Parvoviridae* แต่อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาด้วยวิธีสายวิวัฒนาการพบความแตกต่างไปจาก ungulate protoparvovirus 1 ที่มีรายงานมาแต่เดิมจึงได้เรียกชื่อไวรัสชนิดใหม่นี้ว่า porcine parvovirus 2 (Hijikata et al., 2001) หลังจากนั้นต่อมาได้มีการค้นพบเชื้อนี้จากสุกรในหลายประเทศ ดังนั้น International

Committee on Taxonomy of Viruses ได้กำหนดชื่อเชื้อไวรัสคือ ungulate tetraparvovirus 3 (Cotmore et al., 2014)

พยาธิกำเนิดของเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 ยังไม่ทราบแน่ชัดเนื่องจากสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสสามารถตรวจพบได้จากทั้งสุกรที่ไม่แสดงอาการป่วย (Saekhow et al., 2014; Streck et al., 2015) และสุกรที่แสดงอาการป่วยโดยสามารถตรวจพบได้ในสุกรที่อาการไข้สูง (Wang et al., 2010) และสุกรที่ป่วยในกลุ่มอาการ Porcine circovirus associated disease (Xiao et al., 2013) เชื้อ Ungulate tetraparvovirus 3 เป็นเชื้อไวรัสที่มีรายงานการติดเชื้อในสุกรได้จากหลายภูมิภาคทั่วโลก ทวีปเอเชียได้แก่ ประเทศเมียนมา (Hijikata et al., 2001) ประเทศจีน (Wang et al., 2010) ประเทศญี่ปุ่น (Saekhow et al., 2014) ประเทศเกาหลีใต้ (Lee et al., 2017) และประเทศไทย (Saekhow and Ikeda, 2015) ทวีปยุโรปได้แก่ ประเทศอิตาลี (Csagola et al., 2012) ประเทศเยอรมัน (Streck et al., 2013) ประเทศโรมาเนีย ประเทศเซอร์เบีย ประเทศโปแลนด์ และประเทศโครเอเชีย (Cadar et al., 2013) ทวีปอเมริกาได้แก่ ประเทศสหรัฐอเมริกา (Opriessnig et al., 2014; Xiao et al., 2013) และประเทศบราซิล (Campos et al., 2016) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานพบว่าเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 สามารถตรวจพบความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่กำหนดการสร้างโปรตีน VP1 และ VP2 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของสมาชิกในวงศ์ *Parvoviridae* คาดว่าเกิดจากกลไกการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (Lau et al., 2011) และกระบวนการรีคอมบิเนชัน (recombination) สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่มีการติดเชื้อไวรัสสองสายพันธุ์ในหนึ่งเซลล์ (Weigel-Kelley and Srivastava, 2002) ซึ่งการศึกษาลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ทำให้ทราบการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรม



ของเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อในกลุ่ม parvoviruses พบชนิดใหม่ที่มีรายงานในการติดเชื้อในสุกรเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเหล่านี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานด้านระบาดวิทยาเมื่อตรวจพบเชื้อไวรัสที่มีคุณลักษณะใกล้เคียงกัน ungulate tetraparvovirus 3 จากสุกรที่เลี้ยงในเขตจังหวัดเชียงใหม่ในปี พ.ศ.2559 ถึงแม้ว่าเคยมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ungulate tetraparvovirus 3 จากสุกรในเขตจังหวัดเชียงใหม่ที่มีการเก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2554 ซึ่งระยะเวลาแตกต่างกันระหว่างทั้งสองการศึกษาเป็นระยะเวลา 5 ปี การศึกษาอย่างต่อเนื่องทำให้ทราบการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ อย่างละเอียดมากขึ้น

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเก็บตัวอย่างและประชากรในการศึกษา

ตัวอย่างการศึกษาในครั้งนี้ใช้ทอนซิลของสุกรอายุ 6 เดือนจากโรงฆ่าสัตว์ของสหกรณ์ผู้เลี้ยงสุกรจังหวัดเชียงใหม่และลำพูนจำนวน 100 ตัวอย่าง ในช่วงระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ.2559 ตัวอย่างทั้งหมดเก็บลงในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตรภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสตลอดการศึกษา

### การสกัดสารพันธุกรรม และการตรวจหาสารพันธุกรรมของ ungulate tetraparvovirus 3

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ungulate tetraparvovirus 3 ใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เริ่มจากการเตรียมตัวอย่างสำหรับการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากทอนซิลสุกร โดยตัดทอนซิลขนาด 0.1 มิลลิกรัมเติมในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.9 จำนวน 1000 ไมโครลิตรในหลอด

ทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งภายในหลอดทดลองบรรจุเม็ดเซรามิกมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ทำการบดย่อยสารละลายทอนซิลทำด้วยเครื่อง Mini-Beadbeater-1 (Biospec, Bartlesville, OK, USA) จากนั้นปั่นสารละลายทอนซิลที่ 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยการใช้สารละลายใส่ด้านบนโดยใช้ชุดสกัด QIAgen DNA blood minikit (QIAgen, GmbH, Germany) ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมทำตามที่บริษัทแนะนำ

การตรวจสอบความถูกต้องโดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณเอ็น NS1 (Hijikata et al., 2001) เป็นดังนี้

Q1 (5'-GCGCATTGCGCCAACTAGCTC-3') และ

Q2 (5'-GTTTGCCTTAATG CGATCC-3')

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสำหรับ 1 ตัวอย่าง ประกอบด้วย สารละลายสารพันธุกรรมจำนวน 1 ไมโครลิตร สารละลาย Quick Taq HS Dyemix จำนวน 10 ไมโครลิตร (Toyobo, Osaka, Japan) ไพโรเมอร์ 1 คู่จำนวน 1.6 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 8.2 ไมโครลิตร รวมทั้งสิ้น 25 ไมโครลิตร อุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเริ่มต้นด้วยที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่จำนวน 35 รอบโดยใน 1 รอบประกอบด้วย การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกันที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที การเข้าคู่ของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาทีและขั้นตอนสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ผลผลิตพีซีอาร์สำหรับไพรเมอร์คู่นี้คือ 199 คู่เบส



## การตรวจสอบความหลากหลายทาง

### พันธุกรรมของ ungulate tetraparvovirus 3

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 ของเชื้อ Ungulate tetraparvovirus 3 เพื่อใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรมสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Saekhow et al., 2014) เป็นดังนี้

CnvirusF (5'TTACGAGTTTCCCAGTCTCG-3') และ Q17 (5'-CCAGATATCGTCCTCGTA-3')

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ทำโดยบริษัท Marcrogen จำกัด ประเทศเกาหลี การศึกษาสายวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 18 ตัวอย่างด้วยโปรแกรม MEGA7 (Kumar et al., 2016) เทียบเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal W (Kumar et al., 2015) การสร้างสายวิวัฒนาการโดยวิธี Maximum likelihood และวิเคราะห์ค่า Bootstrapping จำนวนทั้งสิ้น 1000 ครั้ง (Zhou et al., 2016)

## ผลการศึกษา

ผลการตรวจความชุกการติดเชื้อ ungulate tetraparvovirus3 ในทอนซิลของสุกรอายุ 6 เดือนจากโรงฆ่าสัตว์ของสหกรณ์ผู้เลี้ยงสุกรจังหวัดเชียงใหม่และลำพูนจำนวนทั้งสิ้น 100 ตัวอย่างโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยโปรแกรมที่จำเพาะบริเวณยีน NS1 นั้นพบความชุกร้อยละ 41 (41/100) ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 เท่ากับ 31.3 ถึง 51.3

การศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 โดยการตรวจหาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 ความยาว 331 คู่เบสเทียบกับเชื้อ Ungulate tetraparvovirus 3 จำนวน 7 ตัวอย่างที่มีการศึกษาจากสุกรในเขตจังหวัดเชียงใหม่ก่อนหน้านี้ และจากภูมิภาคอื่นทั่วโลกที่มีในฐานข้อมูล GenBank แสดงในแผนภาพของสายวิวัฒนาการจำนวน 32

ตัวอย่าง (รูปที่ 1) การจัดกลุ่มตามลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 ตรวจจากกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มาจากปมเดียวกัน (Saekhow et al., 2014) ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 เกล็ด (Clade) โดย 18 ตัวอย่างมีการกระจายสายวิวัฒนาการแบ่งเป็น 5 กลุ่ม (Groups) ด้วยวิธีทางสายวิวัฒนาการ เกล็ดที่ I ประกอบด้วยกลุ่ม I พบจำนวน 2 ตัวอย่าง กลุ่ม II พบจำนวน 6 ตัวอย่าง และกลุ่ม III พบจำนวน 6 ตัวอย่าง ในขณะที่เกล็ดที่ II จัดได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม IV จำนวน 4 ตัวอย่าง และกลุ่ม V จำนวน 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่พบมากที่สุดกลุ่ม II และ III ในขณะที่กลุ่ม V พบเพียง 1 ตัวอย่าง นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างจำนวน 5 กลุ่มที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้ร่วมกับตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาที่มีรายงานมาก่อนและเก็บตัวอย่างในปี ค.ศ. 2011 จากสุกรในเขตจังหวัดเชียงใหม่ (Saekhow and Ikeda, 2015) พบว่ากลุ่ม III และกลุ่ม IV พบความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 บนแผนภาพวิวัฒนาการระหว่างสองการศึกษา

## วิจารณ์ผล

การศึกษาคครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องโดยการตรวจหาความชุกและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 จากสุกรในเขตจังหวัดเชียงใหม่โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ผลการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบความชุกร้อยละ 41 เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในปี ค.ศ. 2015 พบความชุกร้อยละ 85 (Saekhow and Ikeda, 2015) สำหรับความชุกของทั้งสองการศึกษามีความแตกต่างของระยะเวลาและฟาร์มสุกรถึงแม้ว่าจะเป็นสุกรในเขตเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากรายละเอียดของพยาธิกำเนิดของโรคของเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 ยังไม่ได้มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย



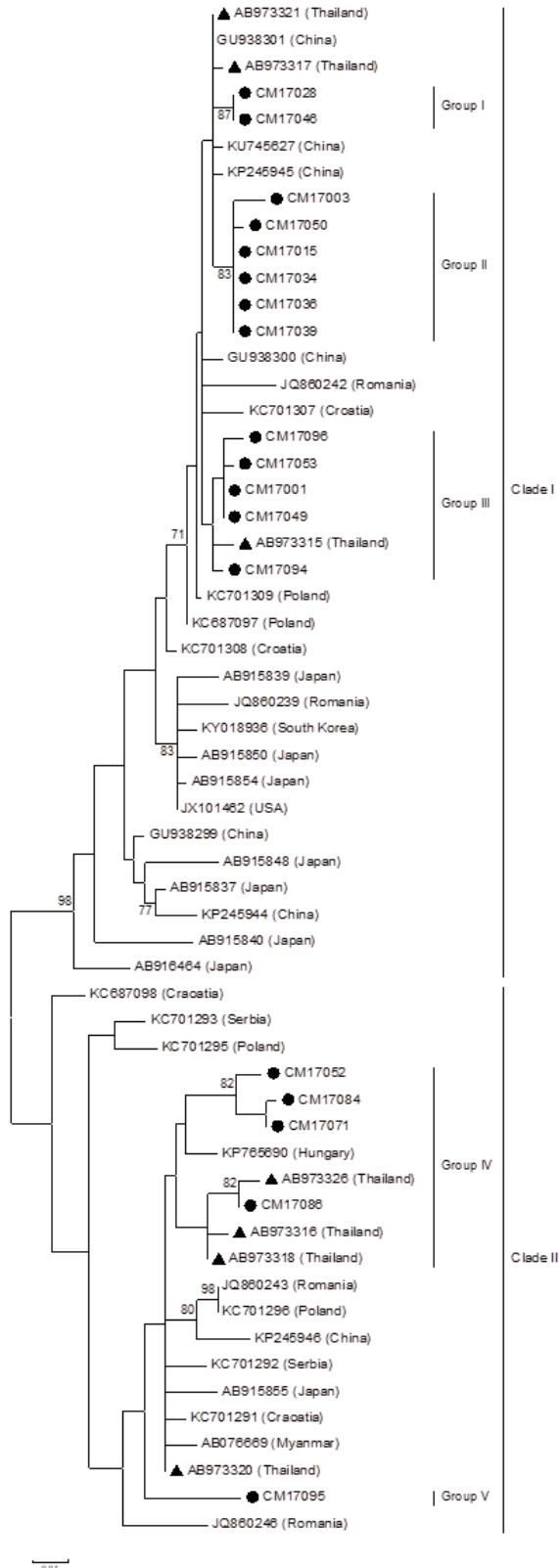


Figure 1. The distribution of 18 nucleotide sequence of ungulate tetraparvovirus 3 examined in this study. The phylogenetic tree was constructed base on 331 base pair. Black circular meant in this study nucleotide sequences and black triangular meant in 2010 nucleotide sequences





ปัจจัยที่อาจมีผลต่อความชุกทั้งสองการศึกษา อาจเกิดจากมาตรการป้องกันการเกิดโรคของฟาร์ม โดยพบว่าเชื้อในวงศ์ *Parvoviridae* ที่มีการติดเชื้อในสุกร ได้แก่ ungulate protoparvovirus 1 porcine parvovirus), ungulate tetraparvovirus 2 (hokovirus), ungulate tetraparvovirus 3, ungulate copiparvovirus 2 (porcine parvovirus4) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ungulate tetraparvovirus 3 สามารถตรวจพบร่วมกับการติดเชื้อ porcine circovirus 2 (Opriessnig et al., 2014; Saekhow et al., 2016; Sun et al., 2015) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ porcine circovirus 2 พบการติดเชื้อจำนวน 68 ตัวอย่างโดยตรวจพบสารพันธุกรรมของทั้งสองเชื้อไวรัส 36 ตัวอย่าง สำหรับกลไกการติดเชื้อ porcine circovirus 2 ร่วมกับ porcine parvovirus พบว่าสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัส porcine circovirus 2 มีการสร้างไซโตไคน์มีความผิดปกติโดยเฉพาะอย่างยิ่ง อินเตอร์เฟอรอนแอลฟาและอินเตอร์เฟอรอนแกมมา ส่งผลให้ภูมิคุ้มกันซึ่งมีผลต่อการกำจัดเชื้อไวรัสลดลงทำให้เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ (Opriessnig et al., 2017) ซึ่งประชากรที่ใช้ศึกษาที่มีความแตกต่างกันอาจมีที่มาที่ต่างกันจึงอาจทำให้สุกรทั้งสองการศึกษาได้รับการปฏิบัติที่ต่างกันส่งผลทำให้ความชุกทั้งสองการศึกษามีความแตกต่างกันได้

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากทอนซิลสุกรจากสุกรอายุ 6 เดือน สำหรับตัวอย่างที่มาจากเนื้อเยื่อน่าจะเป็นตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาเนื่องมาจากการศึกษาจากสุกรในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่าการตรวจตัวอย่างจากปอดพบความชุกร้อยละ 21 และการตรวจจากเลือดพบความชุกร้อยละ 35 นอกจากนี้แล้ว การศึกษาที่ใช้ทอนซิลโดยเป็นการศึกษาจากสุกรประเทศเยอรมันพบความชุกร้อยละ 78 (Streck et al., 2013) ญี่ปุ่นพบความชุกร้อยละ 58 (Saekhow et al., 2014) จีนพบความชุกร้อยละ 39 (Sun et al., 2015)

ไทยพบความชุกร้อยละ 83 (Saekhow and Ikeda, 2015) และ 41 (การศึกษาครั้งนี้) เมื่อเปรียบเทียบกับ การศึกษาจากซีรัมของสุกรประเทศจีนพบความชุกร้อยละ 26 (Wang et al., 2011) ประเทศเมียนมาพบความชุกร้อยละ 25 (Hijikis et al., 2001) ประเทศฮังการีพบความชุกร้อยละ 6 (Csagola et al., 2012) ประเทศโรมาเนียพบความชุกร้อยละ 25 ประเทศเซอร์เบียพบความชุกร้อยละ 26 ประเทศโปรแลนด์พบความชุกร้อยละ 28 ประเทศโครเอเชียพบความชุกร้อยละ 19 (Cadar et al., 2013) ถึงแม้ว่ารายงานความชุกที่พบในแต่ละภูมิภาคมีความแตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบประชากรที่พบความชุกสูงในการศึกษาจากประเทศไทย และเยอรมันซึ่งเก็บตัวอย่างจากทอนซิลของสุกรทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากธรรมชาติของเชื้อในวงศ์ *Parvoviridae* นั้นมีความชอบต่อเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวทำให้สามารถตรวจพบเชื้อได้ในทอนซิลมากกว่าที่จะตรวจพบในเลือด อีกทั้งเป็นไปได้ว่าการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในกระแสเลือดนั้นมียาระยะเวลาสั้นทำให้โอกาสการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากเลือดต่ำกว่า (Csagola et al., 2016) ดังนั้นการใช้ทอนซิลของสุกรอาจมีเป็นอวัยวะที่ความเหมาะสมสำหรับใช้สำหรับการแยกเชื้อไวรัส และหากสามารถเพาะเลี้ยงไวรัสได้ก็ทำให้สามารถทำให้การศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคได้ดียิ่ง

สำหรับอายุของสุกรที่ทำการศึกษานี้เป็นการใช้สุกรอายุ 6 เดือน จากการศึกษาในประเทศฮังการีพบว่าสุกรเริ่มพบการติดเชื้อได้ในช่วงอายุ 2 เดือนและสามารถตรวจพบการติดเชื้อได้ตลอดช่วงการเลี้ยงสุกร (Csagola et al., 2016) ซึ่งสุกรในช่วงอายุ 2 เดือนเป็นช่วงที่ภูมิคุ้มกันจากแม่สุกรลดลงจนกระทั่งไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัส (Dias et al., 2013) อีกทั้งเชื้อในวงศ์ วงศ์ *Parvoviridae* เป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (Fritch Lilla et al., 2015; Karrasch et al., 2017) จึงทำให้สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในทุกช่วงอายุ เนื่องจากการติดเชื้อแบบเรื้อรังของ ungulate tetraparvovirus 3



เป็นผลทำให้เชื้อต้องมีการปรับตัวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง การเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะแคปซิดโปรตีนของเชื้อไวรัส (Streck et al., 2015) โดยพบการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่ open reading frame 2 อันเป็นบริเวณที่กำหนดการ สร้างแคปซิดโปรตีน อีกทั้งพบว่าอัตราทำลายพันธุของ เชื้อ canine parvovirus 2 เป็น  $7.1 \times 10^{-3}$  ต่อตำแหน่ง ของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อปี (Hoelzer et al., 2008) และพบการเกิดรีคอมบินเนชันระหว่างเชื้อไวรัสสองสาย พันธุ์ที่มีการติดเชื้อในเซลล์เดียวกันผลของการเกิดรีคอม บินเนชันนี้สามารถทำให้เกิดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่เช่น ตัวอย่างของเชื้อ human bocavirus 2 ซึ่งเกิดจากการ รีคอมบินเนชันระหว่าง human bocavirus 1 และ human bocavirus 1 (Fu et al., 2011) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ทำ การตรวจสอบหาความหลากหลายพันธุกรรมของเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 จำนวน 18 ตัวอย่างร่วมกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ จาก ลักษณะตำแหน่งของตัวอย่างที่ปรากฏบนแผนภูมิสาย วิวัฒนาการสามารถแบ่งกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ เป็น 2 แคลดซึ่งเป็นไปได้ว่าแหล่งต้นกำเนิดของเชื้อไวรัส ที่พบการติดเชื้อในเขตจังหวัดเชียงใหม่มีที่มาจากต่าง กัน ซึ่งตัวอย่างที่ทำการศึกษานี้ยังสามารถแบ่งได้เป็น จำนวน 5 กลุ่มพบว่าตัวอย่างจำนวน 2 กลุ่มที่พบ ความสัมพันธ์ระหว่างจากที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 ที่ ยังคงพบการติดเชื้อในสุกรนั้นมีแหล่งต้นกำเนิดเดียวกัน สำหรับตัวอย่างอีกจำนวน 3 กลุ่มที่ไม่พบความสัมพันธ์ ระหว่างจากที่เคยมีรายงานไว้สามารถเกิดขึ้นได้ในสอง ลักษณะดังนี้ ลักษณะแรกมีการติดเชื้อในสุกรแต่ไม่ สามารถตรวจพบได้ในการศึกษาในครั้งที่แล้วแต่ สามารถตรวจพบในการศึกษาในครั้งนี้ และลักษณะที่ สองเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมจนกระทั่งเป็น เชื้อไวรัสที่มีลักษณะที่ตรวจพบเฉพาะสุกรในเขตจังหวัด เชียงใหม่ อย่างไรก็ตามเชื้อในกลุ่มที่พบเฉพาะเขต จังหวัดเชียงใหม่พบจำนวนน้อยหากต้องการทราบ รายละเอียดของระบาดวิทยาของเชื้อ ungulate

tetraparvovirus 3 เพิ่มมากขึ้นนั้นควรมีการศึกษาความ หลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อจากประชากรของ สุกรกลุ่มอื่นเช่น สุกรป่า สุกรพื้นเมือง และสุกรที่เลี้ยง หลังบ้าน เพื่อให้ทราบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ ไวรัสได้ละเอียดเพิ่มมากขึ้น

การศึกษานี้มุ่งเน้นไปยังเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 เท่านั้น โดยการก่อโรคของเชื้อไวรัส ยังไม่แน่ชัด และเชื้อในวงศ์ *Parvoviridae* ที่ตรวจพบได้ ในสุกรมีรายงานชนิดใหม่ๆมีเพิ่มมากขึ้นกว่าในอดีตที่ ผ่านมาเนื่องจากการเพิ่มจำนวนของสุกรและวิธีการ ตรวจที่สามารถตรวจได้ละเอียดเพิ่มมากขึ้น การศึกษา ครั้งนี้เป็นประโยชน์ในด้านระบาดวิทยาเพื่อเป็นแนวทาง ในการติดตามและเฝ้าระวังโรคส่งผลทำให้สุกรมีสุขภาพ แข็งแรงปลอดภัยสำหรับการบริโภค

## สรุป

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจหาความชุก ของการติดเชื้อ ungulate tetraparvovirus 3 พบความ ชุกร้อยละ 41 ของสุกรที่เลี้ยงในเขตจังหวัดเชียงใหม่ใน ปี ค.ศ. 2016 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายังคงพบการ แพร่กระจายของเชื้อไวรัสชนิดนี้ในประชากรสุกร อีกทั้ง ยังพบว่ามีเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเชื้อ ทำให้พบความหลากหลายของพันธุกรรม ทำให้ทราบ ข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อไวรัสอันสามารถนำไปใช้ในการ วางแผน ควบคุมและป้องกันโรคต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่มอบทุนวิจัย อ.ดร. วิไลวรรณ เพชรโสภณสกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ อ.ดร. นลินี เปรมประชา ที่ได้ช่วยแนะนำแก้ไขต้นฉบับจนสำเร็จลุล่วง



## เอกสารอ้างอิง

- Cadar, D., Lorincz, M., Kiss, T., Novosel, D., Podgorska, K., Becskei, Z., Tuboly, T., Csagola, A., 2013. Emerging novel porcine parvoviruses in Europe: origin, evolution, phylodynamics and phylogeography. *J Gen Virol.* 94, 2330-2337.
- Campos, F.S., Kluge, M., Franco, A.C., Giongo, A., Valdez, F.P., Saddi, T.M., Brito, W.M.E.D., Roehe, P.M., 2016. Complete Genome Sequence of Porcine Parvovirus 2 Recovered from Swine Sera. *Genome Announcements.* 4.
- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison, A.J., 2014. The family Parvoviridae. *Arch Virol.* 159, 1239-1247.
- Csagola, A., Lorincz, M., Cadar, D., Tombacz, K., Biksi, I., Tuboly, T., 2012. Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Arch Virol.* 157, 1003-1010.
- Csagola, A., Zadori, Z., Meszaros, I., Tuboly, T., 2016. Detection of Porcine Parvovirus 2 (Ungulate Tetraparvovirus 3) Specific Antibodies and Examination of the Serological Profile of an Infected Swine Herd. *PloS one.* 11, e0151036.
- Dias, A.S., Gerber, P.F., Araujo, A.S., Auler, P.A., Gallinari, G.C., Lobato, Z.I., 2013. Lack of antibody protection against Porcine circovirus 2 and Porcine parvovirus in naturally infected dams and their offspring. *Res Vet Sci.* 94, 341-345.
- Fritch Lilla, S.A., Burgett, S.E., McGann, K.A., Wechsler, D.S., 2015. Persistent and Prolonged Parvovirus B19 Viremia in a Pediatric Patient With Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 4, e38-40.
- Fu, X., Wang, X., Ni, B., Shen, H., Wang, H., Zhang, X., Chen, S., Shao, S., Zhang, W., 2011. Recombination analysis based on the complete genome of bocavirus. *Virol J.* 8, 182.
- Hijikata, M., Abe, K., Win, K.M., Shimizu, Y.K., Keicho, N., Yoshikura, H., 2001. Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. *Jpn J Infect Dis.* 54, 244-245.
- Karrasch, M., Schmidt, V., Hammer, A., Hochhaus, A., Rosee, P., Petersen, I., Sauerbrei, A., Baier, M., Sayer, H.G., Hermann, B., 2017. Chronic persistent parvovirus B19 bone marrow infection resulting in transfusion-dependent pure red cell aplasia in multiple myeloma after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and severe graft versus host disease. *Hematology.* 22, 93-98.
- Kumar, R., Rajak, K.K., Chandra, T., Muthuchelvan, D., Saxena, A., Chaudhary, D., Kumar, A., Pandey, A.B., 2015. Sequence-based comparative study of classical swine fever virus genogroup 2.2 isolate with pestivirus reference strains. *Veterinary world.* 8, 1059-1062.
- Lau, S.K., Woo, P.C., Yip, C.C., Li, K.S., Fu, C.T., Huang, Y., Chan, K.H., Yuen, K.Y., 2011. Co-existence of multiple strains of two novel porcine bocaviruses in the same pig, a previously undescribed phenomenon in members of the family Parvoviridae, and evidence for inter- and intra-host genetic diversity and recombination. *J Gen Virol.* 92, 2047-2059.
- Lee, J.Y., Kim, E.J., Cho, I.S., Lee, K.K., Shin, Y.K., 2017. Complete Genome Sequences of Porcine Parvovirus 2 Isolated from Swine in the Republic of Korea. *Genome Announc.* 5.
- Liu, P., Chen, S., Wang, M., Cheng, A., 2017. The role of nuclear localization signal in parvovirus life cycle. *Virol J.* 14, 80.
- Opiessnig, T., Gerber, P.F., Matzinger, S.R., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2017. Markedly different immune responses and virus kinetics in littermates infected with porcine circovirus type 2 or porcine parvovirus type 1. *Vet Immunol Immunopathol.* 191, 51-59.



- Opriessnig, T., Xiao, C.T., Gerber, P.F., Halbur, P.G., 2014. Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North American samples from 1996 and association with porcine circovirus associated disease. *Vet Microbiol.* 173, 9-16.
- Saekhow, P., Ikeda, H., 2015. Prevalence and genomic characterization of porcine parvoviruses detected in Chiangmai area of Thailand in 2011. *Microbiol. Immunol.* 59, 82-88.
- Saekhow, P., Kishizuka, S., Sano, N., Mitsui, H., Akasaki, H., Mawatari, T., Ikeda, H., 2016. Coincidental detection of genomes of porcine parvoviruses and porcine circovirus type 2 infecting pigs in Japan. *J Vet Med Sci* 77. 1581-1586.
- Saekhow, P., Mawatari, T., Ikeda, H., 2014. Coexistence of multiple strains of porcine parvovirus 2 in pig farms. *Microbiol. Immunol.* 58, 382-387.
- Streck, A.F., Canal, C.W., Truyen, U., 2015. Molecular epidemiology and evolution of porcine parvoviruses. *Infect Genet Evol.* 36, 300-306.
- Streck, A.F., Homeier, T., Foerster, T., Fischer, S., Truyen, U., 2013. Analysis of porcine parvoviruses in tonsils and hearts from healthy pigs reveals high prevalence and genetic diversity in Germany. *Arch Virol.* 158, 1173-1180.
- Sun, J., Huang, L., Wei, Y., Wang, Y., Chen, D., Du, W., Wu, H., Liu, C., 2015. Prevalence of emerging porcine parvoviruses and their co-infections with porcine circovirus type 2 in China. *Arch Virol.* 160, 1339-1344.
- Wang, F., Wei, Y., Zhu, C., Huang, X., Xu, Y., Yu, L., Yu, X., 2010. Novel parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae. *Virus Genes.* 41, 305-308.
- Weigel-Kelley, K.A., Srivastava, A., 2002. Recombinant human parvovirus B19 vectors. *Pathol. Biol. (Paris)* 50, 295-306.
- Xiao, C.T., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2013. Molecular evolutionary genetic analysis of emerging parvoviruses identified in pigs. *Infect Genet Evol.* 16,





เชียงใหม่สัตวแพทยสาร  
Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvi



## Original Article

## Microanatomical structure of the dog-faced water snake (*Cerberus rynchops*) from Thailand: A functional unit of the kidney

Lamai Thongboon<sup>1</sup>, Sinlapachai Senarat<sup>2,\*</sup>, Jes Kettratad<sup>2</sup>, Apinya Huskul<sup>2</sup> Wanee Jiraungkoorskul<sup>3</sup>,  
Pisit Poolprasert<sup>4</sup>, Woranop Sukparangsi<sup>5</sup> and Nattarin Wongthamwanich<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110

<sup>2</sup>Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

<sup>3</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400

<sup>4</sup>Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Mueang, Phitsanulok, 65000

<sup>5</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri, 20131

<sup>6</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok, 10110

**Abstract** Dog-faced water snake (*Cerberus rynchops*) is a well-known species inhabiting along coastal area in particular mangrove forests in Thailand. To delineate microstructure of kidney, mammalian species has been mostly used as an animal model, but its structures in snakes are still much less discussed in any literature. For providing evolutionary perspectives on reptilian kidney and comprehensive knowledge of vertebrate kidney, here we aimed to examine microstructure of kidney and uriniferous tubule in the dog-faced water snake using histological and histochemical techniques, which might be able to use as a new animal model for observing anatomy and physiology of squamates. Based on histological sections, several uriniferous tubules in the kidney were observed with differential characterizations. Each uriniferous tubule consists of a urine-forming nephron and a collecting duct. A nephron can be further subdivided into a renal corpuscle (a glomerulus and a Bowman's capsule) and a renal tubule. Three distinguishable parts of convoluted tubule segments under light microscopic level included proximal, intermediate and distal convoluted tubules. All segments of renal tubules were comprised of simple cuboidal epithelium between lumen and basal lamina; however, each tubular segment exhibited some histologically distinct features. The enlarged tubular size (approximately 50  $\mu\text{m}$  in diameter) and the presence of apical brush border with clear PAS staining were detected in proximal convoluted tubule; whereas, the apical brush border could not be found in the intermediate tubule. In addition, collecting duct and metanephric duct (ureter) exhibited the clear distinct epithelium structure, compared to other renal tubular segments. Taken together, the histological study of kidney in dog-faced water snakes not only provides an insight into snakes/reptilian metanephros-derived urinary system but also will potentially lead to more understanding of ultrastructure and physiology of snakes in estuaries of Thailand.

**Keywords:** estuarine snake, histology, renal structure, Thailand

\*Corresponding author: Sinlapachai Senarat Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand  
E-mail address: Senarat.S@hotmail.com



บทความต้นฉบับ

# จุลกายวิภาคของท่อยูรินีเฟอร์รัสในงูปากกว้างน้ำเค็ม (*Cerberus rynchops*) จากประเทศไทย: หน่วยพื้นฐานของไต

ละม้าย ทองบุญ<sup>1</sup> ศิลปชัย เสนารัตน์<sup>2\*</sup> เจษฎ์ เกษตระทัต<sup>2</sup> อภิญญา หัสกุล<sup>2</sup>  
วรณีย์ จิรวงศ์สกุล<sup>3</sup> พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ<sup>4</sup> วรณพ สุขภารังษี<sup>5</sup> และ ณัฐรินทร์ วงศ์ธรรมวานิช<sup>6</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

<sup>2</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

<sup>3</sup>ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400

<sup>4</sup>โปรแกรมชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

<sup>5</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>6</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร 10110

**บทคัดย่อ** งูปากกว้างน้ำเค็ม (*Cerberus rynchops*) จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่รู้จักกันดีในบริเวณชายฝั่ง โดยเฉพาะป่าชายเลนของประเทศไทย การอธิบายถึงจุลกายวิภาคของไตนิยมใช้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นสัตว์ทดลอง แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาโครงสร้างดังกล่าวในงูมีน้อยมากจากการทบทวนเอกสารอ้างอิง ดังนั้นในการศึกษานี้เพื่อให้ได้ความรู้ทางด้านวิวัฒนาการของไตของสัตว์เลื้อยคลานและองค์ความรู้โดยรวมของไตในสัตว์มีกระดูกสันหลัง การศึกษานี้ได้ศึกษาอธิบายถึงจุลกายวิภาคไตและท่อยูรินีเฟอร์รัสของงูปากกว้างน้ำเค็ม ด้วยเทคนิคทางด้านมิกซ์วิทยาและมิถุนเคมี ที่ต่อไปอาจใช้ชนิดนี้เป็นสัตว์ทดลองชนิดใหม่เพื่อศึกษากายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์เลื้อยคลานกลุ่ม squamates จากการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางมิถุนวิทยา พบท่อยูรินีเฟอร์รัสหลายท่อในเนื้อเยื่อไตที่มีความแตกต่างกันทางด้านจุลกายวิภาค ท่อยูรินีเฟอร์รัสแต่ละท่อประกอบด้วยเนฟรอนและท่อไตรวม ส่วนเนฟรอนประกอบด้วยรีนัลคอร์พัสเคิล (โกลเมอรูลัสและโบว์แมนส์แคปซูล) และท่อไตที่แบ่งเป็นท่อไตส่วนต้น ท่อไตส่วนกลาง และท่อไตส่วนท้าย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ทุกท่อไตมีเยื่อบุผิวแบบลูกบาศก์ชั้นเดียว แต่มีโครงสร้างทางจุลกายวิภาคบางอย่างแตกต่างกัน ท่อไตส่วนต้นมีขนาดใหญ่ประมาณ 50 ไมโครเมตรและมีบริบอร์เตอร์ ทำปฏิกิริยากับพีเอเอช ท่อไตส่วนกลางไม่พบบริบอร์เตอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าท่อไตรวมและท่อเมโซเมฟริกมีโครงสร้างเยื่อบุผิวที่แตกต่างชัดเจนจากท่อไตส่วนอื่น เมื่อเทียบกับท่อไต ดังนั้น ในงานวิจัยทางมิถุนวิทยานี้ได้ทำให้ได้รับองค์ความรู้เกี่ยวกับจุลกายวิภาคของระบบขับถ่ายของงูและสัตว์เลื้อยคลานที่พัฒนามาจากเมตาเนฟรอสซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญ สำหรับการการศึกษาโครงสร้างละเอียด และสรีรวิทยาของงูบริเวณชายฝั่งทะเลในประเทศไทย

**คำสำคัญ** งูปากแม่น้ำ, มิถุนวิทยา, โครงสร้างไต, ประเทศไทย

\* ผู้รับผิดชอบบทความ ศิลปชัย เสนารัตน์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330  
อีเมล: Senarat.S@hotmail.com

**ข้อมูลบทความ** วันที่ได้รับบทความ 2 สิงหาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 9 ตุลาคม พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 16 ตุลาคม พ.ศ.2560



## Introduction

The reptile kidney is intriguing and worth studying because it could be applied in several types of research relating to physiology and histopathology as well as evolutionary origin. As well, anatomical and histological evidences of the kidney in the reptile are paired and closely located to the gonadal structure in the abdominal cavity (Zuasti et al., 1987; Kent and Carr, 2001), in which the ontogenic kidney during the reptile embryonic development was described as the mesonephros of the larval stage. Then, it transformed into the metanephros of the adult stage (Edward, 1998). Although the complexity during differentiation of the kidney has widely been reported, it is generally composed of several uriniferous tubules, as a functional unit of the kidney. Each tubule contained the nephron and collecting duct. Typically, the nephron also known as nephric tubule is comprised of the renal (Bowman's) capsule, long and ciliated proximal convoluted tubule, a ciliated intermediated segment, and a short distal convoluted tubule. In reptiles, segment of intermediate tubule is relatively short and lacks of loop of Henle (reptilian-type nephron). In contrast, the elongated intermediate segment with loop of Henle is present in mammals (mammalian-type nephron). Additionally, change in glomerular filtration rate (GFR) may involve adjustments in a relative proportion of reptilian- and mammalian-type nephrons (Bishop, 1959; Dantzler and Bradshaw, 2009; Bradshaw and Bradshaw, 2013; Wyneken, 2013). Unlike the mammalian and amphibian, various reptile-specific components in

the renal corpuscle including a majority of the glomeruli and Bowman's capsule are detected. as shown in some reptile kidney system such as *Testudoaracea* (Zuasti et al., 1987) and *Acanthodactylus boskianus* (Yari and Gharzi, 2013).

The dog-faced water snake (*Cerberus rynchops*) is a well-known estuarine snake and commonly found in coastal areas of Southeast Asia such as Myanmar, Malaysian Peninsulas and Thailand. In recent years, this snake has been attractively examined in several disciplines including ecology, population structure and genetic diversity (Lv et al., 2015). Because of its high abundance in nature and sufficient preliminary data on its biology, this species of snake might probably be a great model to resolve some evolutionary mystery, comparing to other available data of reptilians and vertebrates. In particular, knowledge regarding renal anatomy and physiology of estuarine snakes is still missing. At this point, one query is how this special kind of snakes can inhabit a harsh environment of mangrove environment with the punctuality of water/osmolarity and salinity. To better understand the uniqueness and common features to other vertebrate kidneys, insightful information on the structure of the snake's kidney becomes essential. We hereby described the micro-anatomical structure of the uriniferous tubule of *C. rynchops*, obtained from Estuary Paknam Pranburi, Thailand using the histological and histochemical techniques, which conceivably provide more understanding on how the snakes can cope with estuarine environment.



## Materials and methods

Carcasses of dead female, *Cerberus rynchops* during adult stage (n = 5, the snout-vent length  $74 \pm 4.06$  cm) were donated from fishmongers at two stations (N  $12^{\circ}24'15.8''$  / E  $099^{\circ}58'25.6''$  2 and N  $12^{\circ}24'21.6''$  / E  $099^{\circ}58'37.1''$ ). The kidney tissues were detached from middle line of the abdominal region. Each tissue was collected from two areas (anterior and posterior kidneys) and then was fixed in 4% paraformaldehyde at 4 °C (about 24 hours) under the histological techniques.

Following Presnell and Schreiberman (2013) and Suvarna et al. (2013), fixed kidneys were processed via standard histological techniques, and then paraffin blocks were cut at 4  $\mu$ m thick. All sections were stained with Harris's hematoxylin and eosin (H&E) as well as histochemically stained with Periodic Acid Schiff (PAS) to detect the glycoprotein and Masson's trichrome (MT) to identify the connective tissue and fibers. Evidence of the histological structures of the kidney tissues was finally observed and photomicrographed under a light microscope equipped with a camera for photography (TE2000-Ua).

## Results and discussion

We clearly demonstrated the kidney microanatomy of the *C. rynchops* based on the histological and histochemical techniques (as in Figures 1A-1B). Regarding the metanephric kidney, it was paired and slender organs which

were retroperitoneal and located closely in the reproductive system (Data not shown), as likely reported in *Sceloporus cyanogenys* (Davis et al., 2005). It was also crossly covered by a thin capsule with inserting smooth muscle as greenish color (Figure 1C; MT method). Although the cross section from two regions (anterior and posterior regions) could not be clearly identified into cortex and medulla, it was similarly composed of several uriniferous tubules (Figures 1A-1B). Each uriniferous tubule was composed of nephron and collecting duct (Figures 1A-1B). This similarly described other studied reptiles (Edward, 1998), for example, *Crocodylus acutus* kidneys (Davis and Schmidt-Nielsen, 1976) and *Caiman crocodylus* (Jin et al., 1993).

Our examination revealed that the renal corpuscle of *C. rynchops* was small in size (about 70-80  $\mu$ m in diameter) and formed by a simpler system of a filtration unit (capillary loop), as also called a glomerulus; however, the structure of the renal corpuscle and glomerulus was rarely found in the kidney tissue. This was similarly reported in some reptiles (Davis et al., 2005; Zamik, 1910). A possible reason for the structural modification and the presence of a small and few renal corpuscles might relate to the adaptation to prevent water loss and to control the excretion of nitrogenous compounds with low glomerular infiltration under extreme environment such as estuarine condition, as suggested by several investigators (Pequeux et al., 1983; Dantzler, 2005; Allam and EA Eleneen, 2013).

As a result, the glomerulus was approximately 50  $\mu$ m in diameter and clearly





defined by PAS and MT staining into two features, which were urinary and vascular poles (Figures 1D-1E). The glomerular filtration membrane was sharp and composed of various cell compositions such as the podocyte and red blood cell (Figures 1D-1E), similar to those arrangement in *Alligator mississippiensis* (Moore et al., 2009).

In terms of podocyte, it was an elongated cell with an oval nucleus and basophilic cytoplasm, whereas the oval shape of the red blood cell in the glomerular capillaries was seen. This was also observed in some studied snakes (such as *Eryxjaculus*, *Psammophissibilans* and *Echispyramidium*) from Egyptian area (Moore et al., 2009). The important role of the podocyte of the snake is still unclear (Allam and Eleneen, 2013). It was suggested that podocytes in snake bore several microvilli and large bundle of microfilaments (Peek and McMillan, 1979), and this might probably indicate the function of podocyte in the regulation of glomerular filtration rate. The glomerulus was also surrounded by double layers of Bowman's capsule including parietal and visceral layers (or glomerular epithelium) (Figures 1D-1E).

Microscopically, the histological structure of the renal tubule connected to the renal corpuscles at the urinary pole. This tubule was classified into three convoluted tubule segments (Figures 1F-1G). The first segment of proximal convoluted tubules has the greater diameter, approximately 50  $\mu\text{m}$  in diameter and a small cavity (about 5  $\mu\text{m}$ ) (Figure 1G). It was lined by a simple cuboidal epithelium. In the same way, a good development of the apical structure in both brush border and

cytoplasm in the luminal epithelium was positively reacted in PAS as pinkness (Figures 1F-1G), similar to previous observations in some reptiles (Ventura et al., 1989; Jin et al., 1993).

In transverse sections of *C. rynchops* proximal convoluted tubule, the cuboidal epithelial cell containing spherical nucleus was also seen, similar to those observed in *Crocodylus acutus* (Davis and Schmidt-Nielsen, 1867) and some terrestrial lizards (Roberts and Schmidt-Nielsen, 1966). The proximal convoluted tubule was basally located with strong reddish cytoplasm (PAS staining method), indicating the presence of glycoprotein (Figure 1F). In previous studies, it was suggested that this glycoprotein may indicate the abundance of the mitochondria in the cytoplasm (Soares and Fava-De Moraes, 1984; Roberts and Schmidt-Nielsen, 1966). This implication plays role in the ion-transporting cell throughout the uptake of an isotonic absorbate and the importance of the exchange of fluids (Farias et al., 1998).

Sections of the intermediate convoluted tubule was lined in similarly to the first segment of proximal convoluted tubule, but the size of this tubule was decreased about 20  $\mu\text{m}$  diameter (Figure 1F). Also, the apical brush border was absent (Figure 1F). The second distal convoluted tubule was as similarly lined with the intermediate convoluted tubule, but the size of this segment was increased about 30  $\mu\text{m}$  in diameter (Figure 1F). The brush border was detected and the apical cytoplasm of the cuboidal cell exhibit a faint pinkness staining (PAS staining), compared to the proximal convoluted tubule (Figures 1F-1G).



An explanation of this unique feature is still unknown, and it is possible that brush border in this distal segment might involve in the re-

absorption processes (Danzler and Holmes, 1974).

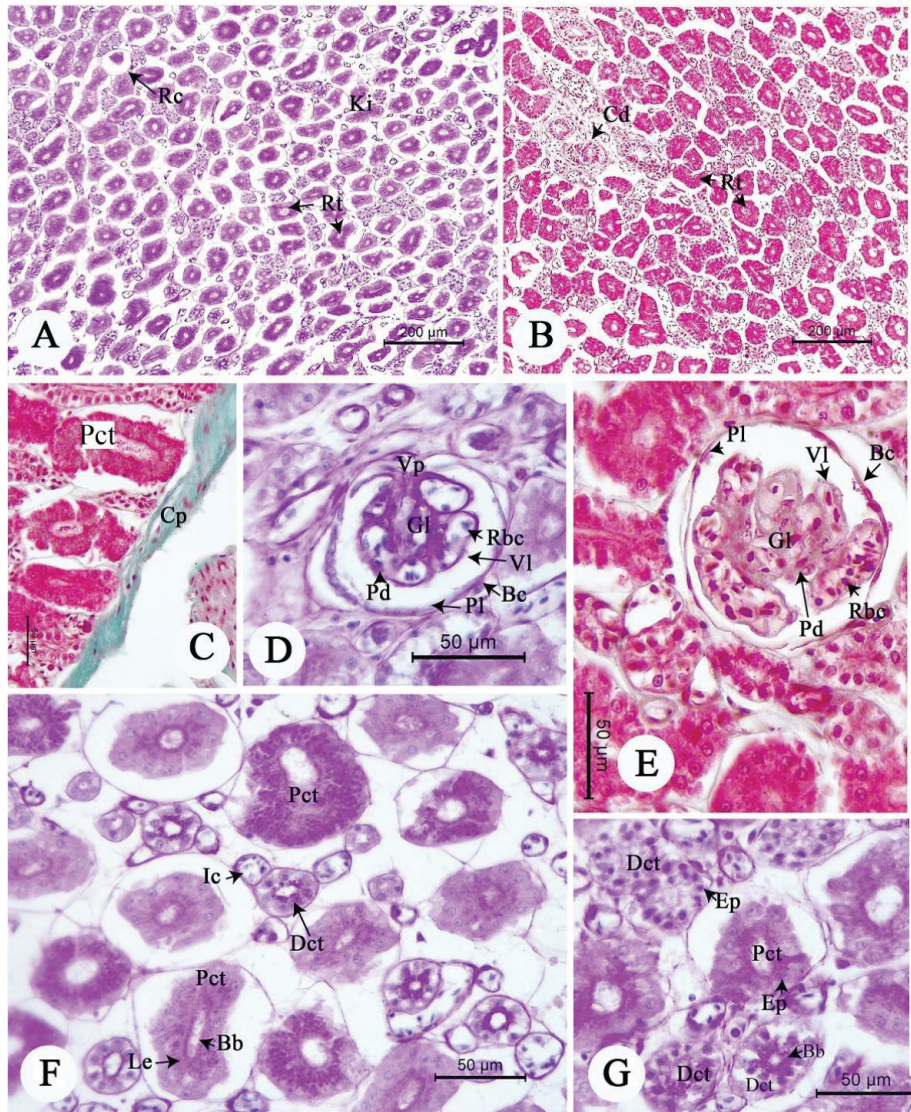
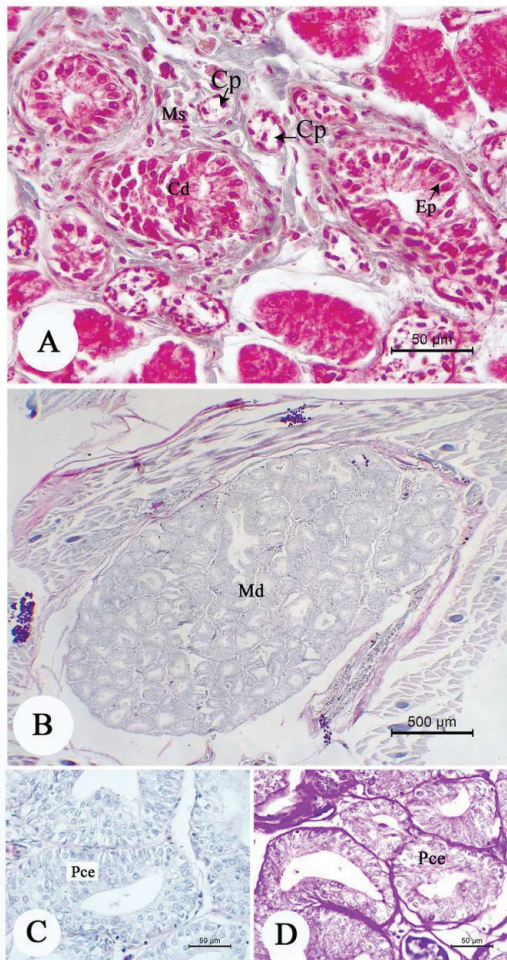


Figure 1. Microanatomy of the uriniferous tubules in *Cerberus rynchops* kidney (Ki) sections (A-H). Labels: Bb = brush border, Bc = Bowman's capsule, Cd = collecting duct, Cp = capsule, Dct = distal convoluted tubule, Ep = epithelium, Gl = glomerulus, Ic = Intermediate convoluted tubule, Le = luminal epithelium of the cytoplasm, Pct = proximal convoluted tubules, Pd = podocyte, Pl = parietal layer, Rbc = red blood cell, Rc = renal corpuscle, Rt = renal tubules, Vl = visceral layer, Vp = vascular pole.

The histological structure of the collecting duct system was continuously connected to the second distal convoluted tubule. It is composed of collecting tubules and collecting ducts. Cell of the collecting duct had a tall columnar epithelium with central to basal nuclei (Figure 2A) and was similar to *Cyrtopodionscabrum* (Al-Shuwaili, 2015). Guzsál (1970) suggested that the role of epithelial cells in the collecting duct is the production of mucin to support the kidney functions. This role is also recorded in other vertebrates such as fishes, reptiles, and birds (Al-Shuwaili, 2015; Guzsál 1970). The collecting duct was surrounded by the

layer of muscularis (as greenish with MT reaction) with inserting to several capillaries (Figure 2A). We proposed that the role of the muscularis layer could possibly be related to the movement of the collecting duct, which needs to be further studied. After this duct transformed into a larger duct before entering the metanephric duct (Figures 2B-2D), the metanephric duct of the snake was well developed as the enlarged efferent duct. The epithelial layer was covered with pseudostratified columnar epithelium (Figures 2C-2D), as likely seen in some vertebrates (Rosenfeld et al., 2000).



**Figure 2.** Microanatomy of the collecting duct (Cd) and metanephric duct (Md) in *Cerberus rynchops* kidney sections (A-D) Labels: Cp = capillaries, Ep = epithelium, Ms = muscularis layer, Pce = pseudostratified columnar epithelium

## Conclusions

The histological structure regarding the kidney together with uriniferous unit (the nephron and collecting duct) of *C. rynchopsare* here is considered as the first descriptions of microscopic examination in estuarine snake. We suggested that the presence of a few renal corpuscles in the kidney of *C. rynchopsare* is a unique feature and probably relates to its adaptation to estuarine condition. The findings and knowledge from this our study would be beneficial for further studies such as in physiology and histopathology as well as evolutionary trends of squamates.

## Acknowledgements

We are thankful to the Microtechnique laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkhla University, and the members of the Fish Research Unit, Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, for their technical supports in the laboratories. We are also grateful to Dr. Chamnan Para and Mr. Simon Watts, Faculty of Humanities and Social Sciences, Pibulsongkram Rajabhat University who helped in the creation of this paper

## References

Al-Shuwaili, E.H. 2015. Morphological and Histological Study of the Kidney in *Cyrtopodion scaberum*. J. Kerbala Univ. 14, 89 –96.

- Allam, A.A., Eleneen, E.A. 2013. Comparative histological, histochemical and ultrastructural studies of the nephron of selected snakes from the Egyptian area. *Biologia*. 68, 546–558.
- Bradshaw, D., Bradshaw, F.J. 2002. Arginine vasotocin: Site and mode of action in the reptilian kidney. 126, 7–13.
- Bishof, K.E. 1959. A histological and histochemical study of the kidney of the common garter snake *Thamnophis sirtalis* with special reference to the renal segment in the male. *J. Morph.* 104, 307–358.
- Dantzler, W.H. 2005. Challenges and intriguing problem in comparative renal physiology. *J. Exp. Biol.* 208, 587–594.
- Davis, L.E., Schmidt-Nielsen, B. 1967. Ultrastructure of crocodile kidney (*Crocodylus acutus*) with special reference to electrolyte and fluid transport. *J. Morphol.* 121, 255–276.
- Davis, L.E., Schmidt-Noelsen, B., Stolte, H. 2005. Anatomy and ultrastructure of the excretory system of the Lizard, *Sceloporus cyanogenys*. *J. Morph.* 149: 279-326.
- Davis, L.E., Schmidt-Nielsen, B. 1967. Ultrastructure of the crocodile kidney (*Crocodylus acutus*) with special reference to electrolyte and fluid transport. *J. Morph.*, 121: 255-276.
- Danzler, W.H., Holmes, W.N. 1974. Water and mineral metabolism in reptilian. In: Floekin, M., Scheer, B.T. (Eds.), *Chemical Zoology Vol IX, Amphibia and Reproduction*, Academic Press, New Yoek London, pp. 277–377.
- Dantzler, W.H, Bradshaw, S.D. 2009. Osmotic and ionic regulation in reptiles. In Evans, DE (ed): *Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals*. CRC Press, Taylor and Frances Group, Boca Raton, FL:443-504.
- Edward, M.C. 1998. Evaluation kidney function in reptiles. The United State of America. Original edition.
- Farias, A., Fiorito, L.E., Hermida, G.N. 1998. Structure of the *Bufo arenarum* kidney: renal corpuscle, neck segment and proximal tubule. *Biocell*. 22, 187–196.



- Guzsal, E. 1970. Histochemical study of kidneys of domestic fowls. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 20, 295–299.
- Jin, S.M., Rodrigues, M.A.M., Souza, A.C. 1993. Histologia e histoquímica dos rins e ureteres do *Caiman crocodylusycare* (Daudin, 1802) Crocodilia-Reptilia. 55.
- Kent, C.C., Carr, R.K. 2001. Comparative anatomy of the vertebrates, 9th ed., McGraw-Hill. Book Co. Inc., New York, pp. 824.
- Longley, J.B., Burtner, H.J. 1963. Mucous substances of excretory organs - a comparative study. *Ann. NY Acad. Sci.* 106, 493–501.
- Lv, X.H., Zhao, S.Z., Zheng, X.X. 2015. Isolation and characterization of microsatellite loci in the dog-faced water snake *Cerberus rynchops* (Colubridae). *Conservation Genet. Resour.* 7, 233–234.
- Moore, B.C., Hyndman, K., Cox, A., Lawler, A., Mathavan, K. 2009. Morphology and Histochemistry of Juvenile American Alligator (*Alligator mississippiensis*) Nephrons. *Anato. Rec.* 292, 1670–1676.
- Pequeux, A., Gilles, R. and Bolis, L. 1983. Proceedings of the Invited Lectures to a Symposium Organized within the 5th Conference of the European Society for Comparative Physiology and Biochemistry - Taormina, Sicily, Italy, pp. 5–8.
- Presnell, J.K., Schreiber, M.P. 2013. Humason's Animal Tissue Techniques. 5th ed. US, Johns Hopkins University Press, pp. 600.
- Rosenfeld, C.S., Cooke, P.S., Welsh, T.H.Jr., Simmer, G., Hufford, M.G., Gustafsson, J.A., Hess, R.A., Lubahn, D.B. The differential fate of mesonephric tubular-derived efferent ductules in estrogen receptor-alpha knockout *Versus* wild-type female mice. *Biol. Reprod.* 141, 3792–3798.
- Roberts, J.S., Schmidt-Nielsen, B. 1966. Renal ultrastructure and excretion of salt and water by three terrestrial lizards. *Am. J. Physiol.* 211, 123–132.
- Soares, A.V., Fava-De, F., Moraes, F. 1984. Morphological and morphometrical studies of the kidney of the green turtle (*Cheloniemydas*). *J. Anat.* 140, 355–369.
- Suvarna, K.S., Layton, J.D. 2013. Bancroft Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th ed. Canada, Elsevier, pp. 654.
- Wyneke, J. 2013. Reptilian renal structure and function. In: Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinaria. 72-78.
- Zuasti, A., Ferrev, C., Ballesta, J., Pastor, L.M. 1987. Ultrastructure of the tubules nephron of *Testudoaracea* (Chelonia). A comparison between hibernation and non hibernation animals. *Histol. Histopath.* 2, 391–400.
- Yari, A., Gharzi, A. 2013. Anatomical and histological study of the excretory system in the Bosc's fringe toes lizard *Acanthodactylus boskianus*. *Asian J. Anim. Sci.* 7, 30–35.
- Ventura, S.C., Northrup, T.E., Schneider, G., Cohen, J.J., Garella, S. 1989. Transport an histochemical-studies of bicarbonate handling by the alligator kidney. *Am. J. Physio.* 256, 239–245.
- Peek, W.D., McMillan, D.B. 1979. Ultrastructure of the renal corpuscle of the garter snake *Thamnophis sirtalis*. *Am. J. Anat.* 155, 83–102.







เชียงใหม่สัตวแพทยสาร  
**Chiang Mai Veterinary Journal**

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; [www.vet.cmu.ac.th/cmjv](http://www.vet.cmu.ac.th/cmjv)**Original Article**

***In vitro* cytotoxicity test and antiviral activity of curcuminoids  
from turmeric extract against PRRS virus**

Pemika Anantikulchai<sup>1</sup>, Pandhira Emprom<sup>1</sup>, Kidsadagon Pringproa<sup>2</sup> and Panuwat Yamsakul<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chonrapatarn road, Maeheha sub-district, Meaung district, Chiang Mai province 50100

<sup>2</sup> Department of Veterinary Bioscience and Veterinary Public health, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chonrapatarn road, Maeheha sub-district, Meaung district, Chiang Mai province 50100

<sup>3</sup> Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chonrapatarn road, Maeheha sub-district, Meaung district, Chiang Mai province 50100

**Abstract** Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) caused by PRRS virus is an important viral infectious disease of swine that causes immense economic loss in swine industries worldwide. Presently, the defensive and controls of PRRS outbreak are mostly depend on the farm biosecurity, gilt management and successive vaccination program. However, the disease control by those strategies remained uncertain and unpredictable. Therefore, seeking an alternative antiviral compound for preventing and controlling PRRS is of great interest. In the present study, we aim to investigate the anti-PRRSv property of the curcuma, compound derived from medicinal plant in *Zingiberaceae* family. Turmeric extraction (curcuminoids) was obtained and was increase dissolved by the solid dispersion technique and found that at the concentration of 0.00005 – 1.56 µg/mL showed no cytotoxicity effect on the MARC-145 cells. Interestingly, at the concentration of 1.56 µg/mL, curcuminoids showed significantly inhibit PRRS virus replication. This result is interesting in use herb extraction against PRRS infection and should be study, in *vivo*.

**Keywords:** PRRSv, turmeric extract, cytotoxic effect, antiviral effect

\*Corresponding author: Panuwat Yamsakul Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chonrapatarn road, Maeheha sub-district, Meaung district, Chiang Mai province 50100 E-mail address: [panuwat.y@cmu.ac.th](mailto:panuwat.y@cmu.ac.th), [ninunu@gmail.com](mailto:ninunu@gmail.com)

**Article history;** received manuscript: 25 October 2017, accepted manuscript: 30 November 2017, published online: 7 December 2017



## บทความต้นฉบับ

# การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และผลการต้านไวรัสของสารเคอร์คูมินอยด์จากการสกัดจากขมิ้นชันต่อเชื้อพรีอาร์อาร์เอสไวรัส

เปมิกา อนันธิกุลชัย<sup>1</sup>, ภัณฑิรา เอมพรหม<sup>1</sup>, กฤษฎาภรณ์ พริงเพราะ<sup>2</sup>, ภานุวัฒน์ แยมสกุล<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ถ.เลียบคลองชลประทาน ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100

<sup>2</sup>ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ถ.เลียบคลองชลประทาน ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100

<sup>3</sup>ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ถ.เลียบคลองชลประทาน ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100

**บทคัดย่อ** โรคกลุ่มอาการระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจ (Porcine reproductive and respiratory syndrome: PRRS) เกิดจากเชื้อไวรัสพรีอาร์อาร์เอส โดยเป็นโรคติดต่อที่สำคัญในสุกร เป็นสาเหตุความสูญเสียทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรทั่วโลก ปัจจุบันการป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคพรีอาร์อาร์เอสขึ้นกับระบบความปลอดภัยทางชีวภาพของฟาร์ม การจัดการสุกรสาวทดแทน และโปรแกรมวัคซีนที่ดี แต่การควบคุมโรคด้วยแผนการเหล่านี้ยังไม่แน่นอนและไม่สามารถคาดการณ์ได้ ดังนั้นการหาทางเลือกอื่นในการควบคุมป้องกันจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้จึงศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดของขมิ้นชัน (curcuminoids) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในตระกูล *Zingiberaceae* ในการต้านไวรัสพรีอาร์อาร์เอส พบว่าการสกัดขมิ้นชันและเพิ่มการละลายด้วยวิธีการเพิ่มการละลายโดยสารเพิ่มการละลาย (solid dispersion) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ที่ความเข้มข้น 0.00005 – 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่ความเข้มข้น 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสพรีอาร์อาร์เอสได้ ผลดังกล่าวจึงเป็นที่สนใจในการใช้สารสกัดสมุนไพรในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสพรีอาร์อาร์เอสและควรมีการศึกษาในสัตว์ต่อไป

**คำสำคัญ** เชื้อไวรัสพรีอาร์อาร์เอส สารสกัดขมิ้นชัน การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการต้านไวรัส

\* ผู้รับผิดชอบบทความ ภานุวัฒน์ แยมสกุล ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ถ.เลียบคลองชลประทาน ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100 อีเมล: panuwat.y@cmu.ac.th, ninunu@gmail.com

ข้อมูลบทความ วันที่ได้รับบทความ 25 ตุลาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 30 พฤศจิกายน พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ XX ธันวาคม พ.ศ.2560





## Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), which is caused by the PRRS virus (PRRSv), is a serious pandemic disease worldwide which appears to have the potential to seriously disrupt the swine industry. For example, there was a lot of pig loss from the outbreak of a new strain of PRRSv known as HP-PRRS in China (Tian *et al.*, 2006). PRRSv can infect pigs of all ages, including boars, sows, weaning pigs, and finishing pigs. In its most serious forms, PRRSv can cause late-term abortion, high rates of stillbirth, increased post-weaning mortality and respiratory problems from porcine respiratory disease complex (PRDC) (Chae, 2016). At present, there is no specific treatment for PRRSv, only supportive treatment to alleviate its severity, although preventative measures, including acclimatization of gilts, vigilant biosecurity and vaccination, have been shown to help but not to provide complete protection (Labarque *et al.*, 2003).

Herbs, with their many antimicrobial, antioxidant, immune stimulant, and antiviral effects, may offer promise in the fight against PRRSv. Pringproa *et al.* (2014) has shown that the crude extract of *Cynodon dactylon* can have an antiviral effect against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Many studies have shown that plants in the *Zingiberaceae* family, which includes Thai ginger, have antiviral properties (Oyuntsetseg *et al.*, 2014; Sornpet *et al.*, 2017). These include *Curcuma longa* Linn, commonly known as turmeric. Its composition are

volatile oils (cineole, linalool, Alpha-terpinene, caryophyllene and germacrone) (Ingkaninan *et al.*, 2000) and curcuminoids (curcumin, demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin) (Ingkaninan *et al.*, 2000) especially curcumin, which is a polyphenolic compound, has been reported to have antiviral and antioxidant activities among other properties (Zorofchian *et al.*, 2014). However, Turmeric extract has the disadvantage of having low solubility in water as well as a low stability which results in low absorption and low bioavailability when administrated orally (Wang *et al.*, 1997). Solid dispersion is a method which may help to circumvent that disadvantage.

The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity and antiviral activity of turmeric extract against PRRS virus *in vitro*.

## Materials and methods

### Preparation of turmeric extract

This study attempted to increase the solubility in water of curcuminoids in turmeric extract which had been obtained by solid dispersion from crude turmeric extract. Turmeric extract was extracted with 95% ethanol, then the extract was evaporated to a high viscosity. The turmeric extract was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and was compared with curcuminoids standard group. Then a crude turmeric extract of the solid dispersion was created using the solvent method as well as the solvent and melt method in which sodium lauryl sulfate (SLS) and polyvinyl



pyrrolidone K30 (PVP-K30) were used to increase solubility in water and the stability of the active ingredient.

### Preparation of PRRSv

This study used PRRSv (VR2332 North American strain) as the agent and MARC-145 cells from the Microbiology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University. The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 5% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin.

### Cytotoxic test

For the cytotoxic test, the MARC-145 cells were cultured in two 96-well plates with 5,000 cells per well and incubated in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 C° for 24 hours. Then the turmeric extract was added and diluted with media in two-fold serial dilutions starting at 100 µg/ml. (The positive control used only the media without the turmeric extract.) Incubation continued in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 C° for an additional 72 hours. The first plate was tested using the MTT assay and the second plate was stained with crystal violet. The highest concentrations of the extract which did not have an observable cytopathic effect were used in the study.

### Antiviral activity test

For the antiviral activity test, the MARC-145 cells were cultured in 96-well plates with 5000 cells per well. Then they were incubated in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 C° for 24 hours after

which they were infected with PRRSv at a multiplicity of infection (MOI) of one, for 1 hour at 37 C°. After that, the virus was removed from the wells and replaced with the diluted turmeric extract at the concentration determined in the cytotoxicity test and additionally at two lower dilutions. 1% DMSO was used as the negative control. After that, the wells were incubated in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 C° and the supernatant was collected at 24, 48 and 72 hours post inoculation (hpi) followed by immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) to determine the viral titer.

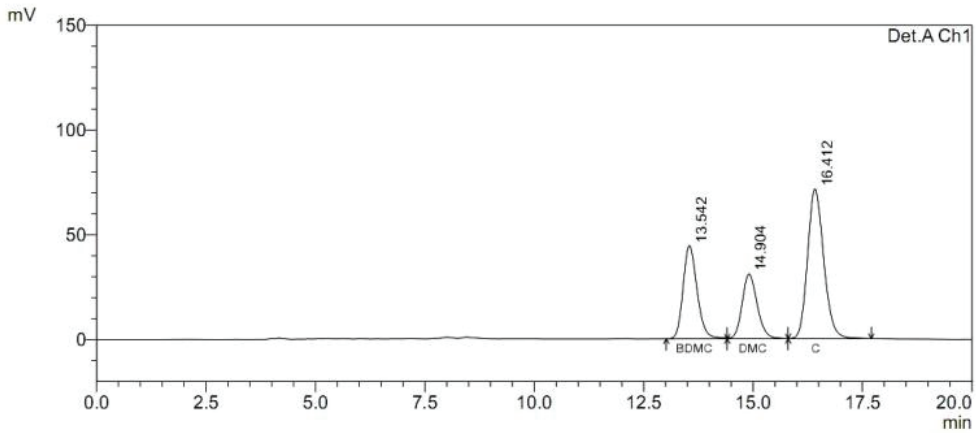
### Statistical analysis

The cytotoxicity and antiviral activity tests were analyzed by two-way ANOVA with Tukey-Kramer HSD to compare the differences of the means.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results and discussion

The percentage yield of turmeric extract was 23.43%. The HPLC profile of turmeric extract compose of curcumin, demethoxycurcumin, and bis-demethoxycurcumin which the drug content was  $10.48 \pm 0.55$ ,  $4.35 \pm 0.20$  and  $4.50 \pm 0.18\%$ , respectively. Those chemicals were done with the standard curve in MeOH and were analyzed by high-performance liquid chromatography (Figure 1).





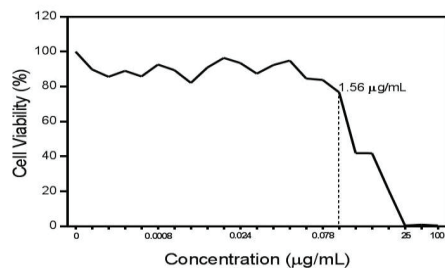
**Figure 1.** HPLC profile of turmeric extract was (C) curcumin, (DMC) demethoxycurcumin, and (BDMC) bis-demethoxycurcumin.

Results of the cytotoxicity test (Figure 2) showed that concentrations of turmeric extract between 0.00005-1.56 µg/mL had more than an 80% cell viability, indicating that these concentrations had no significant cytotoxic effect on MARC-145 cells. That finding was confirmed by IPMA.

Results of the crystal violet stain test compared with experimental cells with the negative control in the lower right of the figure 2. The concentrations of turmeric extract between 0.097-1.56 µg/mL had no cytotoxic effect on MARC-145 cells.

The antiviral ability test used the immunoperoxidase monolayer assay. The MARC-145 cells used in this study had been infected with the virus in each concentration. The virus titer at 24 hpi and at concentrations of 1.56 µg/mL and 0.39 µg/mL had significantly lower mean virus titers than the positive control, indicating that

these concentrations of turmeric extract inhibited PRRSv replication. Comparing the virus titer at different concentrations and after different time periods showed that an extract concentration of 1.56 µg/mL had a significantly lower virus titer concentration than the others ( $P < 0.05$ ) (Figure 3; A,B).



**Figure 2.** Cytotoxicity test results showing cell viability of MARC-145 cells at each concentration of turmeric extract



## Conclusions

This study demonstrated that turmeric extract, which is composed of curcuminoids, inhibited PRRSV replication. The mechanism may be the same as that reported by Chen *et al.*

(2010), i.e., interrupting virus-cell attachment and thereby inhibiting PRRSV propagation (Chae, 2016). This is the interesting report of using turmeric extract against PRRSV *in vitro*. Further study of its effect *in vivo* and its mechanism are needed.

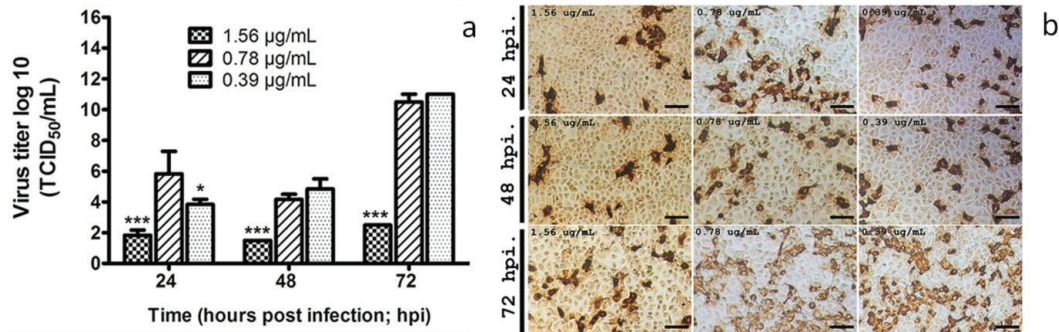


Figure 3. Comparison of virus titer of turmeric extract concentrations of 1.56 µg/mL, 0.78 µg/mL and 0.39 µg/mL at 24, 48, and 72 hpi (a). The cytopathic effect on MARC-145 cells of turmeric extract concentrations of 1.56 µg/mL, 0.78 µg/mL and 0.39 µg/mL at 24, 48, and 72 hpi (b). Symbol “\*” Significantly different from control group (P < 0.05) \*\* Significantly different from control group (P < 0.01) \*\*\* Significantly different from control group (P < 0.001).

## Acknowledgements

We would like to thank the Agricultural Research Development Agency (Public Organization) for financial support and the Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, for use of its laboratory.

## References

Chae, C. 2016. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory

syndrome virus, and Mycoplasma hyopneumoniae. *Vet. J.* 212: 1-6.

Chen, D.Y., Shien, J.H., Tiley, L., Chiou, S.S., Wang, S.Y., Chang, T.J. 2010. Curcumin inhibits influenza virus infection and haemagglutination activity. *Food. Chem.* 119: 1346-1351.

Du, Y., Yoo, D., Paradis, M.A., Scherba, G. 2011. Antiviral Activity of Tilmicosin for Type 1 and Type 2 Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus In Cultured Porcine Alveolar Macrophages. *J. Antivir. Antiretrovir.* 3: 28-33.

Erik, D.C. 2004. Antiviral drug in current clinical use. *J. Clin. Vir.* 30: 115-133.

Ho, J.Y., Chang, H.W., Lin, C.F., Liu, C.J., Hsieh, C.F., Horng, J.T. 2014. Characterization of the Anti-Influenza Activity of the Chinese Herbal Plant *Paeonia lactiflora*. *Viruses.* 6: 1861-1875.



- Ingkaninan, K., de Best, C.M., Irth, H., van der Heijden, R., Hofte, A.J.P., Karabatak, B. 2000. High performance liquid chromatography with on-line coupled UV-mass spectrophotometric-biochemical detection for identification of acetyl cholinesterase inhibitors from natural products. *J. Chromatogr. A.* 872: 61-73.
- Ingkaninan, K., Hazekamp, A., Hoek, A.C., Balconi, S., Verpoorte, R. 2000. Application of a centrifugal partition chromatography in a general separation and dereplication procedure for plant extracts. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 23: 2195-2208.
- Labarque, G., Van Gucht, S., Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M. 2003. Respiratory tract protection upon challenge of pigs vaccinated with attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *Vet. Microbiol.* 95: 187-197.
- Lambert, M.È., Poljak, Z., Arsenaault, J., D'Allaire, S. 2012. Epidemiological investigations in regard to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Quebec, Canada. Part 1: Biosecurity practices and their geographical distribution in two areas of different swine density. *Prev. Vet. Med.* 104: 74-83.
- Pringproa, K., Khonghiran, O., Kunanoppadol, S., Potha, T., Chuammitri, P. 2014. *In vitro* Virucidal and Virustatic Properties of the Crude Extract of *Cynodon dactylon* Against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet. Med. Inter. ID.* 947589.
- Olanratmanee, E.O., Wongyanin, P., Thanawongnuwech, R., Tummaruk, P. 2015. Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus detection in aborted fetuses, mummified fetuses and stillborn piglets using quantitative polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 77: 1071-1077.
- Ouyang, K., Hiremath, J., Binjawadagi, B., Shyu, D.L., Dhakal, S., Arcos, J. 2016. Comparative analysis of routes of immunization of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) vaccine in a heterologous virus challenge study. *Vet. Res.* 47: 1-11.
- Oyuntsetseg, N., Khasnatinov, M.A., Molor-Erdene, P., Oyunbileg, J., Liapunov, A.V., Danchinova, G.A. 2014. Evaluation of direct antiviral activity of the Deva-5 herb formulation and extracts of five Asian plants against influenza A virus H3N8. *BMC. Complement. Altern. Med.* 14: 1-9.
- Sornpet, B., Potha, T., Tragoolpua, Y., Pringproa K. 2017. Antiviral activity of five Asian medicinal plant crude extracts against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus. *Asian Pac J Trop Med.* 10: 871-876.
- Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C. 2007. Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark. *PLoS. ONE.* 2: e526.
- Wang, Y., Pan, M., Cheng, A., Lin, L., Ho, Y., Hsieh, C. 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12: 1867-76.
- Zandi, K., Ramedani, E., Mohammadi, K., Tajbakhsh, S., Deilami, I., Rastian, Z. 2010. Evaluation of antiviral activities of curcumin derivatives against HSV-1 in Vero cell line. *Nat. Prod. Commun.* 5: 1935-1938.
- Zhang, Y.J., Stein, D.A., Fan, S.M., Wang, K.Y., Kroeker, A.D., Meng, X.J., Iversen, P.L., Matson, D.O. 2006. Suppression of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by morpholino antisense oligomers. *Vet. Micro.* 117: 117-129.
- Zorofchian, M.S., Abdul, K.H., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., Zandi, K. 2014. A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *BioMed. Res. Inter. ID.* 186864.







# เชียงใหม่สัตวแพทยสาร Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvi



## บทความปริทัศน์

### ข้อมูลทันสมัยของตัวชี้วัดทางชีวภาพของโรคไตเรื้อรังในแมว

คณางค์ ปิยะรังษี

ภาควิชาคลินิกสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมืองเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50100

**บทคัดย่อ** โรคไตเรื้อรัง เป็นโรคหนึ่งที่ได้พบได้บ่อยในแมวอายุมาก การตรวจการทำงานของไตที่เป็นมาตรฐานคือ การวัดค่าอัตรากรองของไต แต่วิธีการนี้มีความซับซ้อนและไม่นิยมปฏิบัติในทางสัตวแพทย์ ค่าครีเอตินิน และค่ายูเรียในเลือดที่สูงขึ้น หรือค่าความถ่วงจำเพาะของปัสสาวะที่ลดลง จึงถูกใช้ในการวินิจฉัยโรคไตในแมว แต่การตรวจได้จากวิธีนี้เมื่อไตมีการทำงานที่ลดลงมากกว่าร้อยละ 75 ดังนั้นการประเมินการทำงานของไตจึงจำเป็นต้องมีเครื่องมือวินิจฉัยที่บอกการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพการทำงานของไตได้รวดเร็วกว่านี้ บทความนี้ได้ทบทวนการรายงานสารบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคไตเรื้อรังในแมว และอภิปรายการใช้ สารบ่งชี้ทางชีวภาพ ในการตรวจหาโรคไตเรื้อรัง ในแมวได้ตั้งแต่แรกเริ่ม สารบ่งชี้ทางชีวภาพของไตอาจทดแทนกระบวนการที่ยุ่งยากสำหรับประเมินการดำเนินไปของโรคไต สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ไตเริ่มเกิดความเสียหาย

**คำสำคัญ** สารบ่งชี้ทางชีวภาพของไต, โรคไตเรื้อรัง, แมว

\* ผู้รับผิดชอบบทความ คณางค์ ปิยะรังษี ภาควิชาคลินิกสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหียะ อ.เมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100 โทรศัพท์ 053-948015 อีเมล kakanangjp@gmail.com

ข้อมูลบทความ วันที่ได้รับบทความ 9 ตุลาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 6 ธันวาคม พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 19 ธันวาคม พ.ศ.2560



Review Article

## Update on biomarkers in feline chronic kidney disease

Kakanang Piyarungsri

*Department of Companion Animal & Wildlife Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University,  
Chiang Mai 50100*

**Abstract** Chronic kidney disease (CKD) is one of the most commonly found in geriatric cats. The gold standard for identifying renal function is measurement of glomerular filtration rate (GFR), but it is difficult to perform and rarely done in veterinary practice. To assess the renal function, increased serum creatinine and blood urea nitrogen (BUN) or decreased urine specific gravity (USG) are routinely diagnosed kidney disease in cats. However, the kidney disease was detected from these diagnoses when kidney function had decreased more than 75%. Therefore, the assessment of renal function need for the diagnostic tools which early identify performance charge of kidney function. This article reviews the reports of feline CKD biomarkers and discusses their use in early detecting feline CKD. The renal biomarkers may replace the difficult procedure for the assessment of progressive kidney disease and early identify kidney damage.

**Keywords:** renal biomarkers, chronic kidney disease, feline.

---

Corresponding author: Kakanang Piyarungsri Department of Companion Animal & Wildlife Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, 155, Maehia sub-district, Meuang district, Chiang Mai, 50100. Tel: 053-948015; email: kakanangjp@gmail.com

---

*Article history; received manuscript: 9 October 2017, accepted manuscript: 6 December 2017, published online: 19 December 2017*





## บทนำ

โรคไตเรื้อรัง (chronic kidney disease; CKD) คือภาวะที่ไตข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างสูญเสียหน้าที่และโครงสร้างไป ทำให้อัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate; GFR) ลดลงมากกว่าร้อยละ 75 เป็นระยะเวลาานานกว่า 3 เดือน (Polzin, 2011) โดยสมาคมนานาชาติเกี่ยวกับโรคไต (International Renal Interest Society; IRIS) ได้แบ่งโรคไตเรื้อรังในแมวเป็น 4 ระยะ ตามค่าครีเอตินีน (creatinine) ประกอบด้วยระยะที่หนึ่ง (non-azotemic) พบค่าครีเอตินีนในเลือดน้อยกว่า 1.6 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ระยะที่สอง (mild renal azotemia) พบค่าครีเอตินีนในเลือด 1.6 – 2.8 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ระยะที่สาม (moderate renal azotemia) พบค่าครีเอตินีนในเลือด 2.8 – 5.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และระยะที่สี่ (severe renal azotemia) พบค่าครีเอตินีนในเลือดสูงกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (Brown, 2004) สำหรับภาวะโปรตีนในปัสสาวะ (proteinuria) และความดันโลหิตสูง (hypertension) ก็ใช้ร่วมในการแบ่งระยะโรคไตเรื้อรังด้วย ความชุกของประชากรแมวที่เป็นโรคไตเรื้อรัง ในประเทศสหรัฐอเมริกาเท่ากับร้อยละ 1.9 ของประชากรแมวทั้งหมดของประเทศ (Lund et al., 1999) ในประเทศออสเตรเลียพบความชุกแมวเป็นโรคไตเรื้อรังที่รักษาในโรงพยาบาลสัตว์มากกว่าร้อยละ 20 (Watson, 2001) สำหรับประเทศไทยมีรายงานอัตราการป่วยของแมวที่เป็นไตวายเรื้อรังที่เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 6 ตัวต่อแมว 1,000 ตัว (Pusoonthornthum et al., 2010) แมวป่วยส่วนใหญ่มีลักษณะการดำเนินของโรคที่มีความรุนแรงมากขึ้น อาการทางคลินิกจะแสดงมากขึ้นตามการสะสมของของเสียและสารพิษในเลือด หรือเพิ่มขึ้นจากการตอบสนองของร่างกายต่อโรค อาการที่พบบ่อยคือ ปัสสาวะมาก (polyuria) กินน้ำมาก (polydipsia) ภาวะ

ขาดน้ำ (dehydration) น้ำหนักลด (weight loss) และเยื่อเมือกซีด (pale mucous membrane) อาการอื่นที่พบได้บ้าง เช่น ขนมีคุณภาพต่ำ (poor coat) ความดันเลือดสูง (hypertension) อาเจียน (vomiting) มีกลิ่นปาก (halitosis) และอ่อนแรง (weakness)

ปัจจัยเสี่ยงของโรคไตเรื้อรัง ในแมว ได้แก่ อายุที่มากขึ้น (Elliot and Barber, 1998; Lawler et al., 2006) เพศผู้มากกว่าเพศเมีย (White et al., 2006; Piyarungsri and Pusoonthornthum, 2017) ปริมาณโปรตีนและฟอสฟอรัสในอาหารที่สูง (Harte et al., 1994; Elliott et al., 2000) และการเลี้ยงแบบปล่อยนอกบ้าน (Piyarungsri and Pusoonthornthum, 2017) ในส่วนของโรคติดเชื้อที่มีความสัมพันธ์กับโรคไตเรื้อรังในแมว เช่น โรคมะเร็งเม็ดโลหิตขาวในแมว (feline leukemia virus; FeLV) (Hofmann-Lehmann et al., 1997) โรคภูมิคุ้มกันบกพร่องในแมว (feline immunodeficiency virus infection; FIV) (White et al., 2010; Poli et al., 2012), โรคเยื่อช่องท้องอักเสบในแมว (feline infectious peritonitis; FIP) และโรคฉี่หนู (Leptospirosis) (Rodriguez et al., 2014) นอกจากนี้ผลการศึกษาในประเทศไทยพบว่า แมวที่กินอาหารสำเร็จรูปชนิดแห้ง (commercial dry food) มีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคไตเรื้อรังได้น้อยกว่าแมวที่กินอาหารชนิดอื่น (Piyarungsri and Pusoonthornthum, 2017) พบการสร้างสารอนุมูลอิสระในแมวโรคไตเรื้อรังมากกว่าแมวสุขภาพดีที่มีอายุใกล้เคียงกัน (Webb and Falkowski, 2009; Krofic Zel et al., 2014; Piyarungsri and Pusoonthornthum, 2016) อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบถึงสาเหตุหลักที่แน่ชัดของการเกิดโรค พบเพียงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ที่คือไตอักเสบบริเวณอินเตอร์สติเชียลของท่อไต (tubulointerstitial nephritis) (Minkus et al., 1994; Lawler et al., 2006; Polzin, 2011)

วิธีการตรวจการทำงานของไตที่เป็นมาตรฐานนั้นคือ การวัดค่าอัตราการกรองของไต แต่วิธีการนี้



ค่อนข้างยุ่งยากและไม่นิยมปฏิบัติในทางสัตวแพทย์ ปัจจุบันจะประเมินการทำงานของไตในแมวจากการพิจารณาค่าครีเอตินีน (สูงกว่า 1.6 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) และค่ายูเรียในเลือด (blood urea nitrogen; BUN) (สูงกว่า 35 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) ที่เพิ่มสูงขึ้น หรือเรียกว่าภาวะอะซีทีเมีย (azotemia) และค่าความถ่วงจำเพาะของปัสสาวะ (urine specific gravity; USG) ที่ลดลงต่ำกว่า 1.030 (Mayer-Roenne et al., 2007) อย่างไรก็ตามการติดตามการทำงานของไตต้องลดลงมากกว่าร้อยละ 75 จึงจะสามารถวินิจฉัยได้ว่าเป็นโรคไตจากค่าเหล่านี้ได้ (Polzin, 2011) แต่พบว่าค่าครีเอตินีนสามารถเพิ่มสูงขึ้นได้จากสิ่งรบกวน เช่น การมีมวลของกล้ามเนื้อมาก ภาวะอะซีทีเมียก่อนไต (pre-renal azotemia) เช่น ภาวะขาดน้ำ (dehydration) และภาวะอะซีทีเมียหลังไต (post-renal azotemia) เช่น นิ่วในกระเพาะปัสสาวะ นอกจากนี้ค่าครีเอตินีน ยังมีความสัมพันธ์แบบไม่เป็นเส้นตรงกับค่าอัตราการกรองของไต อีกด้วย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการค้นหาการวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการประเมินการทำงานของไต ซึ่งสารบ่งชี้ทางชีวภาพของไต (renal biomarker) จะสามารถใช้วินิจฉัยเพื่อทราบการเกิดโรคไตได้ตั้งแรกและเร็วกว่าค่าครีเอตินีน มีความจำเพาะต่อการทำงานของไต บทความนี้มีวัตถุประสงค์นำเสนอความรู้เกี่ยวกับสารบ่งชี้ทางชีวภาพของไต ที่มีศักยภาพต่อการวินิจฉัยการเกิดโรคไตเรื้อรังในแมว อภิปรายข้อดีหรือข้อจำกัดของสารบ่งชี้แต่ละชนิด และชี้ให้เห็นสารที่มีแนวโน้มจะนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิกในแมวได้ในอนาคตอันใกล้ โดยแบ่งสารบ่งชี้ทางชีวภาพออกตามการใช้ประโยชน์ คือ สำหรับการตรวจพบในระยะแรก (early detection) และสำหรับประเมินการดำเนินไปของโรคไต (the assessment of progressive kidney disease)

## การตรวจพบในระยะแรก

### ซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีน

#### (Symmetric dimethylarginine; SDMA)

ซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีนเป็นผลผลิตพลอยได้ (byproduct) ที่เกิดจากเติมหมู่เมทิลของกรดอะมิโนชนิดอาร์จินีนและโปรตีนภายในเซลล์ในกระบวนการสลายโปรตีน โดยจะถูกปล่อยในกระแสเลือดเมื่อมีการสลายของโปรตีน และถูกขับออกที่หน่วยกรองของไต สำหรับค่าความเข้มข้นของซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีนในเลือดจะใช้เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพ เพื่อประเมินค่าอัตราการกรองของไต ในมนุษย์มีการศึกษาสารบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับโรคไต ที่มีส่วนประกอบใกล้เคียงกับซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีนคือ เอซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีน (asymmetric dimethylarginine; ADMA) ซึ่งทั้ง ซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีนและเอซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีนจะพบได้ในปริมาณมากขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับการฟอกไต เอซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีนถูกเมตาบอลิซึมก่อนผ่านไต แต่ซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีนนั้นจะถูกกำจัดออกที่ไต (Vallance et al., 1992) การศึกษาต่อมาเกี่ยวกับค่าซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีนในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังจำนวน 135 ราย พบว่าสารชนิดนี้เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสำหรับโรคไตเรื้อรังเนื่องจากปริมาณที่พบทั้งในซีรัมและปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับการทำงานของไตโดยประเมินจากค่าอัตราการกรองของไต ( $R = 0.916$ ;  $P < 0.0001$ ) (Marescau et al., 1997) การศึกษาค่าซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีนและโรคไตเรื้อรังทางด้านสัตวแพทย์นั้นมีรายงานครั้งแรกในแมวที่ป่วยเป็นโรคไตเรื้อรัง พบว่าค่าซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีนในพลาสมาจะเพิ่มสูงขึ้นในแมวที่ป่วยเป็นโรคไตเรื้อรังและสัมพันธ์กับระดับของครีเอตินีนในเลือด ( $R = 0.741$ ;  $P < 0.001$ ) (Jepson et al., 2008) ค่าซิมเมตริกไดเมทิลอาร์จินีนมีความสัมพันธ์กับค่าอัตราการกรองของไตมากกว่าค่าครีเอตินีน และมีคุณสมบัติที่ดีกว่าค่าครีเอตินีน คือไม่



ถูกรบกวนจากการมีมวลของกล้ามเนื้ออีกด้วย (Hall et al., 2015) ระดับซิมเมตริกไคเมทิลอาร์จินีนในเลือดสามารถระบุภาวะโรคไตเรื้อรังในแมวได้รวดเร็วกว่าการพิจารณาจากค่าครีเอตินีน (Hall et al., 2014) ในแมวที่มีการทำงานของไตลดลงจะมีค่าความเข้มข้นของซิมเมตริกไคเมทิลอาร์จินีนในเลือดที่เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราการกรองของไต และ ซิมเมตริกไคเมทิลอาร์จินีน ( $R^2 = 0.82, P < 0.001$ ) ใกล้เคียงกับความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราการกรองของไตและค่าครีเอตินีน ( $R^2 = 0.81, P < 0.001$ ) (Braff et al., 2014) ในปี พ.ศ. 2560 ได้มีการศึกษาค่าซิมเมตริกไคเมทิลอาร์จินีนในแมวที่มีนิ่วในไตซึ่งอาจพัฒนาให้เกิดโรคไตเรื้อรังในอนาคต พบว่าแมวที่มีนิ่วในไตจะมีค่าซิมเมตริกไคเมทิลอาร์จินีนที่เพิ่มสูงขึ้นก่อนจะพบค่าครีเอตินีนเพิ่มสูงขึ้น และแมวที่มีนิ่วในไตยังมีค่าซิมเมตริกไคเมทิลอาร์จินีนมากกว่ากลุ่มแมวสุขภาพที่ดีที่มีอายุใกล้เคียงกันอย่างมีนัยสำคัญ (Hall et al., 2017) ปัจจุบันในบางประเทศจึงได้มีการนำเอาซิมเมตริกไคเมทิลอาร์จินีนมาใช้เป็น สารบ่งชี้ทางชีวภาพของไตในแมว โดยสามารถตรวจจากตัวอย่างซีรัมของแมว เพราะซิมเมตริกไคเมทิลอาร์จินีนมีความจำเพาะต่อการทำงานของไตและสามารถระบุความเสียหายของไตได้รวดเร็วกว่าค่าครีเอตินีน ซึ่งต้องรอให้ไตมีความเสียหายมากกว่าร้อยละ 75 จึงจะสามารถระบุภาวะโรคไตเรื้อรังได้

### นิวโทรฟิล เจลาตินเนส-แอสโซซิเอเตด ไลโปคาลิน (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NGAL)

นิวโทรฟิล เจลาตินเนส-แอสโซซิเอเตด ไลโปคาลิน หรือ ไลโปคาลิน 2 เป็นไกลโคโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็ก (25 กิโลดาลตัน) พบในเนกรูลในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล พบว่านิวโทรฟิลเจลาตินเนสแอสโซซิเอเตดไลโปคาลิน ผลิตมากขึ้นในการตอบสนองต่อการอักเสบซึ่ง

มีความสัมพันธ์กับการบาดเจ็บของเยื่อ (epithelial injury) ในภาวะความเสียหายต่อไตแบบเฉียบพลัน (acute kidney injury; AKI) (Kjeldsen et al., 2000) การศึกษาในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อไตแบบเฉียบพลันด้วยสารพิษ ส่งผลให้มีการสร้างสารนิวโทรฟิล เจลาตินเนส-แอสโซซิเอเตด ไลโปคาลินในเซลล์ของท่อไตส่วนต้น (proximal tubule) เพิ่มมากขึ้น (Mishra et al., 2004) ในมนุษย์มีการใช้ค่านิวโทรฟิล เจลาตินเนส-แอสโซซิเอเตด ไลโปคาลินในการประเมินและพยากรณ์ภาวะความเสียหายต่อไตแบบเฉียบพลัน ภายหลังจากผ่าตัดหัวใจ (Mishra et al., 2005) นอกจากนี้พบว่าระดับของสารนิวโทรฟิล เจลาตินเนส-แอสโซซิเอเตด ไลโปคาลินในปัสสาวะยังมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นของโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้ายในผู้ป่วยที่เป็นมนุษย์อีกด้วย (Viau et al., 2010) ในสุนัขมีรายงานว่านิวโทรฟิล เจลาตินเนส-แอสโซซิเอเตด ไลโปคาลินในปัสสาวะเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่ไวต่อการพบภาวะความเสียหายต่อไตแบบเฉียบพลัน (Lee et al., 2012; Kai et al., 2013; Zhou et al., 2014) ตัวอย่างการตรวจนิวโทรฟิล เจลาตินเนส-แอสโซซิเอเตด ไลโปคาลินในปัสสาวะของสุนัขด้วยวิธีอีไลซ่า (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) เพื่อประเมินภาวะความเสียหายต่อไตแบบเฉียบพลันภายหลังจากผ่าตัด พบว่าระดับของนิวโทรฟิล เจลาตินเนส-แอสโซซิเอเตด ไลโปคาลินในปัสสาวะเพิ่มสูงขึ้นได้ก่อน 12 ชั่วโมง ภายหลังจากผ่าตัด มีความไวกว่าการเพิ่มของครีเอตินีน (Lee et al., 2012) และพบว่าค่านิวโทรฟิล เจลาตินเนส-แอสโซซิเอเตด ไลโปคาลินทั้งในปัสสาวะและเลือดยังสามารถใช้ช่วยประเมินการดำเนินไปของภาวะโรคไตเรื้อรังในสุนัขได้ (Hsu et al., 2014) สำหรับการศึกษาในแมวนั้น พบว่าค่านิวโทรฟิล เจลาตินเนส-แอสโซซิเอเตด ไลโปคาลินในปัสสาวะต่อค่าครีเอตินีนในปัสสาวะ จากการตรวจด้วยวิธีอีไลซ่า ในกลุ่มแมวโรคไตเรื้อรังที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีค่ามากกว่ากลุ่มแมวสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ จึงกล่าวได้ว่าค่านิวโทรฟิล เจลา



ดีเนส-แอสโซซิเอเตด ไลโปคาลินในปัสสาวะเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่ดีอีกตัวหนึ่งในการพยากรณ์และติดตามการดำเนินไปของภาวะโรคไตเรื้อรังในแมว (Wang et al., 2017)

## ประเมินการดำเนินไปของโรคไต

สารบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับใช้ประเมินการดำเนินไปของโรคไตนั้น แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ พังผืดในไต (renal fibrosis) ความสมดุลของฟอสฟอรัส (phosphate homeostasis) และตัวบ่งชี้ความผิดปกติของท่อหน่วยไต (markers of tubular dysfunction)

### พังผืดในไต (Renal fibrosis)

#### ทรานส์ฟอร์มมิ่ง โกรทแฟคเตอร์ เบต้า

##### (Transforming growth factor beta; TGF- $\beta$ )

ทรานส์ฟอร์มมิ่ง โกรทแฟคเตอร์ เบต้าเป็นสารสื่อกลางโปรไฟโบรติก (pro-fibrotic mediator) ที่สำคัญเนื่องจากมีหน้าที่ควบคุมกระบวนการหาย (healing process) กระบวนการนี้จะมีการสร้างเนื้อเยื่อเส้นใย (fibrous tissue) เป็นจำนวนมาก มีรายงานการศึกษาพบว่าระดับทรานส์ฟอร์มมิ่ง โกรทแฟคเตอร์ เบต้าจะเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยเช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) (Szekanecz et al., 1995) การอักเสบของทางเดินอาหาร (Wu et al., 2007) กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (myocarditis) (Hao et al., 1999) และโรคไตจากเบาหวาน (diabetic nephropathy) (Yamamoto et al., 1996) ทรานส์ฟอร์มมิ่ง โกรทแฟคเตอร์ เบต้าเป็นสารสื่อกลางที่พบได้มากในไต และภาวะการอักเสบบริเวณอินเตอร์สตีเรียลของท่อไต มักจะมีการสร้างเส้นใยบริเวณเนื้อเยื่อรอบท่อไตและส่งผลทำให้ไตอักเสบ ซึ่งเป็นรอยโรคที่สำคัญและพบได้บ่อยในแมวโรคไตเรื้อรัง (Minkus et al., 1994; Lawler et al., 2006; Polzin, 2011) มีหลายรายงานก่อนนี้พบว่า ทรานส์ฟอร์มมิ่ง โกรทแฟคเตอร์ เบต้า สามารถถูกเหนี่ยวนำให้สร้างเพิ่มขึ้น

จากหลายสาเหตุ เช่น การทำงานของระบบ เรนิน-แองจิโอเทนซิน-แอลโดสเตอโรน (renin-angiotensin-aldosterone system) (Wolf, 2006) ภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) (Orphanides et al., 1997) ภาวะโปรตีนในปัสสาวะ (proteinuria) (Eddy and Giachelli, 1995) และภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) (Shin et al., 2008) นอกจากนี้การอักเสบบริเวณอินเตอร์สตีเรียลของท่อไตยังมีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของภาวะอะซิทีเมีย ภาวะโลหิตจาง (anemia) ภาวะฟอสฟอรัสสูงในเลือด (hyperphosphatemia) และภาวะโปรตีนในปัสสาวะในแมวโรคไตเรื้อรัง (Chakrabarti et al., 2013) พบความสัมพันธ์กันระหว่างการทำงานของไตและภาวะการอักเสบบริเวณอินเตอร์สตีเรียลของท่อไตในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (Nath, 1992) และแมวโรคไตเรื้อรัง (Yabuki et al., 2010; Chakrabarti et al., 2013) โดยแมวโรคไตเรื้อรังที่มีค่าครีเอตินินเพิ่มสูงขึ้นก็จะพบรอยโรคการอักเสบบริเวณอินเตอร์สตีเรียลของท่อไตจากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่เพิ่มมากขึ้น (Yabuki et al., 2010) ในแมวป่วยโรคไตเรื้อรังที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติพบว่าระดับสารทรานส์ฟอร์มมิ่ง โกรทแฟคเตอร์ เบต้าในปัสสาวะเพิ่มสูง (Arata et al., 2005; Habenicht et al., 2013) แมวโรคไตเรื้อรังสามารถพบสัดส่วนของทรานส์ฟอร์มมิ่ง โกรทแฟคเตอร์ เบต้า-1 ในปัสสาวะต่อค่าครีเอตินินในปัสสาวะ (urine TGF- $\beta$ 1:urine creatinine ratio) สูงกว่าแมวสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับ ทรานส์ฟอร์มมิ่ง โกรทแฟคเตอร์ เบต้า-1 ในเลือดของแมวทั้งสองกลุ่ม (Arata et al., 2005) การศึกษาต่อมาพบว่าสัดส่วนของทรานส์ฟอร์มมิ่ง โกรทแฟคเตอร์ เบต้า-1 ต่อค่าครีเอตินินทั้งในปัสสาวะและเลือดของแมวโรคไตเรื้อรังมีค่าสูงกว่าแมวสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (Habenicht et al., 2013) การตรวจค่าทรานส์ฟอร์มมิ่ง โกรทแฟคเตอร์ เบต้า-1 ในแมวสามารถตรวจได้จาก



ตัวอย่างที่เป็นซีรัมและปัสสาวะด้วยวิธีโกลบูลินโดยสารนี้จัดว่าเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่ดีอีกชนิดหนึ่งสำหรับการติดตามการรักษาและการดำเนินไปของโรคไตเรื้อรังในแมว แต่อย่างไรก็ตามทั้งสองการศึกษาข้างขาดข้อมูลทางจุลพยาธิวิทยาถึงความสัมพันธ์กับค่าที่วัดได้จากปัสสาวะและเลือด

### ทรานส์กลูตามิเนส-2 (Transglutaminase 2; TG-2)

ทรานส์กลูตามิเนส-2 เป็นเอนไซม์ในตระกูลทรานส์กลูตามิเนสที่มีขนาดโมเลกุล 78 กิโลดาลตัน มีความสำคัญในการประสานโครงสร้างของโปรตีน โดยเฉพาะเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างกรดอะมิโนชนิดกลูตามีน (glutamine) และไลซีน (lysine) โดยการแสดงออกของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส-2 มีความเกี่ยวข้องกับทรานส์ฟอร์มมิ่ง โกรทแฟคเตอร์ เบต้า-1 และเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ นำไปสู่การสร้างเนื้อเยื่อเส้นใย (Shweke et al., 2008) พบความสัมพันธ์กันระหว่างทรานส์กลูตามิเนส-2 และการเกิดพังผืดที่ไตในหนูทดลอง (Huang et al., 2009) มนุษย์ (Johnson, 2003) และแมว (Sánchez-Lara et al., 2015) พบว่าการให้ตัวยับยั้งทรานส์กลูตามิเนส-2 สามารถลดความรุนแรงของภาวะการเกิดพังผืดในหนูที่เป็นโรคไตได้ (Huang et al., 2009) สำหรับการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของไตแมวที่มีภาวะอะซิทีเมียที่ไต จำนวน 10 ตัว พบว่าโปรตีนทรานส์กลูตามิเนส-2 และการทำงานมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ ภาวะการเกิดพังผืดบริเวณอินเตอรส์ตีเทียลของท่อไต ค่าครีเอตินีน ค่ายูเรีย และค่าฟอสฟอรัสในเลือด ซึ่งบ่งบอกถึงความรุนแรงของภาวะโรคไตเรื้อรัง ข้อดีของค่าทรานส์กลูตามิเนส-2 นี้มีประโยชน์ในการติดตามการรักษาเพื่อดูการดำเนินไปของโรคไตเรื้อรังในแมว โดยเฉพาะภาวะพังผืดที่ไตแต่อย่างไรก็ตามการวัดค่าทรานส์กลูตามิเนส-2 จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างจาก

เนื้อเยื่อของไต ซึ่งยากต่อการติดตามในแมวที่มีชีวิต เพราะอาจมีข้อแทรกซ้อนมากในการเก็บตัวอย่าง

### ยีนตระกูลบีซีแอล-2 (Bcl-2 family genes)

ยีนตระกูลบีซีแอล-2 ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการการตายของเซลล์ หรือเรียกว่ากระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ยีนตระกูลบีซีแอล-2 ประกอบด้วยยีนโปรและแอนตี้อะพอพโทซิส (pro- และ anti-apoptotic genes) *Bax* และ *Bad* เป็นยีนโปรอะพอพโทซิส สำหรับ *Bcl-2* และ *Bcl-XL* เป็นยีนแอนตี้อะพอพโทซิส กระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสมีความสำคัญในการดำเนินไปของการที่มีพังผืดในไต จากกลไกที่มีการแสดงออกของยีน *Bax* เพิ่มมากขึ้น และระดับของยีน *Bcl-2* ลดลง (Yang et al., 2001) มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างยีนกลุ่มตระกูลบีซีแอลทูและโรคไต โดยพบภาวะพร่องยีน *Bcl-2* ในหนูที่มีถุงน้ำจำนวนมากในไต (polycystic kidneys) (Veis et al., 1991) พบระดับโปรตีน *Bax* สูงในเซลล์ไกลเมอรูลัสหลังจากการตัดไตออก (Hattori et al., 1998) โดยกระบวนการอะพอพโทซิสมีความสัมพันธ์กับภาวะโรคไตเรื้อรังในหนูทดลอง (Yang et al., 2001) พบการลดลงของการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (Fernández-Fresnedo et al., 2000) ประกอบกับการศึกษาในแมวโรคไตเรื้อรัง พบว่ามีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ต่ำกว่ากลุ่มแมวสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (Kralova-Kovarikova et al., 2016) ซึ่งคาดว่าจะเป็นผลจากกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสที่เกี่ยวข้องกับภาวะโรคไตเรื้อรัง

### ความสมดุลของฟอสฟอรัส (Phosphate homeostasis)



## ไฟโบรบลาสต์ โกรทแฟคเตอร์-23 (Fibroblast growth factor 23; FGF-23)

ไฟโบรบลาสต์ โกรทแฟคเตอร์-23 ถูกสร้างจากเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (osteoblast) และเซลล์ออสติโอไซต์ (osteocyte) มีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของฟอสฟอรัสและวิตามินดี โดยการตรวจระดับไฟโบรบลาสต์ โกรทแฟคเตอร์-23 ด้วยวิธีอิมูโนฟลูออโรเซนส์ในเลือดของแมวอายุมากที่มีภาวะอะซิทีล เบต้า-ดีกลูโคซามิเนสสูงพบว่าแมวสุขภาพดีที่มีอายุใกล้เคียงกัน และพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างค่าไฟโบรบลาสต์ โกรทแฟคเตอร์-23 กับระดับฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (parathyroid hormone; PTH) สามารถใช้บ่งบอกถึงภาวะต่อมพาราไทรอยด์ทำงานมากเกินไปจากโรคไต (renal secondary hyperparathyroidism) (Finch et al., 2013) และค่าไฟโบรบลาสต์ โกรทแฟคเตอร์-23 ในเลือดยังมีค่าลดลงในแมวอายุมากที่ป่วยด้วยโรคไตเรื้อรังร่วมกับ ทั้งมีและไม่มีภาวะฟอสฟอรัสสูงในเลือดที่ได้รับอาหารสำหรับโรคไตซึ่งมีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำ (Geddes et al., 2013) ไฟโบรบลาสต์ โกรทแฟคเตอร์-23 มีค่าเพิ่มสูงขึ้นก่อนที่แมวจะพัฒนาเข้าสู่ภาวะโรคไตเรื้อรัง ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่าไฟโบรบลาสต์ โกรทแฟคเตอร์-23 อาจจะเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับบ่งชี้การสูญเสียสมดุของฟอสฟอรัสในแมวโรคไตเรื้อรังได้

## ตัวบ่งชี้ความผิดปกติของท่อหน่วยไต (Markers of tubular dysfunction)

### เอน-อะซีทิล เบต้าดี-กลูโคซามิเนส (N-acetyl-β-D-glucosaminidase; NAG)

เอน-อะซีทิล เบต้าดี-กลูโคซามิเนสจัดเป็นเอนไซม์โมเลกุลขนาดใหญ่ (150 กิโลดาลตัน) พบได้มากในเซลล์หลอดไตส่วนต้น (renal proximal tubule) (Bourbouze et al., 1984) โดยตรวจพบได้ในปัสสาวะของมนุษย์และสัตว์สุขภาพดีในปริมาณต่ำ เมื่อเซลล์ท่อไตมีความเสียหายจะพบเอน-อะซีทิล เบต้า-ดีกลูโคซา

มิเนสได้มากขึ้น ดังนั้นสารนี้จึงเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่ดีในการระบุความเสียหายของท่อไตในแมว (Sato et al., 2002) สามารถวัดระดับของเอน-อะซีทิล เบต้าดี-กลูโคซามิเนสทั้งในสุนัขและแมวได้โดยวิธี enzymatic colorimetric NAG assay (Jepson et al. 2010; Smets et al. 2010) ในแมวนั้นไม่พบความแตกต่างของค่าเอน-อะซีทิล เบต้า-ดีกลูโคซามิเนสในปัสสาวะระหว่างเพศผู้และเมีย (Jepson et al., 2010) ระดับเอน-อะซีทิล เบต้า-ดีกลูโคซามิเนสในปัสสาวะจะเพิ่มสูงขึ้นในแมวมีความผิดปกติของทางเดินปัสสาวะส่วนล่าง (lower urinary tract) การศึกษาหนึ่งพบว่าการทำงานของเอน-อะซีทิล เบต้า-ดีกลูโคซามิเนสไม่สัมพันธ์กับค่าครีเอตินีนในเลือด แต่สัมพันธ์กับสัดส่วนของค่าโปรตีนในปัสสาวะต่อค่าครีเอตินีนในปัสสาวะ (urine protein : urine creatinine ratio; UPC) นอกจากนี้ค่าเอน-อะซีทิล เบต้า-ดีกลูโคซามิเนสยังไม่อยู่ในต้นแบบพหุตัวแปร (multivariable model) ของการประเมินภาวะอะซิทีล เบต้า-ดีกลูโคซามิเนสในแมวอีกด้วย (Jepson et al. 2009) ต่อมามีการรายงานในแมว โรคไตเรื้อรังพบการเพิ่มขึ้นของค่าเอนอะซีทิล เบต้าดีกลูโคซามิเนสในปัสสาวะเช่นกัน แต่อาจเป็นการบ่งชี้ถึงภาวะโปรตีนในปัสสาวะมากกว่าการเสียหายที่เซลล์หลอดไตส่วนต้น (Jepson et al. 2010) แมวป่วยด้วยภาวะต่อมไทรอยด์ทำงานเกิน (hyperthyroidism) ร่วมกับภาวะโรคไตเรื้อรังจะมีค่าเอน-อะซีทิล เบต้า-ดีกลูโคซามิเนสในปัสสาวะสูงกว่าแมวสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (Lapointe et al., 2008) ซึ่งการศึกษานี้อาจเป็นเพียงการใช้เอน-อะซีทิล เบต้า-ดีกลูโคซามิเนสในปัสสาวะสำหรับติดตามความเสียหายของไตระหว่างการรักษาด้วยยาในภาวะ ต่อมไทรอยด์ทำงานเกิน อย่างไรก็ตามยังไม่พบความแตกต่างของค่าเอน-อะซีทิล เบต้า-ดีกลูโคซามิเนสในปัสสาวะในแมวป่วยด้วยภาวะต่อมไทรอยด์ทำงานเกินทั้งมีและไม่มีภาวะอะซิทีล เบต้า-ดีกลูโคซามิเนสในปัสสาวะร่วมด้วย โดยทำการศึกษาก่อนการรักษาด้วยยาเมโทมาโซล (methimazole) ซึ่งเป็นยารักษาโรคต่อมไทรอยด์



ทำงานเกินที่มีกระบวนการกำจัดยาออกจากกระแสเลือดโดยขับออกมาที่ปัสสาวะ ข้อดีของค่าเอน-อะซีทิล เบต้า-ดีกัลโคซามินิเดสในการเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพของไตคือช่วยระบุความเสียหายของท่อหน่วยไตแต่แรกเริ่ม แต่อย่างไรก็ตามเมื่อท่อหน่วยไตมีความเสียหายระยะเวลานาน ท่อหน่วยไตจะมีการขับของเอน-อะซีทิล เบต้า-ดีกัลโคซามินิเดสในปัสสาวะลดลง ส่งผลให้พบค่าเอน-อะซีทิล เบต้า-ดีกัลโคซามินิเดสในปัสสาวะในปริมาณต่ำ ค่านี้จึงมีความไวในการระบุภาวะโรคไตเรื้อรังค่อนข้างน้อย สรุปได้ว่าค่าเอน-อะซีทิล เบต้า-ดีกัลโคซามินิเดสยังไม่จำเพาะต่อภาวะโรคไตเรื้อรังในแมวมากนัก

### ซิสเตตินซี

#### (Cystatin C)

ซิสเตตินซีเป็นโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็ก (13 กิโลดาลตัน) ผลิตจากเซลล์ของร่างกายทุกชนิดที่มีนิวเคลียส จากคุณสมบัติที่เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่กรองผ่านไตส่วนโกลเมอรูลัส และดูดกลับที่ท่อไตส่วนต้นในอัตราคงที่ ทำให้ซิสเตตินซีถูกนำมาใช้ในการประเมินอัตราการกรองของไต โดยปกติแล้วนั้นสามารถพบซิสเตตินซีได้เล็กน้อยในปัสสาวะ แต่เมื่อใดที่เกิดความเสียหายที่ท่อไตส่วนต้นจะพบซิสเตตินซีในปัสสาวะมากยิ่งขึ้น (Conti et al., 2006) มีการใช้ค่าซีรั่มซิสเตตินซีประเมินอัตราการกรองของไตในผู้ป่วย พบว่ามีความแม่นยำมากกว่าค่าซีรั่มครีเอตินิน (Newman et al., 1995) แต่การศึกษาต่อมาพบว่าการประเมินค่า อัตราการกรองของไตจากสมการที่คำนวณจากค่าครีเอตินินร่วมกับค่าซิสเตตินซีจะเป็นประโยชน์สำหรับใช้ยืนยันภาวะโรคไตเรื้อรังได้อย่างแม่นยำกว่าค่าครีเอตินินหรือค่าซิสเตตินซีเพียงอย่างเดียว (Inker et al., 2012) การศึกษาในแมวป่วยโรคไตเรื้อรังพบว่าค่าซิสเตตินซีต่อครีเอตินินในซีรั่ม และค่าซิสเตตินซีต่อครีเอตินินในปัสสาวะ สูงกว่าแมวสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (Ghys et al., 2014) นอกจากนี้ค่าซิสเตตินซีในปัสสาวะยังไม่

ถูกกระทบจากโรคอื่น เช่น โรคเบาหวาน เนื่องจากแมวป่วยโรคเบาหวาน มีค่าซิสเตตินซี ต่อครีเอตินินในปัสสาวะต่ำกว่าแมวโรคไตเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญ (Paepe et al., 2014)

### คอกซิน

#### (Cauxin)

คอกซินเป็นเอนไซม์กลุ่มคาร์บอกซิลเอสเตอเรส (carboxylesterase) ขนาดโมเลกุลเท่ากับ 70 กิโลดาลตัน สร้างจากท่อไตส่วนต้น และขับออกทางปัสสาวะ (Miyazaki et al., 2003) ในแมวสุขภาพดีพบว่าคอกซินสามารถขับออกในปัสสาวะเป็นปกติ คอกซินจะพบในปัสสาวะมากขึ้นเมื่ออายุของแมวมากขึ้น และพบได้มากในแมวเพศผู้ที่ยังไม่ได้ทำหมัน เมื่อเปรียบเทียบกับเพศผู้และเพศเมียที่ทำหมันแล้ว (Miyazaki et al., 2006) สำหรับแมวแก่ซึ่งเป็นกลุ่มเสี่ยงของโรคไตเรื้อรังนั้นก็พบว่ามีส่วนของค่าคอกซินต่อครีเอตินินในปัสสาวะ ที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าแมวที่มีอายุน้อยกว่า ในแมวที่มีภาวะการอักเสบบริเวณอินเตอริสตีเทียลของท่อไต และโรคทางเดินปัสสาวะส่วนล่างก็จะพบคอกซินปริมาณมากขึ้นในปัสสาวะเช่นกัน จึงอาจกล่าวได้ว่าคอกซินในปัสสาวะเป็นตัวบ่งชี้ภาวะหลอดไตเสียหายได้ดีในแมว (Miyazaki et al., 2007)

นอกจากนี้ยังพบรายงานการใช้อัลบูมินในปัสสาวะ (urinary albumin) เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อดูความเสียหายของโกลเมอรูลัสในแมวป่วยด้วยโรคไตจากเบาหวาน (Al-Ghazlat et al., 2011) และ สารบ่งชี้ทางชีวภาพต่อความเสียหายของท่อหน่วยไต เช่น แกมมา-กลูตามิลทรานสเปปทิเดส (gamma-glutamyl transpeptidase) ในแมวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการอักเสบของกรวยกรองไตจากภูมิคุ้มกัน (immune complex glomerulonephritis) (Bishop et al., 1991) และโปรตีนตัวพาเรตินอล (retinol binding protein) ในแมวป่วยโรคไตวายเรื้อรัง (van Hoek et al., 2008) เป็นต้น



## บทสรุป (Conclusion)

สารชีววัตถุทางชีวภาพจะช่วยในการวินิจฉัยและประเมินผลการรักษาแมวโรคไตเรื้อรังได้อย่างแม่นยำ ตั้งแต่แรกเริ่มเป็น และสามารถทดแทนการเจาะเก็บเนื้อเยื่อจากไต (renal biopsy) ซึ่งเป็นวิธีการวินิจฉัยที่ค่อนข้างยุ่งยากและมีภาวะแทรกซ้อนมากได้ สำหรับการระบุภาวะโรคไตเรื้อรังได้แต่แรกเริ่มนั้น ค่าซิมเมตริกโดเมทิลอาร์จินีนเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพของไตที่ดีเนื่องจากจำเพาะต่อการทำงานของไตและสามารถระบุความเสียหายของไตได้รวดเร็วกว่าค่าครีเอตินีน ปัจจุบันได้มีการนำเอาซิมเมตริกโดเมทิลอาร์จินีน มาใช้ทางคลินิก โดยซิมเมตริกโดเมทิลอาร์จินีนสามารถตรวจจากตัวอย่างซีรัมของแมว ส่วนการใช้นิวโทรฟิลเจลาติเนสแอสโซซิเอเตดไลโปคาลินในปัสสาวะ เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพของไตสำหรับการตรวจพบแต่แรกเริ่มนั้นค่อนข้างให้ผลดี แต่อย่างไรก็ตามควรมีการพัฒนาวิธีการตรวจให้มีความจำเพาะต่อแมวให้มากขึ้นต่อไป สำหรับการประเมินการดำเนินไปของโรคไต ค่าทรานส์ฟอรั่มมิ่งโกรทแฟคเตอร์เบต้าทั้งในเลือดและปัสสาวะเป็นสารอีกตัวหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความรุนแรงของภาวะโรคไตเรื้อรังโดยเฉพาะภาวะการเกิดพังผืดบริเวณอินเตอร์สตีเชียลของท่อไตและค่าครีเอตินีน ยูเรีย และฟอสฟอรัส ในเลือดที่เพิ่มสูงขึ้น ส่วนไฟโบรบลาสต์ โกรทแฟคเตอร์-23 ก็มีความน่าสนใจเช่นกัน เนื่องจากมีแนวโน้มที่จะสามารถระบุการสูญเสียสมดุคของฟอสฟอรัสในแมวโรคไตเรื้อรังได้ แต่อย่างไรก็ตามสารบ่งชี้ทางชีวภาพเป็นเพียงเครื่องมือหนึ่งที่ใช้ในการวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาโรคไต ซึ่งยังต้องใช้ประกอบรวมกับการตรวจวินิจฉัยที่เป็นมาตรฐานของสมาคมนานาชาติเกี่ยวกับโรคไต คือการพิจารณาค่าครีเอตินีนและค่ายูเรียในเลือดร่วมด้วย นอกจากนี้อาจนำสารบ่งชี้ทางชีวภาพเหล่านี้มาประยุกต์ใช้ในการประเมินการดำเนินไปของโรคและการรักษาโรคไตเรื้อรัง ในมนุษย์ต่อไปในอนาคตได้

## เอกสารอ้างอิง

- Al-Ghazlat, S.A., Langston, C.E., Greco, D.S., Reine, N.J., May, S.N., Shofer, F.S., 2011. The prevalence of microalbuminuria and proteinuria in cats with diabetes mellitus. *Top. Companion Anim. Med.* 26, 154–157.
- Arata, S., Ohmi, A., Mizukoshi, F., Baba, K., Ohno, K., Setoguchi, A., Tsujimoto, H., 2005. Urinary transforming growth factor-beta1 in feline chronic renal failure. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 1253-1255.
- Bishop, S.A., Lucke, V.M., Stokes, C.R., Gruffydd-Jones, T.J., 1991. Plasma and urine biochemical changes in cats with experimental immune complex glomerulonephritis. *J. Comp. Pathol.* 104, 65–76.
- Bourbouze, R., Baumann, F.C., Bonvalet, J.P., Farman, N., 1984. Distribution of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase isoenzymes along the rabbit nephron. *Kidney Int.* 25, 636-642.
- Braff, J., Obare, E., Yerramilli, M., Elliott, J., Yerramilli, M., 2014. Relationship between serum symmetric dimethylarginine concentration and glomerular filtration rate in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 1699-1701.
- Brown, S.A., 2004. Pathogenesis and pathophysiology of renal disease. *Proceeding of 3rd-5th Hill's European Symposium on Chronic Renal Disease*, 14-23.
- Chakrabarti, S., Syme, H.M., Brown, C.A., Elliott, J., 2013. Histomorphometry of feline chronic kidney disease and correlation with markers of renal dysfunction. *Vet. Pathol.* 50, 147-155.
- Conti, M., Moutereau, S., Zater, M., Lallali, K., Durrbach, A., Manivet, P., Eschwège, P., Loric, S., 2006. Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44, 288-291.
- Eddy, A.A., Giachelli, C.M., 1995. Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and





- fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int.* 47, 1546-1557.
- Elliott, J., Barber, P., 1998. Feline chronic renal failure: clinical findings in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. *J. Small Anim. Pract.* 39, 78-85.
- Elliott, J., Rawlings, J.M., Markwell, P.J., Barber, P.J., 2000. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure: effect of dietary management. *J. Small Anim. Pract.* 41, 235-242.
- Fernández-Fresnedo, G., Ramos, M.A., González-Pardo, M.C., de Francisco, A.L., López-Hoyos, M., Arias, M., 2000. B lymphopenia in uremia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15, 502-510.
- Finch, N.C., Geddes, R.F., Syme, H.M., Elliott, J., 2013. Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) concentrations in cats with early nonazotemic chronic kidney disease (CKD) and in healthy geriatric cats. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 227-233.
- Geddes, R.F., Elliott, J., Syme, H.M., 2013. The effect of a feeding renal diet on plasma fibroblast growth factor 23 concentrations in cats with stable azotemic chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 1354-1361.
- Ghys, L.F., Meyer, E., Paepe, D., Delanghe, J., Daminet, S., 2014. Analytical validation of a human particle-enhanced nephelometric assay for cystatin C measurement in feline serum and urine. *Vet. Clin. Pathol.* 43, 226-234.
- Habenicht, L.M., Webb, T.L., Clauss, L.A., Dow, S.W., Quimby, J.M., 2013. Urinary cytokine levels in apparently healthy cats and cats with chronic kidney disease. *J. Feline Med. Surg.* 15, 99-104.
- Hall, J.A., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., Jewell, D.E., 2014. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 1676-1683.
- Hall, J.A., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., Yu, S., Jewell, D.E., 2015. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 1036-1044.
- Hall, J.A., Yerramilli, M., Obare, E., Li, J., Yerramilli, M., Jewell, D.E., 2017. Serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine in cats with kidney stones. *PLoS One.* 12, e0174854.
- Hao, J., Ju, H., Zhao, S., Junaid, A., Scammell-La Fleur, T., Dixon, I.M., 1999. Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 667-678.
- Harte, J.G., Markwell, P.J., Moraillon, R.M., Gettinby, G.G., Smith, B.H.E., Wills, J.M., 1994. Dietary Management of Naturally Occurring Chronic Renal Failure in Cats. *J. Nurt.* 124, 2660S-2662S.
- Hattori, T., Shindo, S., Kawamura, H., 1998. Apoptosis and expression of Bax protein and Fas antigen in glomeruli of a remnant-kidney model. *Nephron.* 79, 186-191.
- Hofmann-Lehmann, R., Holznagel, E., Ossent, P., Lutz, H., 1997. Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infections: hematology, clinical chemistry, and lymphocyte subsets. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4, 33-42.
- Hsu, W.L., Lin, Y.S., Hu, Y.Y., Wong, M.L., Lin, F.Y., Lee, Y.J., 2014. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in dogs with naturally occurring renal diseases. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 437-442.
- Huang, L., Haylor, J.L., Hau, Z., Jones, R.A., Vickers, M.E., Wagner, B., Griffin, M., Saint, R.E., Coutts, I.G., El Nahas, A.M., Johnson, T.S., 2009. Transglutaminase inhibition ameliorates



- experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 76, 383-394.
- Inker, L.A., Schmid, C.H., Tighiouart, H., Eckfeldt, J.H., Feldman, H.I., Greene, T., Kusek, J.W., Manzi, J., Van Lente, F., Zhang, Y.L., Coresh, J., Levey, A.S., 2012. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N. Engl. J. Med.* 367, 20-29.
- Jepson, R.E., Brodbelt, D., Vallance, C., Syme, H.M., Elliott, J., 2009. Evaluation of predictors of the development of azotemia in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 806-813.
- Jepson, R.E., Syme, H.M., Vallance, C., Elliott, J., 2008. Plasma asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, l-arginine, and nitrite/nitrate concentrations in cats with chronic kidney disease and hypertension. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 317-324.
- Jepson, R.E., Vallance, C., Syme, H.M., Elliott, J., 2010. Assessment of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in geriatric cats with variable plasma creatinine concentrations with and without azotemia. *Am. J. Vet. Res.* 71, 241-247.
- Johnson, T.S., El-Koraie, A.F., Skill, N.J., Baddour, N.M., El Nahas, A.M., Njloma, M., Adam, A.G., Griffin, M., 2003. Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2052-2062.
- Kai, K., Yamaguchi, T., Yoshimatsu, Y., Kinoshita, J., Teranishi, M., Takasaki, W., 2013. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a sensitive urinary biomarker of acute kidney injury in dogs receiving gentamicin. *J. Toxicol. Sci.* 38, 269-277.
- Kjeldsen, L., Cowland, J.B., Borregaard, N., 2000. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim. Biophys. Acta.* 1482, 272-283.
- Kralova-Kovarikova, S., Leva, L., Knotek, Z., Toman, M., 2016. Changes in lymphocyte function and subset counts in cats with spontaneous chronic kidney disease. *Vet. Med. (Praha).* 61, 553-559.
- Krofic Zel, M., Tozon, N., Nemeš Svete, A., 2014. Plasma and erythrocyte glutathione peroxidase activity, serum selenium concentration, and plasma total antioxidant capacity in cats with IRIS stages I-IV chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 130-136.
- Lapointe, C., Bélanger, M.C., Dunn, M., Moreau, M., Bédard, C., 2008. N-acetyl-beta-D-glucosaminidase index as an early biomarker for chronic kidney disease in cats with hyperthyroidism. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 1103-1110.
- Lawler, D.F., Evans, R.H., Chase, K., Ellersieck, M., Li, Q., Larson, B.T., Satyaraj, E., Heining, K., 2006. New perspectives the aging feline kidney: a model mortality antagonist. *J. Feline Med. Surg.* 8, 363-371.
- Lee, Y.J., Hu, Y.Y., Lin, Y.S., Chang, C.T., Lin, F.Y., Wong, M.L., Kuo-Hsuan, H., Hsu, W.L., 2012. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute canine kidney injury. *BMC Vet. Res.* 8, 248.
- Lund, E., Armstrong, P.J., Kirk, C.A., Kolar, L.M., Klausner, J.S., 1999. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 1336-1341.
- Marescau, B., Nagels, G., Possemiers, I., De Broe, M.E., because, I., Billioux, J.M., Lornoy, W., De Deyn, P.P., 1997. Guanidino compounds in serum and urine of nondialyzed patients with chronic renal insufficiency. *Metabolism.* 46, 1024-1031.
- Mayer-Roenne, B., Goldstein, R.E., Erb, H.N., 2007. Urinary tract infections in cats with hyperthyroidism, diabetes mellitus and chronic kidney disease. *J. Feline. Med. Surg.* 9, 124-132.



- Minkus, G., Reusch, C., Hörauf, A., Breuer, W., Darbès, J., Kraft, W., Hermanns, W., 1994. Evaluation of renal biopsies in cats and dogs-histopathology in comparison with clinical data. *J. Small Anim. Pract.* 35, 465-472.
- Mishra, J., Dent, C., Tarabishi, R., Mitsnefes, M.M., Ma, Q., Kelly, C., Ruff, S.M., Zahedi, K., Shao, M., Bean, J., Mori, K., Barasch, J., Devarajan, P., 2005. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet.* 365, 1231-1238.
- Mishra, J., Mori, K., Ma, Q., Kelly, C., Barasch, J., Devarajan, P., 2004. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Nephrol.* 24, 307-315.
- Miyazaki, M., Kamiie, K., Soeta, S., Taira, H., Yamashita, T., 2003. Molecular cloning and characterization of a novel carboxylesterase-like protein that is physiologically present at high concentrations in the urine of domestic cats (*Felis catus*). *Biochem J* 370, 101-110.
- Miyazaki, M., Soeta, S., Yamagishi, N., Taira, H., Suzuki, A., Yamashita, T., 2007. Tubulointerstitial nephritis causes decreased renal expression and urinary excretion of cauxin, a major urinary protein of the domestic cat. *Res. Vet. Sci.* 82, 76-79.
- Miyazaki, M., Yamashita, T., Hosokawa, M., Taira, H., Suzuki, A., 2006. Species-, sex-, and age-dependent urinary excretion of cauxin, a mammalian carboxylesterase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 145, 270-277.
- Nath, K.A., 1992. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am. J. Kidney Dis.* 20, 1-17.
- Newman, D.J., Thakkar, H., Edwards, R.G., Wilkie, M., White, T., Grubb, A.O., Price, C.P., 1995. Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int.* 47, 312-318.
- Orphanides, C., Fine, L.G., Norman, J.T., 1997. Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a TGF-beta1-independent mechanism. *Kidney Int.* 52, 637-647.
- Paepe, D., Ghys, L.F., Smets, P., Lefebvre, H.P., Croubels, S., Daminet, S., 2014. Routine kidney variables, glomerular filtration rate and urinary cystatin C in cats with diabetes mellitus, cats with chronic kidney disease and healthy cats. *J. Feline Med. Surg.* 17, 880-808.
- Piyarungsri, K., Pusoonthornthum, R., 2017. Risk and protective factors for cats with naturally occurring chronic kidney disease. *J. Feline Med. Surg.* 19, 358-363.
- Piyarungsri, K., Pusoonthornthum, R., 2016. Changes in reduced glutathione, oxidized glutathione, and glutathione peroxidase in cats with naturally occurring chronic kidney disease. *Comp. Clin. Path.* 25, 655-662.
- Poli, A., Tozon, N., Guidi, G., Pistello, M., 2014. Renal alterations in feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats: a natural model of lentivirus-induced renal disease changes. *Viruses.* 4, 1372-1389.
- Polzin, D.J., 2011. Chronic kidney disease in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 4, 15-30.
- Pusoonthornthum, R., Pusoonthornthum, P., Krishnamra, N., 2010. Calcium-phosphorus homeostasis and changes in parathyroid hormone secretion in cats with various stages of spontaneous chronic renal failure. *Comp. Clin. Path.* 19, 287-293.
- Rodriguez, J., Blais, M.C., Lapointe, C., Arseneault, J., Carioto, L., Harel, J., 2014. Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 284-293.
- Sánchez-Lara, A.C., Elliott, J., Syme, H.M., Brown, C.A., Haylor, J.L., 2015. Feline chronic kidney disease



- is associated with upregulation of transglutaminase 2: a collagen cross-linking enzyme. *Vet. Pathol.* 52, 513-523.
- Sato, R., Soeta, S., Syuto, B., Yamagishi, N., Sato, J., Naito, Y., 2002. Urinary excretion of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and its isoenzymes in cats with urinary disease. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 367-371.
- Shin, D.M., Jeon, J.H., Kim, C.W., Cho, S.Y., Lee, H.J., Jang, G.Y., Jeong, E.M., Lee, D.S., Kang, J.H., Melino, G., Park, S.C., Kim, I.G., 2008. TGFbeta mediates activation of transglutaminase 2 in response to oxidative stress that leads to protein aggregation. *FASEB J.* 22, 2498-2507.
- Shweke, N., Boulous, N., Jouanneau, C., Vandermeersch, S., Melino, G., Dussaule, J.C., Chatziantoniou, C., Ronco, P., Boffa, J.J., 2008. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration. *Am. J. Pathol.* 173, 631-342.
- Smets, P.M., Meyer, E., Maddens, B., Duchateau, L., Daminet, S., 2010. Effect of sampling method and storage conditions on albumin, retinol-binding protein, and N-acetyl-β-D-glucosaminidase concentrations in canine urine samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 896-902.
- Szekanecz, Z., Haines, G.K., Harlow, L.A., Shah, M.R., Fong, T.W., Fu, R., Lin, S.J., Rayan, G., Koch, A.E., 1995. Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)-beta receptor endoglin and TGF-beta 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 76, 187-194.
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S., 1992. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 339, 572-575.
- van Hoek, I., Daminet, S., Notebaert, S., Janssens, I., Meyer, E., 2008. Immunoassay of urinary retinol binding protein as a putative renal marker in cats. *J. Immunol. Methods.* 329, 208-213.
- Weis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., Korsmeyer, S.J., 1991. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell.* 75, 229-240.
- Viau, A., El Karoui, K., Laouari, D., Burtin, M., Nguyen, C., Mori, K., Pillebout, E., Berger, T., Mak, T.W., Knebelmann, B., Friedlander, G., Barasch, J., Terzi, F., 2010. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 120, 4065-4076.
- Wang, I.C., Hsu, W.L., Wu, P.H., Yin, H.Y., Tsai, H.J., Lee, Y.J., 2017. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in cats with naturally occurring chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 31, 102-108.
- Watson, A., 2001. Indicators of renal insufficiency in dogs and cats presented at a veterinary teaching hospital. *Aust. Vet. Pract.* 31, 54-58.
- Webb, C.B., Falkowski, L., 2009. Oxidative stress and innate immunity in feline patients with diabetes mellitus: the role of nutrition. *J. Feline Med. Surg.* 11, 271-276.
- White, J.D., Malik, R., Norris, J.M., Malikides, N., 2010. Association between naturally occurring chronic kidney disease and feline immunodeficiency virus infection status in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 236, 424-429.
- White, J.D., Norris, J.M., Baral, R.M., Malik, R., 2006. Naturally occurring chronic renal disease in Australian cats: a prospective study of 184 cases. *Aust. Vet. J.* 84, 188-194.
- Wolf, G., 2006. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int.* 70, 1914-1919.
- Wu, F., Dassopoulos, T., Cope, L., Maitra, A., Brant, S.R., Harris, M.L., Bayless, T.M., Parmigiani, G., Chakravarti, S., 2007. Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and



- ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis.* 13, 807-821.
- Yabuki, A., Mitani, S., Fujiki, M., Misumi, K., Endo, Y., Miyoshi, N., Yamato, O., 2010. Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: Induction of myofibroblasts. *Res. Vet. Sci.* 88, 294-299.
- Yamamoto, T., Noble, N.A., Cohen, A.H., Nast, C.C., Hishida, A., Gold, L.I., Border, W.A., 1996. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int.* 49, 461-469.
- Yang, B., Johnson, T.S., Thomas, G.L., Watson, P.F., Wagner, B., Skill, N.J., Haylor, J.L., El Nahas, A.M., 2001. Expression of apoptosis-related genes and proteins in experimental chronic renal scarring. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 275-288.
- Zhou, X., Ma, B., Lin, Z., Qu, Z., Huo, Y., Wang, J., Li, B., 2014. Evaluation of the usefulness of novel biomarkers for drug-induced acute kidney injury in beagle dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280, 30-35.







# เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

## Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN: 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website: <http://vet.cmu.ac.th/cmuj>

### คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

#### วัตถุประสงค์ (Objectives)

"เชียงใหม่สัตวแพทยสาร" เป็นวารสารเพื่อการเผยแพร่เผยแพร่ผลงานทางวิชาการที่มีคุณภาพในลักษณะต่างๆ เช่น บทความต้นฉบับ บทความปริทัศน์ รายงานฉบับย่อ และรายงานสัตว์ป่วย ที่เกี่ยวข้องกับทางด้านสัตวแพทยศาสตร์ (Veterinary Science) และวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีการสัตว์ (Animal Science and Technology) ได้แก่ ชีววิทยา สรีรวิทยา จุลชีววิทยา พยาธิวิทยา โภชนาการศาสตร์ กายวิภาคศาสตร์ พันธุศาสตร์ อายุรศาสตร์ ศัลยศาสตร์ สูติศาสตร์ วิทยาศาสตร์ทางชีวภาพวิทยาศาสตร์พื้นฐาน ระบาดวิทยาและแนวทางสุขภาพหนึ่งเดียว

บทความที่ได้รับการเผยแพร่ในเชียงใหม่สัตวแพทยสาร เป็นวารสารที่ผ่านการตรวจคุณภาพ โดยผู้ทรงคุณวุฒิอย่างน้อย 2 ท่านที่ไม่ทราบชื่อผู้แต่งและผู้แต่งไม่ทราบชื่อผู้ทรงคุณวุฒิ (Double-blind peer review) ความคิดเห็นของผู้เขียนแต่ละท่าน ทางกองบรรณาธิการไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป กรณีผู้ประสงค์จะนำบทความ หรือส่วนใดส่วนหนึ่ง (รูป ตาราง ฯลฯ) ที่มีการเผยแพร่ไปแล้ว ต้องได้รับอนุญาตจากกองบรรณาธิการวารสาร "เชียงใหม่สัตวแพทยสาร" คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แม้ว่าจะเป็นผลงานจากงานของผู้เขียนเองผู้แจ้งให้

#### การตีพิมพ์ออนไลน์ (Online publication)

ตั้งแต่ฉบับที่ 2 ปีที่ 14 พ.ศ.2559 เป็นต้นไป เชียงใหม่สัตวแพทยสารได้เปลี่ยนการตีพิมพ์เป็นรูปแบบวารสารออนไลน์เท่านั้นโดยจะไม่มีกรพิมพ์ออกเป็นรูปเล่มเหมือนที่ผ่านมา เพื่อความรวดเร็วในการตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวิชาการและเพื่อให้สอดคล้องกับนโยบายของศูนย์ดัชนีอ้างอิงวารสารภาษาไทย (TCI) ที่สนับสนุนให้วารสารปรับเปลี่ยนเป็นการตีพิมพ์ในรูปแบบออนไลน์ ทั้งนี้ในแต่ละปีทางวารสารยังคงมี 3 ฉบับ ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม-เมษายน ฉบับที่ 2 เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม และฉบับที่ 3 เดือนกันยายน-ธันวาคม รวมทั้งกำหนดให้มีเลขหน้าเรียงตามเรื่องที่ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์

บทความที่ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ระหว่างเดือน มกราคม-เมษายน จะตีพิมพ์เป็นฉบับที่ 1

บทความที่ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ระหว่างเดือน พฤษภาคม-สิงหาคม จะตีพิมพ์เป็นฉบับที่ 2

บทความที่ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ระหว่างเดือน กันยายน-ธันวาคม จะตีพิมพ์เป็นฉบับที่ 3

#### รูปแบบของนิพนธ์ต้นฉบับ (Manuscript Format)

**บทความต้นฉบับ** (Original article) เป็นการรายงานการศึกษาจากงานวิจัยต้นฉบับ (Original research) ซึ่งไม่เคยได้รับการเผยแพร่ที่ใดมาก่อน เนื้อหาประกอบด้วยบทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผลการศึกษา วิเคราะห์ และสรุป

**บทความปริทัศน์** (Review article) เป็นบทความทางวิชาการที่เขียนขึ้นเพื่อนำเสนอเรื่องราวที่กำลังเป็นที่สนใจหรือการเขียนบทความเพื่อประโยชน์ในแง่ของการฟื้นฟูวิชาการ

**รายงานฉบับย่อ (Short communication)** เป็นรูปแบบการรายงานการศึกษาแบบกระชับ อันเนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของการศึกษา แต่ยังคงมีความสมบูรณ์ในเนื้อหาที่น่าสนใจ รูปแบบที่เขียนจะเป็นแบบลักษณะคล้ายนิพนธ์ต้นฉบับแต่จะเป็นรายงานแบบย่อ

**รายงานสัตว์ป่วย (Case report)** บทความประเภทรายงานสัตว์ป่วยในโรคที่พบไม่บ่อย มีการตรวจวินิจฉัยอย่างละเอียดโดยหัวข้อควรประกอบด้วย บทนำ ประวัติและอาการทางคลินิก การวินิจฉัยและการรักษา วิจารณ์และสรุป โดยเป็นการนำเสนอที่แตกต่างจากในหนังสือหรือตำราวิชาการ

## การเตรียมนิพนธ์ต้นฉบับ (Manuscript Preparation)

“เที่ยงใหม่สัตว์แพทยสาร” รับผิดชอบต่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ โดยให้จัดพิมพ์ต้นฉบับบนกระดาษขนาด A4 พิมพ์หน้าเดียว โดยพิมพ์แบบเว้นบรรทัด (double space) ใช้ Cordia New ขนาดอักษร 16 ระบุตำแหน่งบรรทัดทุก 5 บรรทัด ต่อเนื่องตลอดทั้งบทความ ในการเขียนบทความเป็นภาษาไทยให้ใช้หลักการเขียนภาษาไทยตามราชบัณฑิตยสถาน (<http://www.royin.go.th/>) หากคำใดมีการแปลเป็นภาษาไทยแล้วโดยราชบัณฑิตยสถาน ขอให้ใช้ภาษาไทย โดยวงเล็บคำศัพท์ภาษาอังกฤษไว้ครั้งแรกที่เขียนและในทีต่อไปให้เขียนเป็นภาษาไทย ส่วนคำที่ไม่มีการแปลขอให้พิจารณาใช้คำยืม (อ่านได้จากราชบัณฑิตยสถาน) หากผู้เขียนพิจารณาว่าการใช้คำยืมทำให้การสื่อสารผิดไป สามารถใช้ศัพท์ภาษาอังกฤษได้ แต่ขอให้พิจารณาใช้น้อยที่สุด

ต้นฉบับทั้ง 4 ประเภทจะต้องประกอบด้วย 2 ไฟล์แยกจากกันคือ ไฟล์ใบหน้าแรก (title page) และ ไฟล์ต้นฉบับ (manuscript)

## ใบหน้าแรก (Title page)

ประกอบด้วย

- ชื่อบทความ (Title) เขียนทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ชื่อบทความควรกะทัดรัด และตรงกับเนื้อเรื่อง
- ชื่อผู้เขียนทุกคน (Name of author (s)) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ตำแหน่ง สถานที่ทำงาน และที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ (สถานที่ทำงาน ถนน ตำบล อำเภอ จังหวัด รหัสไปรษณีย์)
- ชื่อผู้รับผิดชอบบทความ (Corresponding author) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ สถานที่ทำงาน (สถานที่ทำงาน ถนน ตำบล อำเภอ จังหวัด รหัสไปรษณีย์) เบอร์โทรศัพท์ เบอร์แฟกซ์ ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ และ ที่อยู่ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Email address)

## ต้นฉบับ (Original Manuscript)

เป็นส่วนที่ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิ (Reviewer) ใช้อ่านเพื่อประเมินเอกสารจึงไม่มีชื่อและที่อยู่ของผู้เขียนทั้งหมด โดยประกอบด้วย

- ชื่อบทความ (Title) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ  
ชื่อบทความต้องตรงกันทั้งภาษาไทยและอังกฤษในลักษณะคำต่อคำ
- บทคัดย่อ (Abstract) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

บทความต้นฉบับและบทความปริทัศน์ บทคัดย่อมีความยาวไม่เกิน 300 คำ (ยัดจากภาษาอังกฤษ)



รายงานฉบับย่อและรายงานสัตว์ป่วย บทความย่อมีความยาวไม่เกิน 200 คำ (ยึดจากภาษาอังกฤษ)

การเขียนบทความต้องให้ตรงกันทั้งภาษาไทยและอังกฤษในลักษณะคำต่อคำ

3. คำสำคัญ (Keywords) ให้ระบุคำสำคัญ ทำยบทคัดย่อ (Abstract) จำนวน 3-5 คำ ทั้งภาษาไทยและอังกฤษ
4. เนื้อหา (Content)\*

บทความต้นฉบับ และ รายงานฉบับย่อ ควรประกอบด้วยหัวข้อตามลำดับ บทนำ (Introduction) อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ผลการศึกษา (Results) วิจารณ์ (Discussion) สรุป (Conclusion) กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) และ เอกสารอ้างอิง (References)

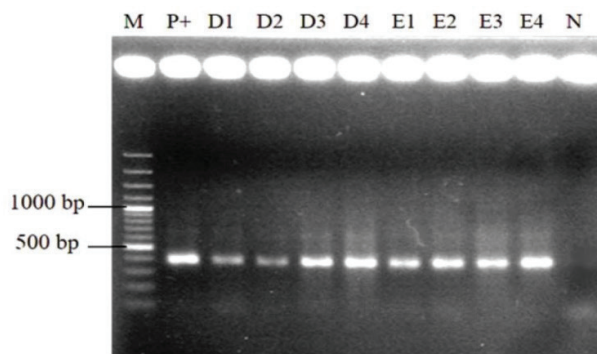
รายงานสัตว์ป่วย ควรประกอบด้วยหัวข้อตามลำดับ บทนำ (Introduction) ประวัติและอาการทางคลินิก (History and Clinical sign) การวินิจฉัยและการรักษา (Diagnosis and Treatment) วิจารณ์และสรุป (Discussion and Conclusion) กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) และ เอกสารอ้างอิง (References)

\*หากมีสมการทางคณิตศาสตร์ให้ใช้โปรแกรม "Microsoft equation editor" หรือโปรแกรม "Math Type"

5. รูปและตารางให้เรียงไว้ท้ายบทความ
6. หากเป็นการทดลองที่มีการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ให้ระบุว่าผ่านการขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลองของหน่วยงานใด วันที่เท่าไร และเลขที่หนังสืออนุญาต (หากมี) ในหัวข้อ อุปกรณ์และวิธีการ

## รูปภาพ (Figure)

1. คำอธิบายรูปและข้อมูลในรูปให้ใช้ภาษาอังกฤษเท่านั้น
2. ไฟล์รูปภาพจะต้องอยู่ในรูปแบบ TIFF หรือ JPEG (file รูปต้นฉบับจะขอเมื่อต้นฉบับได้รับการตอบรับให้เผยแพร่)
3. ขนาดภาพไม่ต่ำกว่า 480x640 pixels หากต้องการพิมพ์ภาพสีผู้เขียนต้องรับผิดชอบค่าใช้จ่ายด้วยตนเอง
4. ลำดับและรูปแบบของภาพ ให้เป็นไปตามลำดับที่ปรากฏในเนื้อหา
5. หากรูปภาพมีการแสดงมาตราวัด (scale) ให้ใช้เป็น scale bar กำกับไว้
6. คำอธิบายรูปภาพให้เขียนด้านล่าง โดยใช้รูปแบบเดียวกับที่ใช้ในเนื้อหา
7. เจ้าของบทความต้องแสดงเอกสารอนุญาตให้ใช้รูปภาพที่มีลิขสิทธิ์ด้วยทุกครั้ง



**Figure 1** PCR product from fresh bones. M indicates marker, P+ indicates a positive control and N is a negative control. D1-D4 refers to diaphysis, while E1-E4 refers to epiphysis.

ตัวอย่างการเขียนรูปภาพ

## ตาราง (Table)

1. ชื่อตารางและคำอธิบายในตารางให้ใช้ภาษาอังกฤษเท่านั้น
2. ลำดับและชื่อตารางให้เขียนไว้ด้านบนของตาราง
3. หลีกเลี่ยงการใช้เส้นตารางแนวตั้ง และใช้เส้นตารางในแนวนอนแบ่งเฉพาะหัวข้อและเนื้อหาเท่านั้น
4. คำอธิบายเพิ่มเติมควรกระทัดรัด และวางใต้ตาราง

Table 1 Primers used for OASL cloning.

Primers	Sequences
F-suis_E	5'-AGTCGAATTCATGGCTATTTATCAAACAT-3'
R-suis_N	5'-ATATGCGGCCGCATCATTGAAGCTATAAAG-3'
pGAP Forward	5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'
3'AOX1	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

#*EcoRI* and *NotI* restriction site are underlined.

### ตัวอย่างการเขียนตาราง

## เอกสารอ้างอิง (References)

การอ้างอิงในเนื้อเรื่องใช้ระบบนาม-ปี ทั้งนี้เอกสารอ้างอิงทั้งหมดต้องพิมพ์เป็นภาษาอังกฤษ หากเป็นเอกสารอ้างอิงภาษาอื่น ผู้เขียนต้องทำการแปลเป็นภาษาอังกฤษให้ถูกต้อง หากผู้เขียนใช้โปรแกรมจัดการเอกสารอ้างอิงเช่น Endnote, Reference manager หรือ Zotero จะช่วยให้ขั้นตอนในการตรวจเอกสารและเผยแพร่เร็วขึ้น **สามารถ download template ของ Endnote ได้จาก website ของเชียงใหม่สัตวแพทยสาร**

1. เอกสารอ้างอิงทุกรายการในเนื้อหาต้องมีรายการอ้างอิง
2. การอ้างอิงในเนื้อหาใช้ระบบชื่อและปีที่พิมพ์ เช่น “จากการศึกษาของ Toyoki (2010) ได้แสดงให้เห็นว่า” หรือ “สอดคล้องกับการศึกษาในสุนัข (Hirada, 2010) ม้า (Maki and Hida, 2011) ที่พบว่าระดับ”
3. การอ้างอิงผู้เขียนมากกว่า 2 คน ให้ใช้ชื่อคนแรก ตามด้วย et al. เช่น “พบว่าการแสดงออกของยีน Oct-4 สูงใน ตัวอ่อนระยะ blastocyst (Nganvongpanit et al., 2006)”
4. การเรียงเอกสารอ้างอิงให้เรียงตามตัวอักษร
5. เอกสารอ้างอิงโดยผู้เขียนคนเดียวกันและปีเดียวกันให้เรียง 2010a, 2010b
6. ในกรณีที่เอกสารอ้างอิงไม่เป็นภาษาอังกฤษให้แปลเป็นภาษาอังกฤษแต่ต้องได้รับความเห็นชอบจากเจ้าของบทความนั้นๆ
7. งานที่ได้ได้รับการเผยแพร่แล้วยังอยู่ในระหว่างการเตรียมให้ระบุตอนท้ายว่า "in press".
8. เอกสารอ้างอิงภาษาไทยหรือภาษาอื่น เช่น เยอรมัน จีน ญี่ปุ่น ผู้เขียนต้องทำการแปลเป็นภาษาอังกฤษให้ถูกต้อง และวงเล็บตอนท้ายว่า (in Thai, in German, in China, in Japan) ขึ้นกับภาษาของต้นฉบับนั้น
9. เอกสารที่ไม่ได้รับการเผยแพร่ ไม่นำมาใช้ในการอ้างอิง
10. เอกสารที่เผยแพร่ในรูปแบบ online ไม่มีการระบุเล่มและเลขหน้าให้ระบุหมายเลข Digital Object identifier (DOI)

11. การย่อของชื่อวารสารให้ยึดตาม Title Word Abbreviations: (<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-Itwa/>.)

12. ตัวอย่างการจัดเขียนเอกสารอ้างอิง

11.1. วารสารวิชาการฉบับปกติ

- Maneepitaksanti, W., Worananthakij, W., Sriwilai, P., Laoprasert, T., 2014. Identification and distribution of gill monogeneans from Nile tilapia and red tilapia in Thailand. Chiang Mai Vet. J. 12, 57–68.
- Tongkamsi, S., Singasa, K., Tubtim, T., Nakhubpa, K., Chansilpa, T., Kayee, S., 2015. Effects of storage time at 32.5°C on amount of *Bacillus cereus* in UHT milk for school in Chonburi province. Chiang Mai Vet. J. 13, 1–6. (in Thai)

11.2. เอกสารประชุมวิชาการ

Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R., Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), Bovine Tuberculosis. Vet. Microbiol. 40, 1–4.

11.3 หนังสือ

Armitage, P., Berry, G., 1987. Statistical Methods in Medical Research. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94–100, 411–416.

AUTHOR INFORMATION PACK 4 Oct 2015 [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic) 12

11.4 หนังสือเป็นบท

Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), The Ruminant Immune System, Plenum Press, New York, pp. 3–55.

## การตรวจการคัดลอกงาน (Plagiarism)

บทความที่ส่งตีพิมพ์เป็นภาษาอังกฤษทั้งหมดจะถูกตรวจการคัดลอกงานและความซ้ำซ้อนด้วยโปรแกรม Turn it in โดยกองบรรณาธิการและหากพบความซ้ำซ้อนที่บ่งบอกว่าอาจมีการจงใจคัดลอก กองบรรณาธิการสามารถปฏิเสธบทความดังกล่าวได้

## กำหนดการ (Timeline)

เชียงใหม่สัตวแพทยสารเป็นวารสารวิชาการที่เผยแพร่ผลงานวิชาการที่มีคุณภาพและใช้เวลาในการดำเนินการที่รวดเร็วโดยกำหนดว่า

- ระยะเวลาจากผู้เขียนส่งบทความต้นฉบับครั้งแรกจนถึงการตัดสินใจครั้งแรก ใช้เวลาเร็วที่สุด 3 สัปดาห์
- ระยะเวลาจากผู้เขียนส่งบทความต้นฉบับครั้งแรกจนถึงการเผยแพร่ในระบบออนไลน์ ใช้เวลาเร็วที่สุด 4 สัปดาห์

## การส่งต้นฉบับ (Manuscript Submission Guideline)

ผู้เขียนส่งบทความต้นฉบับเป็นแบบ PDF เท่านั้น (file ชนิด word จะส่งเมื่อได้รับการตอบรับให้เผยแพร่) ทาง email มายัง cmuvetj@gmail.com โดยประกอบไปด้วย 3 ไฟล์ ดังนี้

1 จดหมายนำ (Cover letter) จากผู้รับผิดชอบบทความยืนยันว่าผลงานนี้ไม่เคยได้รับการเผยแพร่มาก่อน รวมทั้งไม่อยู่ในระหว่างการพิจารณาของวารสารอื่น รวมถึงผู้เขียนสามารถแนะนำผู้ทรงคุณวุฒิเพื่อพิจารณาบทความ จำนวนไม่เกิน 4 ท่าน โดยขอให้ระบุ ชื่อ ที่ทำงาน และ E-mail) เพื่อให้ทางกองบรรณาธิการพิจารณาคัดเลือก ทั้งนี้ผู้ทรงคุณวุฒิต้องไม่มีชื่ออยู่ในบทความที่ส่งพิจารณา

2 ใบนำแรก (Title page)

3. ต้นฉบับ (Manuscript)

## รายการตรวจสอบก่อนส่งต้นฉบับ (Manuscript submission checklist)

- จดหมายนำ (Cover letter) (ต้องมี)
- แนะนำผู้ทรงคุณวุฒิ (Suggestion reviewers)
- ใบนำแรก (Title page) (ต้องมี)
- ต้นฉบับ (Manuscript) (ต้องมี)
- รูปแบบของเอกสารอ้างอิง (Reference format) และเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด (ต้องมี)
- รูปและตารางเป็นภาษาอังกฤษ ทั้งคำอธิบายและเนื้อหาในรูป/ตาราง (ต้องมี)

### หากมีข้อสงสัยติดต่อสอบถามได้ที่

กองบรรณาธิการ “เชียงใหม่สัตวแพทยสาร”

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ถนนเลียบคลองชลประทาน ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100

จดหมายอิเล็กทรอนิกส์: cmuvetj@gmail.com

โทรศัพท์. (66)-5394-8057, 8070

โทรสาร. (66)-5327-4710

หรือ

บรรณาธิการเชียงใหม่สัตวแพทยสาร

รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์

ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ถนนเลียบคลองชลประทาน ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100

จดหมายอิเล็กทรอนิกส์: korakot.n@cmu.ac.th

โทรศัพท์. (66)-5394-8057, 8046



เชียงใหม่สัตวแพทยศาสตร  
**Chiang Mai Veterinary Journal**

ISSN: 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website: <http://vet.cmu.ac.th/cmuj>



## Guide for Authors

### Objectives

“Chiang Mai Veterinary Journal” aims to be a publisher of a wide range of high quality academic journals such as original articles, review article, short communication, and case report in the field of veterinary science and animal science and technology, including biology, physiology, microbiology, pathology, nutrition, anatomy, genetics, internal medicine, surgery, obstetrics, biological science, basic science, and one health.

Articles that are published under our journal are double-blind peer reviewed by at least two experts. The opinions of each author might not be agreed upon by the editorial board. Any republication of a published article, or any part of published article (figure, table, etc.) must acquire permission from the editorial board of the Chiang Mai Veterinary Journal, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University even though the individual who submits the request is the author himself/herself.

### Online publication

After volume 14, year, 2016, Chiang Mai Veterinary Journal will end paper publication and will be published online only for prompt publication. This policy is in accordance with Thai-Journal Citation Index Center that supports online publication. Annually, the Journal publishes three issues: the 1<sup>st</sup> issue during January-April, the 2<sup>nd</sup> issue during May-August, and the 3<sup>rd</sup> during September-December. Pages are numbered according to the articles that are accepted for publication.

Articles accepted during January-April will be published in the 1<sup>st</sup> issue.

Articles accepted during May-August will be published in the 2<sup>nd</sup> issue.

Articles accepted during September-December will be published in the 3<sup>rd</sup> issue.

### Manuscript Format

**The original article** is a report of original research which has never been published by any publisher before. The article is composed of introduction, materials and methods, results, discussion, and conclusion.

**Review article** is an academic article that presents issues of interests or is academically useful.

**Short communication** is a concise study report due to the limits of the study but is complete in terms of content. The format is similar to the original thesis, but is a brief report instead.

**Case report** is a report of a rare case of ill animals that are thoroughly diagnosed. The topics include introduction, clinical history and symptoms, diagnosis and treatment, discussion, and conclusion. The case presentation is different from that in textbooks.

## Manuscript Preparation

The Chiang Mai Veterinary Journal welcomes Thai and English articles. Manuscripts must be hard-copy printout on A4 papers, single-sided. "Cordia New" font of 16-point type should be used along with double spacing between lines. Manuscripts written in Thai should refer to Thai language principles of the Royal Institute Dictionary (<http://www.royin.go.th>). For English words that have been translated to Thai by the Royal Society of Thailand, their Thai translations are encouraged with English words within a bracket in the first time that they are mentioned. Thai words should be used in the following times. For the words with no Thai translations, borrowed words are encouraged (please refer to Royal Institute Dictionary). If the author has considered that borrowed words would alter the original meaning, English words are allowed but at as least as possible.

Digital files of all the four types of manuscripts must compose of two separate files: title page and manuscript.

### Title Page

Title page is composed of the followings.

1. Title of the article in English and Thai language. The title should be concise and refers to the content of the article.
2. Name of author(s) in English and Thai language, position, workplace, correspondence address (company or organization, street, sub-district, district, province, and postal code).
3. Name of corresponding author in both English and Thai language, workplace (company or organization, street, sub-district, district, province, and postal code), telephone number, fax number, correspondence address, and email address.

### Original Manuscript

Original manuscript will be sent to reviewers and will not show name and address of all the author(s). It is composed of the followings.

1. Title in Thai and English language  
Title in Thai and English must be matched word-by-word.
2. Abstract in Thai and English language  
Abstract of the original article and a review article should not exceed 300 words (based on English abstract).  
Abstract of short communication and case report should not exceed 200 words (based on English abstract).
3. Keywords of 3-5 words must be listed below the abstract in Thai and English language.
4. Content

Original articles and short communication should comprise of the topics respectively as follows: introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgement, and references.

If there is any mathematical equation, "Microsoft equation editor" or "Math Type" software should be employed.

5. Figures and tables should be listed at the end of the article.
6. If animals were used in the study, permission to use animals for scientific study from the Animal Ethics Committee must be identified. The organization of the Committee, the date of the permit, and license number (if available) must be mentioned under the topic of materials and method.

## Figure

1. Figure captions and information in figures should be in English.
2. Digital files of figures should be in TIFF or JPEG format. (Original digital files will be requested when the manuscript is accepted for publication.)
3. Size of figures should be more than 480×640 pixels. The author is responsible for cost of colored print-out of figures.
4. Order and format of the figures should be in order as they appear in the content.
5. If figures display scale, scale bar must be accompanied.
6. Figure captions should be below the figure and in the same format as in the content.
7. The author must show document(s) giving permission to use licensed figure(s).

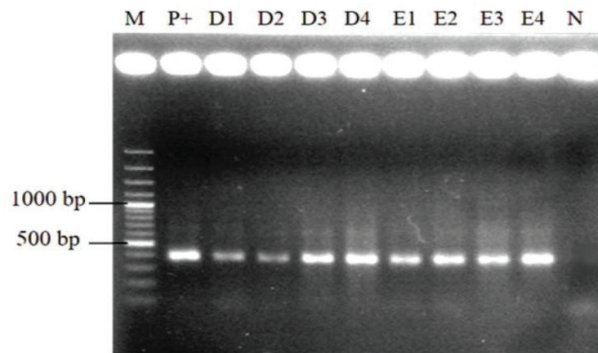


Figure 1 PCR product from fresh bones. M indicates marker, P+ indicates a positive control and N is a negative control. D1-D4 refers to diaphysis, while E1-E4 refers to epiphysis.

## Sample figure

## Table

1. Table caption and content in the tables must be in English only.
2. Numbers and table captions must be above tables
3. Vertical table lines should be avoided; horizontal lines should be used to separate topics from content.

Table 1 Primers used for OASL cloning.

Primers	Sequences
F- <i>suis</i> _E	5'-AGTC <u>GAA</u> TTCATGGCTATTTATCAAACAT-3'
R- <i>suis</i> _N	5'-ATAT <u>GCGGCCG</u> CATCATTGAACTCATAAAG-3'
pGAP Forward	5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'
3' <i>AOX1</i>	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

# *EcoRI* and *NotI* restriction site are underlined.

## Sample table

## References

The name-year system should be employed for in-text citations. All referenced documents should be in English. If referenced documents are in other languages, the author must translate them into English. Authors are welcome to use reference managers such as Endnote, Reference manager, or Zotero, which allow faster proofreading and publishing. **Endnote template is available for downloading from Chiang Mai Veterinary Journal's website.**

1. All in-text citations must have corresponding citations in the reference list.
2. The name - year system must be employed for in-text citations. For example, "Based on the study of Toyoki (2010), it was shown that..." or "... corresponding to the study in canines (Hirada, 2010), horse (Maki and Hida, 2011) which discovered the level...."
3. If citing more than one name of authors, the first author must be cited and followed by *et al.* For example, "... High level of Oct-4 gene expression was discovered in blastocyst (Nganvongpanit *et al.*, 2006)"
4. Reference list should be in alphabetical order.
5. References by the same author and same year of publication should be cited, for example, as 2010a, 2010b.
6. If referenced documents are not in English, they must be translated into English, but with permission of the authors of such documents.
7. Studies that have been published but are during preparation should be identified as "in press" at the end of the reference.
8. Referenced documents in Thai or other languages such as German, Chinese, Japanese must be translated into English. Their references must be followed by (in Thai, in German, in China, in Japan) depending on the language of the documents.
9. Studies that have not been published cannot be used as reference.
10. Studies that are published online without volume and page number must be identified by the Digital Object Identifier (DOI).
11. The title abbreviation must, in accordance with Title Word Abbreviations: ([http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-Itwa/.](http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-Itwa/))
12. Sample references
  - 11.1. Journals
    - Maneepitaksanti, W., Worananthakij, W., Sriwilai, P., Laoprasert, T., 2014. Identification and distribution of gill monogeneans from Nile tilapia and red tilapia in Thailand. *Chiang Mai Vet. J.* 12, 57–68.
    - Tongkamsi, S., Singasa, K., Tubtim, T., Nakbubpa, K., Chansilpa, T., Kayee, S., 2015. Effects of storage time at 32.5 °C on amount of *Bacillus cereus* in UHT milk for school in Chonburi province. *Chiang Mai Vet. J.* 13, 1–6. (In Thai)
  - 11.2. Conference reports  
Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R., Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 1–4.
  - 11.3 Books  
Armitage, P., Berry, G., 1987. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94–100, 411–416.  
AUTHOR INFORMATION PACK 4 Oct 2015 [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic) 12
  - 11.4 Chapters from book  
Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), *The Ruminant Immune System*, Plenum Press, New York, pp. 3–55.



## Plagiarism

English articles submitted for publication will be checked for plagiarism with Turn it in software by the editorial board. If any duplication that might indicate plagiarism is detected, the editorial board might reject the article.

## Timeline

The Chiang Mai Veterinary Journal is a publisher of high quality academic journals and has fast proceedings. The process timeline is as follows.

- Time of proceedings from manuscript submission until the initial decision is at least 3 weeks.
- Time of proceedings from manuscript submission until online publication is at least 4 weeks.

## Manuscript Submission Guideline

The author must submit digital files of the article in PDF format (Word files can be submitted after acceptance for publication.) via email at [cmuvetj@gmail.com](mailto:cmuvetj@gmail.com). The submission must include the followings.

1. Cover letter from the corresponding author, assuring that the article has never been published before and also not in consideration of other publishers. The author can suggest a list of no more than four reviewers with their names, company/organization, and email for the editorial board's consideration. The list of reviewers must not be shown in the submitted manuscript.
2. Title page
3. Manuscript

## Manuscript submission checklist

- Cover letter (Obligatory)
  - Suggestion of reviewers
  - Title page (Obligatory)
  - Manuscript (Obligatory)
  - Reference format in English (Obligatory)
  - Figures and tables in English, including captions and content in figures and tables (Obligatory)
-





**The Faculty of Veterinary Medicine  
Chiang Mai University**

---

**Address : Mae Hia, Muang, Chiang Mai, 50100  
Thailand**

**Website : <http://www.vet.cmu.ac.th/cmuj>**

**Email : [cmuvtj@gmail.ac.th](mailto:cmuvtj@gmail.ac.th)**