

การตรวจหาซาร์โคซิสต์ชนิดติดต่อคนในเนื้อโคด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล
ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

Molecular detection of zoonotic *Sarcocystis* spp. in beef
in the northeastern Thailand

เด่นพงษ์ แซ่ฮ้อง* อัจจง อ่อนหวาน
Denpong Sakhong* Ard-ong Onwan

Abstract

Background: *Sarcocystis* spp. is a pathogenic protozoan that can infect humans through contaminated beef ingestion and previously reported to cause human intestinal sarcocystosis in Thailand. As the pathogen is persistently found in beef carcasses and products, differentiation of zoonotic and non-zoonotic *Sarcocystis* spp. is essential for preventing the spread of the disease.

Method: The total of 235 beef samples collected from local butcher shops and slaughterhouses in the northeastern region were examined for bradyzoite and sarcocyst of *Sarcocystis* spp. based on microscopic and histopathologic techniques. Then, to identify zoonotic species, the samples were subjected to 18S rRNA multiplex PCR followed by sequencing, and phylogenetic analysis. Descriptive statistic and Chi-square were used for data analysis. The positive sample distribution was illustrated by GIS mapping software.

Result: Histopathology findings revealed *Sarcocystis* spp. detection in 16 samples, including 6 thin-walled and 10 thick-walled sarcocysts. Thirty-eight samples (16.17%) were positive by the multiplex PCR. Due to sequence analysis, 23 (9.79%) and 15 (6.38%). sequences were closely related, with 100% nucleotide identity, to *S. hominis* and *S. cruzi*, respectively.

Conclusion: To the best of our knowledge, the present study is the first molecular identification of zoonotic *S. hominis* in beef in Thailand. We demonstrated that, for *Sarcocystis* spp. identification, the molecular method is deemed preferable to histopathologic examination. Detection of zoonotic *S. hominis* is important in term of consumer safety, hence effective measures for the carcass monitoring of the pathogen should be established. Moreover, to prevent the foodborne illness, beef should be properly prepared and fully cooked before serving.

Keywords: beef, zoonotic *Sarcocystis* spp., molecular method, 18S rRNA gene

Veterinary research and development center (Upper northeastern region) Tapha, Mueang, Khon Kaen 40260. Thailand

*Corresponding author: Tel. 043 261246 Fax 043-262050 E-mail: denpongx@gmail.com

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40260 ประเทศไทย

*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 043-261246 โทรสาร 043-262050 E-mail: denpongx@gmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: เชื้อซาร์โคซิสติสเป็นโปรโตซัวก่อโรคที่สามารถติดต่อจากสัตว์ไปสู่คนผ่านการบริโภคเนื้อสัตว์ที่มีเชื้อซาร์โคซิสติส ประเทศไทยมีผู้ป่วยติดเชื้อซาร์โคซิสติสที่แสดงอาการกล้ามเนื้ออักเสบอย่างรุนแรง มีรายงานการตรวจพบเชื้อซาร์โคซิสติสทั้งในซากสัตว์และเนื้อสัตว์อย่างต่อเนื่อง ดังนั้น การวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดที่ติดต่อกันจากชนิดอื่นจะช่วยลดการแพร่กระจายเชื้อสู่คน

วิธีการ: ตัวอย่างเนื้อโคจำนวน 235 ตัวอย่าง จากโครงการเนื้อสัตว์ปลอดพยาธิให้ผู้บริโภคและกิจกรรมตรวจสอบและออกใบอนุญาตโรงฆ่าสัตว์ภายในประเทศ ปีงบประมาณ 2561 ตรวจหาแบคทีเรียและซาร์โคซิสต์ของเชื้อซาร์โคซิสติสด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยวิธี Impression smear และวิธีจุลพยาธิวิทยา ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติสโดยวิธี Multiplex PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน 18S rRNA แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศเพื่อยืนยันชนิดเชื้อ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ร้อยละของการตรวจพบเชื้อด้วยสถิติไครสแควร์และกำหนดพิกัดที่ตรวจพบเชื้อซาร์โคซิสติสในแผนที่ GIS

ผล: การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบซาร์โคซิสในเนื้อโคจำนวน 16 ตัวอย่าง แบ่งเป็นชนิดที่มีผนังซิสต์แบบบางจำนวน 6 ตัวอย่าง และกลุ่มที่มีผนังซิสต์แบบหนาจำนวน 10 ตัวอย่าง ในขณะที่การตรวจด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ได้แก่ Multiplex PCR พบสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติส 38 ตัวอย่าง คิดเป็น 16.17% เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสารพันธุกรรมที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR เป็นเชื้อซาร์โคซิสติสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *S. hominis* 23 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9.79 (23/235) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *S. cruzi* 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.38 (15/235)

สรุป: การศึกษานี้เป็นการรายงานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันในเนื้อโคชนิด *S. hominis* ในประเทศไทยเป็นครั้งแรก พบว่าการตรวจหาเชื้อซาร์โคซิสติสด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลมีความ

แม่นยำสูง สามารถตรวจพบและแยกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติสได้มากกว่าวิธีการตรวจแบบจุลพยาธิวิทยา การตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ในเนื้อโคมีความสำคัญต่อสุขอนามัยในการผลิตอาหาร เนื่องจากว่าเชื้อ *S. hominis* เป็นเชื้อชนิดที่สามารถติดต่อจากสัตว์ไปสู่คนได้ ควรมีมาตรการในการตรวจสอบซากสัตว์ โดย สัตวแพทย์และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ รวมไปถึงการเปลี่ยนพฤติกรรมในการบริโภคเป็นเนื้อโคที่ปรุงสุก สะอาด และถูกสุขอนามัย

คำสำคัญ: เนื้อโค เชื้อซาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกัน วิธีชีวโมเลกุล ยีน 18S rRNA

บทนำ

เชื้อซาร์โคซิสติส (*Sarcocystis* spp.) เป็นโปรโตซัวใน Phylum Apicomplexa ที่สามารถก่อโรคได้ทั้งในสัตว์ป่า สัตว์เลี้ยง และคน พบมีการแพร่กระจายไปทั่วโลกมากกว่า 200 สปีชีส์ (Rosenthal, 2021) ในวงจรชีวิตของเชื้อจะอาศัยอยู่ในโฮสต์ 2 ชนิด คือ โฮสต์กึ่งกลางซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสัตว์กินพืช และโฮสต์สุดท้ายเป็นสัตว์กินเนื้อ จากรายงานพบว่าเชื้อซาร์โคซิสติสที่มีโคเป็นโฮสต์กึ่งกลาง ได้แก่ *S. hominis*, *S. rommeli*, *S. bovini*, *S. bovis*, *S. hirsuta*, *S. heydorni* และ *S. cruzi* ซึ่งติดต่อกันเพียง 2 ชนิด ได้แก่ *S. hominis* และ *S. heydorni* แต่ชนิดที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในคนได้แก่ เชื้อ *S. hominis* และเป็นเชื้อซาร์โคซิสติสเพียงชนิดเดียวที่สามารถพัฒนาจนครบวงจรชีวิตในคนซึ่งเป็นโฮสต์สุดท้ายได้ (Dubey, 2015) คนติดเชื้อซาร์โคซิสติส จากการบริโภคเนื้อโคที่มีแบคทีเรียในซิสต์ของเชื้อซาร์โคซิสติส เรียกว่า ซาร์โคซิสต์ (sarcocyst) พบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อซาร์โคซิสติสชนิด *S. hominis* ทั้งในประเทศเยอรมนี เนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศส สเปน อาร์เจนตินา บราซิล และออสเตรเลีย สำหรับในทวีปเอเชียมีรายงานผู้ป่วยในประเทศจีน อินเดีย ลาว และมาเลเซีย ซึ่งทั้งหมดมีสาเหตุจากการบริโภคเนื้อโคที่ปรุงไม่สุก (Fayer et al., 2015) ในประเทศไทยพบผู้ป่วยติดเชื้อซาร์โคซิสติสจากการบริโภคเนื้อโคในจังหวัดขอนแก่น อุบลราชธานี และกรุงเทพมหานคร โดยคนที่ได้

รับเชื้อชนิดนี้จะแสดงอาการทั้งแบบเฉียบพลัน ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง และปวดกล้ามเนื้อ (Bunyaratvej *et al.*, 1982; Boonjaraspinyo *et al.*, 2013) และแบบเรื้อรัง ได้แก่ อูจาระร่วงเรื้อรัง และปวดกล้ามเนื้อ โดยคนที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังอาจมีอาการของโรคต่อเนื่องยาวนานและยังไม่มียารักษาโรคโดยเฉพาะ (Fayer *et al.*, 2015; Rosenthal, 2021)

การจำแนกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันในเนื้อโคออกจากเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดอื่น มีความสำคัญต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและสุขอนามัยในการผลิตเนื้อสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่คนส่วนใหญ่นิยมบริโภคอาหารประเภทลาบ หรือก้อยที่ปรุงจากเนื้อโค และมีรายงานการติดเชื้อซาร์โคซิสติสในภูมิภาคนี้บ่อยครั้ง (สมชัย และคณะ, 2553; Boonjaraspinyo *et al.*, 2013) ซึ่งวิธีการตรวจหาเชื้อซาร์โคซิสติสในเนื้อโคโดยทั่วไปจะเป็นการตรวจหาแบคทีเรียหรือตรวจหาซาร์โคซิสต์ในเนื้อโคด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา จากนั้นนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง (light microscope) ซึ่งสามารถจำแนกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติสในเนื้อโคจากความแตกต่างของผนังซิสต์ (sarcocyst wall) ออกได้เป็นสองกลุ่ม คือชนิดที่มีผนังซิสต์แบบหนา ($\geq 4 \mu\text{m}$) ได้แก่ *S. hominis*, *S. rommeli*, *S. bovini*, *S. bovifelis* และ *S. hirsuta* และชนิดที่มีผนังซิสต์แบบบาง ($\leq 1 \mu\text{m}$) ได้แก่ *S. heydorni* และ *S. cruzi* (Dubey *et al.*, 2015; Gjerde, 2016) แต่วิธีการดังกล่าวไม่สามารถวินิจฉัยแยกเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันออกจากเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดอื่นได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแยกเชื้อ *S. hominis* ออกจากเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดอื่นที่มีผนังซิสต์แบบหนา และการแยกชนิดเชื้อ *S. heydorni* ซึ่งมีผนังซิสต์แบบบางออกจากเชื้อ *S. cruzi* ที่มีรายงานตรวจพบในโคในประเทศไทย (อาจอง และเด่นพงษ์, 2560) เนื่องจากลักษณะโครงสร้างผนังซิสต์ของเชื้อซาร์โคซิสติสหลายชนิดจะมีความคล้ายคลึงกันและมีโฮสต์กึ่งกลางชนิดเดียวกัน (Fayer *et al.*, 2015) ทำให้การวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติสด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างทำได้ยาก

จากเหตุผลดังกล่าวมาข้างต้น จึงจำเป็นต้องนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจแยก

ชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติส โดย More *et al.* (2011) ใช้วิธี PCR ในการแยกชนิดของเชื้อ เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อซาร์โคซิสติสในโคในประเทศอาร์เจนตินา และพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อซาร์โคซิสติสโดยใช้เทคนิค Real-time PCR ซึ่งพบว่าสามารถแยกเชื้อ *S. hominis*, *S. hirsuta* และ *S. cruzi* ได้แม่นยำและรวดเร็ว (More *et al.*, 2013) นอกจากนี้ Hu *et al.* (2016) ได้จำแนกชนิดของเชื้อ *S. heydorni* ที่ตรวจพบในเนื้อโคด้วยวิธี PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA สอดคล้องกับรายงานของ Prakas *et al.* (2020) และ Rubiola *et al.* (2021) ที่ศึกษาแยกเชื้อ *S. hominis* ซึ่งเป็นชนิดติดต่อกันออกจากเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดอื่นจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ Phylogenetic tree เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ สำหรับในประเทศไทย Hongchuta *et al.* (2021) ได้ศึกษาคุณลักษณะทางชีวโมเลกุลของเชื้อซาร์โคซิสติสในกล้ามเนื้อหัวใจโคและกระปือ ในประเทศไทย ลาว และกัมพูชา และใช้ความแตกต่างของคุณลักษณะทางชีวโมเลกุล ในการแยกชนิดของเชื้อซาร์โคซิสติส แต่การศึกษาคูณลักษณะทางชีวโมเลกุลของเชื้อซาร์โคซิสติสที่ตรวจพบในประเทศไทยมีค่อนข้างน้อย อีกทั้งยังไม่พบรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันในเนื้อโค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันในเนื้อโคด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของซาร์โคซิสต์ที่พบในเนื้อโคจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล วางแผนควบคุมและป้องกันโรค เพื่อไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อเพิ่มมากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ทำการศึกษา

เนื้อโค 235 ตัวอย่าง เก็บจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์จำนวน 174 ตัวอย่าง และจากโรงฆ่าสัตว์จำนวน 61 ตัวอย่าง จากโครงการเนื้อสัตว์ปลอดภัยใส่ใจผู้บริโภค และกิจกรรมตรวจสอบและออกใบอนุญาตโรงฆ่าสัตว์ภายในประเทศ ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ

ประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ.2560 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ.2561

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

ตรวจหาแบคทีเรียของเชื้อปรสิตโคซิซิสในตัวอย่างเนื้อโคโดยวิธี Impression smear (มานวิภา, 2556) ย้อมด้วยสี Giemsa ส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง ใช้กำลังขยาย 100-1,000 เท่า ตรวจผนังซิสต์ด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยาจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เก็บรักษาไว้ในน้ำยาคงสภาพ (10% Neutral formalin solution) ตามวิธีการมาตรฐาน (Bancroft and Gamble, 2002) ย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี Haematoxylin & Eosin (ศุภลักษณ์, 2545) ตรวจหาซีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างโดยใช้กำลังขยาย 40-1,000 เท่า เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อปรสิตในเบื้องต้นจากความหนาของผนังซิสต์ตามเกณฑ์ของ Dubey *et al.* (2015) ออกเป็นสองกลุ่มคือ ผนังซิสต์แบบหนา ($\geq 4 \mu\text{m}$) และผนังซิสต์แบบบาง ($\leq 1 \mu\text{m}$)

การตรวจทางชีวโมเลกุล

การสกัดและการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

ตัดตัวอย่างเนื้อโคและบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง Bullet blender tissue homogenizer (Next Advance Inc., USA) นำตัวอย่างที่บดปริมาณ 50 mg ย่อยด้วย Proteinase K ใน Tissue lysis buffer ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 60 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างจะถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำไปสกัดสารพันธุกรรม ด้วยชุดสกัด QIAamp® DNA Micro Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีการของผู้ผลิต และเก็บสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาตรวจวิเคราะห์

ตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อปรสิตโคซิซิสจากสารพันธุกรรมที่สกัดได้ด้วยวิธี Multiplex PCR โดยใช้เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมยี่ห้อ Applied Biosystems รุ่น Veriti 96 wells (Applied Biosystems, USA) ใช้โปรแกรมในการตรวจแยกชนิดเชื้อปรสิตโคซิซิสที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายบนยีน 18S rRNA (ตารางที่ 1) ตามวิธีการของ Chiesa *et al.* (2013) ส่วนผสมของ PCR reaction ใน 25 μl ประกอบด้วย 10 μM Forward primer ของ *S. hominis* 1 μl และ *S. cruzi* 1 μl , 10 μM Reverse primer ของ *S. hominis* และ *S. cruzi* 2 μl , Taq® 2X Master Mix (New England BioLabs Inc., USA) 12.5 μl , 2 mM MgCl_2 2 μl , น้ำกลั่น 1.5 μl และ DNA template 5 μl ในสภาวะ predenaturation ที่ 95°C นาน 3 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 95°C นาน 60 วินาที annealing ที่ 56°C นาน 60 วินาที extension ที่ 72°C นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และ final extension ที่ 72°C นาน 5 นาที วิเคราะห์ PCR product ด้วยเครื่องตรวจชิ้นส่วน DNA/RNA ยี่ห้อ QIAGEN รุ่น QIAexcel Advanced (Qiagen, Germany) อ่านค่าเปรียบเทียบกับ QX size marker ขนาด 100 bp-2.5 kb (Qiagen, Germany)

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

คัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อปรสิตโคซิซิสด้วยวิธี Multiplex PCR ซึ่งมี PCR product ขนาดประมาณ 182 bp และ 285 bp รวมทั้งสิ้น 6 ตัวอย่างไปตรวจยืนยันชนิดของเชื้อด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มีขั้นตอนโดยย่อ คือ ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR kit

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (Chiesa *et al.*, 2013)

<i>Sarcocystis</i> spp.	Orientation	Primer sequence 5' → 3'	Position	Expected PCR product size (bp)
<i>S. hominis</i> (AF006470)	Forward	ACAGAACCAACACGCTC	143-159	182
	Reverse	AACCCTAATTCCCCGTTA	306-323	
<i>S. cruzi</i> (AF017120)	Forward	ATCAGATGAAAATCTACTACATGG	110-133	285
	Reverse	AACCCTAATTCCCCGTTA	378-395	

(Geneaid, Taiwan) นำ PCR product ที่บริสุทธิ์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย forward และ reverse โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 18S rRNA ของเชื้อแต่ละชนิด โดยใช้ชุดน้ำยา BigDye™ Terminator Ver. 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องวิเคราะห์การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอัตโนมัติ ยี่ห้อ ABI รุ่น 3500 (Applied Biosystems, USA) วิเคราะห์ผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย forward และ reverse ด้วยโปรแกรม BioEdit Ver. 7.2.5 (Hall, 1999) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X Ver. 10.2.0 (Kumar *et al.*, 2018)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

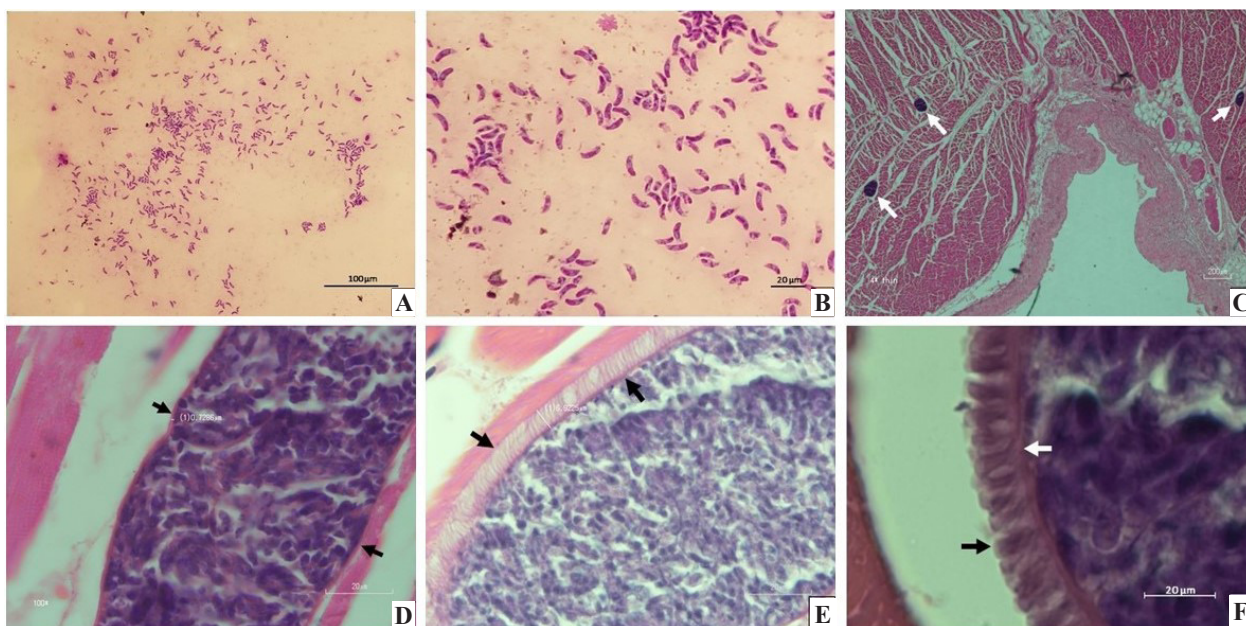
นำข้อมูลการตรวจพบเชื้อซาร์โคซิสติสในเนื้อโคมาวิเคราะห์และรายงานผลในรูปแบบของสถิติพรรณนาด้วยค่าร้อยละ จำแนกตามจังหวัดและสถานที่เก็บตัวอย่างด้วยสถิติไคส์แควร์ เปรียบเทียบความแตกต่างของการตรวจพบเชื้อด้วย Fisher's exact test วิเคราะห์สถานที่ที่มีโอกาสพบเชื้อ *S. hominis* ด้วย odds ratio ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SAS version 9.1 (SAS, 2004)

ผลและวิจารณ์

ตัวอย่างเนื้อโคทั้งหมด 235 ตัวอย่าง นำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง พบแบคทีเรียของเชื้อซาร์โคซิสติสรูปร่างโค้งคล้ายกล้วยหอม ย่อมติดสีม่วง-น้ำเงิน (รูปที่ 1 A-B) ด้วยวิธี Impression smear จำนวน 16 ตัวอย่าง ตรวจสไลด์ด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยาพบซาร์โคซิสต์ ลักษณะยาว รี รูปไข่ถึงทรงกลม ภายในซิสต์อัดแน่นไปด้วยแบคทีเรียของเชื้อในกล้ามเนื้อ (รูปที่ 1 C) จำนวน 16 ตัวอย่าง เมื่อประเมินลักษณะของผนังซิสต์จากสไลด์ชิ้นเนื้อ สามารถแบ่งกลุ่มของ

เชื้อซาร์โคซิสติสจากความหนาของผนังซิสต์ออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามเกณฑ์ของ Dubey *et al.* (2015) คือ กลุ่มที่มีผนังซิสต์แบบบางวัดขนาดได้ ≤ 1 (รูปที่ 1 D) จำนวน 6 ตัวอย่าง และกลุ่มที่มีผนังซิสต์แบบหนาขนาด $\geq 4 \mu\text{m}$ ซึ่งวัดขนาดความหนาของผนังซิสต์ได้ 6.04-7.73 μm (รูปที่ 1 E) จำนวน 10 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะโครงสร้างผนังซิสต์ของกลุ่มที่มีผนังซิสต์แบบหนามีการจัดเรียงตัวเป็นเส้นขวางตั้งตรงตามผนังซิสต์คล้ายกับลักษณะของโครงสร้างที่เรียกว่า finger-like protrusions ดังแสดงในรูปที่ 1 F ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ *S. hominis*, *S. bovis* และ *S. bovis* (Chen *et al.*, 2011; More *et al.*, 2014; Dubey *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างไม่สามารถจำแนกกระหว่างเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดที่ติดต่อกันและไม่ติดต่อกันได้

ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี Multiplex PCR จากตัวอย่างเนื้อโค จำนวน 235 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *S. hominis* จำนวน 23 ตัวอย่าง (PCR product ขนาด 182 bp) และตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *S. cruzi* จำนวน 15 ตัวอย่าง (PCR product ขนาด 285 bp) เมื่อคัดเลือก PCR product ขนาด 182 bp และ 285 bp จำนวน 4 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อในฐานข้อมูล GenBank เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ (ตารางที่ 2) พบว่า PCR product ขนาด 182 bp มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *S. hominis* ที่พบในโคจากประเทศเยอรมนี (JX679471) และอิตาลี (MT92481) มากที่สุด โดยมีค่า percent identity 100% สำหรับ PCR product ขนาด 285 bp มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *S. cruzi* ที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (อาจง และเด่นพงษ์, 2560) และหลายประเทศ เช่น ประเทศอาร์เจนตินา (KT901167) โดยมีค่า percent identity 100%



รูปที่ 1 เชื้อซาร์โคซิสติสและซาร์โคซิสต์ในเนื้อโค จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

รูป A-B : แบคทีเรียของเชื้อซาร์โคซิสติส ย้อมด้วยสี Giemsa กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า ตามลำดับ

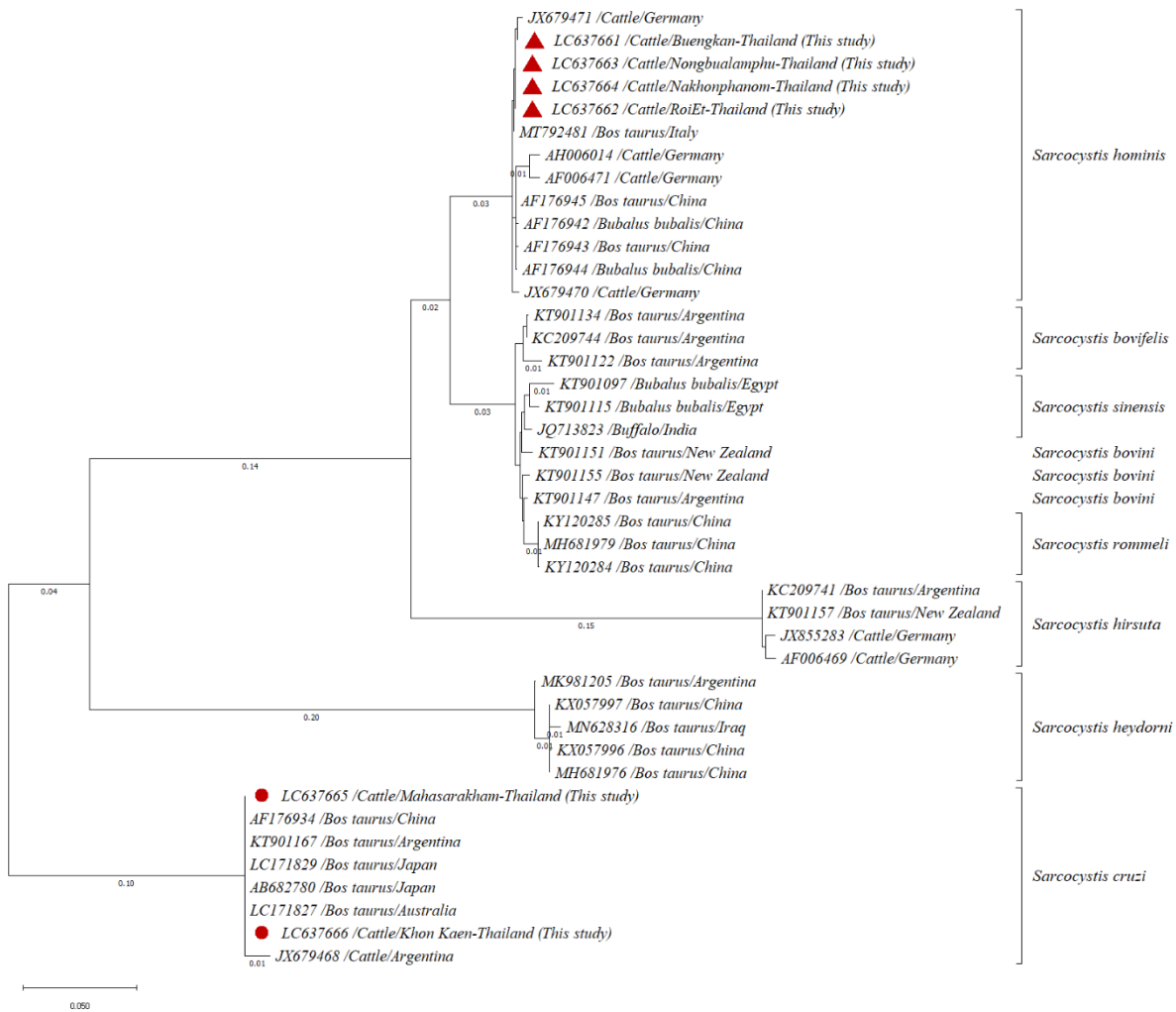
รูป C : ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของซาร์โคซิสต์ในกล้ามเนื้อโค (ลูกศรชี้) ย้อมด้วยสี Haematoxylin & Eosin กำลังขยาย 40 เท่า

รูป D-E : ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของผนังซาร์โคซิสต์แบบบาง และแบบหนาตามลำดับ (ลูกศรชี้) กำลังขยาย 1000 เท่า

รูป F : ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของผนังซาร์โคซิสต์ ที่มีการจัดเรียงตัวคล้ายกับโครงสร้างที่เรียกว่า finger like protrusions (ลูกศรชี้) กำลังขยาย 1000 เท่า

ตารางที่ 2 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อซาร์โคซิสติสที่พบในการศึกษานี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อซาร์โคซิสติส ในฐานข้อมูล GenBank

เชื้อ	Percent identity	Accession no. (โฮสต์; ประเทศ)	อ้างอิง
<i>S. hominis</i>	100%	JX679471 (Cattle; Germany)	More <i>et al.</i> (2013)
		MT792481 (Cattle; Italy)	Prakas <i>et al.</i> (2020)
	99.45%	JX679470 (Cattle; Germany)	More <i>et al.</i> (2013)
		AF176943, AF176945 (Cattle; China)	Yang <i>et al.</i> (2001)
	98.90%	AH006014, AF006471 (Cattle; Germany)	Fischer and Odening (1998)
<i>S. cruzi</i>	100%	LC171827 (Cattle; Australia)	Murata <i>et al.</i> (2018)
		LC171829, AB682780 (Cattle; Japan)	Matsuo and Sato (2012)
		JX679468, KT901167 (Cattle; Argentina)	More <i>et al.</i> (2013), Gjerde (2016)
		AF176934 (Cattle; China)	Yang <i>et al.</i> (2001)



รูปที่ 2 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในส่วนของยีน 18S rRNA ของเชื้อซาร์โคซิสติสที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับเชื้อที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood และวิเคราะห์ bootstrap 1000 รอบ ค่า Branch lengths แสดงไว้ในแต่ละกิ่งของเชื้อที่พบในตัวอย่างเนื้อโคจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงสัญลักษณ์ “▲” คือ เชื้อ *S. hominis* และ “●” คือ เชื้อ *S. cruzi*

ตารางที่ 3 ผลการตรวจเชื้อซาร์โคซิสติสในตัวอย่างเนื้อโค จากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์และโรงฆ่าสัตว์ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ด้วยวิธี Multiplex PCR

<i>Sarcocystis</i> spp.	สถานที่เก็บตัวอย่าง			ood ratio (95% CI)	<i>p</i> -value
	สถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ (%) n = 174	โรงฆ่าสัตว์ (%) n = 61	รวม (%) n = 235		
<i>S. hominis</i>	21 (12.07) ^ก	2 (3.28) ^ข	23 (9.79)	4.05 (0.92-17.81)	0.04
<i>S. cruzi</i>	11 (6.32)	4 (6.56)	15 (6.38)	0.96 (0.29-3.14)	0.95
รวม	32 (18.39)	6 (9.84)	38 (16.17)	2.07 (0.82-5.21)	0.12

^{ก,ข} ค่าร้อยละในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* ในแผนภูมิ Phylogenetic tree (รูปที่ 2) พบว่ามีความสอดคล้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* ที่ตรวจพบด้วยวิธี Multiplex PCR และผลการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมของเชื้อใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าเชื้อ *S. hominis* ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *S. hominis* จากประเทศอื่น ๆ ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ โดยแยกออกจากเชื้อกลุ่มที่มีผนังเซลล์แบบหนาชนิด *S. rommeli*, *S. bovis*, *S. bovis* และ *S. hirsuta* อย่างชัดเจน ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดผนังบางที่ได้จากการศึกษานี้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อ *S. cruzi* ซึ่งแยกออกจากกลุ่มของเชื้อ *S. heydorni* ซึ่งเป็นชนิดติดต่ออย่างชัดเจนเช่นกัน อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่พบรายงานว่าคนและโคในประเทศไทยติดเชื้อ *S. heydorni* (Fayer et al., 2015) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hongchuta et al. (2021) ที่ได้ศึกษาคุณลักษณะทางชีวโมเลกุลของเชื้อซาร์โคซิสติสชนิดผนังหุ้มเซลล์แบบบางในกล้ามเนื้อหัวใจโคและกระป๋อง ในประเทศไทยลาว และกัมพูชา ผลการศึกษาพบเชื้อ *S. heydorni* ในตัวอย่างเนื้อหัวใจโคจากประเทศกัมพูชาเพียงตัวอย่างเดียว ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการติดเชื้อ *S. heydorni* ในประเทศไทยเพิ่มเติม และควรมีมาตรการในการควบคุมเชื้อปรสิตจากการนำเข้าโค กระป๋องจากประเทศเพื่อนบ้านให้รัดกุมมากขึ้น เพื่อเป็นการเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดโรคที่จะเข้ามาในประเทศไทยต่อไป

จากการสืบค้นข้อมูลใน GenBank พบว่าไม่มีรายงานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* ในคนที่ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ถึงแม้ว่ามีรายงานการระบาดของเชื้อ *S. hominis* ในคนจากประเทศมาเลเซีย ลาว และไทย (Fayer et al., 2015) ทั้งนี้อาจเนื่องจากรายงานการศึกษาส่วนใหญ่เป็นการตรวจพบโอโอซิสต์ในอุจจาระผู้ป่วย (สมชัย และคณะ, 2553; Wilairatana et al., 1996; Tungtrongchitr et al., 2007; Boonjaraspinyo et al., 2013) ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติสจากซาร์โคซิสต์

ในเนื้อโคทั้ง 6 ตัวอย่าง รายงานในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเป็นการรายงานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* ที่ตรวจพบในเนื้อโคในประเทศไทยเป็นครั้งแรก โดยได้รับ Accession no. LC13761-LC13764 ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการจำแนกชนิดเชื้อและการศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลต่อไป

ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติสด้วยวิธี Multiplex PCR ในตัวอย่างเนื้อโค 16.17% (38/235) โดยแบ่งเป็นจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์และจากโรงฆ่าสัตว์ 18.39% (32/174) และ 9.84% (6/61) ตามลำดับ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้พบว่าโอกาสที่จะตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อซาร์โคซิสติสในตัวอย่างเนื้อโคจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์สูงเป็น 2.07 เท่า (95% CI; 0.82-5.21) ของตัวอย่างเนื้อโคจากโรงฆ่าสัตว์ โดยสารพันธุกรรมที่ตรวจพบในครั้งนี้แยกเป็นสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* 9.79% (23/235) และสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. cruzi* 6.38% (15/235) นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างเนื้อโคจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* สูงกว่าตัวอย่างเนื้อโคจากโรงฆ่าสัตว์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ และจากโรงฆ่าสัตว์ ตรวจพบ 12.07% (21/174) และ 3.28% (2/61) ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากโรงฆ่าสัตว์แต่ละแห่งอาจมีการกระจายเนื้อโคที่ติดเชื้อ *S. hominis* ไปยังสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์หลายแห่ง จึงมีโอกาสที่จะตรวจพบเชื้อจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์หลายแห่งขึ้น

จังหวัดที่พบเชื้อ *S. hominis* สูงสุดคือ จังหวัดบึงกาฬ 55.56% (5/9) รองลงมาได้แก่ จังหวัดหนองบัวลำภู 33.33% (3/9) และจังหวัดขอนแก่น 23.08% (3/13) (ตารางที่ 4) โดยในจังหวัดร้อยเอ็ดมีการตรวจพบเชื้อ *S. hominis* จากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์เท่านั้น ในขณะที่จังหวัดนครพนมและเลย มีการตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ในตัวอย่างเนื้อโคจากโรงฆ่าสัตว์มากกว่าจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4 และรูปที่ 3) จากการศึกษานี้ตรวจพบเชื้อ *S. hominis* 9.79% (23/235) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานการตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ในเนื้อโคในประเทศอิตาลี (8.47%) (Rubiola et al., 2021) และเยอรมนี (6.23%) (More et al., 2014) แต่ค่าที่ได้

ต่ำกว่ารายงานที่พบในประเทศเวียดนาม (27.72%) (Jehle *et al.*, 2009), ตูนิเซีย (19.00%) (Hornok *et al.*, 2015) และลิทัวเนีย (13.73%) (Prakas *et al.*, 2020) การตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ในเนื้อโคจากการศึกษาครั้งนี้ แสดงว่าเชือดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะมีการพัฒนา จนครบวงจรชีวิตของเชื้อ โดยมีการติดต่อไปยังโฮสต์ สัตว์ท้ายได้แก่คน โดยมีการกระจายตัวอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้วิธีทางชีวโมเลกุล ที่ใช้ในการศึกษานี้ยังสามารถนำมาช่วยวินิจฉัยแยกเชื้อ ชาร์โคซิสติสที่ติดต่อกันชนิด *S. hominis* ออกจากเชื้อ ชาร์โคซิสติสชนิดอื่นในตัวอย่างเนื้อโคได้ และสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อร่วมกับวิธีการตรวจ ด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อเพิ่มความแม่นยำให้มากขึ้น

การตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ในเนื้อโคมีความสำคัญต่อสุขอนามัยการผลิตอาหาร เนื่องจากเชื้อ *S. hominis* เป็นเชื้อชนิดที่สามารถติดต่อกันจากสัตว์สู่คนได้ จากพฤติกรรมการบริโภคเนื้อโคที่ปรุงไม่สุกเป็นปัจจัย สำคัญที่ยังทำให้เชื้อชาร์โคซิสติสชนิด *S. hominis* มีการพัฒนาจนครบวงจรชีวิตและกระจายตัวอยู่ในภาค ตะวันออกเฉียงเหนือในประเทศไทย เห็นได้จากการ รายงานการพบผู้ติดเชื้อชาร์โคซิสติส เช่น การศึกษาของ Wilairatana *et al.* (1996) ที่ทำการสำรวจประวัติใน อุจจาระผู้ใช้แรงงานในกรุงเทพมหานคร พบว่า ผู้ใช้แรงงาน จากทุกภาคของประเทศไทยมีการติดเชื้อชาร์โคซิสติส แต่พบการติดเชื้อสูงสุดในผู้ใช้แรงงานจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่อาศัยอยู่ในกรุงเทพมหานคร และการศึกษา ของ Tungtrongchitr *et al.* (2007) และ Boonjaraspinyo *et al.* (2013) ยังรายงานพบผู้ติดเชื้อชาร์โคซิสติสในจังหวัด อุบลราชธานี (4.6%) และขอนแก่น (8%) นอกจากนี้ การศึกษาของ สมชัย และคณะ (2553) ที่ศึกษาหา ความชุกและปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ในประชากรทุกภาคของประเทศไทย พบว่า ประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตรวจพบโอโอซิสต์ ของเชื้อ *S. hominis* ในอุจจาระสูงสุด เนื่องจากการ บริโภคอาหารประเภทลาบเนื้อโค หลู้เนื้อโค และเนื้อโค แบบปรุงไม่สุก

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า มีการตรวจพบเชื้อ ชาร์โคซิสติสชนิด *S. hominis* ในเนื้อโคจากโรงฆ่าสัตว์และ

สถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์สำหรับการบริโภค ซึ่งอาจส่งผ่าน เชื้อต่อไปยังผู้บริโภคเนื้อโคได้ สำหรับวิธีควบคุมการติดเชื้อ ในคนสามารถดำเนินการผ่านระบบสุขอนามัยการผลิตสัตว์ เพื่อบริโภค โดยมีการตรวจสอบซากสัตว์โดยสัตวแพทย์และ การตรวจทางห้องปฏิบัติการ รวมไปถึงการประชาสัมพันธ์ ให้ความรู้เพื่อเปลี่ยนพฤติกรรมในการบริโภคเป็นเนื้อโคที่ ปรุงสุก สะอาด และถูกสุขอนามัย

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการตรวจพบเชื้อ *S. hominis* ซึ่งเป็นชนิดติดต่อกันจากสัตว์ไปสู่คนและรายงานข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์จากสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. hominis* ของ ประเทศไทย วิธีทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในครั้งนี้ ได้แก่ Multiplex PCR สามารถนำมาช่วยวินิจฉัยแยกเชื้อ ชาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันออกจากเชื้อชาร์โคซิสติส ชนิดอื่นที่มีความใกล้เคียงกันได้ จึงควรมีการระบุให้ ตรวจแยกชนิดเชื้อชาร์โคซิสติสในเนื้อโคทางห้อง ปฏิบัติการเพิ่มเติม นอกจากนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมใน รายละเอียดของการสำรวจความชุก ข้อมูลเชิงระบาดวิทยา ของเชื้อชาร์โคซิสติสชนิดติดต่อกันในเนื้อโคและประชากร รวมไปถึงคุณลักษณะทางชีวโมเลกุลส่วนอื่น ๆ เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงแหล่งที่มาและการถ่ายทอดของเชื้อจาก สัตว์มาสู่คน และเพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพเนื้อโคตั้งแต่ การผลิตจนถึงผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ. มณฑานต์ จิระธันธ์ ผู้เชี่ยวชาญ ด้านวิจัยโรคสัตว์เล็กและสัตว์ใหญ่ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ ดร. ทวีวัฒน์ ตีเมการ และ สพ.ญ. ดร. มัญชรี ทัดติยพงศ์ ที่ช่วยตรวจทานแก้ไขต้นฉบับ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดในภาค ตะวันออกเฉียงเหนือที่ช่วยรวบรวมเก็บตัวอย่างเนื้อโค รวมทั้งเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน และผู้มีส่วนร่วมให้การ ช่วยเหลือและสนับสนุนทุกท่านที่ทำให้การศึกษานี้ ประสบผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

- มานวิภา ผลภาค. 2556. คู่มือการชันสูตรโรคสัตว์ใหญ่เบื้องต้น สำหรับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการระดับพื้นที่. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน จังหวัดขอนแก่น. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 40-42.
- ศุภลักษณ์ โรมนันตพันธ์. 2545. เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 79-91.
- สมชัย นิจนพานิช ฐิติมา วงศาโรจน์ และวรัญช นาคอ้าย. 2553. ความชุกและปัจจัยที่สัมพันธ์กับการตรวจ พบโปรโตซัวในลำไส้ชนิด *Sarcocystis hominis*. วารสารวิชาการสาธารณสุข. 19 (6): 912-920.
- อาจอง อ่อนหวาน และเด่นพงษ์ สาข้อง. 2560. การตรวจพบ *Sarcocystis* ในโค-กระบือในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนระหว่างปี พ.ศ. 2554-2558. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 12 (1): 62-79.
- Bancroft, J.D. and Gamble, M. 2002. Theory and practice of histological techniques. 5th eds. Churchill Livingstone. London, U.K. 769 p.
- Boonjaraspinyo, S., Boonmars, T., Kaewsamut, B., Ekobol, N., Laummaunwai, P., Aukkanimart, R., Wonkchalee, N., Juasook, A. and Sriraj, P. 2013. A cross sectional study on intestinal parasitic infections in rural communities, northeast Thailand. *Korean J. Parasitol.* 51 (6): 727-734.
- Bunyaratvej, S., Bunyawongwiroj, P. and Nitiyanant, P. 1982. Human intestinal sarcosporidiosis: report of six cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31 (1): 36-41.
- Chen, X., Zuo, Y., Rosenthal, B.M., He, Y., Cui, L. and Yang, Z. 2011. *Sarcocystis sinensis* is an ultrastructurally distinct parasite of water buffalo that can cause foodborne illness but cannot complete its life-cycle in human beings. *Vet. Parasitol.* 178: 35-39.
- Chiesa, F., Muratore, E., Dalmasso, A. and Civera, T. 2013. A new molecular approach to assess the occurrence of *Sarcocystis* spp. in cattle and products thereof: preliminary data. *Italian J. Food Safety.* 2 (e41): 148-151.
- Dubey, J.P. 2015. Foodborne and waterborne zoonotic sarcocystosis. *Food and Waterborne Parasitol.* 1 (1): 2-11.
- Dubey, J.P., Wilpe, E.V., Bernal, R.C., Verma, S.K. and Fayer, R. 2015. *Sarcocystis heydorni*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) with cattle (*Bos taurus*) and human (*Homo sapiens*) cycle. *Parasitol Res.* 114 (11): 4143-4147.
- Dubey, J.P., More, G., Wilpe, E.V., Bernal, R.C., Verma, S.K. and Schares, G. 2016. *Sarcocystis rommeli*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from cattle (*Bos taurus*) and its differentiation from *Sarcocystis hominis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 63 (1): 62-68.
- Fayer, R., Esposito, H.D. and Dubey, P.J. 2015. Human infections with *Sarcocystis* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 28 (2): 295-311.
- Fischer, S. and Odening, K. 1998. Characterization of bovine *Sarcocystis* species by analysis of their 18S ribosomal DNA sequences. *J. Parasitol.* 84 (1): 50-54.
- Gjerde, B. 2016. Molecular characterization of *Sarcocystis bovifelis*, *Sarcocystis bovini* n. sp., *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis cruzi* from cattle (*Bos taurus*) and *Sarcocystis sinensis* from water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Parasitol. Res.* 115 (4): 1473-1492.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hongchuta, S., Intapan, P.M., Thanchomnang, T., Sadaow, L., Rodpai, R., Laummuanwai, P., Maleewong, W. and Sanpool O. 2021. Preliminary findings and molecular characterization of thinwalled *Sarcocystis* species in hearts of cattle and buffaloes in Thailand, Lao PDR, and Cambodia. *Parasitol. Res.* 120 (8): 2819-2825.
- Hornok, S., Mester, A., Takacs, N., Baska, F., Majoros, G., Fok, E., Biksi, I., Nemet, Z., Hornyak, A., Janosi, S. and Farkas, R. 2015. *Sarcocystis*-infection of cattle in Hungary. *Parasites & Vectors.* 8. Article 69. doi 10.1186/s13071-015-0685-9.
- Hu, J.J., Wen, T., Chen, X.G., Liu, T.T., Esch, G.W. and Huang, S. 2016. Prevalence, Morphology, and Molecular Characterization of *Sarcocystis heydorni* Sarcocysts from Cattle (*Bos taurus*) in China. *J. Parasitol.* 102 (5): 545-548.
- Jehle, C., Dinkel, A., Sander, A., Morent, M., Romig, T., Luc, P.V., De, T.V., Thai, V.V. and Mackenstedt, U. 2009. Diagnosis of *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos taurus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northern Vietnam. *Vet. Parasitol.* 166: 314-320.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35 (6): 1547-1549.
- Matsuo, K. and Sato, H. 2012. Prevalence of *Sarcocystis* in cattle slaughtered in Gifu prefecture. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 65: 791-794.
- More, G., Schares, S., Maksimov, A., Conraths, F.J., Venturini, M.C. and Schares, G. 2013. Development of a multiplex real time PCR to differentiate *Sarcocystis* spp. affecting cattle. *Vet. Parasitol.* 197 (1-2): 85-94.

- More, G., Pantchev, A., Skuballa, J., Langenmayer, M.C., Maksimov, P., Conraths, F.J., Venturini, M.C. and Schares, G. 2014. *Sarcocystis sinensis* is the most prevalent thick-walled *Sarcocystis* species in beef on sale for consumers in Germany. *Parasitol Res.* 113: 2223-2230.
- More, G.A., Abrahamovich, P., Jurado, S., Bacigalupe, D., Marin, J.C., Rambeaud, M., Venturini, L. and Venturini, M.C. 2011. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinian cattle. *Vet. Parasitol.* 177 (1-2): 162-165.
- Murata, R., Suzuki, J., Hyuga, A., Shinkai, T. and Sadamasu, K. 2018. Molecular identification and characterization of *Sarcocystis* spp. in horsemeat and beef marketed in Japan. *Parasite.* 25 Article 27. doi:10.1051/parasite/2018026.
- Prakas, P., Ziemele, Z.S., Januskevicius, V., Chiesa, F., Baranauskaite, A., Lukosiene, E.R., *et al.* 2020. Molecular identification of four *Sarcocystis* species in cattle from Lithuania, including *S. hominis*, and development of a rapid molecular detection method. *Parasites & Vectors.* 13 Article 610. doi:10.1186/s13071-020-04473-9.
- Rosenthal, B.M. 2021. Zoonotic *Sarcocystis*. *Res. Vet. Sci.* 136: 151-157.
- Rubiola, S., Civera, T., Panebianco, F., Vercellino, D. and Chiesa, F. 2021. Molecular detection of cattle *Sarcocystis* spp. In North-West Italy highlights their association with bovine eosinophilic myositis. *Parasites & Vectors.* 14. Article 223. doi:10.1186/s13071-021-04722-5.
- SAS. 2004. "SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, U.S.A." 5136 p. [Online]. Available: https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/91pdf/sasdoc_91/stat_ug_7313.pdf. Accessed May 17, 2021.
- Tungtrongchitr, A., Chiworaporn, C., Praewanichm, R., Radomyos, P. and Boitano, J.J. 2007. The potential usefulness of the modified Kato thick smear technique in the detection of intestinal sarcocystosis during field surveys. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 38: 232-238.
- Wilairatana, P., Radomyos, P., Radomyos, B., Phraevanich, R., Ploksawasdi, W., Chanthavanich, P., Viravan, C. and Looareesuwan S. 1996. Intestinal sarcocystosis in Thai laborers. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 27: 43-46.
- Yang, Z.Q., Zuo, Y.X., Yao, Y.G., Chen, X.W., Yang, G.C. and Zhang, Y.P. 2001. Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115 (2): 283-288.