บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันปรสิตในเลือดที่สำคัญของสุนัขที่อาศัยอยู่ในเขตร้อนคือ พยาธิหนอนหัวใจ *(Dirofilaria sp.)* เป็นปรสิตที่มีความสำคัญทางคลินิกเนื่องจากเป็นภัยคุกคามต่อชีวิตสุนัขซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงที่มีความใกล้ชิดกับมนุษย์ โดยเฉพาะกลุ่มประเทศที่อยู่ในพื้นที่เขตร้อนและกึ่ง-ร้อน โรคพยาธิหนอนหัวใจเป็นโรคปรสิตที่เกิดจากพยาธิตัวกลมในกลุ่มฟิลาเรีย ชื่อ *Dirofilaria immitis (D. immitis)* เป็นพยาธิที่จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Filaridae เช่นเดียวกับพยาธิในสกุล Brugia และ Wuchereria ซึ่งเป็นพยาธิที่เป็นสาเหตุของโรคเท้าช้างในคน พยาธิหนอนหัวใจทำให้เกิดการป่วย การเปลี่ยนแปลงของค่าเม็ดเลือด ค่าเคมีเลือดและอาจทำให้สุนัขและแมวเสียชีวิตได้ พยาธิชนิดนี้มียุงเป็นพาหะนำโรค พยาธิตัวเต็มวัยซึ่งอาศัยอยู่ในสัตว์เลี้ยงจะปล่อยตัวอ่อนที่เรียกว่าไมโครฟิลาเรีย (Microfilaria) เข้าสู่กระแสเลือด เมื่อยุงมาดูดเลือดของสัตว์ก็จะได้รับไมโครฟิลาเรียเข้าไป หลังจากนั้นไมโครฟิลาเรียจะเจริญเติบโตและพัฒนาจนกลายเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 (L3) ซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะติดต่อของโรคเมื่อยุงที่ติดเชื้อมาดูดเลือดสัตว์เลี้ยง ตัวอ่อนระยะที่ 3 นี้จะเคลื่อนที่ออกจากปากของยุง เข้าสู่ชั้นใต้ผิวหนังของสัตว์เลี้ยงหลังจากนั้นจะเคลื่อนที่ไปสู่หลอดเลือดแดงพัลโมนารี (Pulmonary artery) ซึ่งเป็นที่สำหรับพัฒนา เจริญเติบโตและอยู่อาศัยจนกลายเป็นพยาธิตัวเต็มวัย (Bowman, 2009) นอกเหนือจากการก่อโรคในสัตว์แล้ว พยาธิหนอนหัวใจยังทำให้เกิดการติดเชื้อในคน แต่มักไม่ก่อให้เกิดอาการรุนแรงและติดสู่คนโดยบังเอิญ (incidental host) มีหลายประเทศได้รายงานการติดพยาธิหนอนหัวใจในคน เช่น สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น บราซิล เป็นต้น (Thesis, 2005; Miyoshi et al., 2006; Milanez de Campos et al., 1997) และมีรายงานในประเทศไทย ว่า พบตัวอ่อนของพยาธิหนอนหัวใจจากก้อนเนื้อในปอดจากการผ่าชันสูตรศพ (Sukpanichnant et al., 1998)

จากรายงานการเกิดโรคในคน เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าผู้ป่วยมักอยู่ในแหล่งเดียวกับการระบาดของโรคในสุนัข (Lee et al., 2010; Thesis., 2005) รายงานด้านระบาดวิทยาของโรคพยาธิหนอนหัวใจในประเทศไทยส่วนใหญ่มักเป็นการศึกษาในสุนัข (ดูเนื้อหาเพิ่มเติมในส่วนระบาดวิทยา) ส่วนการศึกษาในแมวนั้นยังมีงานวิจัยไม่มากนัก (Litster and Nilkumhang, 2003; Nuchprayoon et. al., 2006; Sukhumavasi et al., 2012) โดยล่าสุดพบความชุกของการติดพยาธิหนอนหัวใจในแมวในกรุงเทพฯ จำนวน 4.6% (34/746) (Sukhumavasi et al., 2012) แมวไม่สามารถแพร่กระจายโรคพยาธิหนอนหัวใจไปยังโฮสต์อื่นได้ เนื่องจากมีจำนวนไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดน้อยมากหรือไม่มี (Amicrofilaria) และมีอาการที่

แตกต่างจากในสุนัข (Litster and Atwell, 2008; Bowman and Atkins, 2009) ดังนั้นบทความนี้ผู้เขียนจะขอกล่าวโดยเน้นโรคพยาธิหนอนหัวใจในสุนัขเป็นหลัก

การตรวจวินิจฉัยพยาธิหนอนหัวใจในสุนัขสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) เป็นการตรวจหาตัวอ่อนของพยาธิหนอนหัวใจในเลือด ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายใช้เวลาน้อยและราคาถูก แต่ข้อเสียคือมีความไวต่ำ (Low sensitivity) เนื่องจากใช้เลือดปริมาณน้อยในการตรวจจึงมีโอกาสได้ผลลบเทียม และในปัจจุบันมีการตรวจวินิจฉัยพยาธิหนอนหัวใจด้วยชุดทดสอบ Snap 4Dx ที่เป็นที่นิยมในการใช้ตรวจหาปรสิตในเลือดที่มีความสะดวกรวดเร็ว ใช้เวลาเพียงแค่ 10 นาที ในการตรวจแต่ว่ามีบางกรณีที่พบว่าการตรวจหาปรสิตด้วยชุดทดสอบ Snap 4Dx นั้นมีข้อผิดพลาดด้วยการที่ว่าในชุดทดสอบ Snap 4Dx นั้นตรวจไม่พบปรสิตในเลือดเมื่อเทียบกับตรวจหาปรสิตด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์ที่ตรวจพบปรสิตในเลือด และมีข้อเสียคือมีความไม่จำเพาะ นอกจากนั้นชุดทดสอบ Snap 4Dx จะตรวจหาเฉพาะแอนติเจนที่อยู่บนตัวเมียเท่านั้น แต่ในขณะเดียวกันการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของพยาธิ ซึ่งมีความจำเพาะ และความไวสูงขึ้น มีค่าใช้จ่ายสูง วิธีการตรวจซับซ้อน ต้องอาศัยความชำนาญของเจ้าหน้าที่ และทำในห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน จึงเป็น ข้อจำกัดในการนำไปใช้ทางคลินิกแต่จุดเด่นของวิธีนี้คือสามารถยืนยันการจำแนกชนิดพยาธิได้ในระดับชีวโมเลกุล ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย มีประสิทธิภาพและความแม่นยำสูงในการตรวจหาปรสิตในเลือด

การศึกษางานวิจัยในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของชุดทดสอบ Snap 4Dx ในการหาตรวจหาพยาธิหนอนหัวใจในสุนัขและจะทำการยืนยันผลด้วยวิธีเทคนิค PCR เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของชุดทดสอบ Snap 4Dx

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ Snap 4DX ในการตรวจหาพยาธิหนอนหัวใจในสุนัขเมื่อเทียบกับผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR

1.3 ตัวแปร

ตัวแปรต้น : ชุดทดสอบ Snap 4DX

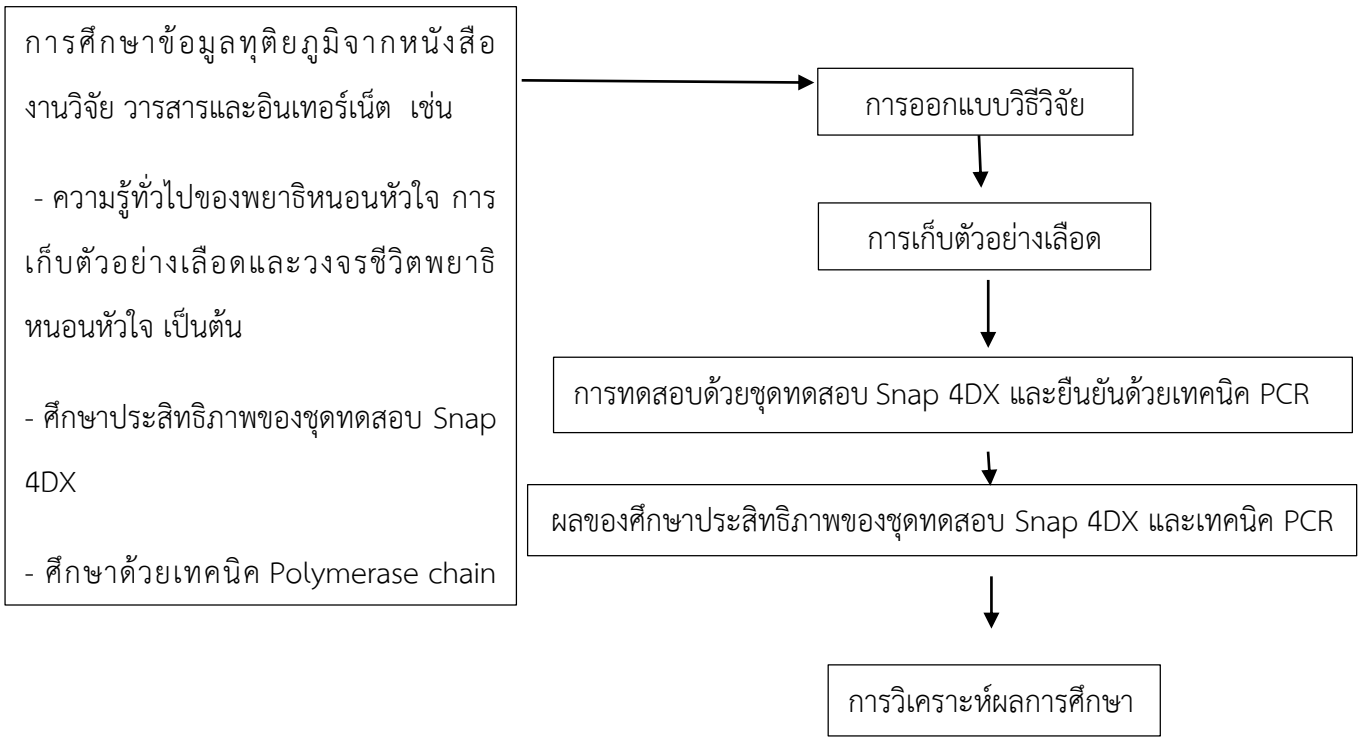
ตัวแปรตาม : ประสิทธิภาพของชุดทดสอบในการตรวจหาพยาธิหนอนหัวใจในสุนัข

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงประสิทธิภาพของชุดทดสอบ Snap 4DX เมื่อเทียบกับการตรวจด้วยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) และสามารถใช้เป็นข้อมูลให้กับสัตวแพทย์ได้

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

ผู้วิจัยได้กำหนดขอบเขตการวิจัยไว้ดังนี้



1.6 นิยามศัพท์ที่ใช้ในการวิจัย

1.6.1 Heartworms พยาธิหนอนหัวใจในสุนัข หรือ พยาธิหนอนหัวใจ ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Dirofilaria immitis* เป็นพยาธิตัวกลมแบบฟิลาเรียชนิดหนึ่งซึ่งมียุงเป็นพาหะ โฮสต์แท้ของพยาธิชนิดนี้คือสุนัข แต่ก็สามารถติดแมว สุนัขป่า สุนัขจิ้งจอก ไคโยตี้ และสัตว์อื่นๆ เช่น เฟอร์เร็ต สิงโตทะเล หรือแม้แต่มนุษย์ได้ แม้จะพบน้อย (ที่มา : กองบรรณาธิการ HONESTDOCS)

1.6.2 ชุดตรวจ Snap 4DX (SNAP 4Dx Plus Test Kit) สำหรับการตรวจหาพยาธิในเม็ดเลือด 3 ชนิด ได้แก่ พยาธิหนอนหัวใจ *Dirofilaria immitis* พยาธิในเม็ดเลือด *Ehrlichia canis* พยาธิในเม็ดเลือด *Anaplasma platys* และพยาธิในเม็ดเลือดที่ก่อให้เกิด Lyme Disease ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำสูงและสะดวกรวดเร็ว สามารถทราบผลภายใน 10 นาที (ที่มา : www.idexx.com)

1.6.3 แอนติเจน (Antigen) คือ สิ่งแปลกปลอมต่อเนื้อเยื่อร่างกาย เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะกระตุ้นร่างกายให้สร้างแอนติบอดี และแอนติเจนนั้นต้องทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดี หรืออาจกล่าวว่า แอนติเจนเป็นสารใด ๆ ที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะเจาะจง (ที่มา : นพ.ชนินันท์ สนธิไชยและคณะ ,2560)

1.6.4 แอนติบอดี (Antibody) คือ โปรตีนที่ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของสิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นมา เพื่อกำจัดและทำลายแอนติเจนซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์ 4 เส้น วางเรียงกันเป็นรูปตัว Y ส่วนใหญ่สร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบีลิมโฟไซต์ แอนติบอดีแต่ละตัวนั้นจะมีปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติเจนแต่ละชนิดที่มากระตุ้นเท่านั้น (ที่มา : นพ.ชนินันท์ สนธิไชยและคณะ,2560)

1.6.5 Polymerase chain reaction เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) มีชื่อเต็มว่าเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมคือดีเอ็นเอ ให้มีปริมาณมากเป็นล้านเท่า ในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ ที่มีการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่อีกหนึ่งสายจากดีเอ็นเอเดิม (ที่มา : ดร. อารีย์รัตน์ หนูนวล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์,2561)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาเรื่อง ศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบ Snap4DX ในการตรวจหาพยาธิหนอนหัวใจในสุนัขสามารถรวบรวมเอกสารเกี่ยวกับผลงานวิจัย ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

สมบูรณ์ แสงมณีและคณะ (2545) ได้ศึกษาความชุกของปรสิตในเลือดสุนัขระหว่างมกราคม 2537 ถึงธันวาคม 2544 จากตัวอย่างเลือดที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลสัตว์คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่นรวม 3, 898 ตัวอย่าง ปรสิตในเลือดที่ตรวจพบมี 5 ชนิด คือ พยาธิหนอนหัวใจ (*Dirofitaria immitis*), *Hepatozoon sp* , *Trypanosome sp*, *Babesia sp*.และ *Ehrtichia sp*. โดยสุนัขมีการติดพยาธิเหล่านี้โดยเฉลี่ยต่อปีคิดเป็นร้อยละ 18.09, 7.08, 1.33, 1.13 และ 0.87 ตามลำดับ และการติดพยาธิของสุนัขที่ให้ผลบวกต่อการตรวจเลือดเมื่อจำแนกตามชนิดของพยาธิโดยเฉลี่ยต่อปีคิดเป็นร้อยละ 64. 13, 24, 44, 4, 60, 3. 78 และ 3. 05 ตามลำดับผลการศึกษาพบว่าสุนัขมีการติดพยาธิหนอนหัวใจ *Hepatozoon sp Trypanosoma sp* ,*Babesia sp.* และ *Ehrtichia sp.* ตลอดทั้งปีและมีเพียง *Trypanosoma sp.* ที่มีแนวโน้มรูปแบบของการติดพยาธิค่อยๆเพิ่มขึ้นเป็นวงจรในทุกๆ 3-4 ปีและสุนัขมีอัตราการติดพยาธิ *Trypanosoma sp*. สูงในช่วงเดือนสิงหาคมถึงธันวาคมของแต่ละปี

พิชิต อึ่งทองและคณะ (2553) ได้กล่าวถึงโรคพยาธิหนอนหัวใจเป็นโรคหนึ่งที่สำคัญในสุนัขมีผลทำให้เกิดภาวะหัวใจล้มเหลวและความผิดปกติของระบบไหลเวียนเลือดเป็นผลต่อการดำเนินชีวิตและสุขภาพของสุนัขที่แย่ลงการศึกษาครั้งนี้เพื่อหาความชุกของการติดตัวอ่อนของพยาธิหนอนหัวใจจากยุงในสุนัขอำเภอห้วยกระเจาจังหวัดกาญจนบุรีโดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากสุนัขจำนวน 145 ตัวทำการตรวจเลือดด้วยวิธีการย้อมสี Modified Wright-Giemsa และส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าสุนัขมีการติดตัวอ่อนของพยาธิหนอนหัวใจคิดเป็นร้อยละ 6. 43 (9/145) พยาธิที่พบคือ *Dirofilaria immitis*

สถาพร จิตตปาลพงศ์และคณะ (2558) ได้ศึกษาโรคพยาธิหนอนหัวใจ (*Dirofilaria immitis*) เป็นโรคที่นำโดยยุงและพบโรคมีการแพร่กระจายส่วนใหญ่ในสุนัข โรคพยาธิหนอนหัวใจ จัดว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญในสัตว์เลี้ยงเป็นโรคที่มีการระบาดแพร่หลายในหลายๆพื้นที่ของกรุงเทพมหานครและบริเวณใกล้เคียงโดยธรรมชาติแมวจะไม่ค่อยติดเชื้อพยาธิหนอนหัวใจได้ง่าย เหมือนใน สุนัข แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบโรคนี้ในแมวมีความถี่มากขึ้นจำนวนของประชากรสุนัขและแมวที่ไม่มีเจ้าของในกรุงเทพมหานครมีจำนวนเพิ่มขึ้น และส่งผลต่อความปลอดภัยในด้านสุขภาพของประชาชนมากขึ้น โดยเฉพาะที่เกี่ยวข่องกับโรค

สัตว์สูคน นอกจากนี้พาหะที่สำคัญของโรคนี้ ได้แก่ ยุงที่พบอยู่โดยทั่วไปซึ่งจะนำโรคไปสู่สัตว์หรือนำโรคจากสัตว์ที่เป็นแหล่งพักโรค โดยเฉพาะในพวกสัตว์ที่ไมมีเจ้าของจากปัจจัยดังกล่าวบ่งชี้ว่า สุนัขและแมวในกรุงเทพมหานคร มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อพยาธิหนอนหัวใจ จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อทำการสำรวจหาระยะตัวอ่อน (Microfilaria) ในเลือดของสุนัขและแมวที่ไมมีเจ้าของในเขตต่างๆ ของกรุงเทพมหานครทำการเก็บตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 598 ตัวอย่างจาก 41 เขต และเลือดสุนัข 475 ตัวอย่าง จาก 38 เขต ทำการตรวจด้วยวิธี Modified Knott's technique ผลการตรวจวินิจฉัย พบว่า ความชุกของการติดพยาธิหนอนหัวใจ ในสุนัขคิดเป็นร้อยละ 13.9 และในแมวร้อยละ 0.3 พื้นที่ของการติดพยาธิหนอนหัวใจในสุนัขพบมากกว่าร้อยละ 73 ขณะที่พบในแมวเพียงร้อยละ 4.9 จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าสุนัขที่ไมมีเจ้าของมีความเสี่ยงในการติดพยาธิ *Dirofilaria immitis* สูงในเขตกรุงเทพมหานคร การใช้ยาป้องกันพยาธิหนอนหัวใจในสัตว์ที่มีเจ้าของจะช่วยลดการติดพยาธิหนอนหัวใจและลดการนำโรคในสัตว์ที่อาจเป็นตัวเก็บกักโรค

Ketsarin Kamyingkirda (2017) เพื่ออัพเดทการติดเชื้อไมโครฟิล์มในสัตว์เลี้ยงการศึกษาครั้งนี้กำหนดความชุกและปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ Microfilaria ในสุนัขและแมวที่รวบรวมจาก 8 อำเภอในจังหวัดสงขลาและสตูลทางตอนใต้ของประเทศไทย รวมทั้งหมด 482 ตัวอย่าง (394 สุนัขและ 88 แมว) ได้รับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ME) ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) และการวิเคราะห์ลำดับ ความชุกโดยรวมของการติดเชื้อ microfilaria ในสุนัขและแมวคือ 24.1% (95/394) และ 36.4% (32/88) โดยใช้ PCR ตามลำดับ นอกจากนี้ผลลัพธ์โดยรวมยังเป็นบวก 7.7% (37/482) เมื่อใช้ ฟME เทียบกับ 26.3% (127/482) โดยใช้ PCR การวิเคราะห์ลำดับของผลิตภัณฑ์ PCR เชิงบวกทั้งหมดระบุ Microfilaria เป็น *Dirofilaria immitis* การติดเชื้อ *Dirofilaria immitis* ในแต่ละอำเภอของจังหวัดสงขลาและสตูลนั้นอยู่ในช่วง 0–48% สำหรับสุนัขและในช่วง 15.4-75% สำหรับแมว การวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงพบว่ามีการติดเชื้อ *Dirofilaria immitis* ในสุนัขที่มีอายุมากกว่า 2 ปีอย่างมีนัยสำคัญ

Manusvee Kaikuntod (2018) Filariasis เป็นปัญหาสาธารณสุขในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนทำให้เกิดโรคระบาดที่พบได้ทั่วไปในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หนอน filarial ที่พบมากที่สุดในสุนัขในภูมิภาคนี้คือ *Dirofilaria immitis* โดยมีอัตราการติดเชื้ออยู่ระหว่าง 1-46% ในปี 2560 ความชุกของสุนัขที่ติดเชื้อ *Dirofilaria immitis* ในสงขลาและสตูลประเทศไทยอยู่ที่ 24.1% นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อของ *Brugia malayi* ในสุนัขและมนุษย์ในมาเลเซียบรูไนอินโดนีเซียเวียดนามกัมพูชาและฟิลิปปินส์ และประเทศไทย ในปี 2554 การติดเชื้อ *Brugia malayi* ในมาเลเซียอยู่ที่ 36.20% มีรายงานการติดเชื้อหนอน filarial ชนิดอื่นได้แก่ *Dirofilaria repens*, *Brugia pahangi* และ *Acanthocheilonema reconditum* ในสุนัขในภูมิภาคนี้รวมทั้งประเทศไทย หนอน Filarial มีทั้งที่ทำให้เกิดโรคและไม่ใช่ที่ทำให้เกิดโรค สปีชีส์บางชนิดเช่น

Dirofilaria immitis ก่อให้เกิดโรคหัวใจที่เป็นอันตรายต่อโฮสต์ของพวกเขาและนำไปสู่การติดเชื้อสัตว์จากสัตว์สู่คนในโฮสต์โดยไม่ได้ตั้งใจซึ่งเป็นหลักฐานในรายงานก่อนหน้านี้ของรอยโรคปอดในมนุษย์ แม้ว่า *Brugia malayi* ส่วนใหญ่เป็นสาเหตุของเท้าช้างในมนุษย์การติดเชื้อยังพบได้ในสัตว์ในอ่างเก็บน้ำ บทความนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับโรคเท้าช้างโดยมุ่งเน้นไปที่การจำแนกประเภทชีววิทยาและวงจรชีวิตของหนอน filarial ระบาดวิทยาของหนอน filarial ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อาการทางคลินิกและการวินิจฉัยโรคเท้าช้าง การทบทวนนี้คาดว่าจะนำไปสู่กลยุทธ์การควบคุมและป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

2.1 ข้อมูลเกี่ยวกับพยาธิหนอนหัวใจ

พยาธิหนอนหัวใจในสุนัข หรือ พยาธิหนอนหัวใจ ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Dirofilaria immitis* เป็นพยาธิตัวกลมแบบฟิลาเรียชนิดหนึ่งซึ่งมียุงเป็นพาหะ โฮสต์แท้ของพยาธินี้คือสุนัข แต่ก็สามารถติดแมว สุนัขป่า สุนัขจิ้งจอก โคโยตี้ และสัตว์อื่นๆ เช่น เฟอร์เร็ต สิงโตทะเล หรือแม้แต่มนุษย์ก็สามารถติดได้แม้จะพบน้อย

2.1.1 การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์

อาณาจักร : Animalia

อาณาจักรย่อย: Magnoliophyta

ไฟลัม : Nematoda

ชั้น: Secernentea

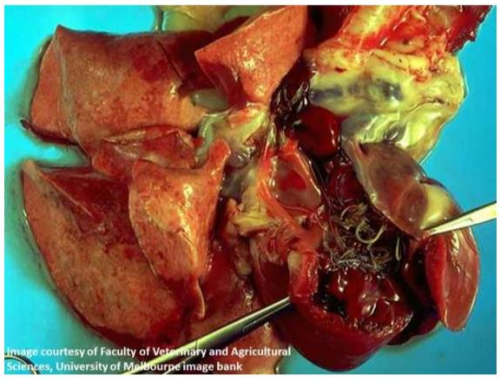
ชั้นย่อย: Spiruria

อันดับ: Spirurida

วงศ์: : Onchocercidae

สกุล: Dirofilaria

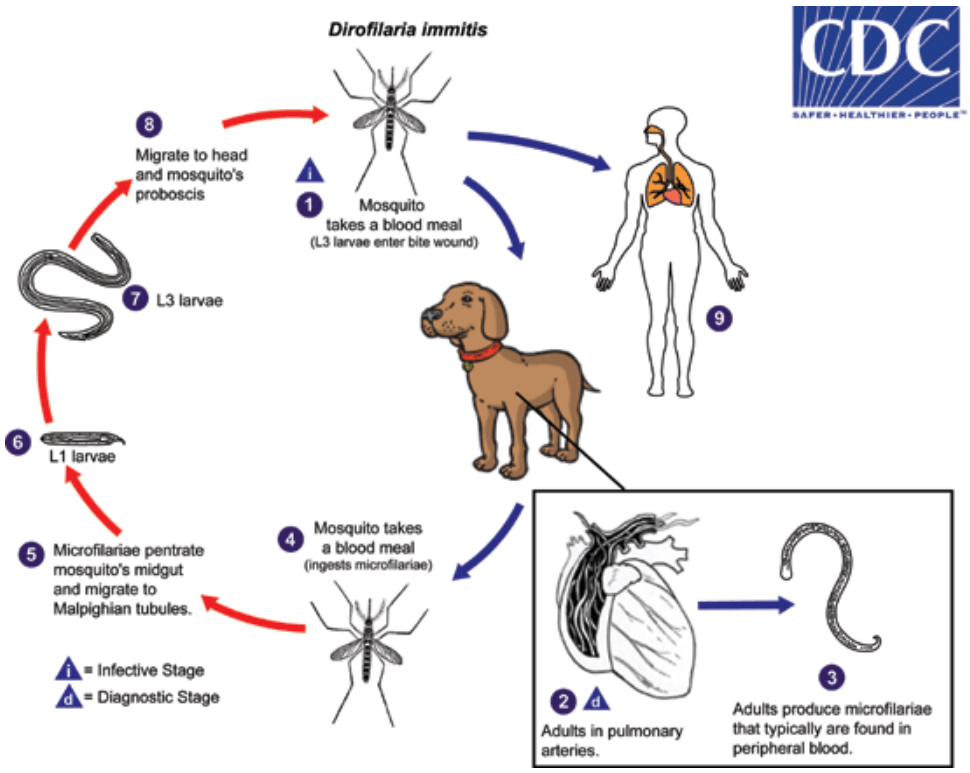
สปีชีส์: D. *immitis*



รูปที่1 พยาธิหนอนหัวใจ
(ที่มา: คลังภาพปรสิตของ University of Melbourne parasite)

โรคพยาธิหนอนหัวใจ (heartworm disease, dilofiriasis) เกิดจากการได้รับเชื้อพยาธิหนอนหัวใจที่ชื่อว่า *Dilofilaria immitis* ซึ่งเป็นหนอนพยาธิตัวกลมชนิดหนึ่งที่พบวามีพาหะเป็นยุง โดยตัวอ่อนของหนอนพยาธิจะอยู่ในร่างกายสุนัขตัวหนึ่ง เมื่อยุงมาดูดเลือดสุนัข ก็จะเอาตัวอ่อนเข้าไปพัฒนาในตัว และตัวเต็มวัยก็จะถูกปล่อยออกมาพร้อมน้ำลายเมื่อยุงไปดูดสุนัขอีกตัวหนึ่ง เมื่อพยาธิหนอนหัวใจ เมื่อพยาธิหนอนหัวใจโตเต็มที่ก็จะเข้าไปอาศัยอยู่ในห้องหัวใจและหลอดเลือดใกล้เคียง เป็นผลให้การทำงานของหัวใจไป เกิดภาวะความดันเลือดในปอดสูงขึ้น (pulmonary hypertension) และตัวอ่อนในกระแสเลือดยังก่อให้เกิดความเสียหายต่อเลือดได้อีกด้วย นอกจากนี้ *Dilofilaria immitis* ยังมาพร้อมๆกับแบคทีเรียที่อยู่ด้วยกันที่ชื่อว่า *Wolbachia sp.* ซึ่งก่อให้เกิดภาวะปอดอักเสบอย่างรุนแรงร่วมด้วย จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าโรคพยาธิหนอนหัวใจเป็นโรคที่ติดต่อได้ง่าย หากสุนัขไม่ได้รับการป้องกันพยาธิหนอนหัวใจอย่างต่อเนื่องก็มีโอกาสเป็นโรคได้ทันที

2.2 วงจรชีวิตของพยาธิหนอนหัวใจ



รูปที่2 วงจรชีวิตพยาธิหนอนหัวใจ

ที่มา: www.cdc.gov.com

วงจรชีวิตของพยาธิหนอนหัวใจ แบ่งออกเป็น 4 ระยะใหญ่ๆ คือ

ระยะที่ 1 แพร่โดยยุงจะนำตัวอ่อนของพยาธิหนอนหัวใจมาสู่สุนัข จากการที่ยุงไปกัดสุนัขที่ป่วยเป็นโรคนี้ ซึ่งตัวอ่อนของพยาธิหนอนหัวใจจะเข้าสู่ตัวยุงผ่านเลือดของสุนัข ดังนั้นในระยะนี้ทำให้ยุงเป็นพาหะนำโรคพยาธิหนอนหัวใจโดยสมบูรณ์

ระยะที่ 2 ระยะฟักตัวในยุง ตัวอ่อนของพยาธิหนอนหัวใจจะฟักตัวอยู่ในยุงประมาณ 2-3 สัปดาห์

ระยะที่ 3 ตัวอ่อนในสุนัขยุงที่มีตัวอ่อนพยาธิหนอนหัวใจจะไปกัดสุนัข จากนั้นตัวอ่อนของพยาธิหนอนหัวใจจะเข้าสู่ตัวสุนัข ชอนไชผ่านเนื้อเยื่อ จนไปถึงหัวใจและปอด

ระยะที่ 4 ระยะโตเต็มวัย พยาธิหนอนหัวใจจะเติบโตเต็มวัยในหัวใจและปอด และจะเริ่มแพร่พันธุ์ตัวอ่อนไปในกระแสเลือดของสุนัข จากนั้นเมื่อยุงมากัดสุนัขที่ป่วยเป็นโรคยุงก็จะกลายเป็นพาหะ

2.3 อาการ

อาการของโรคสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระดับ ระดับที่ 1 จะยังไม่แสดงอาการใดๆ การทำงานของหัวใจอาจจะยังปกติอยู่ก็ได้ แต่พบการปรากฏของหนอนพยาธิในห้องหัวใจหรือหลอดเลือดที่ไปปอด (Pulmonary artery) แล้ว ระดับ 2 จะเริ่มแสดงอาการผิดปกติของหัวใจโดยส่วนใหญ่จะทำให้เกิดภาวะหัวใจฝั่งขวาล้มเหลว (Right-sided congestive heart failure) แต่ยังไม่รุนแรงมากนัก อาจจะพบการเพิ่มขึ้นของความดันในระบบเลือดปอด ซึ่งก่อให้เกิดอาการไอ ร่วมกับภาวะท้องมาน ตับโต เป็นต้น ระดับ3 จะเริ่มมีอาการของการถ่ายปัสสาวะสีแดง ซึ่งเป็นสีของ Hemoglobin ทั้งนี้เนื่องจากตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของ พยาธิหนอนหัวใจจะไปเฉือนเม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดแล้วทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ได้ Hemoglobin ในเลือดปริมาณมากจึงถ่ายปัสสาวะออกมาเป็นสีแดงด้วย และอาจพบภาวะโลหิตจางด้วยเช่นกัน ส่วนระดับ 4 หรือระดับสุดท้าย จะเรียกว่า Caval syndrome หรือเกิดการอุดตันของหลอดเลือดดำใหญ่ Vena cava คือ ปริมาณของพยาธิหนอนหัวใจเยอะมากจนเบียดกันเต็มห้องหัวใจทั้งหมด ส่งผลให้เกิดภาวะหัวใจวายรุนแรง มีอาการไอ เหนื่อยง่าย หายใจลำบาก เป็นลม และอาจรุนแรงถึงชีวิตได้

2.4 ข้อมูลเกี่ยวกับ Snap 4DX Plus Test

Snap 4Dx คือ ชุดตรวจนี้จะใช้ในการตรวจโรคปรสิตในเลือดของสุนัข คือ

1. พยาธิหนอนหัวใจ *Dirofilaria sp*.
2. พยาธิในเม็ดเลือด *Ehrlichia sp.*
3. พยาธิในเม็ดเลือด *Anaplasma sp.*
4. เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Borrelia burgdorferi* ที่ก่อให้เกิด Lyme Disease

ชุดทดสอบ SNAP 4Dx

ชุดตรวจ Snap 4DX (SNAP 4Dx Plus Test Kit) สำหรับการตรวจหาพยาธิในเม็ดเลือด 4 ชนิด ได้แก่ พยาธิหนอนหัวใจ *Dirofilaria sp*. พยาธิในเม็ดเลือด *Ehrlichia sp.* พยาธิในเม็ดเลือด *Anaplasma sp*. และเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Borrelia burgdorferi* ก่อให้เกิด Lyme Disease ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำสูงและสะดวกรวดเร็ว สามารถทราบผลภายใน 8 นาที

รูปที่3 Snap4dx

ที่มา : www.idexx.com

รูปที่4 Snap4DX

ที่มา : www.idexx.com

รูปที่5 Snap4dx

ที่มา : www.idexx.com

รูปที่6 หลอดเก็บตัวอย่าง

ที่มา : www.idexx.com

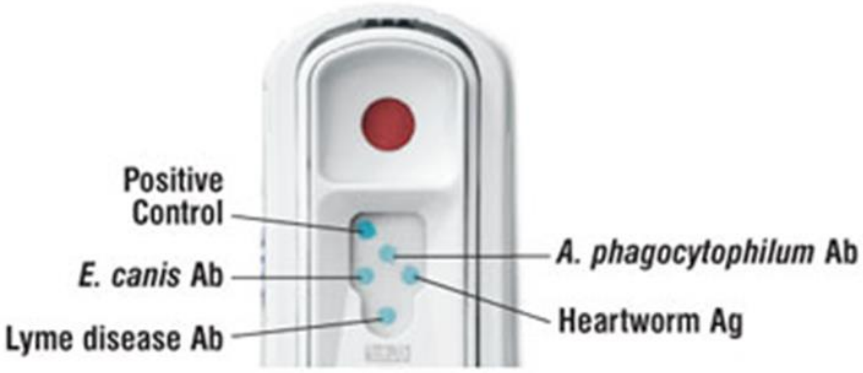
การเก็บตัวอย่างสำหรับการตรวจด้วยชุดตรวจ Snap4DX

1) ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจ คือ เซรั่ม พลาสม่าหรือเลือดจากหลอดEDTA

2) การเก็บรักษาตัวอย่างควรเก็บอยู่ที่อุณหภูมิห้อง 18-25 ° C ก่อนเริ่มทดสอบ

การอ่านผลการทดสอบ

เมื่อได้รับการตรวจโดยใช้ชุดตรวจ Snap 4Dx แล้วการตรวจด้วยวิธีนี้พบว่าผลเป็น บวก(+)หรือ positive นั่นก็หมายถึงว่า สุนัขมีการติดเชื้อ ส่วนที่ไม่มีจุดขึ้น หรือ เป็นลบ(-) หรือ negative นั่นหมายถึงว่า สุนัขไม่มีการติดเชื้อ หรืออาจจะแปลได้ว่าสุนัขอาจมีการติดเชื้อน้อยกว่า 6 เดือน ต้องมีการติดเชื้อมากกว่า 6-7 เดือน เนื่องจากว่าชุดตรวจ Snap4Dx เป็นชุดตรวจที่ตรวจหาพยาธิหนอนหัวใจระยะที่ 4 หรือตัวเต็มวัยและเป็นเพศเมียเท่านั้น ดังนั้นจะไม่สามารถตรวจหาพยาธิหนอนหัวใจที่เป็นระยะที่ 1- ระยะที่ 3 ได้



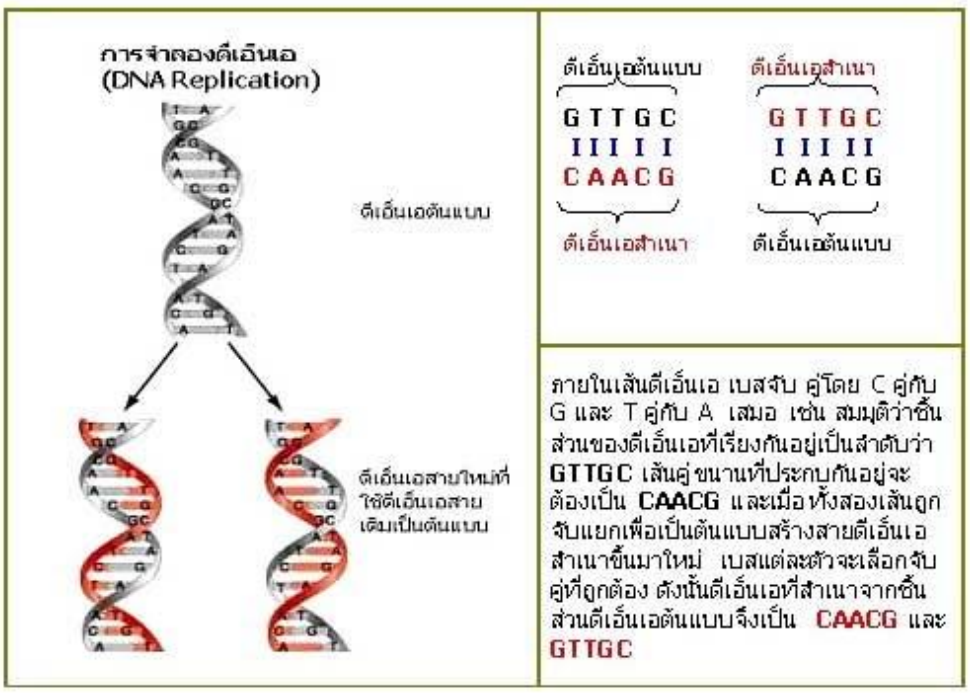
รูปที่7 Snap4dx

ที่มา : www.idexx.com

2.5 เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis และคณะ แห่งบริษัท Cetus Corporation ข้อดีของเทคนิคนี้คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานน้อย และใช้เวลาไม่นาน PCR เป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมาก โดยสามารถนำไปใช้ได้กับงานวิจัยทางชีวโมเลกุล และพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้าง DNA probe และการวิจัยประยุกต์ เช่น การสร้างยีนกลายพันธุ์ (PCR based mutagenesis) การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของโรค เป็นต้น (ที่มา : www.barascientific.com)

เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) มีชื่อเต็มว่าเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมคือดีเอ็นเอ ให้มีปริมาณมากเป็นล้านเท่าในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ ที่มีการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่อีกหนึ่งสายจากดีเอ็นเอเดิม (ที่มา : https://juthapornapisara.wordpress.com)



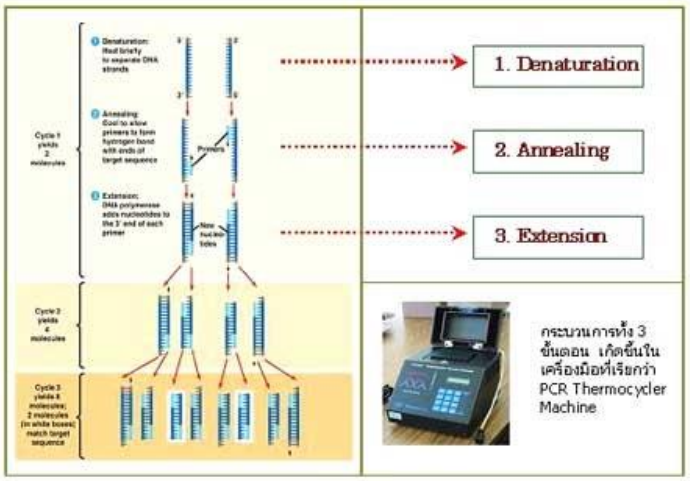
รูปที่ 8 การจำลองดีเอ็นเอ

ที่มา : https://sites.google.com

หลักการทำงานของเทคนิคพีซีอาร์

เทคนิคนี้ใช้หลักการพื้นฐานในการเพิ่มดีเอ็นเอด้วยการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสาย ด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นหรือไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ ทำให้สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน ประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

(ที่มา : https://juthapornapisara.wordpress.com)



รูปที่ 9 หลักการทำงาน

ที่มา : https://sites.google.com

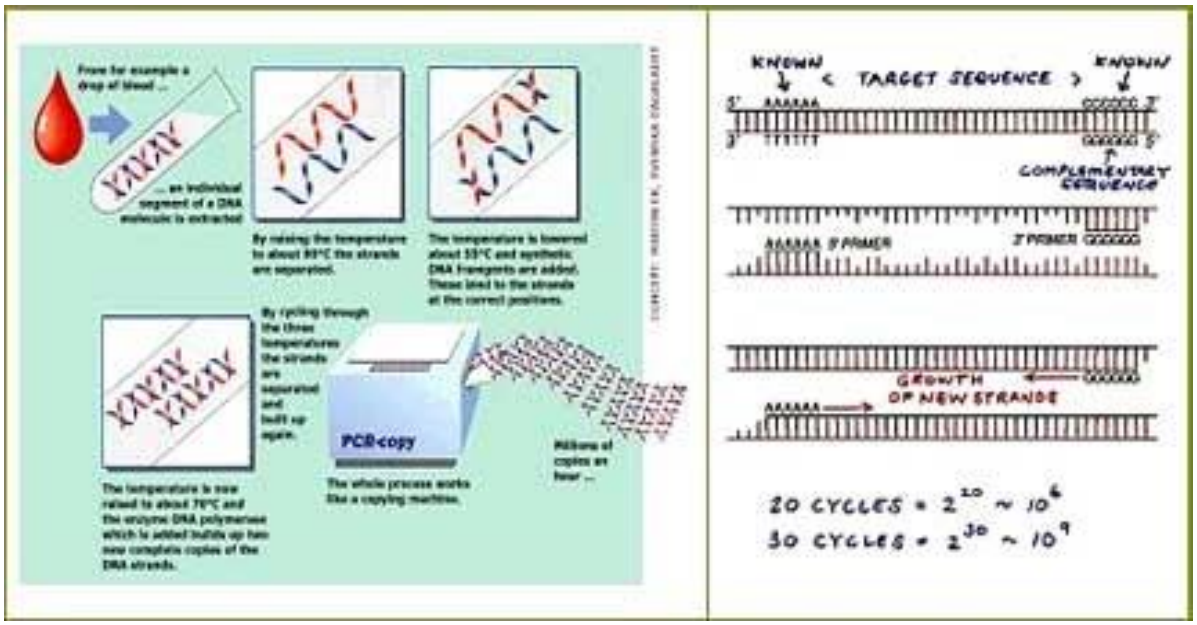
1. การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation) ใช้อุณหภูมิ ประมาณ 94 องศาเซลเซียส เมื่อเริ่มต้นดีเอ็นเอแม่แบบ จะอยู่ในลักษณะที่เป็นเกลียวคู่ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึงประมาณ 94 องศาเซลเซียส จะทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอถูกทำลาย ทำให้เส้นดีเอ็นเอแยกออกจากกัน โดยขั้นตอนนี้จะแตกต่างจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ คือ ในสิ่งมีชีวิติจะมีเอนไซม์เฮลิเคส(Helicase) ช่วยในการแยกสายและคลายเกลียวดีเอ็นเอ

2. การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) ใช้อุณหภูมิประมาณ 40-62 องศาเซลเซียส เมื่อแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันแล้ว จะลดอุณหภูมิลงเหลือ 40-62 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ขนาดสั้นประมาณ 15-25 เบส ที่เรียกว่าไพรเมอร์ (Primer) เข้ามาจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ไม่สามารถที่จะเริ่มจากศูนย์ได้เนื่องจากเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ต้องการปลาย-OH ทางด้าน 3’เพื่อนำ นิวคลีโอไทด์ตัวต่อมาต่อ ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีเอ็นไซม์ที่มีชื่อว่า ไพรเมส (Primase) เป็นตัวสร้างอาร์เอ็นเอไพรเมอร์ขึ้น

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension) ใช้อุณหภูมิ ประมาณ 68-72 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนนี้จะเป็นการสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ โดยอุณหภูมิที่ใช้จะพอเหมาะกับ การทำงานของ Taq DNA polymerase (ที่มา : https://juthapornapisara.wordpress.com)

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (One cycle) ให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (หรือเข้ากัน) กับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และเมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวนมาก ประมาณว่าปฏิกิริยา 30 – 40 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอได้ไม่น้อยกว่าพันล้านเท่า ดังนั้น แม้ตัวอย่างที่นำมาศึกษามีปริมาณสารพันธุกรรมน้อยมาก เราก็ใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มจำนวนได้หลายเท่าทวีคูณ

(ที่มา : https://juthapornapisara.wordpress.com)



ดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคนี้ในหลอดทลอง มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิต ต้องนำตัวอย่างที่ทำพีซีอาร์มแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่าอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริสิส (Agarose gel electrophoresis) ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปได้ขึ้นกับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้ มองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (ที่มา : https://juthapornapisara.wordpress.com)

ประโยชน์ของ PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรค

PCR เป็นเทคนิคสำคัญมากในงานอณูชีวโมเลกุล ทั้งในส่วนที่เป็นงานพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ และการเกษตรสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ทั้งโรคติดเชื้อและโรคจากพันธุกรรม ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรม ศึกษากลายพันธุ์ของยีน ทำแผนที่ยีน และศึกษาลำดับเบสของยีนของสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด (ที่มา : https://juthapornapisara.wordpress.com)

ข้อจำกัดของเทคนิค PCR

แม้ว่าเทคนิค PCR จะมีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อจำกัดบางอย่าง เช่น

1. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ต้องการเพิ่มจำนวน

การทำปฏิกิริยา PCR จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณขอบหรือบริเวณขนาบข้างของบริเวณที่ต้องการเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งคู่ของไพรเมอร์ (forward primer และ reverse primer) จะเข้าไปจับโดยคร่อมส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา

2. ข้อผิดพลาดในการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase

Taq DNA polymerase มีความผิดพลาดในการนำนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ใช่คู่สมมาต่อกับดีเอ็นเอที่กำลังสร้างขึ้นมาเท่ากับ 10-5 error/base เมื่อทำ PCR ไป 30 รอบ โอกาสที่จะผิดพลาดจะพบ 1 ใน 3000 bp ของ PCR product ดังนั้นถ้าใช้จำนวนรอบที่มากขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะได้ PCR product ผิดพลาดก็มากขึ้นตามไปด้วย

3. ความยาวของขนาด PCR

ถึงแม้ว่าปฏิกิริยา PCR สามารถทำให้ได้ผลผลิตที่มีขนาดยาวถึงประมาณ 10 Kb ได้ แต่โดยปกติจะได้ผลดีที่สุดเมื่อ PCR product ขนาดน้อยกว่า 1 kb (1000 bp) เพราะข้อจำกัดในการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่ไม่มีคุณสมบัติ proof reading ทำให้มีความผิดพลาดในการนำนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องมาต่อในสายดีเอ็นเอ จนอาจทำให้ไม่สามารถต่อสายดีเอ็นเอต่อไปอีกได้

4. การปนเปื้อนของปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากปฏิกิริยา PCR สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เป็นล้านเท่าในเวลาอันสั้น ดังนั้น PCR จึงเป็นวิธีที่ไวต่อการปนเปื้อนของดีเอ็นเออื่น ๆ ที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอต้นแบบ หากไพรเมอร์สามารถจับได้ก็จะมีการเพิ่มจำนวน

ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอนั้นไปพร้อมกันกับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการศึกษา การปนเปื้อนอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ในขั้นตอนการสกัดแยกดีเอ็นเอ หรือจากการปนเปื้อนของผลผลิต PCR ครั้งก่อน

(ที่มา : https://juthapornapisara.wordpress.com)

บทที่3

วิธีดำเนินการวิจัย

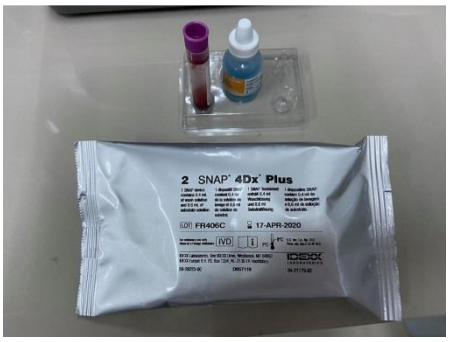
การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจ Snap 4Dx ในการตรวจหา พยาธิหนอนหัวใจในสุนัข (*Dirofilaria immitis*) และใช้เทคนิคการตรวจทาง PCR (Polymerase Chain Reaction) ในการยืนยันชุดตรวจ

1. กลุ่มตัวอย่าง

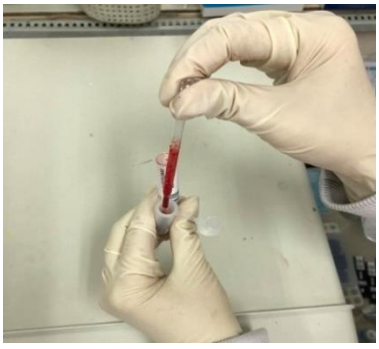
ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 1 ธันวาคม 2562 ถึง 1 มกราคม 2563 โดยทำการสุ่มตัวอย่างเลือดสุนัขทั้งหมดจำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างเลือดสุนัขที่ทางโรงพยาบาลนำมาส่งตรวจกับทาง Vet & Vitro Central Lab

2. ขั้นตอนวิธีการทดลอง

2.1 วิธีการทดลองชุดทดสอบ Snap 4Dx



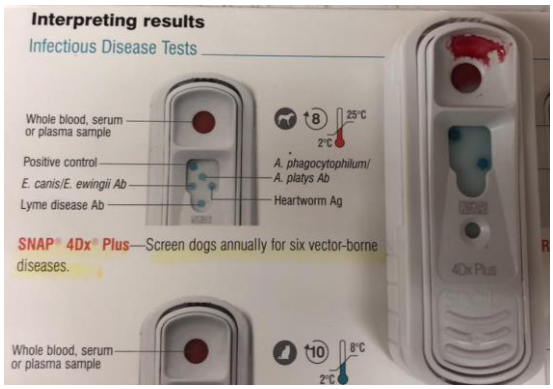
1. เตรียมอุปกรณ์ตรวจทดสอบ Snap 4Dx และตัวอย่างเลือดที่ต้องการทดสอบ



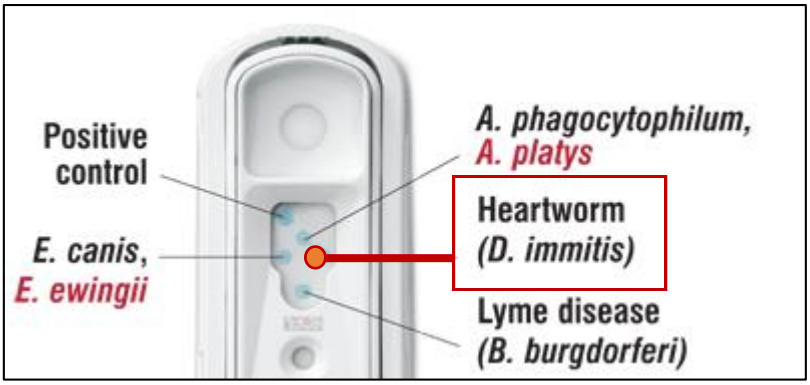
2. มิกซ์เลือด แล้วใช้ Dropper ดูดเลือดแล้วหยดตัวอย่างเลือด 3 หยดลงใน Microcentrifuge Tube และ หยด Buffer 4 หยด ปิดฝามิกซ์ตัวอย่างให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดไปมา 3-5 ครั้ง

3. เทตัวอย่างเลือดทั้งหมดลงบริเวณตำแหน่งที่ใช้สำหรับหยดตัวอย่างในชุดทดสอบ Snap 4Dx

4. เมื่อสีแรกปรากฏในวงกลมให้กดตัวกระตุ้นให้แน่น



5. ทำการจับเวลา 8 นาที แล้วอ่านผลทันที (ไม่ควรอ่านผลหลังจาก 8 นาที เพราะจะทำให้ผลการตรวจของชุดตรวจคลาดเคลื่อนได้) การอ่านผล ถ้าเกิดจุดวงกลมบริเวณตำแหน่งต่าง ๆ แสดงถึงการตรวจพบแอนติเจนของ Heartworm และแอนติบอดีต่อ Ehrlichiosis , Anaplasmosis และ Lyme Disease



ที่มา : http://www.avmhk.com/IDEXX-Laboratories/SNAP-4Dx-Plus-Test

2.2 วิธีการทดลองใช้เทคนิคการตรวจทาง PCR (Polymerase Chain Reaction)

นำตัวอย่างเลือดที่ตรวจด้วยชุดทดสอบ Snap 4Dx มาทำการสกัด DNA โดยใช้วิธีของ (In Young Oh et al. 2017) โดยใช้ยีน COI ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Dirofilaria immitis* ซึ่งใช้ Primer ขนาด 150 bp. ทำการเพิ่มจำนวน ใช้มิกซ์เซอร์ขนาด 1 x master mix ใช้ DNA 50 นาโนกรัม Primer ขนาด 500 นาโนเมตร จากนั้นนำตัวอย่าง DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวนใส่ในเครื่อง PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งขั้นตอนหลักจะมีดังนี้

1. ขั้นตอน Denaturing เป็นการแยกสายDNA ต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยปรับอุณหภูมิให้สูงที่ 98 °C

2. ขั้นตอน Annealing โดยทำการลดอุณหภูมิลงเหลือ 60 °C เป็นเวลา 20 นาที และจัดไพรเมอร์ ซึ่งเป็น DNA สายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 17-24 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA *Dirofilaria immitis* ที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน

3. ขั้นตอน Extension ทำการสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5′ ไป 3′ ของไพรเมอร์ ตามลำดับเบสคู่สมของ DNA *Dirofilaria immitis* ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ซึ่งเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ อุณหภูมิ 68-72 °C

4. นำ DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ไปทำการย้อมสี อิธิเดียมโบรไมด์ แล้วมาแยกหา DNA โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า Agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 500 นาโนเมตร จะปรากฏแถบ DNA เรืองแสงขึ้นบนแผ่นวุ้น (สุรินทร์, 2558)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การตรวจตัวอย่างเลือดสุนัขด้วยชุดตรวจ Snap 4Dx

นำตัวอย่างเลือดสุนัขทั้ง 12 ตัวอย่างนำไปตรวจหา พยาธิหนอนหัวใจในสุนัข (*Dirofilaria immitis*) โดยชุดตรวจ Snap 4Dx

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจตัวอย่างเลือดสุนัขด้วยชุดตรวจ Snap 4Dx

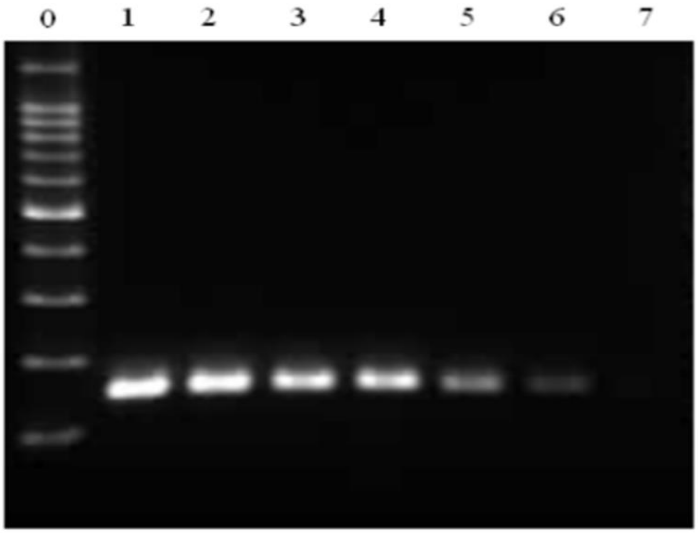
ตัวอย่าง	Positive (+)	Negative (-)
1	+	
2	+	
3	+	
4	+	
5		-
6		-
7		-
8		-
9		-
10		-
11		-
12		-

4.2 การตรวจตัวอย่างเลือดสุนัขด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

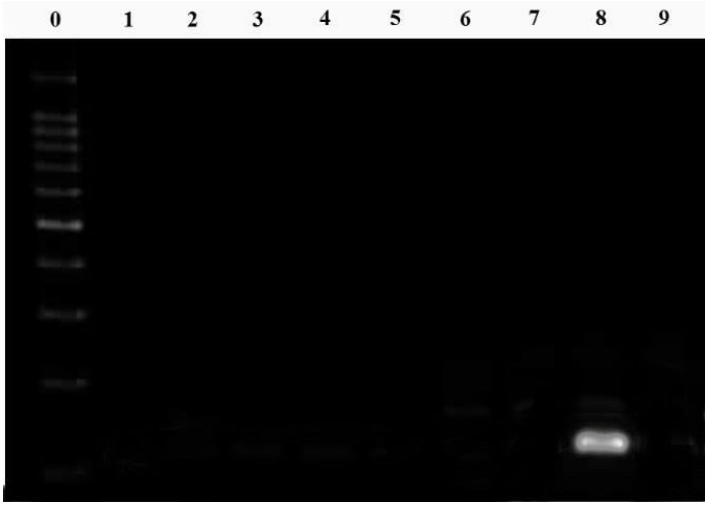
ตัวอย่างเลือดสุนัขทั้ง 12 ตัวอย่างที่ตรวจด้วยชุดทดสอบ Snap 4Dx แล้วนำไปตรวจยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจเลือดด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ตัวอย่าง	Positive (+)	Negative (-)
1	+	
2	+	
3	+	
4	+	
5	+	
6		-
7		-
8		-
9		-
10		-
11		-
12		-



รูปที่ 4.2.1 แสดงผล Positive (+) โดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)



รูปที่ 4.2.2 ภาพแสดงผล Negative (-) โดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)

4.3 การเปรียบเทียบผลการทดลองตรวจหาพยาธิหนอนหัวใจ (*Dirofilaria immitis*)

ตารางที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบการทดลองตรวจหาพยาธิหนอนหัวใจในสุนัข (*Dirofilaria immitis*) โดยใช้ด้วยชุดตรวจ Snap 4Dx และ เทคนิค PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

	ชุดทดสอบ Snap 4Dx	PCR (*Polymerase Chain Reaction*)
Positive (+)	4	5
Negative (-)	8	7
รวม	12	12

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างเลือดสุนัข 12 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างเลือดสุนัขหมายเลข 1,2,3 และ 4 ที่มีการทดสอบด้วยชุดทดสอบ Snap 4Dx ให้ผลเป็น Positive และหมายเลขที่ 5,6,7,8,9,10,11 และ 12 ให้ผลเป็น Negative และจึงนำมายืนยันผลของตัวอย่างเลือดสุนัข ด้วยเทคนิค PCR พบว่า หมายเลข 1,2,3 และ 4 ให้ผลเป็น Positive และ หมายเลข 6,7,8,9,10,11 และ 12 ให้ผลเป็น Negative ดังเดิม มีเพียงหมายเลข 5 ที่จากเดิมคือ ให้ผลเป็น Negative จากชุดทดสอบ Snap 4Dx กลายเป็นผล Positive ในการตรวจยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR แสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบ Snap 4Dx ยังมีข้อบกพร่องที่ทำให้ผลลบลวง (False Negative) เกิดจากตัว Test kit ที่มีข้อจำกัดในการตรวจคือ ปริมาณของปรสิต ต้องมากกว่า 2 ตัวขึ้นไป และสามารถตรวจ Antigen บนรังไข่เพศเมียของพยาธิหนอนหัวใจเท่านั้น ทำให้ส่งผลเสียต่อตัวสุนัข ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจยืนยันเพิ่มเติมด้วยเทคนิค PCR เพื่อความแม่นยำในการตรวจและการรักษาอย่างถูกต้องของสัตวแพทย์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเลือกตัวอย่างเลือดที่มีปริมาณเพียงพอต่อการตรวจในแต่ละวิธี
2. ควรเพิ่มระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง

บรรณานุกรม

กองบรรณาธิการ HONESTDOCS. 2560. โรคพยาธิหนอนหัวใจในสุนัข. [ออนไลน์]: https://www.honestdocs.co/dog/ (5 กุมภาพันธ์ 2563).

ชนินันท์ สนธิไชยและคณะ. 2560. วัคซีน. สถาบันวัคซีนแห่งชาติ.

พิชิต อึ่งทอง. 2553. ความชุกของโรคพยาธิหนอนหัวใจในสุนัข. คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น.

สถาพร จิตตปาลพงศ. 2558. ความชุกของโรคพยาธิหนอนหัวใจในสุนัขและแมวที่ไมมีเจ้าของในกฐุงเทพมหานคร. การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43: สาขาสัตวแพทยศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์, หน้า 97-105.

สมบูรณ์ แสงมณีเดช. 2545. รายงานความชุกของปรสิตในเลือดสุนัขระหว่างมกราคม 2537 ถึงธันวาคม 2544 จากตัวอย่างเลือดที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลสัตว์คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2558. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารีย์รัตน์ หนูนวล. 2560. Molecular genetic testing techniques-Polymerase chain reaction and electrophoresis. [ออนไลน์]: https://meded.psu.ac.th/ (2 กุมภาพันธ์2563).

Bowman, D.D. and Atkins, C.E. 2009. Heartworm biology, treatment, and control. Vet.Clin.Small Anim. 39:1127-1158.

Idexx USA. 2019. SNAP 4Dx Plus Test Kit. [online]. Available. www.idexx.com/snap4Dx/ (5th February 2020).

Kamyingkird, K., Junsiri, W., Chimnoi, W., Kengradomkij, C., Saengow, S., Sangchuto, K., Ka jeerum, W., Pangjai, D., Nimsuphan, B., Inpankeaw, T., Jittapalapong, S., 2017. Prevalence and risk factors associated with *Dirofilaria immitis* infection in dogs and cats in Songkhla and Satun provinces, Thailand. Agric. Nat. Resour. 51, 299-302.

Lee, A.C. and Atkins, C.E. 2010. Understanding feline heartworm infection: disease, diagnosis,and treatment. Top Companion Anim. Med. 25(4):224-230.

Litster, A. and Nilkumhang, P. 2003. Prevalence of feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in Thailand. Proceeding 28th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Bangkok, Thailand.: 710.

Manusvee Kaikuntod, Kriangkrai Thongkorn, Saruda Tiwananthagorn and Chavalit Boonyapakorn.Filarial worms in dogs in Southeast Asia. Veterinary Integrative Sciences.2018; 16(2): 1-17.

Sukhumavasi, W., Bellosa, M.L., Lucio-Forster, A., Liotta, J., Lee, A.C., Pornmingmas, P., Chungpivat, S., Mohammed, H.O., Lorentzen, L.,Dubey, J.P., Bowman, D.D. 2012. Serological survey of Toxoplasma gondii, Dirofilaria immitis, feline immunodeficiencey virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) infections in pet cats in Bangkok and vicinities, Thailand. Vet. Parasitol. 188(1-2): 25-30.

Sukpanichnant, S., Leenuttapong, V., Dejsomritrutai, W., Thakerngpol, K., Wanachiwanaw in, W., Kachintorn, U., Nitiyanant, W., 1998. Pulmonary dirofilariasis in a patientwith multisystem langerhans cell histiocytosis - the first reported case in Thailand. J. Med. Assoc. Thai. 81, 722-727.

Theis, J.H. (2005). Public health aspects of dirofilariasis in the United States. Vet. Parasitol. 133(2-3):157-80.