

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาบทบาทของระดับภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการติดเชื้อบาร์โทเนลล่า
ในแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง
(งบประมาณปี 2561)

The Role of Immunity in Cats with Feline Immunodeficiency Virus and
Bartonella spp. Coinfection.

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. รสมา ภูสุนทรธรรม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ พินิจ ภูสุนทรธรรม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เดชฤทธิ์ นิลอุบล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ชาญณรงค์ รอดคำ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

39 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติในการสนับสนุนด้วยทุนวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2561 ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ กฤษดา บุญอร่ามเรืองและสัตวแพทย์หญิง เพ็ญพิชชา เกิดบ้านตะเคียน ที่ช่วยเก็บตัวอย่างและร่วมทดลองในการศึกษา คุณวันทนี ใจจำนงค์ และคุณบุญลือ ประคองศรี ที่ช่วยงานธุรการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นวพล เตชะเกรียงไกร ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการดำเนินงานวิจัย

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาถึงความชุกของการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในแมวปกติและแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง ที่มารับการรักษา ณ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2561 พบว่ามีความชุกเท่ากับ 16.67% เมื่อทำการศึกษาถึงชนิดของการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ด้วยวิธี PCR ในแมวที่เข้ามารับการฉีดวัคซีนป้องกันโรค และแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง พบว่าเป็นเชื้อ *Bartonella henselae* ทั้งหมด ตรวจพบการติดเชื้อในแมวจำนวน 15 ตัวจากแมวที่ทำการศึกษาทั้งสิ้น 90 ตัว แมวส่วนใหญ่ที่ตรวจพบการติดเชื้อ *Bartonella henselae* ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นแมวปกติที่แข็งแรงและไม่มีประวัติการเจ็บป่วยถึง 11 ตัว พบการติดเชื้อในแมวตั้งแต่อายุ 3 เดือน ถึงอายุ 12 ปี เชื้อนี้สามารถติดต่อสู่แมวได้ในทุกช่วงอายุ และทุกเพศ แต่เพศเมียมีจำนวนมากกว่าเพศผู้ การมีหมัดบนตัวแมวเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการติดเชื้อ *Bartonella* spp. เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันของแมวปกติและแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องต่อการติดเชื้อ *Bartonella* spp. และหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับภูมิคุ้มกันของแมวกับอาการผิดปกติที่แมวแสดงออก ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าค่าอัตราส่วน CD4+:CD8+ ที่ต่ำกว่าปกติมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Bartonella henselae* เมื่อทดสอบความสัมพันธ์ของโรค FIV กับการติดเชื้อ *Bartonella henselae* ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลที่ได้นี้แตกต่างจากกลุ่มแมวที่ติดเชื้อ FeLV และมีค่าอัตราส่วน CD4+:CD8+ ต่ำกว่าปกติ เนื่องจากแมวติดเชื้อ FeLV ในกลุ่มนี้เป็นแมวป่วยที่แสดงอาการผิดปกติ จึงมีค่า CD4+:CD8+ ที่ต่ำกว่าจึงทำให้โอกาสที่ตรวจพบ *Bartonella henselae* สูงกว่า ควรจัดการตรวจหาภูมิคุ้มกันในแมวซึ่งเลี้ยงโดยเจ้าของที่มีประวัติภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ เช่น กลุ่มคนได้รับเคมีบำบัด กลุ่มคนที่ติดเชื้อโรค HIV หรือกลุ่มคนสูงอายุที่เลี้ยงแมวจำนวนมาก เป็นต้น เนื่องจากแมวที่เลี้ยงอาจแพร่เชื้อ *Bartonella* spp. นี้สู่ผู้เลี้ยงและเป็นแหล่งรังโรคที่อาจติดต่อถึงคนต่อไป นอกจากนี้ควรมีโปรแกรมกำจัดหมัดบนตัวแมวเป็นประจำ เพื่อยับยั้งการแพร่ของเชื้อสู่แมวผ่านการติดหมัด

ABSTRACT

The study was performed to find the relationship between immunity and *Bartonella* spp infection in cats. Ninety cats presented to the Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University were studied. The prevalence of feline *Bartonella* spp. infection in the hospital was 16.67%. *Bartonella henselae* was identified in fifteen cats by using PCR. Eleven out of fifteen cats were cats without any clinical signs. The age of the cats ranged from 3 months to 12 years old. Female cats were more infected with *B. henselae*. Cats with flea were found positive for *B. henselae* infection. Feline immunodeficiency-infected (FIV) cats and Feline leukemia virus – infected (FeLV) cats were also studied. CD4+:CD8+ ratio for cats' immunity were measured and demonstrated that the lower CD4+:CD8+ ratio, the more risk for cats to develop Bartonellosis. FIV cats in this study showed lower number of cats with *B. henselae* infection. This finding may be due to the stages of FIV infection in FIV cats were all in the asymptomatic stage. However, the results demonstrated higher number of cats with Bartonellosis in FeLV cats. One explanation for this may be because FeLV cats had clinical signs with lower immunity than the FIV cats. Cats with lower immunity or lower CD4+:CD8+ ratio were at risk for *B. henselae* infection. Cat owners with low immunity such as HIV patients, patients receive chemotherapy or elderly persons with many cats in the same house should routinely measure the cat immunity and screen their cats for Bartonellosis. The flea control program should be employed to all cats in the house to control the spreading of the disease between cats.

สารบัญเรื่อง

บทนำ	2
วัตถุประสงค์การวิจัย	2
วิธีการดำเนินการ	3
ผลการศึกษา	5
สรุปและวิจารณ์ผล	16
บรรณานุกรม	19
ภาคผนวก	23
ประวัติคณะผู้วิจัย	28
ผลงานตีพิมพ์ที่ได้รับการตีพิมพ์และเกี่ยวข้องกับกรวิจัย	39

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	จำนวนและเปอร์เซ็นต์ ของแมวปกติ แมวติดเชื้อ FIV แมวติดเชื้อ FeLV และแมวติดเชื้อทั้ง FIV และ FeLV จากแมวที่ศึกษาทั้งหมด 90 ตัว	5
ตารางที่ 2	จำนวนแมวปกติและแมวติดเชื้อ FIV ที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจหาการติดเชื้อบาร์โทเนลล่า ด้วยวิธี PCR	7
ตารางที่ 3	การติดเชื้อ <i>Bartonella</i> spp. ในแมวที่ศึกษาแบ่งตามเพศด้วยวิธี PCR	8
ตารางที่ 4	การติดเชื้อ FIV และ FeLV ร่วมกัน และผลการติดเชื้อ <i>Bartonella</i> spp. ด้วยวิธี PCR ในแมวกุุ่มต่างๆที่ทำการศึกษา	9
ตารางที่ 5	ผลการตรวจพบเชื้อ <i>Bartonella</i> spp. ด้วยวิธี PCR ในแมวที่ตรวจพบว่า มีหมัดบนตัวและแมวที่ตรวจไม่พบหมัดบนตัวแมว	10
ตารางที่ 6	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน CD4+:CD8+ ของกลุ่มแมวที่ศึกษา	11
ตารางที่ 7	จำนวนแมวปกติและแมวติดเชื้อ FeLV ที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจหาเชื้อบาร์โทเนลล่า	15

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	ความถี่และอายุแมวที่เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด	6
ภาพที่ 2	อัตราส่วน CD4+ : CD8+ และจำนวนแมวที่ทำการศึกษาของแมวทั้งหมด	11
ภาพที่ 3	อัตราส่วน CD4+: CD8+ ในแมวที่ทำการศึกษาทั้งหมดร่วมกับผลการติดเชื้อ <i>Bartonella</i> spp.	12
ภาพที่ 4	อัตราส่วน CD4+:CD8+ ในแมวที่ทำการศึกษากลุ่มติดเชื้อ FIV และ FIV ร่วมกับผลการติดเชื้อ <i>Bartonella</i> spp.	13
ภาพที่ 5	อัตราส่วน CD4+:CD8+ ในแมวที่ทำการศึกษากลุ่มติดเชื้อ FeLV กับผลการติดเชื้อ <i>Bartonella</i> spp.	14

สารบัญภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 แสดงจำนวนแมวที่ทำการศึกษาแบ่งตามช่วงอายุ	24
ภาคผนวกที่ 2 อัตราส่วน CD4+ : CD8+ และจำนวนแมวที่ทำการศึกษาของแมวทั้งหมด	25
ภาคผนวกที่ 3 สรุปผลความสัมพันธ์ของตัวแปรที่ศึกษา	27

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การศึกษาบทบาทของระดับภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการติดเชื้อบาร์โทเนลล่า
ในแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง

(ภาษาอังกฤษ) The Role of Immunity in Cats with Feline Immunodeficiency Virus
and *Bartonella spp.* Coinfection.

ผู้รับผิดชอบโครงการ

1. รศ.สพ.ญ.ดร.รสมา ภูสุนทรธรรม หัวหน้าโครงการวิจัย
(Assoc. Prof. Dr. Rosama Pusoonthornthum) email: drrosama@gmail.com
ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
39 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02 218 9412 โทรสาร 02 252 9575
2. ผศ.น.สพ. พินิจ ภูสุนทรธรรม
(Asst. Prof. Pinit Pusoonthornthum) email: pchi45@gmail.com
ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
39 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02 218 9412 โทรสาร 02 252 9575
3. ผศ.น.สพ.ดร. เดชฤทธิ์ นิลอุบล
(Asst. Prof. Dr. Dachkrit Nilubol) email: dachrit@gmail.com
ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
39 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02 218 9582 โทรสาร 02 251 1656
4. ผศ.น.สพ.ดร. ชาญณรงค์ รอดคำ
(Asst. Prof. Dr. Channarong Rodthum) email: Channarong_R@Chula.ac.th
ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
39 ถ.อังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02 218 9582 โทรสาร 02 251 1656

บทนำ

โรคบาร์โทเนลลาหรือโรคแมวข่วนเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนซึ่งเป็นโรคอุบัติใหม่ที่สำคัญมากที่สุดโรคหนึ่งในปัจจุบัน ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ตรวจพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อโรค Bartonellosis ในคนมากที่สุดประเทศหนึ่งของโลก (4,5,6) มีรายงานการตรวจพบเชื้อในผู้ป่วยบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ นอกจากนี้ยังมีรายงานตรวจพบเชื้อในผู้ป่วยที่มีลิ้นหัวใจอักเสบและเสียชีวิต โรคนี้ยังตรวจพบการสัมผัสโรคในนิสิตสัตวแพทย์ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เนื่องจากมีพาหะที่สำคัญคือ สัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข (7) หรือ แมว (8,9,10,11,12,13,14,15) ซึ่งเป็นสัตว์ที่มีความใกล้ชิดกับเจ้าของ และสัตว์ที่ติดเชื้อเหล่านี้มักไม่แสดงอาการผิดปกติให้เจ้าของสังเกตได้ กอปรกับการตรวจวินิจฉัยโรคนี้ทำได้ยากในทางคลินิกและมีค่าใช้จ่ายสูง

อย่างไรก็ตามสำหรับความชุกของโรคในสัตว์เลี้ยงและสัตว์เลี้ยงจรจัด ได้มีผู้รายงานเป็นจำนวนมากในช่วงสิบปีที่ผ่านมา แต่สาเหตุการแพร่กระจายและพาหะที่แท้จริงของโรคนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด หมัดแมวได้ถูกเสนอว่าเป็นพาหะที่สำคัญในการแพร่โรคจากแมวสู่เจ้าของและบุคคลทั่วไป (16, 17)

แมวป่วยด้วยโรคเรื้อรังจำนวนมากป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องในแมวหรือโรคเอดส์แมวซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1986 ที่มลรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา โรคนี้มีสาเหตุจากการติดเชื้อ Feline immunodeficiency virus (FIV) ไวรัสนี้มีเซลล์เป้าหมายคือ T-lymphocytes (12) ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัส Human immunodeficiency virus (HIV) ที่ทำให้เกิดโรคเอดส์ในคน เชื้อ FIV นี้อยู่ใน Lentivirinae subfamily ของ Retroviridae โรคเอดส์แมวนี้อาจมีลักษณะคล้ายคลึงกับโรคที่เกิดจากเชื้อ Lentivirus ในสัตว์อื่น เช่น ในแกะ (Maedi-Visna Virus, MVV) แพะ (Caprine Arthritis/Encephalitis Virus, CAEV) และเช่นเดียวกับคน (HIV) โดยที่เชื้อ FIV นี้จะไม่สามารถก่อให้เกิดโรคในคนได้

จากการศึกษาเบื้องต้นในปี พ.ศ. 2540 ในแมวที่ป่วยด้วยโรคเรื้อรังเกิน 2 สัปดาห์ขึ้นไป คณะผู้วิจัยได้ตรวจพบว่า 32.0% ของแมวที่ป่วยด้วยโรคเรื้อรังดังกล่าวตรวจพบหลักฐานการปรากฏแอนติบอดีบ่งชี้การติดเชื้อโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องในแมว (FIV) (18, 19) โอกาสที่แมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องเหล่านี้จะติดเชื้อโรค Bartonellosis จึงมีมากกว่าแมวปกติทั่วไปและอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญที่จะส่งผ่านการติดเชื้อสู่เจ้าของแมว บุคคลอื่นในบ้านและแมวปกติ แมวที่ป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง จึงอาจเป็นแหล่งรวมโรคที่สำคัญในประชากรแมว

นอกจากนี้การเกิดโรค HIV ในคน และการที่แมวป่วยด้วยโรค FIV เชื้อไวรัสทั้งสองจัดอยู่ในกลุ่มไวรัสเดียวกัน ผลของการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้นอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อการรักษาโรค Bartonellosis ในแมวที่ติดเชื้อ FIV แล้วและยังสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้เป็นแนวทางในการรักษา คัดกรองและการป้องกันการติดเชื้อ Bartonella ในผู้ป่วยด้วยโรค HIV ในคนได้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาถึงความชุกของการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในแมวปกติและแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง
2. ศึกษาชนิดของเชื้อ *Bartonella* spp. ที่พบอยู่ในแมวปกติ และแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง

3. เปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันของแมวปกติและแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องต่อการติดเชื้อ *Bartonella* spp. และหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับภูมิคุ้มกันของแมวกับอาการผิดปกติที่แมวแสดงออก
4. ศึกษาบทบาทของระดับภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีต่อการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องในระยะต่างๆ

วิธีการดำเนินการ

เก็บข้อมูลแมวที่เข้ารับการรักษาระยะสั้นที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2560-มีนาคม 2562 โดยไม่จำกัด เพศ พันธุ์ และอายุ และได้รับการตรวจร่างกายทั่วไปและการวินิจฉัยเบื้องต้นจากสัตวแพทย์ประจำโรงพยาบาลสัตว์ ร่วมกับการได้รับการทดสอบหาแอนติบอดีต่อโรค FIV ด้วยการทดสอบ ELISA Test และให้ผลลบเมื่อทำการทดสอบหาแอนติเจนต่อโรค FeLV แมวเหล่านี้จะถูกจัดว่าเป็นแมวที่ป่วยด้วยโรค FIV ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากแมวเพื่อทำการเพาะเชื้อ และ/หรือตรวจด้วย PCR เพื่อหาการติดเชื้อ *Bartonella* spp.

ผลการวิเคราะห์

การตรวจหาการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในแมว

1. แมวปกติที่ผ่านการตรวจคัดกรองโรคติดเชื้อต่างๆ ด้วยชุดทดสอบ FIV และ FeLV แล้วให้ผลลบ แต่มีหมัดมากและคาดว่าจะมีการติดเชื้อ Bartonellosis
2. แมวที่แสดงอาการป่วยของโรคเรื้อรัง เช่น ระบบทางเดินหายใจเรื้อรัง โรคผิวหนังเรื้อรัง ระบบทางเดินอาหารเรื้อรัง ตาอักเสบ และช่องปากอักเสบเรื้อรัง ซึ่งให้ผลบวกด้วยการทดสอบ FIV และให้ผลลบต่อการตรวจด้วย FeLV
3. เก็บตัวอย่างเลือดแมวทั้ง 2 กลุ่ม แล้วนำไปเพาะเชื้อ (Bacterial Culture) เพื่อตรวจหาเชื้อ Bartonellosis ตามวิธีของ Kosoy และคณะในปี 2008 (20) และ/หรือ ตรวจหาการติดเชื้อ Bartonellosis ด้วยวิธี PCR

การทดสอบเปรียบเทียบการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ต่ออาการทางคลินิก ระดับ CD4⁺:CD8⁺ และ virus load ในเลือดของแมวที่ป่วยด้วยการติดเชื้อไวรัสภูมิคุ้มกันบกพร่อง (FIV)

1. ทำการบันทึกประวัติและข้อมูลของแมวที่ป่วยด้วยโรค FIV อย่างละเอียด
2. แมวที่ป่วยด้วยโรค Bartonellosis ทั้งหมดจะถูกกำหนดหมายเลขประจำตัวและจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มทดลอง 2 กลุ่ม โดยแบ่งเป็น
กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มแมวปกติ เป็นแมวปกติซึ่งตรวจไม่พบการติดเชื้อ FIV แต่มีการตรวจพบการติดเชื้อ *Bartonella* spp.
กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มแมวป่วยด้วยโรค FIV ร่วมกับการตรวจพบการติดเชื้อ *Bartonella* spp.

3. แมวในแต่ละกลุ่มจะได้รับการตรวจร่างกายโดยละเอียดและจดบันทึกผลการตรวจร่างกายในแบบฟอร์มประเมินสุขภาพ ผลของการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ต่ออาการทางคลินิกจะประเมินจากสภาพของช่องปาก(oral cavity) และจากสภาพทั่วไปของแมว การประเมินจากสภาพของช่องปากในแมวที่ป่วยด้วยโรค FIV นั้นจะให้คะแนนตั้งแต่ -1 ถึง 2 โดยที่ค่า 0 หมายถึงช่องปากปกติ ค่า 2 หมายถึงมีพยาธิสภาพเกิดขึ้นรุนแรงภายในช่องปาก ส่วนการประเมินสุขภาพทั่วไปในแมวป่วยจะประเมินจากการชั่งน้ำหนักตัวแมวป่วย ความอยากอาหาร ตลอดจนสภาพขน โดยจะให้คะแนนตั้งแต่ -1 ถึง 2 เช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น
4. ทำการเก็บเลือดเพื่อหาอัตราส่วน CD4+ต่อCD8+ในเลือดแมวป่วยโดยใช้วิธี Whole Blood Lysis (WBL) ซึ่งมีวิธีการดังนี้
 - a. เจาะเลือดแมวทั้งสองกลุ่ม ปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อตัว เก็บโดยใส่สารป้องกันเลือดแข็งตัว (EDTA) โดยจะเก็บเลือดไว้ไม่เกิน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
 - b. นำเลือดมาปั่นด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที (400 g) 5 นาที จากนั้นใช้ Pipette ดูด ส่วนพลาสมาทิ้งไป
 - c. เติมน้ำยา PBS (Phosphate Buffer Saline) 3 มิลลิลิตร แล้วปั่นล้างด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที (400 g) 5 นาที จากนั้นใช้ Pipette ดูด Supernatant ทิ้งไป
 - d. เติมน้ำยา PBS 2 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เตรียมหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด นำเลือดที่เตรียมข้างต้น ใส่ลงในหลอดทดลองทั้งสาม หลอดละ 100 ไมโครลิตร
 - e. จากนั้น เติมน้ำยา Monoclonal Antibody ดังนี้
 - หลอดที่ 1 เติมน้ำยา Mouse IgG FITC-PE (Opticlone™) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น (Vertex) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
 - หลอดที่ 2 เติมน้ำยา Mouse Anti-Feline CD4: FITC (MCA 1346F)* (CD4⁺ maker) 10 ไมโครลิตร และ Mouse Anti-Feline CD5 (MCA 20388)* (Pan T cell maker) 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น (Vertex) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมน้ำยา PBS เพื่อปั่นล้างที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที จากนั้นเติมน้ำยา Goat Anti mouse IgG1: RPE ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เพื่อย้อมสี Mouse Anti-Feline CD5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมน้ำยา PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตรเพื่อปั่นล้างอีกครั้งที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที
 - หลอดที่ 3 เติมน้ำยา Mouse Anti-Feline CD4: FITC (MCA 1346F) (CD4⁺ maker) 10 ไมโครลิตร และ Mouse Anti-Feline CD8 (MCA 1347PE) (CD8⁺ maker) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น (Vertex) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
 - f. จากนั้นเติมน้ำยา Lysis Buffer (Becton®) 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทั้งสาม เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก โดยจะสังเกตได้จากสีภายในหลอดทดลองจะเป็นสีแดงใส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมน้ำยา PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตรเพื่อปั่นล้างที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที 5 นาที จากนั้นเทสารละลายดังกล่าวทิ้งทั้งหมด

- g. เติมน้ำยา PBS ปริมาตร 2 มิลลิตรเพื่อปั่นล้างอีกครั้งที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที 5 นาที จากนั้นเทสารละลายดังกล่าวทิ้งทั้งหมด
- h. ทำการ Fixed เซลล์ โดยเติม 1 % Paraformaldehyde 300 ไมโครลิตร เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- i. จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดไปตรวจโดยเครื่อง Flow Cytometer (ภายใน 7 วันหลังจาการเตรียมข้างต้น) เพื่อคำนวณอัตราส่วนระหว่าง CD4⁺ กับ CD8⁺ ต่อไป
- j. สรุปผลการศึกษา โดยทำการประเมินปริมาณของ T-lymphocyte และหาระดับของอัตราส่วน CD4⁺ ต่อ CD8⁺ ในแมวกุ่มปกติที่ติดเชื้อ Bartonella spp. และกลุ่มแมวป่วยด้วย FIV ร่วมกับ Bartonella spp. พร้อมกับนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน

ผลการศึกษา

จากแมวที่เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 90 ตัว ตรวจพบการติดเชื้อ FIV จำนวน 8 ตัว (8.89%) ติดเชื้อ FeLV จำนวน 13 (14.44%) และพบแมวที่มีการติดเชื้อร่วมกันของทั้ง FIV และ FeLV จำนวน 2 ตัว (2.22%) (ตารางที่ 1)

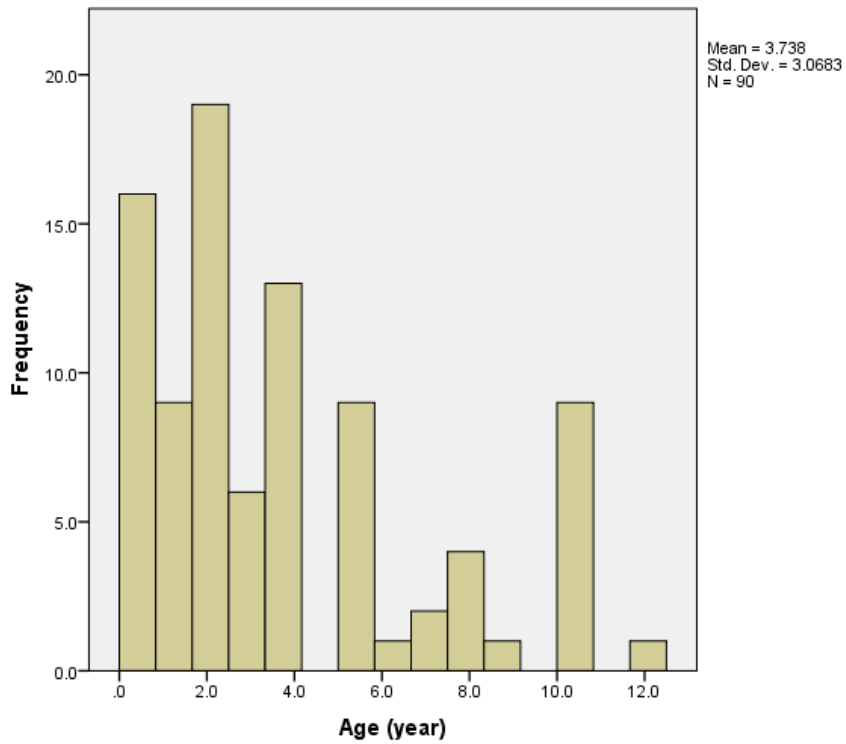
ตารางที่ 1 แสดงจำนวนและเปอร์เซ็นต์ ของแมวกุมปกติ แมวติดเชื้อ FIV แมวติดเชื้อ FeLV และแมวติดเชื้อทั้ง FIV และ FeLV จากแมวที่ศึกษาทั้งหมด 90 ตัว

แมวที่ศึกษา	จำนวนแมว	
	จำนวน (ตัว)	เปอร์เซ็นต์
แมวกุมปกติ	67	74.45
แมวป่วยด้วยโรค FIV	8	8.89
แมวป่วยด้วยโรค FeLV	13	14.44
แมวป่วยด้วยโรค FIV และ FeLV ร่วมกัน	2	2.22
รวม	90	100

หมายเหตุ: FIV = Feline immunodeficiency virus

FeLV = Feline leukemia virus

จากแม่วทั้งหมดที่ศึกษา พบว่าแม่วมีช่วงอายุตั้งแต่ 3 เดือนจนถึงอายุ 12 ปี และมีอายุเฉลี่ยอยู่ที่ 3.7 ปี และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอายุที่ 3 ปี (ภาพที่ 1, ภาคผนวกที่ 1) แบ่งเป็นเพศผู้ 38 ตัว (42%) และเพศเมีย 52 ตัว (57.8%)



ภาพที่ 1 ความถี่และอายุแม่ว (ปี) ที่เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด

เมื่อทำการตรวจหาการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในตัวอย่างเลือดของแมวทั้งหมดที่ทำการศึกษาด้วยวิธี PCR ตรวจพบการติดเชื้อ *Bartonella henselae* ในแมวจำนวน 15 ตัวจากแมวที่ศึกษาทั้งหมด 90 ตัว คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อ *Bartonella henselae* ในแมว ณ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเท่ากับ 16.7% แบ่งเป็นแมวปกติที่ตรวจพบการติดเชื้อ *Bartonella henselae*. จำนวน 11 ตัว (73.33%) แมวที่ติดเชื้อ FIV ร่วมกับติดเชื้อ *Bartonella henselae* จำนวน 1 ตัว (6.7%) นอกจากนั้นเป็นแมวที่ติดเชื้อ FeLV และแมวที่ติดเชื้อ FeLV ร่วมกับ *Bartonella henselae* จำนวน 1 ตัว (26.67 %) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนแมวปกติและแมวติดเชื้อ FIV ที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจหาการติดเชื้อ บาร์โทเนลล่า ด้วยวิธี PCR

แมวที่ศึกษา	ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Bartonella</i> spp.		รวม
	ผลลบ (ตัว)	ผลบวก (ตัว)	
แมวปกติ	56	11	67
แมวป่วยด้วยโรค FIV	7	1	8
รวม	75	15	90

หมายเหตุ: FIV = Feline immunodeficiency virus

เมื่อทำการตรวจหาการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในตัวอย่างเลือดของแมวทั้งหมดที่ทำการศึกษาด้วยวิธี PCR พบการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในแมว 15 ตัว จากแมวที่ศึกษาทั้งหมด 90 ตัว เป็นแมวเพศผู้ 6 ตัว (40%) เพศเมีย 9 ตัว (60%) พบการติดเชื้อ *Bartonella* spp. จำนวนมากที่สุด ในแมวเพศเมียที่ได้รับการทำหมัน 9 ตัว (60%) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การติดเชื้อ *Bartonella* spp. ด้วยวิธี PCR ในแมวที่ศึกษาแบ่งตามเพศ

แมวที่ศึกษาแบ่งตามเพศ	การตรวจหา <i>Bartonella</i> spp.		รวม
	ผลลบ (ตัว)	ผลบวก (ตัว)	
เพศผู้	12	2	14
เพศผู้ทำหมัน	20	4	24
เพศเมีย	8	0	8
เพศเมียทำหมัน	35	9	44
รวม	75	15	90

เมื่อทำการตรวจหาการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในตัวอย่างเลือดของแมวทั้งหมดที่ทำการศึกษาด้วยวิธี PCR พบการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในแมวปกติที่ติดเชื้อ *Bartonella* spp. จำนวน 11 ตัว แมวที่ติดเชื้อ FIV ร่วมกับติดเชื้อ *Bartonella* spp.จำนวน 1 ตัว และแมวที่ติดเชื้อ FeLV ร่วมกับติดเชื้อ *Bartonella* spp. จำนวน 3 ตัว (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การติดเชื้อ FIV และ FeLV ร่วมกัน และผลการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ด้วยวิธี PCR ในแมวกกลุ่มต่างๆ ที่ทำการศึกษา

แมวกกลุ่มต่างๆ	ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Bartonella</i> spp.		รวม
	ผลลบ (ตัว)	ผลบวก (ตัว)	
แมวปกติ	56	11	67
แมวติดเชื้อ FIV	7	1	8
แมวติดเชื้อ FeLV	10	3	13
แมวติดเชื้อ FIV ร่วมกับ FeLV	2	0	2
รวม	75	15	90

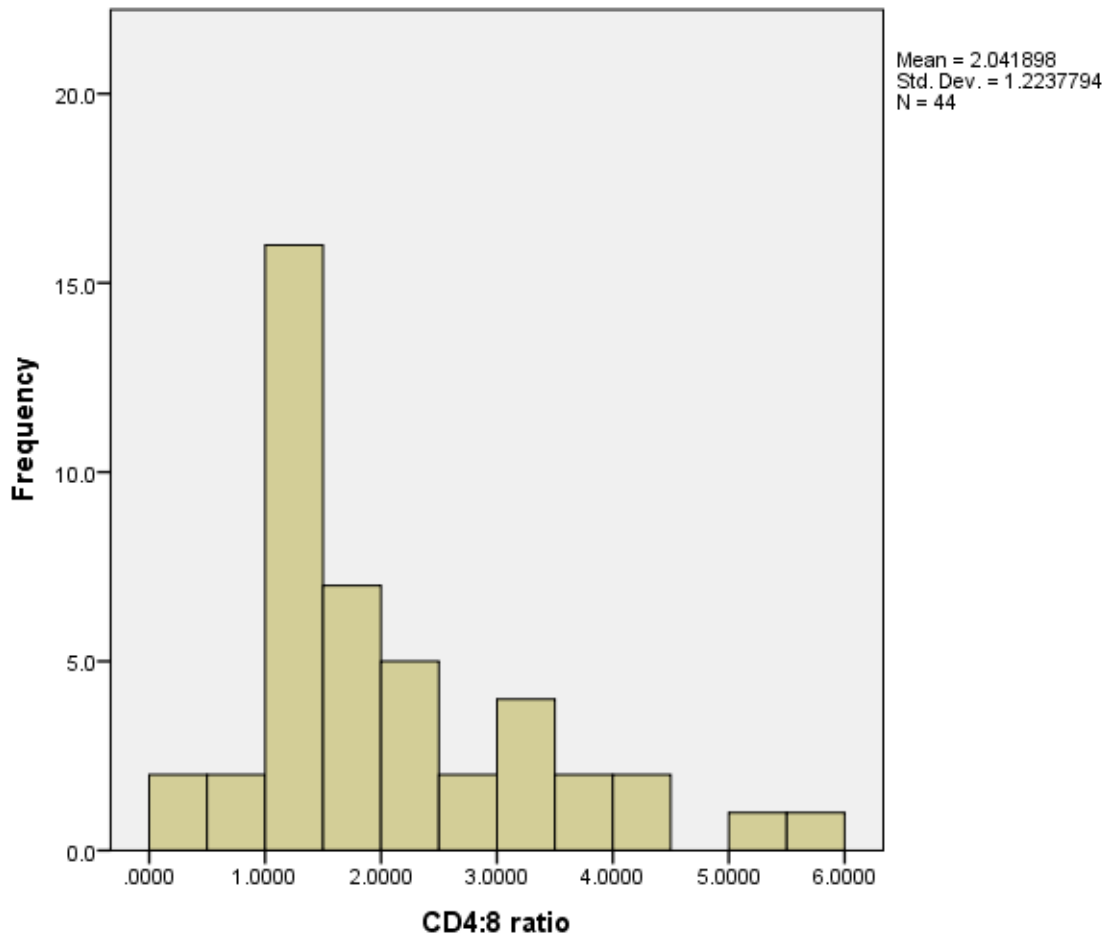
หมายเหตุ: FIV = Feline immunodeficiency virus, FeLV = Feline leukemia virus

เมื่อพิจารณาแมวที่ตรวจพบหมัดบนตัวแมวโดยการสังเกต มีแมวที่ตรวจพบหมัดที่มองเห็นด้วยตาเปล่าจำนวน 50 ตัวจากแมวทั้งหมด 90 ตัว (55.6%) และเมื่อนำไปตรวจหาการติดเชื้อ พบว่ามีผลการตรวจพบการติดเชื้อ *Bartonella* spp. (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. ด้วยวิธี PCR ในแมวที่ตรวจพบว่ามีหมัดบนตัว และแมวที่ตรวจไม่พบหมัดบนตัวแมว

การตรวจพบหมัดบนตัว	ผลการตรวจหา <i>Bartonella</i> spp.		รวม
	ผลลบ (ตัว)	ผลบวก (ตัว)	
พบหมัด	39	11	50
ไม่พบหมัด	36	4	40
รวม	75	15	90

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า เมื่อเปรียบเทียบอัตราการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในระหว่างกลุ่มที่มีการติดเชื้อ FIV, FeLV, การติดเชื้อ FIV ร่วมกับ FeLV และการตรวจพบหมัดบนตัวแมว ด้วยวิธี Fisher's Exact Test (2-sided) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ระหว่างเพศ และการทำหมัน ด้วยวิธี Pearson Chi-square พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 2 อัตราส่วน CD4+:CD8+ ในแมวที่ทำการศึกษาทั้งหมด

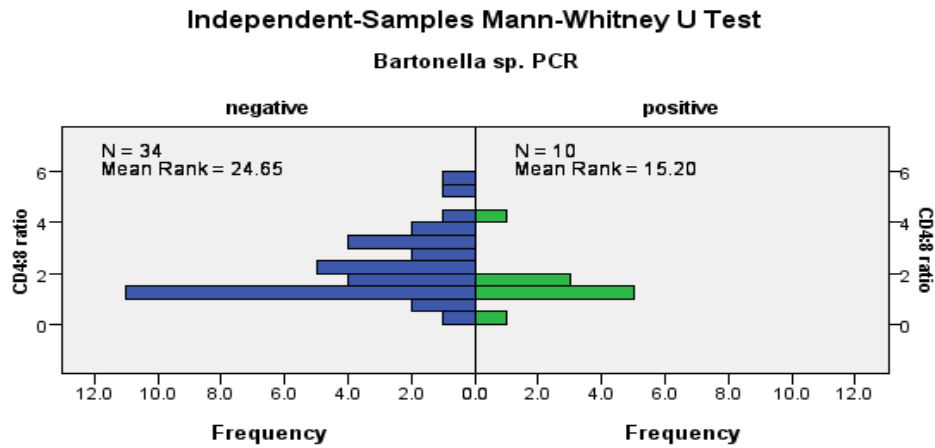
จากตัวอย่างเลือด จำนวน 44 ตัวอย่างที่สามารถเก็บได้จากแมวที่ทำการศึกษาทั้งหมด เมื่อทำการตรวจหาระดับ CD4+:CD8+ พบว่า ค่าอัตราส่วน CD4+:CD8+ ของแมวที่ทำการศึกษาทั้งหมดมีค่าตั้งแต่ 0.329 จนถึง 5.6312 โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 2.042 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ 1.224 (ภาพที่ 2, ภาคผนวกที่ 2) ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน CD4+:CD8+ ในกลุ่มต่างๆ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน CD4+:CD8+ ของกลุ่มแมวที่ศึกษา

กลุ่มแมวที่ศึกษา (n)	ค่า CD4+:CD8+ (mean \pm SD) (min, max)
แมวที่ติดเชื้อ <i>B. henselae</i> (10)	1.46 \pm 0.98 (0.32, 4.00)
แมวติดเชื้อ FIV (7)	1.73 \pm 1.73 (0.60, 5.63)
แมวติดเชื้อ FIV ร่วมกับ <i>B. henselae</i> (1)	1.02
แมวติดเชื้อ FeLV (10)	1.66 \pm 1.01 (0.32, 3.30)
แมวติดเชื้อ FeLV ร่วมกับ <i>B. henselae</i> (2)	0.65

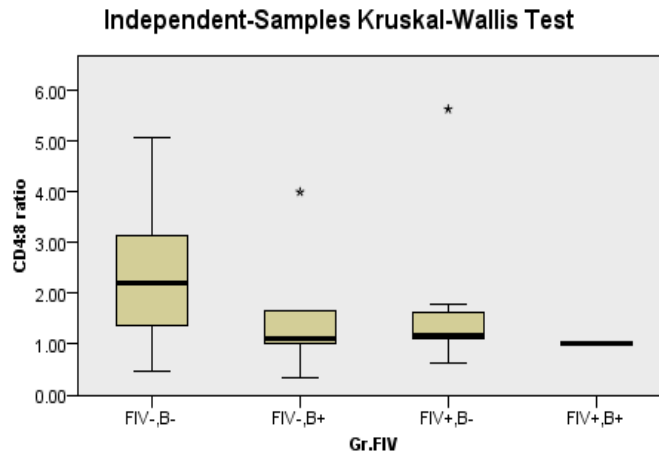
หมายเหตุ: n = จำนวนแมวในแต่ละกลุ่มการศึกษา

จากผลการตรวจ ระดับ CD4+:CD8+ ratio เมื่อใช้วิธีการทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลของ 2 กลุ่มแมวที่พบการติดเชื้อ *Bartonella henselae* ด้วยวิธี PCR พบว่าอัตราส่วน ระดับ CD4+:CD8+ ในกลุ่มที่ติดเชื้อ *Bartonella henselae* และกลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.041$) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 อัตราส่วน CD4+:CD8+ ในแมวที่ทำการศึกษาทั้งหมดร่วมกับผลการติดเชื้อ *Bartonella henselae*

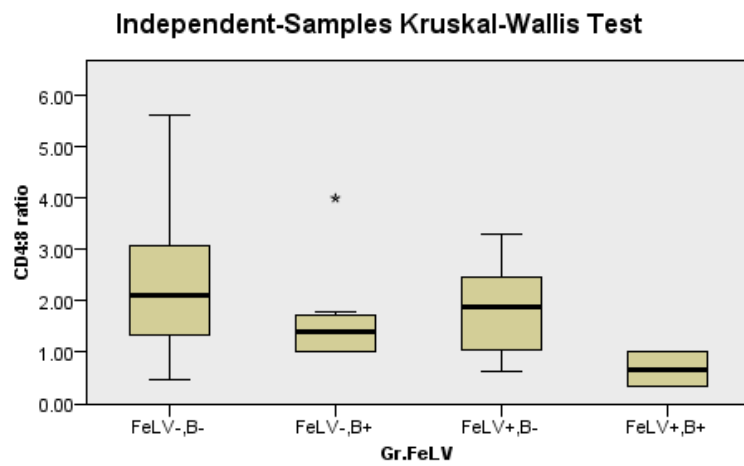
เมื่อศึกษาอัตราส่วน CD4+:CD8+ ratio ในแมวกลุ่มที่พบและไม่พบการติดเชื้อ FIV ร่วมกับการติดเชื้อ *Bartonella henselae* พบว่าทั้ง 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ตรวจไม่พบการติดเชื้อทั้ง FIV และ *Bartonella* spp., กลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อ FIV แต่พบการติดเชื้อ *Bartonella* spp., กลุ่มที่พบการติดเชื้อ FIV แต่ไม่พบการติดเชื้อ *Bartonella* spp. และกลุ่มที่พบการติดเชื้อทั้งคู่ พบว่า ไม่มีความแตกต่างของค่า CD4:CD8 ระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.052$) แต่ค่า CD4:CD8 มีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อมีการติดเชื้อ FIV ร่วมกับการติดเชื้อ *Bartonella* spp. (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 อัตราส่วน CD4+:CD8+ ในแมวที่ทำการศึกษากลุ่มติดเชื้อ FIV และ FIV ร่วมกับผลการติดเชื้อ *Bartonella henselae*

หมายเหตุ FIV- /B- = Feline immunodeficiency virus negative *Bartonella* spp. negative
 FIV-/B+ = Feline immunodeficiency virus negative *Bartonella* spp. positive
 FIV+/B- = Feline immunodeficiency virus positive *Bartonella* spp. negative
 FIV+/B+ = Feline immunodeficiency virus positive *Bartonella* spp. positive

เมื่อพิจารณาในกลุ่มแมวที่ติดเชื้อ Feline leukemia virus (FeLV) ในทำนองเดียวกันเมื่อศึกษาระดับ CD4+:CD8+ ratio ในกลุ่มที่พบและไม่พบการติดเชื้อ FeLV ร่วมกับการติดเชื้อ *Bartonella* spp. พบว่าระดับ CD4+:CD8+ ratio มีแนวโน้มลดลงเมื่อมีการติดเชื้อทั้ง FeLV ร่วมกับ *Bartonella* spp. แต่เมื่อทำการทดสอบทางสถิติระหว่างการติดเชื้อ FeLV กับค่าอัตราส่วน CD4+:CD8+ พบว่าไม่มีความแตกต่างของระดับ CD4+:CD8+ ratio ในแต่ละกลุ่มทางสถิติ ($p=0.069$) อย่างไรก็ตามหากดูภาพประกอบจะพบว่าแมวกลุ่มที่ติดเชื้อ FeLV ร่วมกับ *Bartonella* spp. นั้นมีระดับอัตราส่วน CD4+:CD8+ ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ ที่ทำการศึกษา (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 อัตราส่วน CD4+:CD8+ ในแมวที่ทำการศึกษากลุ่มติดเชื้อ FeLV กับผลการติดเชื้อ *Bartonella* spp.

หมายเหตุ FeLV- /B- = Feline leukemia virus negative *Bartonella* spp. negative
 FeLV-/B+ = Feline leukemia virus negative *Bartonella* spp. positive
 FeLV+/B- = Feline leukemia virus positive *Bartonella* spp. negative
 FeLV+/B+ = Feline leukemia virus positive *Bartonella* spp. positive

นอกจากนี้เมื่อศึกษาในกลุ่มแมวที่ไม่พบการติดเชื้อ FIV โดยเปรียบเทียบระดับ CD4:CD8 ratio ระหว่างกลุ่มที่พบและไม่พบการติดเชื้อ *Bartonella* spp. พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.070)

ตารางที่ 7 จำนวนแมวปกติและแมวติดเชื้อ FeLV ที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจหาเชื้อบาร์โทเนลล่า ด้วยวิธี PCR

แมวที่ศึกษา	ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Bartonella</i> spp.		รวม
	ผลลบ (ตัว)	ผลบวก (ตัว)	
แมวปกติ	56	11	67
แมวป่วยด้วยโรค FeLV	10	3	13
รวม	66	14	80

หมายเหตุ: FeLV = Feline leukemia virus

สรุปและวิจารณ์ผล

เมื่อศึกษาถึงความชุกของการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในแมวปกติและแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง ที่มารับการรักษา ณ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2561 พบว่ามีความชุกเท่ากับ 16.67% ซึ่งต่ำกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ของผู้วิจัยในปี พ.ศ. 2557 ที่มีความชุกเท่ากับ 35% (21) ค่าความชุกที่มีค่าน้อยลงอาจมีสาเหตุจากการใช้ยาป้องกันหมัดที่มากในรูปแบบหยอดหลัง ซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา เนื่องจากการรณรงค์ ให้ความรู้ ความเข้าใจ เกี่ยวกับโรคที่สามารถติดต่อผ่านหมัดแมวสู่คน กอปรกับการพัฒนาการเลี้ยงดูแมวและความนิยมของการเลี้ยงแมวที่มีมากขึ้นในปัจจุบัน

ในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อทำการศึกษาถึงชนิดของการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ด้วยวิธี PCR ในแมวที่เข้ามารับการฉีดวัคซีนป้องกันโรค และแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง พบว่าเป็นเชื้อ *Bartonella henselae* ทั้งหมด ตรวจพบการติดเชื้อในแมวจำนวน 15 ตัวจากแมวที่ทำการศึกษาทั้งสิ้น 90 ตัว เชื้อ *Bartonella henselae* เป็นเชื้อชนิดเดิมที่คณะผู้วิจัยเคยตรวจพบในแมวที่ได้ทำการศึกษาก่อนหน้า ในปี พ.ศ. 2557 (19) เชื้อ *Bartonella henselae* นี้สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในคนจากโรคแมวข่วน (cat scratch disease, CSD) ตรวจพบครั้งแรกในปี 1950 ที่ประเทศฝรั่งเศส แต่ทราบสาเหตุที่แท้จริงในปี 1992 เชื้อนี้ก่อให้เกิดผู้ป่วยในประเทศสหรัฐอเมริกาประมาณ 22,000-24,000 รายต่อปี (5) ในจำนวนนี้มีประมาณ 2,000 รายที่มีอาการรุนแรงจนต้องเข้ารับการรักษาตัวที่โรงพยาบาล ในยุโรปมีรายงานผู้ป่วยหลายพันรายต่อปี จากผลการศึกษาพบหลักฐานทางวิทยาเชื้อมต่อเชื้อ *Bartonella henselae* ในคนที่มีภูมิคุ้มกันปกติได้ร้อยละ 3.6-6 และตรวจพบเชื้อ *Bartonella* spp. มีปริมาณที่สูงในประชากรกลุ่มเสี่ยงบางกลุ่ม เช่น สัตวแพทย์และเด็ก ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีของโรคในแมวเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1997 (8)

แมวส่วนใหญ่ที่ตรวจพบการติดเชื้อ *Bartonella henselae* ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นแมวปกติที่แข็งแรงและไม่มีประวัติการเจ็บป่วยถึง 11 ตัว สอดคล้องกับการศึกษาของ Satranarakun และคณะในปี 2016 ที่พบการติดเชื้อในแมวที่ได้รับการเลี้ยงดูเป็นอย่างดีและตรวจไม่พบหมัดบนตัวจากการสังเกต (19) มีแมวที่ป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องและแมวที่ติดเชื้อ Feline leukemia virus ที่สามารถติดเชื้อ *Bartonella henselae* ได้ แต่จำนวนน้อยกว่าแมวปกติ แสดงให้เห็นว่า โรคที่ก่ระดับภูมิคุ้มกันในแมว เช่น โรคภูมิคุ้มกันบกพร่องในแมว และ/หรือ โรคไวรัสสวิตช์เมียในแมว เป็นต้น ไม่ได้เป็นโรคที่โน้มนำให้เกิดการติดเชื้อ *Bartonella* spp. โดยตรง แต่ระดับของภูมิคุ้มกันในแมวต่างหากที่เป็นตัวกำหนดว่าแมวตัวนั้นจะติดเชื้อ *Bartonella* spp. หรือไม่ มีรายงานในเด็กหรือคนที่มีอายุต่ำกว่า 21 ปี ส่วนมากตรวจพบในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Human Deficiency Virus Infection; HIV) ระยะพักตัวของโรคกินเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ จึงเป็นการยากที่จะคาดเดาว่าแมวตัวใดที่จะติดเชื้อ *Bartonella* spp. ได้ เพราะแมวเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อ *Bartonella* spp. ที่ไม่แสดงอาการผิดปกติให้สังเกตเห็นและแม้แตแมวที่ติด

โรคที่มักทำให้ระดับภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ ได้แก่ โรคภูมิคุ้มกันบกพร่องในแมว และ/หรือ โรคไวรัสสิวิคเมียในแมว ก็ไม่ได้ติดเชื้อ *Bartonella* spp. นี้ทั้งหมด ซึ่งสามารถพบได้จากผลการศึกษาในครั้งนี้

การศึกษาก่อนหน้าเป็นจำนวนมากในแมวที่ระบุว่า แมวที่ติดเชื้อ *Bartonella* spp. มักไม่แสดงอาการผิดปกติหรือมีอาการผิดปกติเล็กน้อย (23) ซึ่งแตกต่างจากการติดเชื้อในคนและสุนัข เชื้อนี้ทำให้สุนัขแสดงอาการทางคลินิกและพบความผิดปกติที่คล้ายอาการผิดปกติที่ตรวจพบในคน มีรายงานในคนการติดเชื้อ *Bartonella henselae* จะทำให้ผู้ป่วยมีไข้ และมีภาวะติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิตเป็นระยะเวลาานาน อาการของโรคไม่เด่นชัด อาจพบลักษณะเป็นตุ่มที่บริเวณที่เกา จากนั้นราว 3-10 วัน จะมีการบวมโตของต่อมน้ำเหลืองบริเวณที่ใกล้กับรอยโรค ต่อมน้ำเหลืองที่มักบวมโต คือ บริเวณรักแร้ ต้นแขน คอ และไหปลาร้า (axillary epitrochlear cervical และ supraclavicular) คนไข้จะมีอาการปวดเมื่อยตามตัว ส่วนใหญ่ขนาดของต่อมน้ำเหลืองจะเล็กลงภายใน 1 เดือน แต่บางรายอาจมีหนองอยู่ภายใน (23)

นอกจากนี้ยังพบ cutaneous bacillary angiomatosis peliosis hepatitis ม้ามอักเสบ ภาวะติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิตและเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบสามารถพบได้บ่อยในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือในคนไข้ติดเชื้อเอดส์ และยังพบในรายที่มีการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยในกลุ่มนี้บางราย อาจพบอาการทางคลินิกที่รุนแรง เช่น กลุ่มอาการ “Parinaud oculoglandular” สมองอักเสบ ประสาทจอตาอักเสบ มีอาการทางประสาท เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบ ผื่นที่มีก้อนใต้ผิวหนัง (erythema nodosum) และมีภาวะติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิต

เชื้อ *Bartonella henselae* ที่ตรวจได้ในครั้งนี้เป็นหนึ่งใน 17 ชนิดที่สามารถก่อโรคได้ในคน เพราะปัจจุบันพบว่า เชื้อที่มีความเป็นไปได้ที่ก่อโรคในคนมี 7 ชนิดที่แยกได้จากสุนัขและแมว คือ *B. henselae* *B. clarridgeiae* *B. koehlerae* *Bvb* *B. washoensis* *B. elizabethae* และ *B. quintana* โดยที่แมวเป็นตัวกักโรคของเชื้อ *Bartonella* 5 ชนิดคือ *B. henselae* *B. clarridgeiae* *B. bovis* และ *B. koehlerae* และ *B. quintana* ส่วนสุนัขบ้านเป็นตัวกักโรคของเชื้อ *Bartonella* 7 ชนิดคือ *Bvb* *B. henselae* *B. clarridgeiae* *B. washoensis* *B. elizabethae* *B. bovis* และ *B. quintana* (24)

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสามารถตรวจพบการติดเชื้อในแมวตั้งแต่อายุ 3 เดือน ถึงอายุ 12 ปี เชื้อนี้สามารถติดต่อสู่แมวได้ในทุกช่วงอายุ และทุกเพศ การตรวจพบการติดเชื้อ *Bartonella henselae* ในแมวอายุน้อยในครั้งนี้นี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่า แมวอายุน้อยกว่า 1 ปีโดยเฉพาะแมวที่มีหมัดจำนวนมากสามารถตรวจพบเชื้อนี้ได้ หรือในผู้ที่ถูกแมวข่วนหรือกัด นอกจากนี้พบมากในผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 20 ปีที่เลี้ยงลูกแมวที่ติดหมัดแมว (23)

การศึกษานี้สนับสนุนว่าการมีหมัดบนตัวแมวเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการติดเชื้อ *Bartonella* spp. เนื่องจากเมื่อพิจารณาถึงผลของการมีหมัดบนตัว กับ การตรวจพบ *Bartonella henselae* ได้ถึง 11 ตัว จากแมวทั้งหมด คนสามารถติดเชื้อ *Bartonella henselae* ได้จากการเกาหรือถูกแมวข่วน เชื้อจะติดต่อสู่คนโดยหมัดแมว อย่างไรก็ตามการตรวจพบเชื้อในหมัดแมวนั้นมีความสำคัญในการที่เชื้อจะอยู่ได้ในตัวแมว การถูกเห็บแมวกัดจึงเป็นความเสี่ยงของการติดเชื้อโรคแมวข่วนที่สำคัญในคน (25)

ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *B. henselae* ร่วมกับเส้นเลือดดำที่จอตาอักเสบเป็นหย่อมๆ เส้นประสาทจอตาอักเสบ การมีแขนงเส้นเลือดเกิดใหม่ที่เส้นประสาทจอตาและเส้นประสาทตา และมีการอุดตันที่เส้นเลือดดำและเส้นเลือดแดง ไม่ค่อยพบอาการทางระบบประสาท และคนไข้สามารถหายจากโรคได้เองภายใน 1 ปี โดยไม่ได้รับการรักษา ในรายที่วินิจฉัยด้วยวิธีการทางวิทยาเซรุ่มพบ ตับและไตโต มีการสลายของกระดูก พบรอยโรคคล้ายเนื้องอกที่เต้านม ตับ ม้าม และพบภาวะไตส่วนโกลเมอรูลัสอักเสบในผู้ป่วยที่มีไข้เป็นระยะเวลานานโดยไม่พบพยาธิภาวะของต่อมน้ำเหลือง อ่อนเพลียเรื้อรัง โลหิตจางเนื่องจากเม็ดโลหิตแดงแตก ตรวจพบลักษณะเป็นจ้ำๆ จากภาวะเกล็ดเลือดน้อย พบกลุ่มอาการ “Henoch-Schönlein purpura” เยื่อหุ้มปอดอักเสบ ปอดอักเสบ และขอบเล็บอักเสบ ส่วนมากอาการเหล่านี้จะหายเองภายในไม่กี่สัปดาห์หรือภายใน 2-3 เดือน มักไม่พบภาวะติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิตในคนที่มีภูมิคุ้มกันแข็งแรง ในคนที่มีรอยโรคที่ลิ้นหัวใจมักตรวจพบภาวะเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (26,27)

เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันของแมวปกติและแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องต่อการติดเชื้อ *Bartonella* spp. และหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับภูมิคุ้มกันของแมวกับอาการผิดปกติที่แมวแสดงออก ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าค่าอัตราส่วน CD4+:CD8+ ที่ต่ำกว่าปกติมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Bartonella henselae* ที่ตรวจพบด้วยวิธี PCR จากการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงให้เห็นว่าระดับภูมิคุ้มกันในร่างกายของแมวเป็นปัจจัยสำคัญในการติดเชื้อ *Bartonella henselae* ยิ่งแมวที่มีค่าอัตราส่วน CD4+:CD8+ ต่ำ ยังมีโอกาสติดเชื้อ *Bartonella henselae* สูงมากขึ้น ส่วนในแมวที่ติดเชื้อ Feline immunodeficiency virus นั้น ไม่ได้มีผลต่อความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *Bartonella henselae* แต่อย่างใด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระดับภูมิคุ้มกันของแมวป่วยด้วย FIV ไม่ได้มีระดับต่ำมาก เช่น แมวอาจติดเชื้อ FIV แต่อยู่ในระยะไม่แสดงอาการ ซึ่งแมวในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มักมีค่าอัตราส่วน CD4+:CD8+ อยู่ในช่วงเกือบปกติ ส่วนแมวที่มีอัตราส่วน CD4+:CD8+ ที่มีค่าต่ำมาก มักพบได้ในแมวป่วยด้วย FIV ในระยะ Aids-related complex และกลุ่มแมวใน terminal stage น่าจะเป็นแมวที่มีโอกาสติดเชื้อ *Bartonella henselae* ได้สูงสุด เนื่องจากแมวในการศึกษานี้ที่ติดเชื้อ FIV ต่างเป็นแมวที่อยู่ในกลุ่ม asymptomatic phase ที่ไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ เป็นส่วนใหญ่ จึงทำให้ไม่พบความสัมพันธ์ของ FIV กับโอกาสที่จะติดเชื้อ *Bartonella* spp.

การศึกษาบทบาทของระดับภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีต่อการติดเชื้อ *Bartonella* spp. ในแมวป่วยด้วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องในระยะต่างๆ ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าแมวที่ติดเชื้อ FIV อยู่ในระยะไม่แสดงอาการ (asymptomatic phase) ทั้งหมด แต่อย่างไรก็ดีผลการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า แมวในระยะไม่แสดงอาการทั้งหลายมักมีค่า CD4+:CD8+ ratio อยู่เกือบเป็นปกติ จึงไม่แปลกใจที่แมวในกลุ่มการศึกษานี้มีโอกาสที่จะติดเชื้อ *Bartonella henselae* น้อยมาก และเมื่อทดสอบความสัมพันธ์ของโรค FIV กับการติดเชื้อ *Bartonella henselae* จึงไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลที่ได้แตกต่างจากกลุ่มแมวที่ติดเชื้อ FeLV และมีค่าอัตราส่วน CD4+:CD8+ ต่ำกว่าปกติ เนื่องจากแมวติดเชื้อ FeLV ในกลุ่มนี้เป็นแมวป่วยที่แสดงอาการผิดปกติ จึงมีค่า CD4+:CD8+ ที่ต่ำกว่าจึงทำให้โอกาสที่ตรวจพบ *Bartonella henselae* สูง จึงมีมากกว่าคนติดเชื้อ *Bartonella henselae* ได้จากการเกาหรือถูกแมวข่วน เชื่อจะมีการติดต่อสู่คนโดยหมัด

แมว อย่างไรก็ตามการตรวจพบเชื้อในหมัดแมวนั้นมีความสำคัญในการที่เชื้อจะอยู่ได้ในตัวแมว การถูกเห็บแมวกัดจึงเป็นความเสี่ยงของการติดเชื้อโรคแมวข่วนที่สำคัญในคน (24)

เนื่องจากแมวเป็นสัตว์ที่นิยมเลี้ยงมากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากมีขนาดเล็กและสามารถเลี้ยงได้ในบริเวณจำกัด แมวจึงเป็นสัตว์ที่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึก โดยเฉพาะกลุ่มแมวที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำ โดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วน CD4:CD8 เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ เพื่อเพิ่มความไวในการคัดกรองโรคในแมวที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อ *Bartonella* spp. แต่ไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆให้เจ้าของเห็น และควรจัดการตรวจหาภูมิคุ้มกันในแมวซึ่งเลี้ยงโดยเจ้าของที่มีประวัติภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ เช่น กลุ่มคนได้รับเคมีบำบัด กลุ่มคนที่ติดเชื้อโรค HIV หรือกลุ่มคนสูงอายุที่เลี้ยงแมวจำนวนมาก เป็นต้น เนื่องจากแมวที่เลี้ยงอาจแพร่เชื้อ *Bartonella* spp. นี้สู่ผู้เลี้ยงและเป็นแหล่งรังโรคที่อาจติดต่อถึงคนต่อไป นอกจากนี้ควรมีโปรแกรมกำจัดหมัดบนตัวแมวเป็นประจำ เพื่อยับยั้งการแพร่ของเชื้อสู่แมวผ่านการติดหมัด (27)

บรรณานุกรม

1. รสมา ภูสุนทรธรรม, คณิศศักดิ์ อรวีระกุล, ภาวนา อุทัยโชติวรรณ, กาญจน์ เชื้อศิริ. 1998 (2541). "ความชุกของโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องในแมวที่แสดงอาการทางคลินิกของโรคเรื้อรัง" เวชสารสัตวแพทย์ 28(3):77-88.
2. รสมา ภูสุนทรธรรม, พินิจ ภูสุนทรธรรม, ภาวนา อุทัยโชติวรรณ, พิทชา พรหมิงมาศ, จุฑาทิพย์ เขียวเจริญ, ธาเรีย เกียรติทอง. 2002 (2545). "ผลของการใช้ยา Zidovudine (AZT) ในการรักษาแมวที่ติดเชื้อไวรัสภูมิคุ้มกันบกพร่อง" สัตวแพทยสาร 53(1):45-53.
3. ศศิภา สิงหะไชย, พิมพ์พนิต โขคลิขิตอำนาจ, ภาณุวัฒน์ ทองดี, วิชระเวศ ประชาณุกุล, รสมา ภูสุนทรธรรม. 2013 (2558). "การสำรวจความชุกของเชื้อ *Bartonella henselae* ในตัวอย่างเลือดแมวที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย" รายงาน Special Topic ประจำปี 2558 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
4. Kosoy, M., Morway, C., Sheff, K.W., Bai, Y., Colborn, J., Chalcraft, L., Dowell, S.F., Peruski, L.F., Maloney, S.A., Baggett, H., Sutthirattana, S., Sidhirat, A., Maruyama, S., Kabeya, H., Chomel, B.B., Kasten, R., Popov, V., Robinson, J., Kruglov, A. and Petersen, L.R. 2008. *Bartonella tamiae* sp. nov., a newly recognized pathogen isolated from three human patients from Thailand. J Clin Microbiol. 46(2): 772-775.
5. Maruyama, S., Boonmar, S., Morita, Y., Sakai, T., Tanaka, S., Yamaguchi, F., Kabeya, H. and Katsube, Y. 2000. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* among healthy individuals in Thailand. J Vet Med Sci .62(6): 635-637.
6. Paitoonpong, L., Chitsomkasem, A., Chantrakooptungool, S., Chitsomkasem, A., Chantrakooptungool, S., Kanjanahareutai, S., Tribuddharat, C. and Srifuengfung, S. 2008. *Bartonella henselae*: first reported isolate in a human in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 39(1): 123-129.
7. Kordick, D.L., Swaminathan, B., Greene, C.E., Wilson, K.H., Whitney, A.M., O'Connor, S., Hollis, D.G., Matar, G.M., Steigerwalt, A.G., Malcolm, G.B., Hayes, P.S., Hadfield T.L., Breitschwerdt, E. B. and Brenner, D. J. 1996. *Bartonella vinsonii* subsp. berkhoffii subsp. nov., isolated from dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. vinsonii; and emended description of *Bartonella vinsonii*. Int J Syst Bacteriol. 46(3): 704-709.
8. Boonma, S., Poapalathep, A., Pisetpaisarn, K., Sanyathitiseeree, P., Maruyama, S. and Katsube, Y. 1997. Prevalence of *Bartonella henselae* Antibodies in Domestic Cats in Thailand. Kasetsart J. 31: 268-270.

9. Jitchum, S., Wongnarkpet, S., Amavisit, P., Maruyama S. and Jittapalapong, S. 2009. Detection of *Bartonella* spp. Infection of Stray Cats Resided in Monasteries of Bangkok Metropolitan areas by Polymerase Chain Reaction Technique. Proceeding Kasetsart University Annual Conference, Bangkok (Thailand). 47: 139-147.
10. La, V.D., Tran-Hung, L., Aboudharam, G., Raoult, D. and Micheal, D.M. 2005. *Bartonella quintana* in domestic cat. Emerg Infect Dis. 11: 1287–1289.
11. Marston, E.L., Finkel, A.B., Regnery, R.L., Winoto, I.L., Graham, R.R., Wignal, S., Simanjuntak, G. and Olson, J.G. 1999. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in an Urban Indonesian Cat Population. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6(1): 41-44.
12. Maruyama, S., Sakai, T., Morita, Y., Tanaka, S., Kabeya, H., Boonmar, S., Poapolathep, A., Chalarmchaikit, T., Chang, C.C., Kasten, R.W., Chomel, B.B. and Katsube, Y. 2007. Prevalence of Bartonella species and 16s rRNA gene types of *Bartonella henselae* from domestic cats in Thailand. Am J Trop Med Hyg. 65: 783–787.
13. Rolain, J.M., Franc, M., Davoust, B. and Rauolt, D. 2003. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. Emerg Infect Dis. 9: 338–342.
14. Yamamoto J.K., Hansen H., Ho W.E., Morishata T.Y., Okuda T., Sawa T.R., Nakamura R.M. and Pederson N.C. 1989. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cat from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. J Am Vet Med Assoc. 194(2): 213-220.
15. Yamamoto, K., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Hew, C.M., Carrie M. Hew, David K. Weber, D.K., Lee, W.I., Koehler, J.E. and Pedersen, N.C. 2003. Infection and re-infection of domestic cats with various Bartonella species or types: *B. henselae* type I is protective against heterologous challenge with *B. henselae* type II, Vet Microbiol. 92(1-2): 73-86.
16. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequenceing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci. 72: 5463-5467.
17. Stevenson, H.L., Bai, Y., Kosoy, M.Y., Montienieri, J.A., Lowell, J.L., Chu, M.C. and Gage, K.L. 2003. Detection of novel Bartonella strains and Yersinia pestis in prairie dogs and their fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae and Pulicidae) using multiplex polymerase chain reaction. J Med Entomol. 40: 329-337.

18. Satranarakun P, Maruyama S, Kabeya H, Sato S, Jittapalapong S, Jitchum S, Jiyipong T, Rodkhum C, **Pusoonthornthum R.** Prevalence of *Bartonella* infection in well-cared cats in Bangkok metropolitan. Thai J Vet Med 2016. 46(4): 555-560.
19. Chomel B.B., Boulouis H.J., Maruyama S., Breitschwerdt E.B. 2006. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. Emerg Infect Dis. 12: 389-394.
20. Kosoy M, Morway C, Sheff KW, Bai Y, Colborn J, Chalcraft L, et al. *Bartonella tamiae* sp. nov., a newly recognized pathogen isolated from three human patients from Thailand. J Clin Microbiol 2008; 46: 772-775.
21. Chomel B.B., Kasten R.W., Floyd-Hawkins K., et al. 1996. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. J Clin Microbiol. 34: 1952–1956.
22. Chomel, B.B., MacDonald, K.A., Kasten, R.W., Chang, C.C., Wey, A.C., Foley, J.E., Thomas, W.P. and Kittleson, M.D. 2001. Aortic valve endocarditis in a dog due to *Bartonella clarridgeiae*. J Clin Microbiol. 39(10): 3548-3554.
23. Garré, L., Guaraglia, W., Cuatz, D., Kaufman, S., Gil, H., and Rosa, A.F.D. 2008. Infective endocarditis due to *Bartonella quintana*. Medicina (B Aires). 68(2): 144-146.
24. Lappin M.R., Davis W.L., Hawley J.R., Brewer M., Morris A., Stanneck D. 2013. A flea and tick collar containing 10% imidacloprid and 4.5% flumethrin prevents flea transmission of *Bartonella henselae* in cats. Parasit Vectors. 6:26.
25. Bown, K. J., M. Benneth and M. Begon. 2004. Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. Emerg Infect Dis. 10: 684–687.
26. Breitschwerdt, E.B. and Kordick, D.L. 2000. Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin Microbiol Rev. 13: 428–438.
27. Castle, K.T., Kosoy, M., Lerdthusnee, K., Phelan, L., Bai, Y., Gage, K.L., Leepitakrat, W., Monkanna, T., Khlaimanee, L., Chandranoi, K., Jone, J.W. and Colemann, R.E. 2004. Prevalence and diversity of Bartonella in rodents of northern Thailand: a comparison with Bartonella in rodents from southern China. Am J Trop Med Hyg. 70(4): 429-433.
28. Chang, C.C., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Romano, V. and Tietze, N. 2001. Molecular evidence of *Bartonella* sp. in questing adult Ixodes pacificus ticks in California. J Clin Microbiol. 39: 1221–1226.

29. Chomel, B.B., Carlos, E.T., Kasten, R.W., Yamamoto, K., Chang, C.C., Carlos, R.S., Abenes, M.V. and Pajares, C.M. 1999. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from The Philippines Am. J. Trop. Med. Hyg. 60(4): 593-597.
30. Chung, C.Y., Kasten, R.W., Paff, S.M., Vanhorn, B.A., Vayssier-Taussat, M., Boulouis, H.J. and Chomel, B.B. 2004. *Bartonella* sp. DNA associated with biting flies from California. Emerg Infect Dis. 10: 1311–1313.
31. Durden, L.A., Ellis, B.A., Banks, C.W., Crowe, J.D., and Oliver, J.H. 2004. Ectoparasites of gray squirrels in two different habitats and screening of selected ectoparasites for Bartonellae. J Parasitol. 90: 485–489.
32. Fenollar, F., Sire, S. and Raoult, D. 2005. *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* as an agent of blood culture-negative endocarditis in a human. J Clin Microbiol. 43(9): 945-947
33. Hartmann FG, Thum I, Ackley C. 1992. Decline in CD4+ cell numbers in cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. J Virol 86:1484-1482.
34. Jacomo, V., Kelly, P.J. and Raoult D. 2002. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). Clin Diagn Lab Immunol. 9: 8-18.
35. Jonathan, A. W., Rickeie, W. K., Sunlian, F., Jane, E. S., Emir, H., Michelle, R. S., Stephen W. B. and Chomel, B.B. 2007. Experimental infection of domestic cats with passaged genotype I *Bartoenlla henselae*. Vet. Microbiol. 122: 290-297.
36. Just, F.T., Gilles, J., Pradel, I., Pfalzer, S., Lengauer, H., Hellmann, K. and Pfister, K. 2008. Molecular evidence for *Bartonella* spp. in cat and dog fleas from Germany and France. Zoonoses Public Health. 55(8-10): 514-520.
37. Kim, Y.K., Seo, K.W., Lee, J.H., Choi, E.W., Lee, H.W., Hwang, C.Y., Shin, N.S., Youn, H.J., Hwa, Y. and Youn, H.Y. 2009. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats and dogs in Korea J Vet Sci. 10(1): 85-87.
38. Koehler, J.E., Quinn, F.D., Berger, T.G., LeBoit, P.E. and Tappero, J.W. 1992. Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. N Engl J Med. 327: 1625-1631.
39. Kosoy , M.Y., Regnery, R.L., Tzianabos, T., Marston, E.L., Jones, D.C., Green, D., Maupin, G.O., Olson, J.G. and Childs, J.E. 1997. Distribution, diversity, and host specificity of *Bartonella* in rodents from the Southeastern United States. Am J Trop Med Hyg. 57: 578–588.

40. Lee, S.C., Fung, C.P., Lee, N. and Shieh, W.B. 1998. Cat-scratch disease caused by *Bartonella henselae*: the first case report in Taiwan. J Formo Med Assoc. 97(8): 569-572.
41. Mitsuya H, Weinhold KJ, Fuman PA, et al. 1985. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits infectivity and cytopathic effect of Human T-Lymphocyte Virus Type III/Lymphadenopathy-associated virus in vitro. Proc Natl Acad Sci 82:7096-7100.
42. Pedersen N.C., Ho E., Brown M.L. and Yamamoto J.K. 1987. Isolation of a T-Lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. Science. 235-790-793.
43. Sanogo, Y., Zeaiter, Z., Caruso, G., Merola, F., Shpynov, S., Philippe Brouqui, P. and Raoult, D. 2003. *Bartonella henselae* in Ixodes ricinus ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. Emerg Infect Dis. 9: 329-332.
44. Ueno, H., Hohdatsu, T., Muramatsu, Y., Koyama, H. and Morita, C. 1996. Does coinfection of *Bartonella henselae* and FIV induce clinical disorders in cats? Microbiol. Immunol. 40: 617-620.
45. Satranarakun P, Kubera A, Jitapalapong S, Rodkhum C, **Pusoonthornthum R**. Expression and purification of *Bartonella henselae* VirB protein. J Trop Med Parasitol 2017. 40: 8-19.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 แสดงจำนวนแมวที่ทำการศึกษาแบ่งตามอายุ

อายุ (ปี)	จำนวนแมว	เปอร์เซ็นต์	จำนวนเปอร์เซ็นต์รวม
.3	5	5.6	5.6
.6	4	4.4	10.0
.7	3	3.3	13.3
.8	4	4.4	17.8
1.0	3	3.3	21.1
1.3	2	2.2	23.3
1.6	4	4.4	27.8
2.0	19	21.1	48.9
2.6	1	1.1	50.0
3.0	5	5.6	55.6
3.6	1	1.1	56.7
4.0	12	13.3	70.0
5.0	9	10.0	80.0
6.0	1	1.1	81.1
7.0	2	2.2	83.3
8.0	4	4.4	87.8
9.0	1	1.1	88.9
10.0	9	10.0	98.9
12.0	1	1.1	100.0
Total	90	100.0	

ภาคผนวกที่ 2 อัตราส่วน CD4+ : CD8+ และจำนวนแมวที่ทำการรักษาทั้งหมด

CD4:CD8	จำนวนแมว	เปอร์เซ็นต์	จำนวนเปอร์เซ็นต์รวม
.3229	1	1.1	2.3
.4553	1	1.1	4.5
.6327	1	1.1	6.8
.9977	1	1.1	9.1
1.0167	1	1.1	11.4
1.0214	1	1.1	13.6
1.0269	1	1.1	15.9
1.0376	1	1.1	18.2
1.0513	1	1.1	20.5
1.0867	1	1.1	22.7
1.1193	1	1.1	25.0
1.1215	1	1.1	27.3
1.1704	1	1.1	29.5
1.1822	1	1.1	31.8
1.2231	1	1.1	34.1
1.3059	1	1.1	36.4
1.3802	1	1.1	38.6
1.3802	1	1.1	40.9
1.4685	1	1.1	43.2
1.4919	1	1.1	45.5
1.5519	1	1.1	47.7
1.6413	1	1.1	50.0
1.6545	1	1.1	52.3
1.6844	1	1.1	54.5
1.7808	1	1.1	56.8

ภาคผนวกที่ 2 อัตราส่วน CD4+ : CD8+ และจำนวนแม่วิเคราะห์การศึกษาของแม่วทั้งหมด (ต่อ)

CD4:CD8	จำนวนแม่ว	เปอร์เซ็นต์	จำนวนเปอร์เซ็นต์รวม
1.8745	1	1.1	59.1
1.9053	1	1.1	61.4
2.1210	1	1.1	63.6
2.3101	1	1.1	65.9
2.3624	1	1.1	68.2
2.3702	1	1.1	70.5
2.3752	1	1.1	72.7
2.5376	1	1.1	75.0
2.8810	1	1.1	77.3
3.0282	1	1.1	79.5
3.2812	1	1.1	81.8
3.3062	1	1.1	84.1
3.4279	1	1.1	86.4
3.7547	1	1.1	88.6
3.8061	1	1.1	90.9
4.0000	1	1.1	93.2
4.0008	1	1.1	95.5
5.0647	1	1.1	97.7
5.6312	1	1.1	100.0
Total	44	48.9	
Missing System	46	51.1	
Total	90	100.0	

ภาคผนวกที่ 3 สรุปผลการทดสอบทางสถิติของตัวแปรที่ทำการศึกษา

สมมติฐาน	วิธีการทดสอบทางสถิติ	p-Value
The proportion of <i>Bartonella</i> spp. PCR is same across sex status	Pearson Chi-Square	0.550
The proportion of <i>Bartonella</i> spp. PCR is same across Visible Fleas	Fisher's Exact Test (2-sided)	0.161
The proportion of <i>Bartonella</i> spp. PCR is same across FeLV	Fisher's Exact Test (2-sided)	0.697
The proportion of <i>Bartonella</i> spp. PCR is same across FIV	Fisher's Exact Test (2-sided)	0.683
The proportion of <i>Bartonella</i> spp. PCR is same across FeLV*FIV group	Pearson Chi-Square	0.828
Distribution of CD4:CD8 ratio is same across categories of <i>Bartonella</i> spp. PCR	Independent Kruskal-Wallis test	0.041
Distribution of CD4:CD8 ratio is same across categories of FIV* <i>Bartonella</i> spp. PCR	Independent Kruskal-Wallis test	0.052
Distribution of CD4:CD8 ratio is same across categories of FeLV* <i>Bartonella</i> spp. PCR	Independent Kruskal-Wallis test	0.069
Distribution of CD4:CD8 ratio is same across categories of FeLV*FIV group	Independent Kruskal-Wallis test	0.215
In FIV negative group, distribution of CD4:CD8 ratio is same across categories of <i>Bartonella</i> sp. PCR	Independent Mann-Whitney U test	0.070

ประวัติคณะผู้วิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาง รสมา ภูสุนทรธรรม
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Rosama Pusoonthornthum
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1009 02445 55 7
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ A3
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และ e-mail
ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนอังรีดูนังค์ กรุงเทพมหานคร 10330 e-mail: drrosama@gmail.com
โทร: (02) 218-9412, (02) 252-9575, 095-946-4692 โทรสาร: (02) 252-9575
- ประวัติการศึกษา ต้องระบุสถาบันการศึกษา สาขาวิชาและปีที่จบการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา (ตรี โท เอกและปริญญา ประกาศนียบัตร)	อักษรย่อการศึกษา สาขาวิชา วิชาเอก และชื่อเต็ม	ชื่อสถาบันการศึกษา ประเทศ
2530	ตรี	สพ.บ. (สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2533	โท	วท.ม. (สรีรวิทยา)	มหาวิทยาลัยมหิดล
2539	เอก	Ph.D. (Veterinary Medicine)	University of Minnesota, ประเทศสหรัฐอเมริกา

- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
อายุรศาสตร์สัตว์เลี้ยง
โรคไตและระบบขับถ่ายปัสสาวะ
โรคแมว

- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

The Therapeutic Effect of Prednisolone in Cats with Immune-mediated Hemolytic Anemia.

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

95,000 Bahts

งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

The Therapeutic Effect of the Thai Herbal Plants on Clinical Signs and CD4+:CD8+ Ratios and Virus-loading in Cats Infected with Naturally Acquired Feline

Immunodeficiency Virus (FIV) Infection: A Placebo-controlled Double-blind Study	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)	1,054,800 Bahts งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
The Therapeutic Effect of the Combination of Zidovudine (AZT) and Human Interferon Alpha on Clinical Signs and CD4+:CD8+ Ratios and Virus-loading in Cats Infected with Naturally Acquired Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection: A Placebo-controlled Double-blind Study	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)	684,800 Bahts งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
The Role of Metabolic Acidosis on Parathyroid Hormone Secretion, and Changes in Calcium-phosphorus Homeostasis in Siamese Cats with Naturally Occurring Feline Chronic Renal Failure	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)	1,080,000 Bahts งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
The Therapeutic Effect of the Combination of Zidovudine (AZT) and Human Interferon Alpha on Clinical Signs and CD4+:CD8+ Ratios in Cats Infected with Naturally Acquired Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection: A Placebo-controlled Double-blind Study	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)	260,800 Bahts งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
The Role of Feline Lower Urinary Tract Diseases in Thailand	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)	384,000 Bahts งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
The Rabies Titers in Puppies Presented to Chulalongkorn University Veterinary Teaching Hospital	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)	142,000 Bahts งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

Fungbun N, Wongseripipatana S, Pusoonthornthum R. 2019. The Comparative Study of Crude Extract of *Antidesma acidum.*, Butylhydroxytoluene and Quercetin hydrate on DPPH Radical Scavenging Activity. J Vet Int Med. (submitted).

Satranarakun P, Kubera A, Jitapalapong S, Rodkhum C, Pusoonthornthum R. 2017. Expression

- and purification of *Bartonella henselae* VirB protein” J Trop Med Parasitol. 40:8-19.
- Panboon I, Asawakarn S, Pusoonthornthum R. 2017. Urine protein, urine protein to creatinine ratio and N-acetyl-B-D-glucosaminidase index in cats with idiopathic cystitis vs healthy control cats. 2017. J Feline Med Surg. 869-875.
- Jaimun K, Pusoonthornthum R. 2017. Risk factors for cats with naturally occurring chronic kidney disease. J Feline Med Surg. 19(4): 358-363.
- Satranarakun P, Maruyama S, Jitapalpong, Rodkhum C, Pusoonthornthum R. 2016. The incident of Bartonella infection in well-care cats in Bangkok Metropolitan. Thai J Vet Med 46(4): 555-560.
- Jaimun K, Pusoonthornthum R. 2016. Changes in the glutathione, oxidized glutathione, and glutathione peroxidase in cats with naturally occurring chronic kidney disease. Comp Clin Path.25(3): 655-662.
- Leopenwong P, Pusoonthornthum R. 2014. Chronic vomiting resulting from canine chronic active gastritis. J Thai Vet Pract Assoc.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่า ได้ทำการวิจัย ลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

การศึกษาความชุกและ subtype ของแมวที่ติดเชื้อโรคมูมิคัมกันบกพร่อง
แหล่งทุนภายนอก การทำวิจัยลุล่วงไปแล้วกว่า 90%
การศึกษาถึงเชื้อในระบบทางเดินหายใจของสุนัขและแมว
แหล่งทุนภายนอก งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อโครงการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัย (ผู้บริหารโครงการ หัวหน้าโครงการ และ/หรือผู้ร่วมวิจัย) ระบุเดือน และปีที่เริ่มต้นและสิ้นสุด

การศึกษาความชุกและ subtype ของแมวที่ติดเชื้อโรคมูมิคัมกันบกพร่อง
แหล่งทุนภายนอก ปี 2553 หัวหน้าโครงการวิจัย
การศึกษาถึงเชื้อในระบบทางเดินหายใจของสุนัขและแมว
แหล่งทุนภายนอก ปี 2553 หัวหน้าโครงการวิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายพินิจ ภู่อสุนทรธรรม
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Pinit Pusoonthornthum
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 5099 00425 11 1
- ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และ e-mail

หน่วยอายุรศาสตร์สัตว์เลี้ยง ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนอังรีดูนังค์ กรุงเทพมหานคร 10330

โทร: (02) 218-9412, (02) 252-9575 โทร: (02) 252-9575

- ประวัติการศึกษา ต้องระบุสถาบันการศึกษา สาขาวิชาและปีที่จบการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา
	(ตรี โท เอกและประกาศนียบัตร)	และชื่อเต็ม			
2530	ปริญญาตรี	สพ.บ.(สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต)			จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2538	ปริญญาโท	M.Sc. (Animal Health)			University of London, UK

- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมหาบัณฑิต) ระบุสาขาวิชาการ อายุรศาสตร์สัตว์เลี้ยง โรคหัวใจในสัตว์เลี้ยง
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ (โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือ ผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)
 - หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
 - งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

- งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่า ได้ทำการวิจัย ล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

The Therapeutic Effect of the Thai Herbal Plants on Clinical Signs and CD4+:CD8+ Ratios and Virus-loading in Cats Infected with Naturally Acquired Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection: A Placebo-controlled Double-blind

Study

Thai Research Council	1,054,800 Bahts
	งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
The Therapeutic Effect of the Combination of Zidovudine (AZT) and Human Interferon Alpha on Clinical Signs and CD4+:CD8+ Ratios and Virus-loading in Cats Infected with Naturally Acquired Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection: A Placebo-controlled Double-blind Study	
Thai Research Council	684,800 Bahts
	งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
The Role of Metabolic Acidosis on Parathyroid Hormone Secretion, and Changes in Calcium-phosphorus Homeostasis in Siamese Cats with Naturally Occurring Feline Chronic Renal Failure	
The Thai Research Fund	1,080,000 Bahts
	งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
The Therapeutic Effect of the Combination of Zidovudine (AZT) and Human Interferon Alpha on Clinical Signs and CD4+:CD8+ Ratios in Cats Infected with Naturally Acquired Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection: A Placebo-controlled Double-blind Study	
Thai Research Council	260,800 Bahts
	งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
The Role of Feline Lower Urinary Tract Diseases in Thailand	
The Thai Research Fund	384,000 Bahts
	งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อโครงการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัย (ผู้บริหารโครงการ หัวหน้าโครงการ และ/หรือผู้ร่วมวิจัย) ระบุเดือน และปีที่เริ่มต้น และสิ้นสุด

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายเดชฤทธิ์ นิลอุบล
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Dachkrit Nilubol
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 5 1201 00041 02 1
- ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 7
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และ e-mail

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนอังรีดูนังค์ กรุงเทพมหานคร 10330

โทร: (02) 218-9583 มือถือ 081-628-6367

- ประวัติการศึกษา ต้องระบุสถาบันการศึกษา สาขาวิชาและปีที่จบการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา
	(ตรี โท เอกและประเทศ	ปริญญา			
	ประกาศนียบัตร)	และชื่อเต็ม			
2540	ปริญญาตรี	สพ.บ. (สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต)			จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2545	ปริญญาโท	M.S. (Veterinary Microbiology)			Iowa State University
2547	ปริญญาเอก	Ph.D. Philosophy (Veterinary Microbiology with Preventive Medicine Emphasis)			Iowa State University

- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมหาบัณฑิต) ระบุสาขาวิชาการ ภูมิคุ้มกันวิทยาของสุกร ไวรัสวิทยาของสุกร ระบาดวิทยา สลิตี โรคสุกรและเวชกรรมป้องกัน
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ (โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือ ผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย การพัฒนาดีเอ็นเอวัคซีนแบบกินเพื่อป้องกันโรค porcine epidemic diarrhea (PED) ในฟาร์มสุกร สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2554

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

ชื่อโครงการ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสพอร์อาร์เอสในสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสร่วมระหว่างสายพันธุ์อเมริกาเหนือและสายพันธุ์ยุโรป ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ปี พ.ศ. 2550 สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ธันวาคม 2552) หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกรเมื่อติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสทั้งสายพันธุ์ยุโรปและอเมริกาและเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง และลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสพอร์อาร์เอส งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 (มิถุนายน 2552) หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อโครงการการผลิตสุกรปลอดเชื้อพอร์อาร์เอสจากฟาร์มติดเชื้อพอร์อาร์เอส ทุนโครงการการสร้างกำลังคนเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรม ปี พ.ศ. 2551 สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ระหว่างจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์) หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ ceftiofur ที่สามารถยับยั้ง *Streptococcus suis* ที่แยกได้จากฟาร์มสุกรในประเทศไทย ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (ธันวาคม 2551) ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อโครงการ การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา CeftiofurHCl ในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส ทุนอุดหนุนการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ธันวาคม 2550) ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อโครงการ ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน NSP-2 ของเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสที่แยกได้จากสุกรที่ติดเชื้อร่วมของสายพันธุ์อเมริกาเหนือและยุโรป งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่า
ได้ทำการวิจัย ล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

ชื่อโครงการ การพัฒนาดีเอ็นเอวัคซีนแบบกิน เพื่อป้องกันโรค porcine epidemic diarrhea (PED) ในฟาร์มสุกร สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2554

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อโครงการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัย

(ผู้บริหารโครงการ หัวหน้าโครงการ และ/หรือผู้ร่วมวิจัย) ระบุเดือน และปีที่เริ่มต้นและสิ้นสุด

ชื่อโครงการ การพัฒนาดีเอ็นเอวัคซีนแบบกิน เพื่อป้องกันโรค porcine epidemic diarrhea (PED) ในฟาร์มสุกร สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2554

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายชาญณรงค์ รอดคำ
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Channarong Rodkhum
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3179900013542
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ A-4
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และ e-mail
5. ประวัติการศึกษา ต้องระบุสถาบันการศึกษา สาขาวิชาและปีที่จบการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา (ตรี โท เอกและประเทศ ประกาศนียบัตร)	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา
2540	ปริญญาตรี	สพ.บ. (สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต)			จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2548	ปริญญาเอก		Ph.D. Philosophy (Aquatic Biosciences)		Tokyo University of Marine Sciences and Technology

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมหาบัณฑิต) ระบุสาขาวิชาการ
แบคทีเรียวิทยาทางสัตวแพทย์ อนุชีววิทยาทางพันธุศาสตร์ของแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์เลี้ยง
และปลุสัตว์ อนุชีววิทยาทางพันธุศาสตร์ของแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
(โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้า
โครงการวิจัย หรือ ผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)
7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

Rodkhum, C., Hirono, I., Crosa, J.H., Aoki, T. (2005). Four novel hemolysin genes of *Vibrio anguillarum* and their virulence to rainbow trout. *Microbial Pathogenesis* 39:109-119. [มี impact factor 2.303 (2005) Journal Citation Reports® 2005, published by Thomson Scientific]

Rodkhum C., Hirono I., Crosa J.H. & Aoki T. (2006) Multiplex PCR for simultaneous detection of five virulence hemolysin genes in *Vibrio anguillarum*. *Journal of Microbiological Methods*, 65: 612-618. [มี impact factor 2.297 (2005) Journal Citation Reports® 2005, published by Thomson Scientific]

Rodkhum, C., Hirono, I., Stork, M., Di Lorenzo, M., Crosa, J. H. and Aoki T. (2006) Putative virulence-related genes in *Vibrio anguillarum* identified by random genome

- sequencing. *Journal of Fish Diseases*. 29: 157-166. [มี impact factor 1.661 (2005) Journal Citation Reports® 2005, published by Thomson Scientific]
- Rodkhum C, Maki T, Hirono I, Aoki T. (2008). *gyrA* and *parC* associated with quinolone resistance in *Vibrio anguillarum*. *Journal of Fish Diseases*. 31(5):395-399. [ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2006: 7/41 (Fisheries); 23/79 (Marine & Freshwater Biology); 14/128 (Veterinary Sciences) Impact Factor: 1.715]
- Rodkhum, C., Hirono I., and Aoki T. (2004) Molecular cloning and Nucleotide sequence of *parC* and *parE* genes of *Vibrio anguillarum* and detection of its quinolone-resistant mutation. 104th General meeting of American Society for Microbiology, 23rd-27th May, 2004, New Orleans, Louisiana, USA. [by American Society for Microbiology (ASM)]
- Rodkhum, C., Hirono I., Crosa, J.H. and Aoki T. (2004) Complete Nucleotide Sequences and Characterization of Four Different Types of Hemolysin Gene from *Vibrio anguillarum* Strain H775-3. Symposium of Japanese Society of Fisheries Science in Kanto region 2004, University of Tokyo, 14th November, 2004, Tokyo, Japan. [by Japanese Society of Fisheries Science (JSFS)]
- Rodkhum, C., Na-pompet S., Jongthaleong A., Hirono I., and Aoki T (2005) Molecular Detection and Confirmation of Fluoroquinolone-resistant mutation in *GyrA* and *ParC* QRDRs from Fluoroquinolone-resistant *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from Diseased Black Tiger Shrimps (*Penaeus monodon*) and Their Cultural Environments in Thailand. Workshop on Antibiotic Resistance in Asian Aquaculture Environments, 24th-25th Febuary, 2005, Chaingmai, Thailand. [by EU funded project ASIARESIST : Hazard Analysis of Antimicrobial resistance associated with Asian Aquacultural Environments (Project no. ICA4-2000-10090)]
- Rodkhum, C., Maki, T., Hirono I., and Aoki T (2006) DNA Gyrase and Topoisomerase IV Genes and Their Association with Quinolone-resistance in *Vibrio anguillarum* isolated from Diseased Fish. Proceedings of 2nd Symposium of zoo and wildlife Medicine and the 1st workshop on the asian Zoo and Wildlife Pathology (edited by Banlunara et al.), 26-29 October 2006 Faculty of Veterinary Science Chulalongkorn University. P.58. [by Faculty of Veterinary Science Chulalongkorn University]
- ชาญณรงค์ รอดคำ ทศวัชร ฤดีใจ ฤทัย สอนองอุทัย ศรีสุภา พงศ์ศรีวัฒน์ สุภาพ กำลั้ง แพทย์ และ ผุสดี กล้าชาย “ชนิดและความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียก่อโรคที่ผิวหนังของสุนัขและแมวโดยมุ่งเน้นการดื้อต่อยากลุ่มเซฟฟาโลสปอรินและฟลูออโรควิโนโลนของเชื้อ สตาฟฟีโลคอคคัส อินเตอร์มีเดียส” หนังสือประมวลเรื่องการประชุมวิชาการ (Proceedings) ทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ ๓๓ จัด

โดยสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชัน
โรงแรมโซฟิเทล เซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ ฯ วันที่ ๓๑ ตุลาคม, ๑ -๒ พฤศจิกายน พ. ศ. ๒๕๕๐ หน้า
๑๗-๑๘.

- Pongprapachuen Y., Rodkhum C. and Pusoonthornthum R. (2008). Patterns of Urovirulence Associated Genes of *Escherichia coli* and Correlation with Urinary Tract Infection in Dogs. Proceeding of VPAT Regional Veterinary Congress 2008. P. 526-529.
- Rodkhum C., Hirono I. and Aoki T. (2008). RTX Toxin Transporter Gene and RTX Toxin Activating Protein Gene in RTX Toxin Gene Cluster of *Vibrio anguillarum* and Their Virulence to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)
Proceeding of 5th World Fisheries Congress 2008. Yokohama, Japan P. 344.
- Pinpimai K., Chankow K., Malila K., Rodkhum C., Ponpornpisit A., Chunsue N., and Pirarat N. (2008). The efficacy of *Lactobacillus rhamnosus* GG, against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis niloticus*), Proceeding of 5th World Fisheries Congress 2008. Yokohama, Japan P. 348.
- Rodkhum C., Pirarat N., Kattiya R., Wongtawatchai J. (2008). Multiplex PCR for Simultaneous Detection of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* associated with Streptococcosis in Thai Culture Tilapia. บทความวิชาการ การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ การประชุม นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 8 วันที่ 16-18 ตุลาคม 2551 หน้า 389.
- Pirarat N., Rodkhum C., Ponpornpisit A., and Chansue N. (2008). Efficacy of Human-derived probiotics, *Lactobacillus rhamnosus* GG, against *Streptococcus iniae* in Tilapias (*Oreochromis niloticus*). บทความวิชาการ การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ การประชุม นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 8 วันที่ 16-18 ตุลาคม 2551 หน้า 388.
- Rodkhum C., S. Maugkeaw, P. Makum, S. Ruedeejai, R. Snonguthai, S. Pongsiwat, (2009) Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus intermedius* Group (SIG) Isolated from Skin Lesions of Dogs in Thailand. บทความวิชาการ การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ การประชุมวิชาการคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วันที่ 3 เมษายน พ.ศ. ๒๕๕๒
- Rodkhum C., S. Maugkeaw, P. Makum, S. Ruedeejai, R. Snonguthai, S. Pongsiwat, (2009) Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus intermedius* Group (SIG) Isolated from Skin Lesions of Dogs in Thailand. The Thai Journal of Veterinary Medicine. 39(1): 91
- Nopadon Pirarat, Komkiew Pinpimai, Katreya Chankow, Kotchakorn Malila, Nantrika Chansue, Watee Niyomtham, Channarong Rodkhum (2009). *In Vitro* efficacy of Human-Derived

- Probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* Against Pathogenic Bacteria in Fish and Frogs. Thai Journal of Veterinary Medicine. 39(4): 305-310.
- Rodkhum C, Kayansamruaj P., Pirarat, N., Wongtawatchai, J. 2009. Multiplex PCR for Simultaneous Detection of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* associated with Streptococcosis in Thai Cultured Tilapia. Book of Abstracts JSPS-NRCT International Symposium Joint Seminar 2009 in Fisheries Science: Strengthening the Advancement in Fishery Research: Towards the Sustainable Cooperation. 14-15 December 2009 Rayong Province, THAILAND. P. 44.
- Rodkhum C, Satranarkun P, and Pusoonthornthum R. 2010. Surveillance of Bartonella Species from Pet Cats in Bangkok by Polymerase Chain Reaction Amplification of the 16S-23S rRNA Intergenic Region. Thai Journal of Veterinary Medicine. 40 (1): 133
- Rodkhum C., Kayansamruaj P., Pirarat N. 2011. Effect of Water Temperature on Susceptibility to *Streptococcus agalactiae* Serotype Ia Infection in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Thai Journal of Veterinary Medicine. 41(3): 309-314.
- Pirarat N., Pratakpiriya W., Jongnimitpaiboon K., Sajjawiriyakul K., Rodkhum C., Chansue N. 2011. Lymphocystis disease in cultured false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*). Aquaculture 315: 414-416.
- Pirarat N., Rodkhum C., Ponpornpisit A., Suthikrai W. 2012. *In Vitro* Efficacy of Red Kwao Krua (*Butea superba* Roxb.) Extract against Streptococcal bacteria Isolated from Diseased Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Thai Journal of Veterinary Medicine. 42 (1): 101-105.
- Rodkhum C., Kayansamruaj P., Pirarat N., Wontawatchai J. 2012. Duplex PCR for Simultaneous and Unambiguous Detection of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* associated with Streptococcosis of cultured Tilapia in Thailand. Thai Journal of Veterinary Medicine. 42(1):

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่า ได้ทำการวิจัย
คล้ววงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อโครงการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัย
(ผู้บริหารโครงการ หัวหน้าโครงการ และ/หรือผู้ร่วมวิจัย) ระบุเดือน และปีที่เริ่มต้น และสิ้นสุด

ผลงานตีพิมพ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในครั้งนี้

ผลงานตีพิมพ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในครั้งนี้

1. Satranarakun P, Kubera A, Jitapalapong S, Rodkhum C, Pusoonthornthum R. Expression and purification of *Bartonella henselae* VirB protein. J Trop Med Parasitol 2017. 40: 8-19.
2. Satranarakun P, Maruyama S, Kabeya H, Sato S, Jitapalapong S, Jitchum S, Jiyipong T, Rodkhum C, Pusoonthornthum R. Prevalence of *Bartonella* infection in well-cared cats in Bangkok metropolitan. Thai J Vet Med 2016. 46(4): 555-560.



Expression and purification of *Bartonella henselae* VirB protein

Pakkawan Satranarakun¹, Anchanee Kubera², Sathaporn Jitapalpong³,
Channarong Rodkhum⁴, Rosama Pusoonthornthum⁵

¹Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science,
Chulalongkorn University, Thailand

²Department of Genetic, Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand

³Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

⁴Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Science,
Chulalongkorn University, Thailand

Abstract

This study aimed to obtain the recombinant 17 kDa or VirB of *Bartonella henselae* or Cat Scratch Disease diagnosis application from these bacteria. Blood samples were taken from two hundred well-care client-owned cats during November 2010-November 2011. Blood collection was performed and cultured in 5% sheep blood agar. *Bartonella* species of positive samples were identified with Polymerase Chain Reaction (PCR) and gene sequencing. DNA of *B. henselae* was used as a DNA template for PCR targeting VirB gene. PCR product of VirB protein gene which is the well-known antigenic protein for *B. henselae* was cloned into pET28a and transformed into *E. coli*. Our VirB specific protein was successfully expressed and purified by affinity chromatography. The purified VirB protein was examined by Western blotting. This protein will be further employed for ELISA assay in order to detect the disease.

Keywords: Expression, *Bartonellahenselae*, Purification, VirB

Introduction

Cat scratch disease is a human disease caused by *Bartonella henselae* which presents worldwide especially in Thailand. The first report of *Bartonella* spp. was done by a surveillance of sero-prevalence in cats (Boonmar et al., 1997). In 2000, prevalence of *B. henselae* in Thailand was confirmed (Maruyama et al., 2000). In 2008, the first human

case was published and it was the first document of *B. henselae* isolation in Thailand (Paitoonpong et al., 2008). Three cases of endocarditis in human caused by *B. tamiae* were reported in KhonKaen Province (Kosoy et al., 2008). Those findings imply that Thailand may be an endemic area of *Bartonella* spp.

Cats are the main reservoirs of many species of *Bartonella* spp. including *B. clarridgeiae* (Kordick et al., 1997), *B. koehlerae* (Droz et al., 1999; Yamamoto et al., 2003) and *B. bovis* (Chomel et al., 2006), formerly *B. weissi* (Regnery et al., 2000). In cats, there have been at least six potential zoonotic *Bartonella* spp., including *B. henselae*, *B. koehlerae*

Corresponding author: Rosama Pusoonthornthum,
Department of Veterinary Medicine, Faculty of
Veterinary Science, Chulalongkorn University,
Thailand.
Email: drrosama@gmail.com

(Quorollo et al., 2014), *B. clarridgeia* (Chomel et al., 1999; Giacomo et al., 2002), *B. vinsonii* subsp. *Berkhoffii* (Bvb) (Varanat et al., 2009), *B. Quintana* and *B. bovis*. However *B. henselae* and *B. clarridgeiae* are the major cause of cat scratch disease in human patients. Cats and cat fleas were the major transmission of CSD to humans.

At present, the common clinical diagnostic methods for feline bartonellosis is serological testing. Current serological testing for *B. spp.* antibody includes indirect immunofluorescence assay (IFA) (Pons et al., 2005) and ELISA (Sander et al., 2001). IFA is not practical due to the unavailability of fluorescent microscope outside research laboratory or veterinary schools. Many studies showed the limitation of IFA which is very low in the sensitivity (Bergmans et al., 1997; Zbinden, 1998). IFA is not only very low in the sensitivity but also cross reactivity between *B. spp.* (Iralu et al., 2006) and other bacteria such as *Chlamydia sp.* (Maurin et al., 1997). ELISA can facilitate the diagnosis of this disease as the advantages of the ELISA over IFA are: (1) it is more quantitative and not subjective, (2) more tests can be performed in a given time, (3) it is more sensitive, and (4) it does not need an expensive instrument.

According to the limitation of serological test previously described, many proteins of *B. spp.* were studied for developing and improving diagnosis tools for bartonellosis. Until now, many specific proteins of *B. spp.* from human products were used to develop ELISA test but they showed low sensitivity and specificity (Sander et al., 2001; Schmiederer et al., 2001; Litwin et al., 2004; Loa et al., 2006). The 17-kDa (VirB) (Anderson et al., 1995; Sweger et al., 2000) and outer membrane protein 43 (OMP 43) (Chenoweth et al., 2004) are two of the few characterized proteins of *B. henselae* that induce antibody responses in hosts. There were many reports on serologic detection of bartonellosis by *B. henselae* specific protein (BSP) as 17-kDa (Loa et al., 2006) and OMP 43 (Burgess and Anderson, 1998; Fuhrmann et al., 2001; Riess et al., 2004) but most of the publications are mainly in humans and less study in animals.

However the specific proteins mentioned above should be used for the development of an antibody enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serologic diagnosis of *B. henselae* infections in cats to screen cat scratch disease from cat to their owner in the future

Materials and Methods

Animals

Two hundred healthy client-owned cats presented to the Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University and other private animal hospitals in Bangkok Metropolitan with the following criteria were included into this study; (1) normal physical examination, (2) being of any age, sex and breed, (3) full vaccination record, (4) no fleas, and (5) no history of previous illness and treatment with antibiotic within three months. Unhealthy cats with antibiotic treatment were excluded from the study. The protocol was approved by the Chulalongkorn University Institutional Animal Care and Use Committee; certificate number 1031068.

Sample collection

Blood samples were collected from 200 healthy client-owned cats from the Small Animal Hospital, Chulalongkorn University and private veterinary hospitals in Bangkok Metropolitan. The amount of 2.5 ml of blood samples was collected by sterile technique from saphenous vein. One ml of blood sample was placed into 2 EDTA tubes (Appendorf, USA), 0.5 ml each. First tube was for complete blood count (CBC) and the second tube was stored at -80°C for bacterial culture (Breitschwerdt et al., 2000). Serum prepared from the remaining blood sample (1.5 ml) was stored at -80 °C for further analysis.

Bartonella spp. culture and identification Bacterial culture (Clarridge et al., 1995)

All blood samples from the second tube was used for *Bartonella spp.* isolation by bacterial culture which was the gold standard method. Thawed blood samples were centrifuged and

the supernatant were drawn off and discarded. Subsequently, the pellet was re-suspended into 125 µl of isolation medium-199 (Koehler et al., 1992). The re-suspended pellets was streaked onto Brain-heart infusion agar plated supplemented with 5% sheep red blood cells and incubated in a humidified chamber at 35- 37 °C with 5% CO2 condition.

Then, the *Bartonella* culture positive samples were tested with polymerase chain reaction (PCR) (Norman et al., 1995). DNA sequencing was employed for the *Bartonella* spp. confirmation

(Sanger et al., 1977).

Production of VirB characterized proteins of *B. henselae*

1. VirB gene construction

The entire coding sequence of the published BSP gene was cloned from *B. henselae* genomic DNA by PCR. The VirB gene specific primers were designed from NCBI database. The oligonucleotide primers were designed and used in the present study.

Primer	Oligonucleotide sequences
Forward Nde I 17 kDa	5'-GGGCATATGAAAAATATAGCTTAGTCA -3'
Reverse Xho I 17 kDa	5'-GGGCTCGAGAAGTCGGACATCAGATTT -3'

VirB gene was amplified by PCR at conditions: 95 °C for 3 min followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 45 s then 72 °C for 5 min. The amplified product was digested with Nde I and Xho I and cloned to plasmid pET28a (Novagen, USA). The recombinant plasmid was transformed into competent *Escherichia coli* (*E. coli*) strain BL 21. Plasmids were purified with a QIAquick mini-prep kit (Qiagen, Germany), and the in-frame DNA sequences were submitted for sequencing at AIT biotech, Singapore.

2. Expression of the VirB in *E. coli*

The colonies of *E. coli* BL21 harboring the recombinant plasmid was cultured at 37 °C with shaking 180 rpm in LB broth medium containing 50 µg/ml kanamycin. The empty vector transformed into *E. coli* BL21 cells were used as a control. The 1-3% overnight culture of *E. coli* was used as a starter culture and transferred into a new 200 ml LB broth containing 50 µg/ml kanamycin. The cell cultures were grown at 37 °C with shaking at 180 rpm until the optical density at 600 nm of the culture reached 0.4-0.6.

Cells were harvested by centrifugation at 6,000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the whole cell lysate was identified using 12% SDS-PAGE gel. The cell suspension was incubated with 1 mg lysozyme at

room temperature for 30 min. After incubation, the cells were lysed by sonication using 40% amplitude, pulse on 10 seconds and off 5 seconds for 20 min. Sample must be on ice. The sample was centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4°C. After centrifugation, the supernatant was collected and the pellets was re-suspended in 2 ml of SDW as inclusion body fraction. The whole cell lysate, the supernatant and the inclusion body fractions of VirB protein were identified using 12% SDS-PAGE gels.

From protein expression, the inclusion body of VirB protein was solubilized in 8 M urea at room temperature for 2 hours. The supernatant was collected by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at room temperature and then transferred into a new tube. The protein solubilized in 8 M urea which was the denatured form of VirB protein was analyzed by 12% SDS-PAGE gels.

Purification of the recombinant BSP

The denatured VirB protein was purified by His-trap-affinity using Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel, Germany). The column was equilibrated with SDW for 10 column volumes and column buffer (6M Urea) for 10 column volumes. One ml of protein sample (1.364 mg/ml) was loaded into the column and collected the flow through fraction. After that, the column was

washed with column buffer for 5 column volumes. The VirB protein was eluted with 1 column volume of elution buffer (6M Urea which contains 20, 50, 100 and 200 mM imidazole). The flow through, wash and elution fractions were analyzed by 12% SDS-PAGE gels and kept at -20 °C.

Refolding of purified VirB protein

The denatured specific BSP recombinant protein in 8 M urea obtained from purification was refolded using the concentrator, Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Merck, Germany), with cut off at 5 kDa. Five hundred milliliters of purified protein was transferred into the concentrator and then centrifuged at 6,000 rpm, 4 °C until the supernatant on the top remained at 100 µl. Then, 400 microliters of Sterile Distilled Water (SDW) was added and centrifuged at 6,000 rpm at 4 °C until the supernatant on the top remained at 100 µl. Lastly, 400 microliters of SDW was added and the total supernatant was collected and analyzed by SDS-PAGE.

3. The VirB protein detect by Western immunoblotting

The nitrocellulose membrane, two fiber pads, and two Whatman papers (BioRad Laboratories, USA) were placed in a shallow tray filled with Transfer Buffer for a few min. The stacking gel was cut off from 12% SDS-PAGE gel with a clean razor blade and the gel was soaked in Transfer Buffer for a few min. The transfer apparatus gel cassettes was opened with the black panel lying flat on the bottom of the tray filled with Transfer Buffer, the clear panel should be against the side of the tray. The transfer sandwich was prepared on the black panel in the tray filled with Transfer Buffer: one fiber pad - one Whatman papers - SDS gel - nitrocellulose membrane - one Whatman papers - one fiber pad. The air bubbles were removed by rolling a glass tube on the membrane. The sandwich was covered with the clear panel, fasten with the latch, and the gel cassette was inserted into the electrode module with the black panel facing the black cathode electrode panel. The bio-ice cooling unit was inserted into the

buffer chamber, and filled the buffer chamber with Transfer Buffer, transferred for 70 min at 4 °C, stirred at a constant current of 100V and then the membrane was washed with distilled water on the shaker for 10 min. The membrane was incubated with blocking buffer on a shaker at 37 °C for 30 min. The positive cat serum by culture and PCR was used as primary antibody, diluted to blocking buffer (1:5000) and incubated the membrane with the blocking buffer the diluted primary antibody on a shaker for overnight at 4 °C. The membrane was washed two times with blocking buffer on the shaker for 10 min each time. The anti-cat serum used as secondary antibody (Goat pAb to cat IgG (HRP) (Abcam®, United Kingdom) was diluted with blocking buffer (1:5000) and the membrane was incubated with the diluted secondary antibody on a shaker at 37 °C for 1.30 hours. The membrane was washed two times with distilled water on the shaker for 5 min each time. It was further washed with 0.05% PBS-tween on the shaker for 5 min and incubated in AEC Substrate Reagent (4 ml deionized water, 2 drops Acetate Buffer, 1 drop AEC Chromogen, 1 drop hydrogen peroxide) at 37 °C for 15 min until clear red insoluble signal was obtained for positive control. Finally, it was washed with sterilized distilled water.

Results

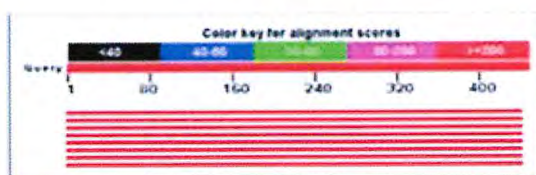
VirB protein gene construction

The VirB protein gene was cloned into pET28a; it was composed of 18 bp His tag-coding sequence, 27 bp T7 tag-coding sequence, 51 bp sequence of pET28a expression vector, 6 bp restriction size. Therefore, the total length of VirB protein gene was estimation at 20-23 kDa. The DNA sequence of VirB protein gene recombinant was sequenced by AIT Biotech, Singapore. The result present in Fig 1.

The cloning sequence of VirB was blasted in www.ncbi.com. The result of sequence producing alignment with accession number U23447 showed 99% similarity in *Bartonella henselae* VirB protein gene as present in Figs 2 and 3.

ATG AAA AAA TAT AGC TTA GTC ACA TTG TTA TCT TTT TGC ATC CCT CAT GCA AAA GCA CAA ACA GCA
 CCC CTT ACT GAT GAA TAT TAT AAA AAA GCC TTA GAA AAC ACG CAA AAA TTA GAC GTT GCA AAA TCA
 CAA ACA GCT GAG TCT ATT TAT GAA TCT GCA ACA CAA ACT GCA AAA AAA TTC AGG AAT TAA ACG AGA
 AGC TTG AAA AGG CTA AAA CAG CTG AAA AAA CCA AAT CTG AAG AAT TGC AGG CTC TTC AAG TAG AGC
 TCT CTC TTC TCC AAG CAC AGT TGC AAG TGG ATA CTT TAA AAG TTC AGT CCC TTT CTA TGA TTC AAG CAA
 AAG ATA CAA AAA CAA AAG AAG AAC TGC GTG AAG AGC AAA CGC AGC AAA ATC ATA AAA AAA TTG AAG
 AAA AAT TAA AAG AAA AAC TTG GGA AAT CTG ATG TCC GAC TTC TCG AG

Fig 1: Nucleotide sequence cloning alignment of VirB protein gene



Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Max ident	Accession
Bartonella henselae strain 17/04a subgenus Bartonella	802	802	99%	0.0	99%	U021288.1
Bartonella henselae strain 17/04a subgenus Bartonella	802	802	99%	0.0	99%	U021288.1
Bartonella henselae strain 17/04a subgenus Bartonella	626	626	98%	1e-173	92%	U021288.2
Bartonella henselae strain 17/04a subgenus Bartonella	547	547	98%	2e-152	89%	U021288.3
Bartonella henselae strain 17/04a subgenus Bartonella	547	547	98%	2e-152	89%	U021288.3
Bartonella henselae strain 17/04a subgenus Bartonella	547	547	98%	2e-152	89%	U021288.3
Bartonella henselae strain 17/04a subgenus Bartonella	547	547	98%	2e-152	89%	U021288.3
Bartonella sp. strain 17/04a subgenus Bartonella	420	420	98%	1e-144	88%	U021288.1

Fig 2: Sequence producing alignment

Expression of the VirB protein

The colonies were verified by PCR and DNA sequencing. The DNA sequences of colony mutants are colonies #3,4. The colonies were picked and grown in 10 ml LB containing 50 µg/ml Kanamycin and 0.1 mM IPTG to induce protein expression of each selected colony. Total proteins were separated on 12% SDS-PAGE and visualized by Coomassie blue-R stain. Fig 4 shows the result of protein expression at 23 kDa in both colonies when compared to non-induced colonies. Large scale protein expression was performed for protein purification.

The extraction and Inclusion body solubilization

The protein extraction and solubilization of inclusion body and supernatant were shown in

Fig 5. The product obtained was further performed for protein purification in the next step.

VirB protein purification

After protein expression, the supernatant of VirB protein was purified using His-trap-affinity column. The flow through, wash and elution fractions were analyzed on 12% SDS-PAGE. The result indicated that both inclusion body and supernatant of recombinant BSP protein were successfully purified. The result of purification protein at 23 kDa is presented in Fig 6 and confirmed by Western Immunoblot (Fig 7).

Discussion

There are many diagnostic methods for detection of bartonellosis in cats including blood culture, PCR, immunofluorescent assays (IFA)

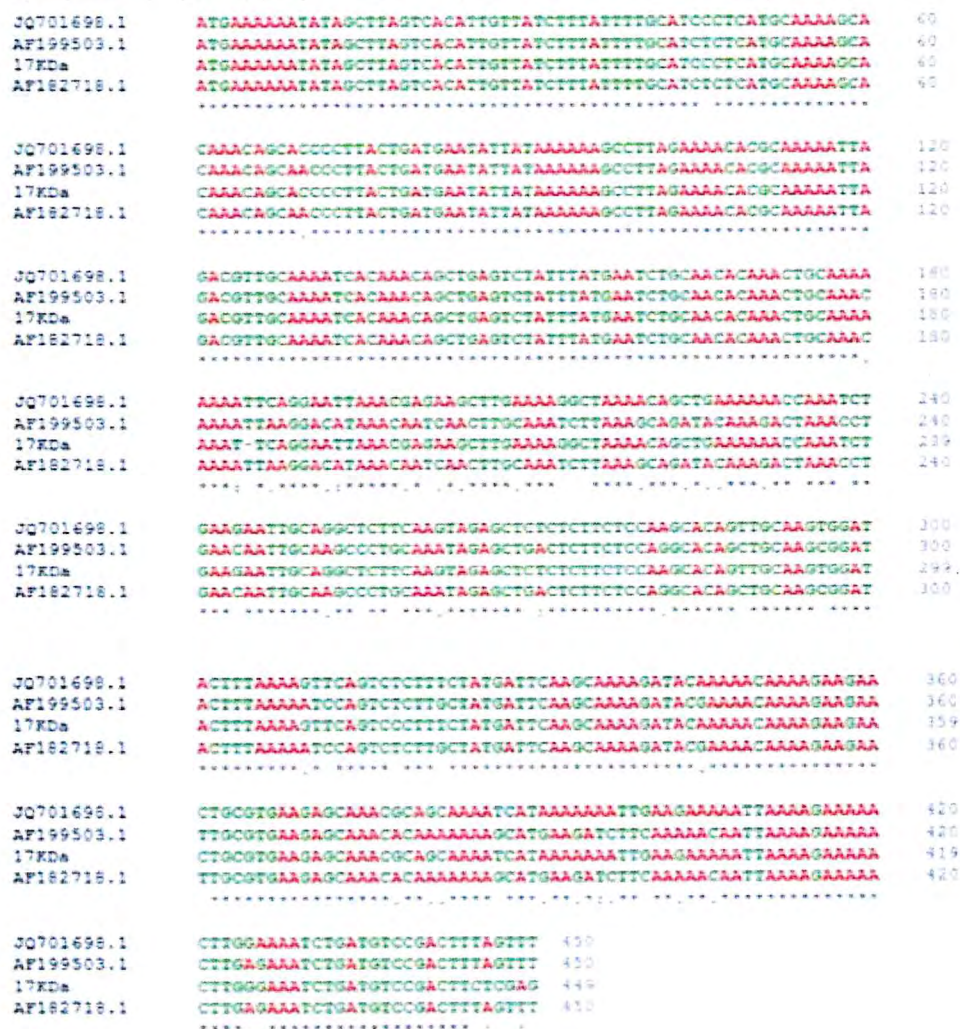


Fig 3 Nucleotide alignment of VirB genes

The accession number 17KDa is *Bartonella henselae* positive sample, AF182718.1 is *Bartonella henselae* virB operon, complete sequence, AF199503.1 is *Bartonella henselae* 17kDa antigen-like protein gene, complete and JQ701698.1 is *Bartonella henselae* VirB2 (virB2), VirB3 (virB3), VirB4 (virB4), VirB5 (virB5), VirB6 (virB6), VirB7 (virB7), VirB8 (virB8), VirB9 (virB9), VirB10 (virB10), VirB11 (virB11), hypothetical protein, BepA (bepA), VirD4 (virD4), BepB (bepB), BepC (bepC), BepD (bepD), BepE (bepE), BepF (bepF), and BepG (bepG) genes, complete cds

and ELISA. For ELISA, many specific proteins of *B. henselae* were used to develop ELISA test including the 17-kDa (VirB), *Bartonella* effector proteins (Beps), outer membrane protein (OMP) (Kempf, 2008), and heat shock protein (GroEL) (Ferrara et al., 2014). The 17 kDa protein (VirB) is one of the most interesting candidates for a good antigenic proteins highly specific for *B.*

henselae infection (Anderson et al., 1995; Loa et al., 2006; Eberhardt et al., 2009; Ferrara et al., 2014) and used for *Bartonella* antibody detection kit in human (Anderson et al., 1995; Sweger et al., 2000). Therefore, the 17 kDa or VirB protein was selected and produced for using in development of indirect ELISA antibody detection for *B. henselae* infection in cats in this present study. This study

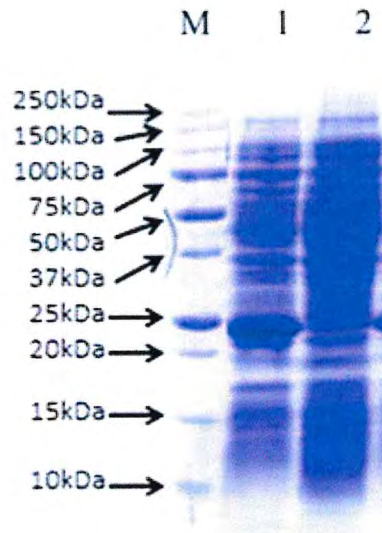


Fig 4: Fraction identification of VirB protein expression with 0.1 mM IPTG in 10 ml LB broth

Lane M represents protein molecular weight marker

Lane 1 represents protein induced with IPTG

Lane 2 represents protein non-induced with IPTG

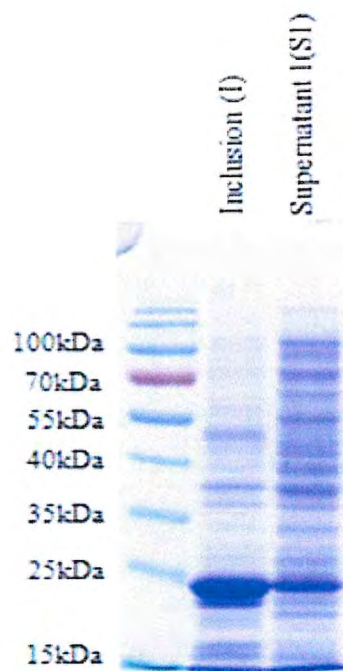


Fig 5: Fraction identification of Inclusion body and supernatant

The first lane: Protein molecular weight marker, Lanes 2 and 3: Inclusion and supernatant after 1st and 2nd re-suspension of bacteria harboring pET28a, respectively.

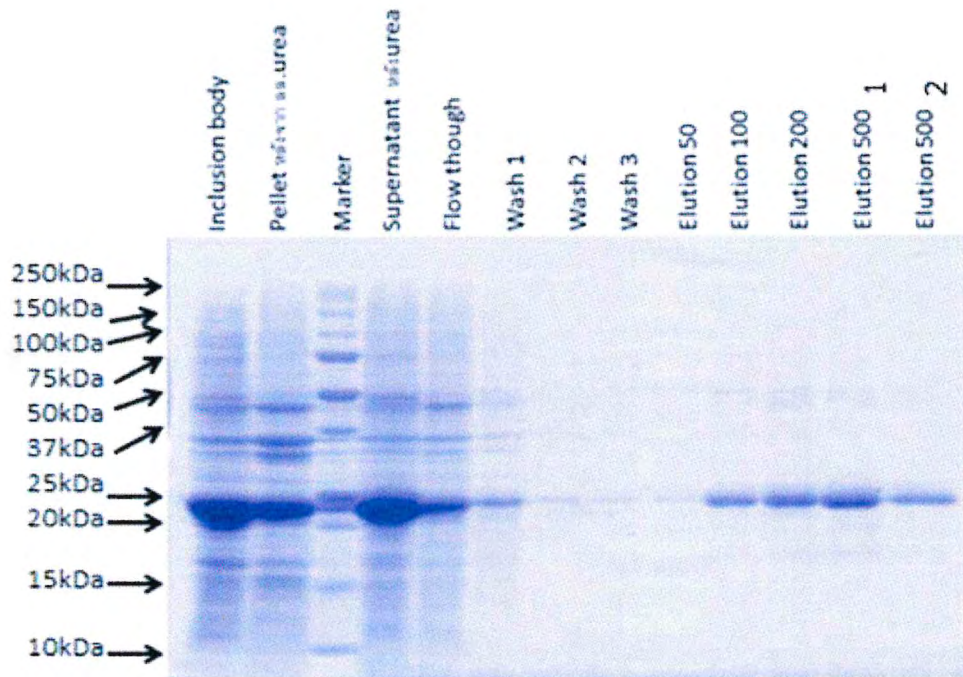


Fig 6: SDS page analysis of supernatant recombination VirB protein after solubilized in 8M urea purification

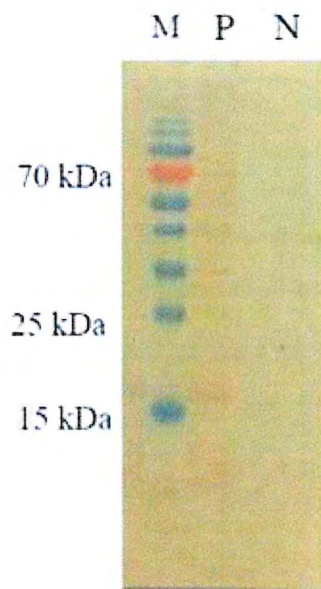


Fig 7: Western immunoblot results of the purified of 0.5 mg VirB protein

Lane M represents molecular weight marker
Lane P represents positive serum
Lane N represents to negative serum

has been focused on expression of recombinant protein from the VirB gene by using pET28a *E. coli* expression system which differed from expression vectors and primers in other previous study (Loa et al., 2006; Ferrara et al., 2014). Thus, our study gives the original method for *Bartonella* VirB protein expression by using the expression vector pET28a. The recombinant VirB protein was expressed 0.1 mM IPTG incubation at 37°C for 4 hours. This VirB was expressed both as inclusion body and supernatant. However, it was produced much more as an inclusion body component. The VirB protein is scarcely soluble due to deposition in inclusion bodies, same as experiment of Loa et al. (2006). The result also indicated that the VirB protein found was expressed as inclusion body, because high temperatures during expression and high level expression of recombinant protein in *E. coli* caused aggregated protein formation referred to inclusion body. The inclusion bodies of recombinant protein need to elaborate solubilization, refolding and purification for recover biological activity of protein (Vallejo and Rinas, 2004). Therefore, the inclusion body of VirB protein was solubilized in 8 M urea. The clear supernatant obtained from inclusion body solubilization was successfully purified by affinity chromatography.

Our VirB specific protein gene was successfully expressed in pET28a expression vector and design specific primers for evaluation ELISA in cat blood samples. The difference between the cat and human serum samples was one of the most difficult parameters which give the differences in ELISA results. The other important factor for the differences in results may be due to different methods of antigen preparation as well as the difference in two different of *B. henselae* Houston and Marseille. The study of Zhao et al. (2005) demonstrated the importance of the different virulence proteins and antigenicity on host response. Antigen of *B. henselae* (ATCC 49882) from patients with cat scratch disease yield 86.9% sensitivity and 96% specificity due to the process of protect *Bartonella* antigen from heat degradation (Not et al., 1999).

The evaluation on other specific antigenic protein genes of this bacterial species should be further investigated. The protein expression in different expression vectors and conditions should also be further performed for discovering the soluble proteins which can be a good candidate for development of ELISA assays for detection of cat antibody to *B. henselae*. The development of high sensitivity and specificity of ELISA can also support for the prevention and control strategies of *B. henselae* infection in cats and cat scratch disease (CSD) in humans in the future.

Acknowledgements

The present study was supported by the grant from the 90 years graduate scholarship, Ratchadapisek Sompot Fund, Chulalongkorn University.

References

- Anderson B, Lu E, Jones D, Regnery R. Characterization of a 17-kilodalton antigen of *Bartonella henselae* reactive with sera from patients with cat scratch disease. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2358-65.
- Bergmans A, Peeters M, Schellekens J, Vos M, Sabbe L, Ossewaarde J, et al. 1997. Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: evaluation of *Bartonella henselae*-based indirect fluorescence assay and enzyme-linked immunoassay. *J Clin Microbiol.* 1997;35(8):1931-7.
- Boonmar S, Poapolathep A, Pisetpaisan K, Sanyathitiseree P, Maruyama S, Katsube Y. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in domestic cats in Thailand. *Kasetsart J (Nat Sci).* 1997;31:268-70.
- Burgess AW, Anderson BE. Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. *Microb Pathogenesis.* 1998;25(3):157-64.
- Chenoweth MR, Greene CE, Krause DC, Gherardini FC. Predominant outer membrane antigens of *Bartonella henselae*. *Infect Immun.* 2004;72(6):3097-105.
- Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB. *Bartonella* spp. in pets

- and effect on human health. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(3): 389-94.
- Chomel BB, Carlos ET, Kasten RW, Yamamoto K, Chang CC, Carlos RS, et al. 1999. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from the Philippines. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(4):593-7.
- Droz S, Chi B, Horn E, Steigerwalt AG, Whitney AM, Brenner DJ. *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. *J Clin Microbiol.* 1999;37(4):1117-22.
- Eberhardt C, Engelmann S, Kusch H, Albrecht D, Hecker M, Autenrieth IB, et al. Proteomic analysis of the bacterial pathogen *Bartonella henselae* and identification of immunogenic proteins for serodiagnosis. *Proteomics.* 2009;9(7):1967-81.
- Ferrara F, Di Niro R, D'Angelo S, Busetti M, Marzari R, Not T, et al. Development of an enzyme linked immunosorbent assay for *Bartonella henselae* infection detection. *Lett Appl Microbiol.* 2014;59(3): 253-262.
- Fuhrmann O, Arvand M, Göhler A, Schmid M, Krüll M, Hippenstiel S, et al. *Bartonella henselae* induces NF- B-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. *Infect Immun.* 2001;69(8):5088-97.
- Iralu J, Bai Y, Crook L, Tempest B, Simpson G, McKenzie T, et al. Rodent-associated *Bartonella* febrile illness, southwestern United States. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(7):1081-6.
- Jacomo V, Kelly P, Raoult D. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin Diag Lab Immunol.* 2002;9(1):8-18.
- Kempf VAJ. Pathogenicity mechanisms of human pathogenic *Bartonella* spp. Proceedings of the The 3rd canine vector-borne disease (CVBD) symposium. Germany; 2008:56-64.
- Koehler JE, Quinn FD, Berger TG, LeBoit PE, Tappero JW. Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N Engl J Med.* 1992;327(23):1625-31.
- Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TL, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ et al. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J Clin Microbiol.* 1997;35(7):1813-8.
- Kosoy M, Morway C, Sheff KW, Bai Y, Colborn J, Chalcraft L, et al. *Bartonella tamiae* sp. nov., a newly recognized pathogen isolated from three human patients from Thailand. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):772-5.
- Litwin CM, Johnson JM, Martins TB. The *Bartonella henselae* sucB gene encodes a dihydroipoamide succinyltransferase protein reactive with sera from patients with cat-scratch disease. *J Med Microbiol.* 2004;53(12):1221-7.
- Loa CC, Mordechai E, Tilton RC, Adelson ME. Production of recombinant *Bartonella henselae* 17-kDa protein for antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2006;55(1):1-7.
- Maruyama S, Boonmar S, MOrita Y, Sakai T, Tanaka S, Yamaguchi F, et al. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* among healthy individuals in Thailand. *J Vet Med Sci.* 2000;62(6):635-7.
- Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1997;35(9):2283-7.
- Norman A, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause D. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol.* 1995;33(7):1797-803.
- Not T, Canciani M, Buratti E, Dal Molin G, Tommasini A, Trevisiol C et al. Serologic response to *Bartonella henselae* in patients with cat scratch disease and in sick and healthy children. *Acta Paediatrica.* 1999;88(3):284-9.
- Paitoonpong L, Chitsomkasem A, Chantrakooptungool S, Kanjanahareutai S, Tribuddharat C, Srifuengfung, S. Case report - *Bartonella henselae*: first reported isolate in a human in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2008;39(1):123.

- Pons I, Sanfeliu I, Nogueras MM, Sala M, Cervantes M, Amengual MJ, et al. Seroprevalence of *Bartonella* spp. infection in HIV patients in Catalonia, Spain. *BMC Infect Dis*. 2008;8(1):1.
- Quorllo BA, Balakrishnan N, Cannon CZ, Maggi RG, Breitschwerdt EB. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae*, *Bartonella koehlerae* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in a cat diagnosed with splenic plasmacytosis and multiple myeloma. *J Feline Med Surg*. 2014;16(8):713-20.
- Regnery R, Marano N, Jameson P, Marston E, Jones D, Handley S, et al. A fourth *Bartonella* species, *B. weissii* species nova, isolated from domestic cats. Proceedings of the 15th Meeting of the American Society for Rickettsiology, Captiva Island, Florida;2000.
- Riess T, Andersson SG, Lupas A, Schaller M, Schäfer A, Kyme P, et al. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med*. 2004;200(10):1267-78.
- Sander A, Berner R, Ruess M. Serodiagnosis of cat scratch disease: response to *Bartonella henselae* in children and a review of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;20(6):392-401.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463-7.
- Schmiederer M, Arcenas R, Widen R, Valkov N, Anderson B. Intracellular induction of the *Bartonella henselae* virB operon by human endothelial cells. *Infect Immun*. 2001;69(10):6495-502.
- Sweger D, Resto-Ruiz S, Johnson DP, Schmiederer M, Hawke N, Anderson B. Conservation of the 17-kilodalton antigen gene within the genus *Bartonella*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(2):251-7.
- Vallejo LF, Rinas U. 2004. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact*. 2004;3(1):11.
- Varanat M, Travis A, Lee W, Maggi R, Bissett S, Linder K, et al. Isolation of *Bartonella vinsonii* subsp *berkhoffii* genotype II from a cat with recurrent osteomyelitis. *J Vet Intern Med*. 2009;23:1273-7.
- Vermeulen MJ, Herremans M, Verbakel H, Bergmans AMC, Roord JJ, Van Dijken PJ, et al. Serological testing for *Bartonella henselae* infections in The Netherlands: clinical evaluation of immunofluorescence assay and ELISA. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(6):627-34.
- Yamamoto K, Chomel BB, Kasten RW, Hew CM, Weber DK, Lee WI, et al. Infection and re-infection of domestic cats with various *Bartonella* species or types: *B. henselae* type I is protective against heterologous challenge with *B. henselae* type II. *Vet Microbiol*. 2003;92(1-2):73-86.
- Zbinden R. *Bartonella henselae*-based indirect fluorescence assays are useful for diagnosis of cat scratch disease. *J Clin Microbiol*. 1998;36(12):3741-2.
- Zhao S, Cai Y, Zhu Z. 2005. Comparative proteomic analysis of *B. henselae* Houston and *B. henselae* Marseille by two-dimensional gel electrophoresis. *Biomed Env Sci*. 2005;18(5):341.

การผลิตและทำให้มีความบริสุทธิ์ของเชื้อบาโทเนลลา เฮนเซลเลเวอร์บี โปรตีน

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการนำเวอร์บีอินจากเชื้อบาโทเนลลา เฮนเซลเล มาใช้ในการวินิจฉัยโรคแมวข่วนที่มีสาเหตุมาจากเชื้อนี้ โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากแมวจำนวน 200 ตัวระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2553-พฤศจิกายน 2554 เพื่อทำการตรวจหาเชื้อบาโทเนลลา เฮนเซลเล ด้วยวิธีการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดแกะ 5% และตรวจยืนยันด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกจะถูกส่งตรวจหาลำดับสารพันธุกรรมเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ ดีเอ็นเอของเชื้อบาโทเนลลาเฮนเซลเลถูกนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อหาเวอร์บีอิน ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสดังกล่าวถูกนำมาทำการโคลนและกระตุ้นการสร้างเวอร์บีโปรตีนซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนสูงต่อการติดเชื้อบาโทเนลลาเฮนเซลเล การศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการกระตุ้นการสร้างเวอร์บีโปรตีนได้โดยใช้ระบบการสร้างโปรตีน ในพีอีที 28เอของระบบการสกัดโปรตีนจากอีโคโนและถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี ทำการตรวจพิสูจน์เวอร์บีโปรตีนที่บริสุทธิ์แล้วด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอตติง และพบว่าโปรตีนนี้อาจสามารถนำไปพัฒนาใช้ในชุดทดสอบอิมโมโนออสซาเพื่อในการตรวจหาโรคนั้นต่อไป

คำสำคัญ: การผลิต, บาโทเนลลา เฮนเซลเล, การทำให้บริสุทธิ์, เวอร์บี

Prevalence of *Bartonella* infection in well-cared cats in Bangkok metropolitan

Pakkawan Satranarakun¹ Soichi Maruyama² Hidori Kabeya² Shigo Sato²

Sathaporn Jitapalapong³ Saowalak Jitchum³ Tawisa Jiyipong³

Channarong Rodkhum⁴ Rosama Pusoonthornthum^{1*}

Abstract

The study was conducted to determine the prevalence of bartonellosis in two hundred well-cared client-owned cats that have close relationship with their owners in Bangkok metropolitan area from November 2010 to November 2011. These cats had no clinical signs at the time of presentation and no visual flea infestation. Blood collection was performed and cultured in 5% rabbit blood agar. Species of *Bartonella* spp. was identified with Polymerase Chain Reaction and gene sequencing. Results demonstrated that eleven out of the two hundred cats were positive for bartonellosis. Moreover, the prevalence was 5.5% (11/200), with *Bartonella henselae* 91% (10/11) and *Bartonella clarridgeiae* 9% (1/11). Therefore, this study indicated that the major cause of bartonellosis in well-cared cats in Bangkok metropolitan was *Bartonella henselae*. It is recommended that pet owners perform regular ectoparasite prevention. Also, knowledge of bartonellosis should be spread to both veterinarians and pet owners for effective prevention of the disease.

Keywords: Bangkok, *Bartonella*, prevalence, well-cared cats

¹Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Thailand

²Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Japan

³Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

⁴Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Thailand

*Correspondence: drrosana@gmail.com

Introduction

Bartonella spp. are considered as vector-borne parasites (Jacomo et al., 2002; Rolain et al., 2003; Just et al., 2008). Previous studies demonstrated that *Bartonella* DNA was detected in fleas (Rolain et al., 2003; Stevenson et al., 2003), ticks (Change et al., 2001; Sanogo et al., 2003), lice (Durden et al., 2004), sand flies (Jacomo et al., 2002) and biting flies (Chung et al., 2004). These are suspected vectors for bartonellosis such as *B. bacilliformis*, *B. quintana* (La et al., 2005; Garré et al., 2008), *B. vinsonii* subsp. *berkoffii* (Kordick et al., 1996) and *B. henselae* (Jonathan et al., 2007), respectively. Several wild rodent-associated *Bartonella* spp. have been linked to human diseases⁵ including *B. elizabethae*, *B. grahamii* (Boonma et al., 1997), *B. vinsonii* subsp. *arupensis* (Fenollar et al., 2005), and *B. washoensis* (Kosoy et al., 1997).

A variety of bactonella species has been identified in Thailand including *B. vinsonii* subv *berkoffii* in dogs (Suksawat, 2007), *B. vinsonii* subv *arupensis* (Bai et al., 2012) and *B. thailandensis* in rats (Saisongkorh et al., 2008), *B. bovis* (Boonmar et al., 2012), *B. henselae* and *B. clarridgeiae* in cats (Maruyama et al., 1997, Jitchum et al., 2009), and *B. kohleriae* (Sukkullaya et al., 2012). According to zoonotic concern about bartonellosis, there have been many reports of bartonellosis in Thai patients such as *B. henselae* (Paitoonpong et al., 2008), *B. tamiiae* (Kosoy et al., 2008), and *B. vinsonii* ver *berkoffii* (Suksawat et al., 2002). Vectors of most concern for the transmission of bartonellosis to human are fleas (Rolain et al., 2003; Stevenson et al., 2003), ticks (Change et al., 2001; Sanogo et al., 2003), lice (Durden et al., 2004), sand flies (Jacomo et al., 2002) and biting flies (Chung et al., 2004).

Cats are carriers of *B. henselae*, as limited pathology has been associated with natural infection. It has been difficult to specify clinical signs of naturally infected cats with *B. henselae*⁶. Based on serologic results, naturally *B. henselae*-infected cats have lymphadenitis and gingivitis, especially those co-infected with the feline immunodeficiency virus (Ueno et al., 1996). In experimental conditions, cats infected with *B. henselae*, mainly type II, have developed various clinical signs including fever, local inflammation (erythema, swelling) at the site of inoculation and localized or generalized lymphadenopathy (Yamamoto et al., 2003).

Cat scratch disease caused by *B. henselae* is presented worldwide, especially in Asian countries. Bartonellosis has been reported in Japan (Maruyama et al., 2007), Korea (Kim et al., 2009), Indonesia (Marston et al., 1999), the Philippines (Chomel et al., 2001) and Taiwan (Lee et al., 1998). In Thailand, the first report of *Bartonella* spp. was done by a serosurvey in cats (Boonma et al., 1997). In 2000, the first incidence of bartonellosis in Thailand was confirmed by Maruyama and colleagues. In 2008, the first human case was published and it was the first paper of *B. henselae* isolation in Thailand (Paitoonpong et al., 2008). Three cases of endocarditis caused by *B. tamiiae* were reported in Khon Kaen, a province in the north-eastern part of Thailand (Kosoy et al., 2008). Those findings suggested that Thailand might be an endemic area of *Bartonella* spp.

Up to the present time, there has been prevalence of *Bartonella* spp. reported in stray and domestic cats in

Bangkok (Jitchum et al., 2009; Maruyama et al., 2007; Maruyama et al., 2000; Boonma et al., 1997) but not in well-cared client-owned cats. Therefore, the purpose of the present study was to find the prevalence of *Bartonella* spp. in well-cared cats without visible flea infestation to investigate possible transmission to cats' owners.

Materials and Methods

Animals: Two hundred healthy client-owned cats presented to the Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University and other private animal hospitals in Bangkok metropolitan with these criteria: 1) normal physical examination 2) any age, sex and breed 3) full vaccination record 4) no fleas 5) no history of previous illness and treatment with antibiotic within three months were included into this study. Unhealthy cats with antibiotic treatment were excluded from the study. The protocol was approved by the Chulalongkorn University Institutional Animal Care and Use Committee.

Sample collection: Blood samples were collected from all cats. An amount of 2.5 ml of blood was collected by a sterile technique from the saphenous vein. One ml of the blood sample was placed into 2 EDTA tubes (Appendorf, USA), 0.5 ml each. The first tube was for complete blood count (CBC) and the second tube was stored at -80°C for bacterial culture (Breitschwerdt et al., 2000). Sera prepared from the remaining blood sample (1.5 ml) were stored at -80°C for further analysis.

Bartonella spp. culture and identification

Bacterial culture (Clarridge et al., 1999): All blood sample from the second tube was used for *Bartonella* spp. identification by bacterial culture which was the gold standard method. Thawed blood samples were centrifuged and supernatant was drawn off and discarded. Subsequently, pellets were resuspended into 125 µl of isolation medium-199 (Koehler et al., 1992). The resuspended pellets were streaked onto a Brain-heart infusion agar plate supplemented with 5% sheep red blood cells and incubated in a humidified chamber at 35-37°C with 5% CO₂ condition.

The cultured plates were examined for bacterial growth and *Bartonella* spp. were identified based on Gram's staining, morphology, growth characteristic and standard biochemical test. The bacterium was biochemically inert with oxidase, catalase, urease and nitrate reductase negative except for the production of peptidase (Breitschwerdt et al., 2000).

After bacteria were initially identified, *Bartonella* positive samples were tested with polymerase chain reaction (PCR) (Norman et al., 1995). DNA sequencing was employed for *Bartonella* spp. confirmation (Sanger et al., 1977).

PCR for specific identification of *Bartonella* spp.

Preparing DNA for PCR: DNA was extracted from each positive sample using Nucleospin blood kit. The sample was mixed with 100 µl of sterile water in a sterile test tube, then 20 µl of proteinase K and 200 µl of lysis buffer were added. The sample was incubated at 56°C for 10 min. Two hundred µl of absolute ethanol was added and transferred into the DNeasy Mini spin column. The

column was then centrifuged and washed twice with provided washing buffer. Subsequently, 100 µl of provided elution buffer was added into the column to elute the DNA. Finally, extract DNA samples were kept at -80°C until used for other purposes.

PCR amplification of *gltA* gene: PCR was used for detection of *Bartonella* spp. in cat blood as previously described (Norman et al., 1995) Primer of citrate synthase gene (*gltA*)

All PCR mixture was performed in 20 µl containing 0.2 mM each of dNTP, 0.5 pmoles/µl each of Forward-BhCS. 781p; 5'-GGGGACCAGCTCATGGTGG-3', and Reverse: BhCS.1137n; 5'-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA-3', 3 mM MgCl₂ reaction buffer, 0.4 pmoles/µl primer, 0.5 units *Taq* polymerase (Invitrogen, USA) and DNA template 2 µl in primary reaction. The nested reaction comprised 0.2 mM each of dNTP, 0.5 pmoles/µl each of forward and reverse primers, 1.5 mM MgCl₂ reaction buffer, 0.5 units *Taq* polymerase and DNA template 2 µl. PCR amplification was performed in a MyCycle™ Thermal Cycler (BioRad Laboratories, USA). PCR cycle conditions were optimized at 95°C for 10 min, 95°C for 30 s, 57°C for 1 min and 72°C for 2 min for 45 cycles, then at 72°C for 5 min.

After PCR processing, the PCR products were analyzed on agarose gel and identified by 1% agarose in 1X Tris-borate-EDTA (TBE). The PCR amplification product was visualized under an ultra-violet transluminator. The positive *Bartonella* samples demonstrated a 380-bp.

Sequencing of PCR amplification products: Positive DNA fragment was extracted and purified from

agarose gel by Gene JET® Gel Extraction Kit (Fermentas,USA) following the manufacturer's instructions for elimination of excess primers, nucleotides, polymerase and salts. The purified DNA products were submitted for sequencing at the 1st Base Sequence Company in Singapore.

Results

The blood samples from two hundred healthy well-cared client-owned cats were included. All cats were between 5 months to 15 years old. The selected cats had close relationship with their owners and lived mostly indoors. Results from 11 *Bartonella*-positive samples indicated the presence of *Bartonella* spp. All positive bartonellosis cats in the present study were Siamese-mixed breed (100%). Mean age of the positive cats was 5.0±3.7 years. Mean weight of the positive cats was 3.5± 0.4 kg. The positive cats were neutered male (36.3%) and neutered female (63.7%). The positive samples were identified by colony identification, Gram's staining, morphology, growth characteristic and standard biochemical test. The bacterium was biochemically inert with oxidase, catalase, urease and nitrate reductase negative. All positive samples were further identified for *Bartonella* spp. by using the PCR technique with *gltA* gene and gene sequencing (Tables 1 and 2). Results indicated that the prevalence of bartonellosis in well-cared client-owned cats in Bangkok metropolitan area from November 2010 to November 2011 was 5.5%. Among the 11 *Bartonella*-positive cats, 10 (91.9%) were infected with *B. henselae* and 1 (9.1%) with *B. clarridgeiae*.

Table 1 Sequencing result of 11 positive samples

Samples	<i>Bartonella</i> species	% Similarity
No.3	<i>B.henselae</i>	99.69%
No.12	<i>B.henselae</i>	100%
No.27	<i>B. henselae</i>	100%
No.53	<i>B. henselae</i>	100%
No.60	<i>B. clarridgeiae</i>	100%
No.62	<i>B. henselae</i>	100%
No.76	<i>B. henselae</i>	99.69%
No.77	<i>B. henselae</i>	99.69%
No.78	<i>B. henselae</i>	100%
No.79	<i>B. henselae</i>	99.69%
No.83	<i>B. henselae</i>	100%

Table 2 Oligonucleotide citrate synthase gene (*gltA*) primers used in this study

Target gene	Primers	Oligonucleotide sequences
<i>gltA</i> gene	Forward-BhCS. 781p	5'-GGGGACCAGCTCATGGTGG-3'
	Reveres-BhCS.1137n	5'-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA-3'

Discussion

There are many reports of the prevalence and possible carriers of *Bartonella*, particularly cats. Most reports focused on stray cats because they are mostly infested with fleas. The present study reported the prevalence of bartonellosis in healthy well-cared client-

owned cats. The prevalence of the infection was different from a previous report by Jitchum and colleagues in 2009. In that study, the authors studied stray cats and found high prevalence of *B. henselae* and *B. clarridgeiae* in stray cats but low prevalence in pet cats. Both studies used the PCR technique (16S rRNA gene), but the present study included the *gltA* gene.

Another report of bartonellosis in four regions of Thailand showed that bartonellosis infection in domestic cats was 82.9% (63/76) with *B. henselae* and 11.8% (9/76) with *B. clarridgeiae* (Maruyama et al., 2007).

In conclusion, owners of cats should increase their awareness of the cat scratch disease, which can be transmitted from cats to humans as shown by cats in the present study. One interesting point is that all cats in the present study had no visible flea infestation. The owners reported use of heartworm and flea prevention spot-on products once a month on most of the cats (more than 80%). The difference in the results of *Bartonella* prevalence among studies might be caused by the difference in vectors such as wood louse hunter spider (Mascarelli et al., 2012) or chigger mite (Kabeya et al., 2010; Kosoy et al., 2010), which should be further investigated in future studies of bartonellosis.

Acknowledgements

The present study was supported by the grant from the 90 years graduate scholarship, Ratchadapisek Sompot Fund, Chulalongkorn University.

References

- Bai Y., Bhengsi S., Boonmar S., Diaz M. H., Kosoy M., Susan A Maloney S.A., Sawatwong P., Winchell J., Baggett H. and Peruski L. 2012 *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* in humans, Thailand. *Emerg infect dis.*, 18(6):989-991.
- Boonma, S., Poapalathep, A., Pisetpaisarn, K., Sanyathitiseree, P., Maruyama, S. and Katsube, Y. 1997. Prevalence of *Bartonella henselae* Antibodies in Domestic Cats in Thailand. *Kasetsart J.* 31: 268-270.
- Bown, K. J., M. Benneth and M. Begon. 2004. Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. *Emerg Infect Dis.* 10(4): 684-687.
- Breitschwerdt, E.B. and Kordick, D.L. 2000. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev.* 13(3): 428-438.
- Chang, C.C., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Romano, V. and Tietze, N. 2001. Molecular evidence of *Bartonella* sp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol.* 39(4): 1221-1226.
- Castle, K.T., Kosoy, M., Lerdthusnee, K., Phelan, L., Bai, Y., Gage, K.L., Leepitakrat, W., Monkanna, T., Khlaimanee, L., Chandranoi, K., Jone, J.W. and Colemann, R.E. 2004. Prevalence and diversity of *Bartonella* in rodents of northern Thailand: a comparison with *Bartonella* in rodents from southern China. *Am J Trop Med Hyg.* 70(4): 429-433.
- Chomel, B.B., Carlos, E.T., Kasten, R.W., Yamamoto, K., Chang, C.C., Carlos, R.S., Abenes, M.V. and Pajares, C.M. 1999. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(4): 593-597.
- Chomel, B.B., MacDonald, K.A., Kasten, R.W., Chang, C.C., Wey, A.C., Foley, J.E., Thomas, W.P. and Kittleson, M.D. 2001. Aortic valve endocarditis in a dog due to *Bartonella clarridgeiae*. *J Clin Microbiol.* 39(10): 3548-3554.
- Chung, C.Y., Kasten, R.W., Paff, S.M., Vanhorn, B.A., Vayssier-Taussat, M., Boulouis, H.J. and Chomel, B.B. 2004. *Bartonella* sp. DNA associated with biting flies from California. *Emerg Infect Dis.* 10(7): 1311-1313.
- Durden, L.A., Ellis, B.A., Banks, C.W., Crowe, J.D., and Oliver, J.H. 2004. Ectoparasites of gray squirrels in two different habitats and screening of selected ectoparasites for *Bartonella*. *J Parasitol.* 90(3): 485-489.
- Fenollar, F., Sire, S. and Raoult, D. 2005. *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* as an agent of blood culture-negative endocarditis in a human. *J Clin Microbiol.* 43(9): 945-947
- Garré, L., Guaraglia, W., Cuatz, D., Kaufman, S., Gil, H., and Rosa, A.F.D. 2008. Infective endocarditis due to *Bartonella quintana*. *Medicina (B Aires).* 68(2): 144-146.
- Jacomo, V., Kelly, P.J. and Raoult D. 2002. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(1): 8-18.
- Jitchum, S., Wongnarkpet, S., Amavisit, P., Maruyama S. and Jittapalapong, S. 2009. Detection of *Bartonella* spp. Infection of Stray Cats Resided in Monasteries of Bangkok Metropolitan areas by Polymerase Chain Reaction Technique. *Proceeding Kasetsart University Annual Conference, Bangkok (Thailand).* 47: 139-147.
- Jonathan, A. W., Rickeie, W. K., Sunlian, F., Jane, E. S., Emir, H., Michelle, R. S., Stephen W. B. and Chomel, B.B. 2007. Experimental infection of domestic cats with passaged genotype I *Bartonella henselae*. *Vet. Microbiol.* 122: 290-297.
- Just, F.T., Gilles, J., Pradel, I., Pfalzer, S., Lengauer, H., Hellmann, K. and Pfister, K. 2008. Molecular evidence for *Bartonella* spp. in cat and dog fleas from Germany and France. *Zoonoses Public Health.* 55(8-10): 514-520.
- Kabeya H., Colborn J.M., Bai Y., Kriangkrai Lerdthusnee, Jason H. Richardson, Soichi Maruyama, and Michael Y. Kosoy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* June 2010, 10(5): 429-434.
- Kim, Y.K., Seo, K.W., Lee, J.H., Choi, E.W., Lee, H.W., Hwang, C.Y., Shin, N.S., Youn, H.J., Hwa, Y. and Youn, H.Y. 2009. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats and dogs in Korea *J Vet Sci.* 10(1): 85-87.
- Koehler, J.E., Quinn, F.D., Berger, T.G., LeBoit, P.E. and Tappero, J.W. 1992. Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N Engl J Med.* 327(23): 1625-1631.
- Kordick, D.L., Swaminathan, B., Greene, C.E., Wilson, K.H., Whitney, A.M., O'Connor, S., Hollis, D.G., Matar, G.M., Steigerwalt, A.G., Malcolm, G.B., Hayes, P.S., Hadfield T.L., Breitschwerdt, E. B. and Brenner, D. J. 1996. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* subsp. nov., isolated from dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and emended

- description of *Bartonella vinsonii*. Int J Syst Bacteriol. 46(3): 704-709.
- Kosoy M., Bai Y., Sheff K., Morway C., Baggett H., Maloney S.A., Boonmar S., Bhengsi S., Dowell S.F., Sitdhirasdr A., Lerdthusnee K., Richardson J. and Peruski L.F. 2010. Identification of *Bartonella* Infections in febrile human patients from Thailand and their potential animal reservoirs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82(6): 1140-1145.
- Kosoy, M., Morway, C., Sheff, K.W., Bai, Y., Colborn, J., Chalcraft, L., Dowell, S.F., Peruski, L.F., Maloney, S.A., Baggett, H., Sutthirattana, S., Sidhirat, A., Maruyama, S., Kabeya, H., Chomel, B.B., Kasten, R., Popov, V., Robinson, J., Kruglov, A. and Petersen, L.R. 2008. *Bartonella tami* sp. nov., a newly recognized pathogen isolated from three human patients from Thailand. J Clin Microbiol. 46(2): 772-775.
- Kosoy, M.Y., Regnery, R.L., Tzianabos, T., Marston, E.L., Jones, D.C., Green, D., Maupin, G.O., Olson, J.G. and Childs, J.E. 1997. Distribution, diversity, and host specificity of *Bartonella* in rodents from the Southeastern United States. Am J Trop Med Hyg. 57(5): 578-588.
- La, V.D., Tran-Hung, L., Aboudharam, G., Raoult, D. and Micheal, D.M. 2005. *Bartonella quintana* in domestic cat. Emerg Infect Dis. 11(8): 1287-1289.
- Lee, S.C., Fung, C.P., Lee, N. and Shieh, W.B. 1998. Cat-scratch disease caused by *Bartonella henselae*: the first case report in Taiwan. J Formo Med Assoc. 97(8): 569-572.
- Marston, E.L., Finkel, A.B., Regnery, R.L., Winoto, I.L., Graham, R.R., Wignall, S., Simanjuntak, G. and Olson, J.G. 1999. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in an urban Indonesian cat population. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6(1): 41-44.
- Maruyama, S., Boonmar, S., Morita, Y., Sakai, T., Tanaka, S., Yamaguchi, F., Kabeya, H. and Katsube, Y. 2000. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* among healthy individuals in Thailand. J Vet Med Sci. 62(6): 635-637.
- Maruyama, S., Sakai, T., Morita, Y., Tanaka, S., Kabeya, H., Boonmar, S., Poapolathep, A., Chalermchaikit, T., Chang, C.C., Kasten, R.W., Chomel, B.B. and Katsube, Y. 2007. Prevalence of *Bartonella* species and 16S rRNA gene types of *Bartonella henselae* from domestic cats in Thailand. Am J Trop Med Hyg. 65(6): 783-787.
- Mascarelli P.E., Bradley J.M., Trull C., Maggi R.G. and Breitschwerdt E.B. 2012. *Bartonella* infection in a mother and son from Kentucky exposed to wood louse hunter spiders. 7th International Conference on *Bartonella* as Animal and Human Pathogens. Raleigh, North Carolina, USA.
- Paitoonpong, L., Chitsomkasem, A., Chantrakooptungool, S., Chitsomkasem, A., Chantrakooptungool, S., Kanjanahareutai, S., Tribuddharat, C. and Srifuengfung, S. 2008. *Bartonella henselae*: first reported isolate in a human in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 39(1): 123-129.
- Rolain, J.M., Franc, M., Davoust, B. and Raoult, D. 2003. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipipentis* in cat fleas, France. Emerg Infect Dis. 9(3): 338-342.
- Saisongkorh W., Wootta W., Sawanpanyalert P., Raoult D., Rolain J.M. 2009. "*Candidatus Bartonella thailandensis*": a new genotype of *Bartonella* identified from rodents. Vet. Microbiol. 139(1-2): 197-201.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci. 74(12): 5463-5467.
- Sanogo, Y., Zeaiter, Z., Caruso, G., Merola, F., Shpynov, S., Philippe Brouqui, P. and Raoult, D. 2003. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. Emerg Infect Dis. 9(13): 329-332.
- Stevenson, H.L., Bai, Y., Kosoy, M.Y., Montienieri, J.A., Lowell, J.L., Chu, M.C. and Gage, K.L. 2003. Detection of novel *Bartonella* strains and *Yersinia pestis* in prairie dogs and their fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae and Pulicidae) using multiplex polymerase chain reaction. J Med Entomol. 40(3): 329-337.
- Suksawat, J., Chomel, B., Hegarty, B.A. and Breitschwerdt, E.B. 2002. Western immunoblot analysis of the immunologic response of dogs to *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* antigens. J Vet Diagn Invest. 15(4): 349-354.
- Ueno, H., Hohdatsu, T., Muramatsu, Y., Koyama, H. and Morita, C. 1996. Does coinfection of *Bartonella henselae* and FIV induce clinical disorders in cats. Microbiol. Immunol. 40(9): 617-620.
- Yamamoto, K., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Hew, C.M., Carrie M. Hew, David K. Weber, D.K., Lee, W.I., Koehler, J.E. and Pedersen, N.C. 2003. Infection and re-infection of domestic cats with various *Bartonella* species or types: *B. henselae* type I is protective against heterologous challenge with *B. henselae* type II, Vet Microbiol. 92(1-2): 73-86.

บทคัดย่อ

อุบัติการณ์การติดเชื้อบาร์โทเนลลาในแมวบ้านในเขตกรุงเทพมหานคร

ภควัน ศาสตรากรกุล¹ ไชอิชิ มารูยามา² ฮิโตรี คาเบยา² ซินโก ซาโต² สถาพร จิตตपालะพงษ์³
เสาวลักษณ์ จิตชุม³ ทวีชา จิย์พงษ์³ ชาญณรงค์ รอดคำ⁴ รสมา ภูสุนทรธรรม^{1*}

ทำการศึกษาลักษณะทางด้านชีวโมเลกุลของเชื้อบาร์โทเนลลาในแมวบ้านที่มีเจ้าของและได้รับการเลี้ยงดูอย่างดีจำนวน 200 ตัว ที่มารับการบริการที่โรงพยาบาลสัตว์เล็กจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยแมวที่เข้าร่วมโครงการต้องไม่แสดงอาการผิดปกติและไม่มีหมัดบนตัว ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาเชื้อตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2554 ทำการตรวจหาเชื้อบาร์โทเนลลา เฮนเซลเล ในตัวอย่างเลือดด้วยวิธีการเพาะเชื้อบน 5% rabbit blood agar และวิธี PCR ตัวอย่างที่ได้ผลเป็นบวกถูกส่งตรวจ DNA Sequencing เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ การศึกษาพบว่าการติดเชื้อบาร์โทเนลลาคิดเป็น 5.5% (11/200) ของแมวที่ทำการศึกษาทั้งหมด โดยเป็นเชื้อบาร์โทเนลลา เฮนเซลเล 91% (10/11) และเชื้อบาร์โทเนลลา *clarridgeiae* 9% (1/11) จากการศึกษา สรุปได้ว่าเชื้อบาร์โทเนลลา เฮนเซลเลเป็นเชื้อหลักที่พบในแมวบ้าน ดังนั้น เจ้าของแมวจึงควรป้องกันหมัดซึ่งเป็นพาหะของโรคในแมวเป็นประจำ นอกจากนี้การให้ความรู้กับสัตวแพทย์และเจ้าของแมวเกี่ยวกับโรคเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยในการวางแผนการป้องกันการติดต่อของโรค

คำสำคัญ: กรุงเทพมหานคร บาร์โทเนลลา อุบัติการณ์ แมวบ้าน

¹ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

²ภาควิชาอายุรศาสตร์ทางสัตวแพทย์ วิทยาลัยสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยนิฮอน ประเทศญี่ปุ่น

³ภาควิชาปรสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย

⁴ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: drosama@gmail.com