

การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ในการตรวจวินิจฉัย

โรคเฮโมรายิกเซปติซีเมียในโค-กระบือ

พัชรี ทองคำคุณ* พรเพ็ญ พัฒนโสภณ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

*ผู้รับผิดชอบ โทร. 0 2579 8908- 14 ต่อ 405 email: thongkamkoon@msn.com

บทคัดย่อ

โรคเฮโมรายิกเซปติซีเมีย (Hemorrhagic septicemia, HS) เป็นโรคระบาดแบบเฉียบพลันในโค-กระบือ มีอัตราการป่วยและตายสูง การวินิจฉัยโรคอย่างรวดเร็วมีความจำเป็นเพื่อให้การควบคุมโรคมีประสิทธิภาพและลดความสูญเสียได้ คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธี multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ประกอบด้วย species-specific, HS-causing type B-specific และ 16S-23S rRNA intergenic spacer มาทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน โดยให้ผลในการจำแนกชนิดของเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่ก่อโรคเฮโมรายิกเซปติซีเมีย สายพันธุ์ท้องถิ่นจำนวน 88 สายพันธุ์ ตรงกับวิธีทางซีรัมวิทยาทุกสายพันธุ์ และมีความไวในการตรวจเชื้อได้ตั้งแต่ 10^4 CFU/ml นอกจากนี้ยังได้นำเทคนิคนี้มาใช้ตรวจตัวอย่างอวัยวะของกระบือที่เป็นโรคเฮโมรายิกเซปติซีเมียที่ระบาดในโค-กระบือที่จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งสามารถตอบผลได้ภายใน 1 วัน วิธีนี้จึงมีประโยชน์ที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคเพราะเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว อีกทั้งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

คำสำคัญ: โรคเฮโมรายิกเซปติซีเมีย, โค-กระบือ, การวินิจฉัย, multiplex PCR

บทนำ

การเลี้ยงโค-กระบือในปัจจุบันมีวัตถุประสงค์ทั้งเพื่อการบริโภคและเป็นแรงงานในการประกอบอาชีพของเกษตรกร เนื่องจากการใช้เครื่องจักรกลที่ต้องใช้น้ำมันที่มีราคาแพง ธนาकरโค-กระบือเป็นโครงการหนึ่งของการนำโค-กระบือกลับไปใช้แรงงาน ในการนี้สัตว์จะต้องมีสุขภาพดี ปราศจากโรคที่เป็นอันตรายต่อตัวสัตว์เองและผู้เกี่ยวข้อง เชื้อ *Pasteurella multocida* เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้ในทางเดินหายใจส่วนต้นของปศุสัตว์หลายชนิด รวมทั้งโค-กระบือ เชื้อจำแนกได้เป็น 5 ซีโรไทป์ตามชนิดของแคปซูล คือ A B D E และ F ตามระบบคาร์เตอร์ (Carter system) ซึ่งแคปซูลเป็นโครงสร้างชั้นนอกสุดของเชื้อมีหน้าที่รักษาความชุ่มชื้นให้กับเซลล์ของแบคทีเรีย ช่วยในการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อของโฮสต์ และป้องกันการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (Boyce *et al.*, 2000) ในขณะเดียวกัน *P. multocida* ยังมีองค์ประกอบของผนังเซลล์ชั้นนอกเป็น lipopolysaccharide หรือ LPS ที่มีความแตกต่างทางโครงสร้างทำให้สามารถจัดแบ่งเป็นกลุ่มที่ 1-16 ตามระบบเฮดเดิลสตัน (Heddlestone system) (Adlam and Rutters, 1989) เชื้อ *P. multocida* ก่อโรคในโค-กระบือได้ 2 แบบขึ้นกับชนิดของเชื้อ ได้แก่ การติดเชื้อในปอดหรือโรคปอดบวม และการติดเชื้อในกระแสโลหิตหรือโรคเฮโมราจิกเซปติซีเมีย ซึ่งโรคปอดบวมมักเกิดจากการติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียชนิดอื่นเป็นปัจจัยนำ นำมาประกอบกับสัตว์มีความเครียดเนื่องจากถูกเลี้ยงอยู่ในคอกที่แออัด ทำให้มีอาการซึม เบื่ออาหาร ไอบ น้ำมูกไหลและมีไข้ มักเป็นการติดเชื้อรายตัว ไม่มีการระบาดของโรค ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อสายพันธุ์ที่มีแคปซูลชนิด A และมี LPS ชนิดที่ 3 หรือ A:3 (Dabo *et al.*, 2007) ซึ่งเรียกจากระบบคาร์เตอร์ต่อยอดด้วยระบบเฮดเดิลสตัน

ส่วนโรคเฮโมราจิกเซปติซีเมีย (Hemorrhagic septicemia, HS) เป็นโรคติดต่อตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 ซึ่งมีการระบาดแบบเฉียบพลันในโค-กระบือ มีอัตราการป่วยและตายสูง โดยเฉพาะในฝูงที่ไม่ได้รับวัคซีนจะตายอย่างกะทันหัน โดยบางครั้งเจ้าของอาจไม่ทันสังเกตเห็นอาการป่วย ตัวที่แสดงอาการจะพบว่าบริเวณหัวและคอของสัตว์มีการบวม ต่อมน้ำเหลืองบวมและมีเลือดออก อาจพบจุดเลือดออกที่อวัยวะอื่นร่วมด้วย สัตว์หายใจลำบาก และเป็นฟองออกมาทางช่องจมูกและปาก ล้มและตายในที่สุด (Shivachandra *et al.*, 2011) กระบือจะติดเชื้อได้ง่ายกว่าและแสดงอาการรุนแรงกว่าโค สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรคนี้ในแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ B:2 B:5 และ B:2,5 (Carter and De Alwis, 1989) อย่างไรก็ตามโรค HS สามารถรักษาได้ด้วยการใช้ยาต้านจุลชีพที่ทันทั่วถึง อีกทั้งมีวัคซีนสำหรับป้องกันโรค การวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ จะช่วยให้มีการรักษา ควบคุมโรคได้อย่างถูกต้อง รวมถึงการแยกสัตว์ป่วยเพื่อทำการรักษา และการให้วัคซีนแก่ตัวที่ยังไม่ติดโรคและสัตว์ในรัศมีโดยรอบ จะช่วยลดความสูญเสียให้เกษตรกรได้เป็นอย่างดี

โดยปกติเมื่อมีสัตว์ป่วยและตายสงสัยเป็นโรค HS การชันสูตรโรคเพื่อหาสาเหตุจะต้องทำการเพาะแยกเชื้อ *P. multocida* การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน หลังจากนั้นจึงทำการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อด้วยวิธี indirect haemagglutination (IHA) (Sawada *et al.*, 1982) และ agar gel precipitation (AGP) (Heddlestone *et al.*, 1972) เพื่อหาชนิดของแคปซูลและ LPS ตามลำดับ ซึ่งใช้เวลาอีกประมาณ 1-2 วัน การใช้เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์เป็นทางเลือกในการตรวจหาดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อส่วนต่างๆ

ของเชื้อ ได้แก่ *P. multocida*-specific PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. multocida* ทุกสายพันธุ์ และ HS-causing type B-specific PCR ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ B:2 B:5 และ B:2,5 เท่านั้น (Townsend *et al.*, 1998) รวมทั้ง 16S-23S rRNA intergenic spacer ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ B:2 (Brickell *et al.*, 1998) วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อพัฒนาวิธี multiplex PCR ของ primer ทั้งสามชุด เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคเฮโมรายิกเซปติซีเมียจากสัตว์ป่วยหรือตายได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วขึ้น อันจะทำให้การรักษาและควบคุมโรคที่กำลังมีการระบาดเป็นไปได้อย่างทัน่วงที่และมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *P. multocida* เป็น เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *P. multocida* ซีโรไทป์ A, D, E และ F ได้รับความอนุเคราะห์จาก National Institute of Animal Health ประเทศญี่ปุ่น เชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ B:2 ที่ใช้ผลิตวัคซีนป้องกันโรค HS ที่ได้รับอนุเคราะห์จากประเทศลาว ปากีสถาน รวมทั้งของประเทศไทย และเชื้อก่อโรคสายพันธุ์ท้องถิ่นที่เพาะแยกได้จากโค-กระบือป่วยและตาย ระหว่างปี พ.ศ. 2532-2555 จำนวน 88 สายพันธุ์

การทดสอบวิธี multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR)

ไพรเมอร์ที่ใช้มี 3 คู่ ประกอบด้วย *P. multocida*-specific, HS-causing type B-specific (Townsend *et al.*, 1998) และ 16S-23S rRNA intergenic spacer (Brickell *et al.*, 1998) ดังแสดงใน Table 1 การทำ multiplex PCR มีวิธีโดยย่อ คือ เพาะเชื้อ *P. multocida* ทั้งหมดบน blood agar บ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง นำมาเตรียม DNA โดยละลายเชื้อ 1-2 โคโลนีในน้ำกลั่น 1 ml ล้าง 1 ครั้งโดยปั่น 12,000 รอบ นาน 5 นาที ทิ้งน้ำใส แล้วใส่น้ำกลั่น 100 μ l ต้มให้เดือด 10 นาที เมื่อเย็นลง ปั่นเช่นเดิม และนำส่วนใสที่เป็น DNA template มาทดสอบด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ Go taq green (Promega, USA) 10 μ l เติมไพรเมอร์ทุกตัวในปริมาณตาม Table 1 เติม $MgCl_2$ 0.5 mM และ DNA template 2 μ l แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 20 μ l โดยมี DNA เชื้ออ้างอิงมาตรฐานและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมบวกและลบตามลำดับ นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Bio-Rad, USA) ตามโปรแกรม preheating 94°C นาน 2 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation 94°C นาน 1 นาที annealing 60°C นาน 1 นาที extension 72°C นาน 1 นาที ต่อจากนั้นเป็น final extension 72°C นาน 5 นาที แล้วแยกแถบ DNA ของ PCR product ใน 1.5% agarose gel ด้วยเครื่อง electrophoresis (Cosmo Bio Co. Ltd., Korea) ซึ่งมี 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Germany) เป็น DNA มาตรฐาน ย้อมในสารละลาย ethidium bromide 0.5 μ g/ml แล้วตรวจผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง GelDoc. It (UVP, USA)

การทดสอบความไวของวิธี multiplex PCR

นำเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ B:2 เพาะลงใน tryptic soy broth บ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง ทำ colony count เพื่อนับจำนวนเชื้อ จากนั้นเจือจางเชื้อให้มีระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10^1 - 10^7 CFU/ml

และนำเชื้อทุกระดับความเข้มข้นมาสกัด DNA และทำ multiplex PCR ตามวิธีข้างต้น เพื่อหาปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ multiplex PCR สามารถตรวจได้

Table 1. Oligonucleotide primers, sizes and concentration of PCR products in this study

Oligonucleotide primer		Sequence	Concentration (μ M)	Product size (bp)
<i>P. multocida</i> -specific	KMT1T7	ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG	0.2	460
	KMT1SP6	GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC	0.2	
HS-causing type B-specific	KTT72	AGG CTC GTT TGG ATT ATG AAG	0.625	620
	KTSP61	ATC CGC TAA CAC ACT CTC	0.625	
16S-23S rRNA	IPFWD	CGA AAG AAA CCC AAG GCG AA	0.5	334
intergenic spacer	IPREV	ACA ATC GAA TAA CCG TGA GAC	0.5	

การจำแนกเชื้อโรไทป์ของเชื้อ *P. multocida* ทางซีรัมวิทยา

ตรวจหาชนิดแคปซูลของเชื้อก่อโรค HS สายพันธุ์ที่องค์ที่เพาะแยกได้จากโค-กระบือป่วยและตายระหว่าง ปี พ.ศ. 2532-2555 จำนวน 88 สายพันธุ์ โดยวิธี IHA และชนิดของ LPS 1-16 โดยวิธี AGP

การสกัด DNA จากอวัยวะกระบือที่ติดเชื้อมาตามธรรมชาติ

อวัยวะกระบือที่สงสัยตายด้วยโรค HS ถูกนำส่งมายืนยันผลที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ตัวอย่างหัวใจ และปอดหรือม้าม ขนาด 1 กรัมตัดซอยให้ละเอียด ใส่ลงในหลอดปั่นขนาด 15 ml เติมน้ำ phosphate buffered saline (PBS) 3-5 ml เขย่าให้ผสมกันดี ตั้งทิ้งไว้ให้อวัยวะตกตะกอน ใช้ไปเปิดดูดูน้ำส่วนบน 1 ml ใส่ในหลอดไมโครทิวขนาด 1.5 ml นำไปปั่นที่ 10,000 รอบ 5 นาที ล้างตะกอนด้วย PBS 1 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย InstaGene matrix (Bio-Rad, USA) 200 μ l แช่ในอ่างน้ำอุ่นที่ 56°C นาน 30 นาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 8 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วปั่นอีกครั้ง เก็บส่วนใสใช้เป็น DNA template และทำการทดสอบด้วย multiplex-PCR

ผล

ความเหมาะสมของปฏิกิริยาและความไวของวิธี multiplex PCR

การปรับปริมาณของไพรเมอร์ และ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยา และการปรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อวิธี multiplex PCR พบว่า DNA ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ B:2 ที่ใช้ผลิตวัคซีนป้องกันโรค HS แสดง PCR product ทั้ง 3 แถบที่ขนาด 460 620 และ 334 bp กับไพรเมอร์ *P. multocida*-specific HS-causing type B-specific และ 16S-23S rRNA intergenic spacer ตามลำดับ เชื้อ *P. multocida* อ้างอิงมาตรฐาน ซีโร

ไทป์ A D E และ F แสดง PCR product เฉพาะกับไพรเมอร์ *P. multocida*-specific ที่ขนาด 460 bp เท่านั้น และไม่เกิด PCR product กับน้ำกลั่นที่เป็นควบคุมลบ (Fig 1) เมื่อใช้ไพรเมอร์ข้างต้นที่ความเข้มข้น 0.2 0.625 และ 0.5 μM ตามลำดับ (Table 1) พร้อมกับใช้ความเข้มข้นของ MgCl_2 ที่ 2 mM และอุณหภูมิ (annealing temperature) ในการจับของไพรเมอร์กับสาย DNA template ที่ 60°C ซึ่งตามเงื่อนไขนี้ พบว่าวิธี multiplex PCR มีความไว หรือสามารถตรวจพบแถบ PCR product ได้เมื่อมีจำนวนเชื้อตั้งแต่ 10^4 CFU/ml ขึ้นไป (Fig 2)

การจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ท้องถิ่นทางซีรัมวิทยาและ multiplex PCR

การจำแนกชนิดของแคปซูลของเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ท้องถิ่นทั้ง 88 สายพันธุ์ โดยวิธี IHA และ AGP พบว่ามีเพียง 2 สายพันธุ์ ที่มีแคปซูลชนิด A ในขณะที่เชื้อส่วนใหญ่จำนวน 86 สายพันธุ์ มีแคปซูลชนิด B ซึ่งในจำนวนนี้ 76 สายพันธุ์จำแนกได้เป็นเชื้อซีโรไทป์ B:2 และ 10 สายพันธุ์เป็นเชื้อซีโรไทป์ B:2,5

ทั้งนี้ผลการตรวจทางซีรัมวิทยาให้ผลถูกต้องตรงกันทั้งหมด (100%) กับผลของวิธี multiplex PCR กล่าวคือมีเชื้อจำนวน 86 สายพันธุ์ตรวจพบ แถบ PCR product ทั้งสามแถบ ในขณะที่เชื้ออีก 2 สายพันธุ์ ตรวจพบแถบ PCR product ขนาด 460 bp เพียงแถบเดียว

การวินิจฉัยสาเหตุการตายของกระป๋องที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ

การใช้ multiplex PCR ตรวจ DNA template ที่สกัดโดยตรงจากอวัยวะหัวใจ และปอดหรือม้ามของกระป๋องที่สงสัยตายจากการระบาดของโรค HS จำนวน 4 ราย พบว่าเกิดแถบ PCR product ทั้งสามแถบบนทุกอวัยวะที่ทำการตรวจ ทั้ง 4 ราย (Fig 3) โดยใช้เวลาในการตรวจเพียง 1-2 วัน

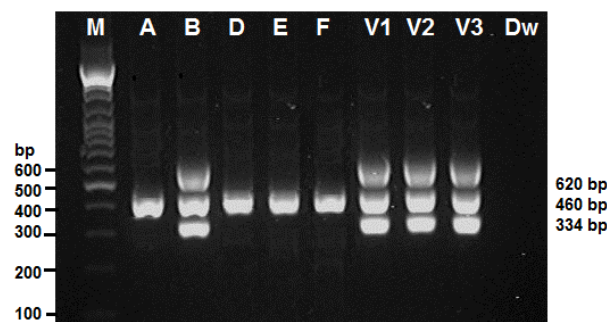


Fig 1. PCR product of multiplex PCR specific to the strains of hemorrhagic septicemia causing *P. multocida* (lane M, 100 bp DNA ladder; lane A, B, D, E, F, *P. multocida* serotype A, B, D, E, F, respectively; lane V1, V2, V3, Vaccine strains for hemorrhagic septicemia from Lao, Pakistan and Thailand, respectively; lane Dw, negative control (distilled water))

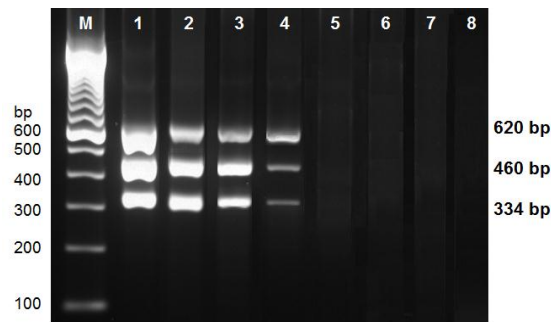


Fig 2. Sensitivity of multiplex PCR for detection of DNA of hemorrhagic septicemia causing *P. multocida* (lane M, 100 bp DNA ladder; lane 1-7, DNA of *P. multocida* at 10^7 - 10^1 CFU/ml, respectively; lane 8, distilled water)

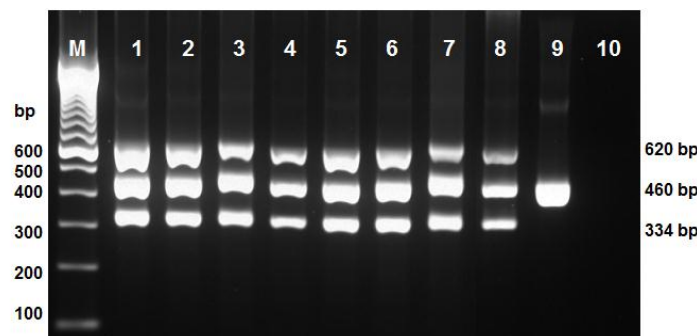


Fig 3. Multiplex PCR of the DNA extracted from internal organs of buffaloes naturally infected with hemorrhagic septicemia causing *P. multocida* (lane M, 100 bp DNA ladder; lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, DNA extracted from lung and heart of buffalo no.1, 2, 3, respectively; lane 7, 8, DNA extracted from lung and spleen of buffalo no.4, respectively; lane 9, *P. multocida* serotype A; lane 10, distilled water)

วิจารณ์

การระบาดของโรค HS ในประเทศไทยยังคงเกิดขึ้นทุกปี แสดงให้เห็นว่ากรมปศุสัตว์ยังคงต้องให้ความสำคัญในการจัดหามาตรการที่เหมาะสมต่อการเฝ้าระวัง ควบคุม และแก้ไขสถานการณ์เมื่อเกิดการระบาดในฝูงโค-กระบือให้ได้อย่างทันท่วงที เพื่อลดความสูญเสียที่จะเกิดแก่เกษตรกร เช่น ผลิตและแจกจ่ายวัคซีนป้องกันโรคให้เพียงพอต่อความต้องการ เจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ตอบสนองอย่างรวดเร็วเมื่อเกิดโรคในพื้นที่ โดยเก็บและส่งตัวอย่างมาทำการชันสูตรหาสาเหตุของโรคอย่างเหมาะสม นอกจากนี้การพัฒนาเทคนิคเพื่อให้มีความถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ จะช่วยให้การควบคุม ป้องกันและรักษาโรคมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากโรค HS มีสาเหตุมาจาก เชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ B:2 B:5 หรือ B:2,5 รวมทั้ง E:2 ที่พบในทวีปแอฟริกา ดังนั้นการยืนยันชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อจึงต้องใช้ทั้งการทดสอบ

คุณสมบัติทางชีวเคมีและซีรัมวิทยา เพื่อให้การควบคุมโรคกระทำได้อย่างถูกต้องตามมาตรฐานของโรคระบาดสัตว์ อย่างไรก็ตามทั้งสองขั้นตอนนี้ใช้เวลาอย่างรวดเร็วที่สุด 3-4 วัน อีกทั้งต้องใช้แอนติซีรัมที่เตรียมจากการฉีดเชื้ออ้างอิงมาตรฐานเข้าสัตว์ทดลอง ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อที่จำเพาะต่อแคปซูล 5 ชนิด และ LPS 16 ชนิด (Heddlestone *et al.*, 1972; Sawada *et al.*, 1982) จึงไม่เหมาะสมกับปัจจุบันที่ควรคำนึงถึงจรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลอง ดังนั้นการนำเทคนิคอณูชีวโมเลกุลมาใช้ นอกจากจะสามารถลดขั้นตอนและระยะเวลาในการชันสูตรและวินิจฉัยโรคลงได้แล้ว ยังลดการใช้สัตว์ทดลองเพื่อการผลิตแอนติซีรัมได้อีกด้วย

วิธี multiplex PCR สามารถตอบผลเร็วที่สุดภายในเวลาเพียง 1 วัน เทคนิคนี้ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน โดยนำไพรเมอร์ที่ OIE (OIE, 2014) ยอมรับ ว่าเป็น species-specific และ HS-causing type B-specific (Townsend *et al.*, 1998) รวมทั้งนำ 16S-23S rRNA intergenic spacer (Brickell *et al.*, 1998) มาทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกันเพื่อเป็นการยืนยันผลซึ่งกันและกัน ซึ่งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายกว่าการทำ single PCR ด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่ จากการทดสอบกับเชื้อก่อโรค HS สายพันธุ์ท้องถิ่นทั้ง 88 สายพันธุ์ให้ผลตรงกับวิธีซีรัมวิทยาทุกสายพันธุ์ ทั้งนี้การจำแนกซีโรไทป์โดยวิธีทางซีรัมวิทยาพบว่าปัจจุบันสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยมีเพียงสองซีโรไทป์ คือ B:2 และ B:2,5 ทำให้มั่นใจในระดับหนึ่งว่าเทคนิคนี้เหมาะสมและเพียงพอในการวินิจฉัยโรค HS ในประเทศไทย เนื่องจากไพรเมอร์ HS-causing type B-specific ครอบคลุมซีโรไทป์ B:2 และ B:2,5 แต่ไม่รวมซีโรไทป์ E:2 ที่ระบาดในทวีปแอฟริกา (Francis *et al.*, 1980) ในขณะที่ Brickell *et al.* (1998) พบข้อบกพร่องของไพรเมอร์ 16S-23S rRNA intergenic spacer ที่ไม่เกิดผลบวกกับเชื้อก่อโรค HS สายพันธุ์ B จำนวน 1 isolate และเกิดผลบวกกับเชื้อก่อโรค HS สายพันธุ์ E เพียง 1 จาก 3 isolates ปัจจุบันมีผู้พัฒนาเทคนิค real time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน esterase ในการยืนยันเชื้อก่อโรค HS (Petersen *et al.*, 2014) ได้ครอบคลุม ซึ่งผู้วิจัยจะศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคนี้กับเชื้อในประเทศไทยต่อไป

อย่างไรก็ตามเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ได้ถูกนำมาใช้อย่างทันท่วงทีในการวินิจฉัยการระบาดของโรค HS ในโค-กระบือที่จังหวัดพิษณุโลก เมื่อเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 โดยผู้วิจัยได้รับตัวอย่างอวัยวะกระบือ จำนวน 4 ราย จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง จังหวัดพิษณุโลก เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ *P. multocida* ซึ่งเมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากหัวใจ ปอด และหริ่อม้ามของกระบือทั้ง 4 ตัว พบว่าสามารถพบแถบ PCR product จากดีเอ็นเอของเชื้อที่อยู่ในอวัยวะดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถตรวจเชื้อได้ตั้งแต่ 10^4 CFU/ml ในขณะที่ในเลือดของสัตว์ที่เป็นโรคมักจะมีปริมาณเชื้อ 10^5 - 10^6 และจะเพิ่มปริมาณสูงถึง 10^{11} - 10^{12} CFU/ml ในซากสัตว์ที่เลี้ยงอยู่ในเขตร้อนหลังจากที่ตายแล้วประมาณ 20 ชั่วโมง (De Alwis, 1999) แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เทคนิค multiplex PCR ในการตรวจตัวอย่างอวัยวะจากสัตว์ที่ติดเชื้อโรค HS ในปัจจุบันได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณนัยนา หัสสรังสี คุณชยภัค สีนุ่ คุณอุบลรัตน์ แทนกลาง ซึ่งทำหน้าที่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เพิ่มจำนวนเชื้อ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคต่าง ๆ รวมทั้งเจ้าหน้าที่กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการทำวิจัยจนประสบความสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Adlam, C. and Rutters, J.M. 1989. *Pasteurella* and *Pasteurellosis*. Acedemic Press Limited. London, UK. 341 p.
- Boyce, J.D., Chung, J.Y. and Adler, B. 2000. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. J. Biotechnol. 83: 153-160.
- Brickell, S.K., Thomas, L.M., Long, K.A., Panaccio, M. and Widders, P.R. 1998. Development of PCR test based on gene region associated with the pathogenicity of *Pasteurella multocida* serotype B:2, the causal agent of hemorrhagic septicemia in Asia. Vet. Microbiol. 59: 295-307.
- Carter, G.R. and De Alws, M.C.L. 1989. Hemorrhagic septicemia In: *Pasteurella* and *pasteurellosis*. Adlam, C. and Rutters, J.M. (eds.) Academic Press. London, UK. p.131-160.
- Dabo, S.M., Taylor, J.D. and Confer, A.W. 2007. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. Anim. Health Res. Rev. 8: 129-150.
- De Alwis, M.C.L. 1999. Haemorrhagic septicaemia. ACIAR Monograph No. 57. Australian Center for International Agricultural Research, Canberra, Australia. 141 p.
- Francis, B.K.T., Schels, H.F. and Carter, G.R. 1980. Type E *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia in Zambia. Vet. Rec. 107: 135.
- Heddleston, K.L., Gallagher, J.E. and Robers, P.A. 1972. Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis. 16: 925-936.
- Petersen, A., Bisgaard, M., Townsend, K. and Christensen, H. 2014. MLST typing of *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia and development of a real-time PCR specific for haemorrhagic septicaemia associated isolates. Vet. Microbiol. 170: 335-341.
- Sawada, T., Rimler, R.B. and Rhoades, K.R. 1982. Indirect haemagglutination tests that use glutaraldehyde fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of *pasteurella* antibody. J. Clin. Microbiol. 15: 752-756.

- Shivachandra, S.B., Viswas, K.N. and Kumar, A.A. 2011. A review of hemorrhagic septicemia in cattle and buffalo. *Anim. Health Res. Rev.* 12: 67-82.
- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M. and Dawkins, H.J.S. 1998. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1096-1100.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2014.: "Haemorrhagic septicaemia. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2012. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014." Chapter 2.4.12. [Online]. Available: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual>. Accessed March 12, 2015.

Development of multiplex PCR for diagnosis of Hemorrhagic septicemia in cattle and buffaloes

Pacharee Thongkamkoon* Pornpen Pathanasophon

National Institute of Animal Health, Kaset Klang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900.

*Corresponding author: Tel. 02579809 ext. 405, email: thongkamkoon@msn.com

Abstract

Hemorrhagic septicemia (HS) is an acute contagious disease causing high morbidity and mortality in cattle and buffaloes. Rapid diagnosis is necessary and benefit for the effective disease control resulting in less damages and losses. We could develop the multiplex PCR using 3 primer pairs including the species-specific, HS-causing type B-specific and 16S-23S rRNA intergenic spacer in only one reaction. The comparison between multiplex PCR and serology test revealed the same results for identification of totally 88 local strains of HS-causing *Pasteurella multocida*. The sensitivity of the multiplex PCR in detecting the bacteria was 10^4 CFU/ml. In addition, we could use this technique for diagnosis of hemorrhagic septicemia directly from the internal organs of naturally infected-buffaloes in Phitsanulok Province within only one day. Therefore, this multiplex PCR is suitable and useful for the diagnostic laboratory because of its quickness as well as time and cost saving.

Keywords: hemorrhagic septicemia, cattle, buffaloes, diagnosis, multiplex PCR