

ลักษณะทางพันธุกรรมและความไวต่อยาต้านจุลชีพของ เชื้อก่อโรคเฮโมราจิกเซปติซีเมียที่ระบาดในปี พ.ศ. 2557

พัชรี ทองคำคูณ^{*1} เนตรชนก จิวกานนท์²
เสกสิทธิ์ สิงห์แจ่ม³ วัฒนศักดิ์ จำละคร⁴

1 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เขตจตุจักร กทม.

2 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน อ. เมือง จ. ขอนแก่น

3 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง อ. วังทอง จ. พิษณุโลก

4 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน อ. ห้างฉัตร จ. ลำปาง

* ผู้รับผิดชอบบทความ: โทร. 02 5798909 โทรสาร 02 5798919 อีเมล: thongkamkoon@msn.com

บทคัดย่อ

ในปี พ.ศ. 2557 มีการระบาดของโรคเฮโมราจิกเซปติซีเมีย (Haemorrhagic septicaemia, HS) ในกระบือและโคเนื้อ จำนวนการระบาดนับจากการส่งตัวอย่างสัตว์ป่วยและตายเข้ามาชันสูตรและยืนยันโรคที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภูมิภาค ตั้งแต่เดือน มิถุนายน ถึง พฤศจิกายน 2557 รวมทั้งสิ้น 26 ครั้ง การระบาดส่วนใหญ่เกิดขึ้นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน 14 ครั้ง ตามด้วยภาคเหนือตอนล่าง 4 ครั้ง ภาคเหนือตอนบน 3 ครั้ง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง 2 ครั้ง ส่วนภาคตะวันตก ภาคกลาง และภาคตะวันออก มีการระบาดภาคละ 1 ครั้ง

นำเชื้อก่อโรค HS ที่แยกได้จากสัตว์ป่วยและตายจำนวน 31 สายพันธุ์มาศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยวิธี pulsed field gel electrophoresis (PFGE) พบว่ามี 3 pattern ได้แก่ pattern 1 มีจำนวน 27 สายพันธุ์ pattern 2 และ 3 มีจำนวน 3 และ 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่ง pattern 1 และ 2 มีความใกล้เคียงกันมากกว่า 90% การทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ 14 ชนิด พบว่าค่าพิสัยของ minimal inhibitory concentration (MIC range) ($\mu\text{g/ml}$) ของเชื้อต่างๆ มีดังนี้ ampicillin (0.25->128), penicillin (0.25->128), streptomycin (8->128), gentamicin (0.5-1), tetracycline (1-16), oxytetracycline (1-64), nalidixic acid (1->128), enrofloxacin (≤ 0.125 -2), ciprofloxacin (≤ 0.125 -2), danofloxacin (≤ 0.125 -1), erythromycin (≤ 0.125 -1), colistin (4-32), trimethoprim (1->128) และ sulfamethoxazole/trimethoprim (0.25-64)

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อก่อโรค HS ที่มี PFGE pattern 1 มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 9-11 ชนิด และมีรูปแบบความไวเชื้อต่อยา 14 ชนิด 6 แบบ (A, B, C, D, E หรือ F) ในขณะที่เชื้อที่มี PFGE pattern 3 มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 7 ชนิด ที่เป็นรูปแบบ G และเชื้อที่มี PFGE pattern 2 มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพเพียง 2-3 ชนิด เป็นรูปแบบ H, I หรือ J

คำสำคัญ: ลักษณะทางพันธุกรรม โรคเฮโมราจิกเซปติซีเมีย ความไวต่อยาต้านจุลชีพ

บทนำ

โรคเฮโมราจิกเซปติซีเมีย (Haemorrhagic septicaemia, HS) เป็นโรคประจำถิ่นในประเทศไทย โดยเป็นโรคระบาดที่อยู่ในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 ซึ่งปรับปรุงจากพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 และฉบับที่ 2 พ.ศ. 2542 (ราชกิจจานุเบกษา, 2558) สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) สายพันธุ์ B:2 B:5 B:2,5 ในประเทศแถบเอเชีย และ E:2 ในประเทศแถบแอฟริกา (OIE, 2014) ในประเทศไทยพบเฉพาะสายพันธุ์ B:2 และ B:2,5 (Worarach et al., 2014) สัตว์ที่ไวต่อการติดเชื้อและแสดงอาการรุนแรงเป็นอันดับแรกและรองลงมาคือ กระบือและโค โดยเฉพาะที่ช่วงอายุ 1-2 ปี (De Alwis, 1999) เชื้อสามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น พุ่หญ้าและดินที่ชื้นแฉะได้ ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น การแพร่กระจายของโรคจึงมักเกิดจากโค-กระบือที่มีเชื้ออยู่ในบริเวณลำคอ ทอนซิล และคอกอหยได้เป็นเวลานานโดยไม่แสดงอาการ ซึ่งเชื้อจะเพิ่มจำนวนขึ้นและถูกขับออกมาทั้งน้ำมูก ของสัตว์ได้เป็นระยะๆ (De Alwis et al., 1990; Harper et al., 2006) ระยะฟักตัวของโรคประมาณ 3-5 วัน ส่วนอาการของโรคมีทั้งแบบเฉียบพลัน (acute) คือ แสดงอาการและตายภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยสัตว์มีไข้สูง ($41-42^{\circ}\text{C}$) หายใจตื่นและเร็ว เยื่อเมือกม่วงคล้ำ หรืออาจแสดงอาการกระวนกระวาย กล้ามเนื้อสั่น น้ำมูกน้ำตาไหล และถ่ายเหลว (Benkirane and De Alwis, 2002) อาการแบบกึ่งเฉียบพลัน (sub-acute) คือ พบการบวมน้ำใต้ผิวหนังโดยเฉพาะบริเวณคาง ลำคอ หน้าอก รวมทั้งปอดบวม และตายภายใน 2-3 วัน ส่วนอาการแบบเรื้อรัง (chronic) คือ สัตว์แสดงอาการยาวนานขึ้น หายใจลำบาก น้ำมูกข้นและมีเลือดปน (De Alwis, 1999) เมื่อผ่าซากพบรอยโรคบวมน้ำ จุดหรือปื้นเลือดออกไปจนถึงเลือดคั่งที่ปอด ปอดบวม ชนิด bronchopneumonia หรือ fibrinous pneumonia เยื่อหุ้มปอดและเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (Shafarin et al., 2009)

ในประเทศไทยการระบาดมักเริ่มในช่วงต่อระหว่างฤดูร้อนและฤดูฝนของทุกปี ปี พ.ศ. 2555-2556 พบการระบาดที่ยืนยันผลโดยส่งชันสูตรที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (สสช.) และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ (ศวพ.) ประจำภูมิภาค จำนวน 53 และ 23 ราย ตามลำดับ นอกเหนือจากการทำวัคซีนป้องกันโรคให้ทั่วถึงแล้ว การชันสูตรโรคที่รวดเร็ว ตลอดจนการทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จะช่วยให้ทำการรักษา ควบคุมและลดการแพร่ระบาดของโรคได้ทันทั่วๆไป นอกจากนี้การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อโรคที่กำลังระบาดจะทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของเชื้อโรค และใช้ประกอบการศึกษาวิเคราะห์แนวโน้มประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้ในการควบคุมโรคในปัจจุบันได้ การรายงานโรคเฮโมราจิกเซปติซีเมียในปี พ.ศ. 2557 นี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยา การพิจารณาการใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมกับเชื้อที่ระบาดในปัจจุบัน ตลอดจนเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเฝ้าระวังความเปลี่ยนแปลงของเชื้อที่ระบาดในแต่ละช่วงเวลาเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์วัคซีนของประเทศไทยต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ประวัติสัตว์ป่วย

ในระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 มีการระบาดของโรคเฮโมราจิกเซปติซีเมียในกระบือและโคเนื้อกระจายอย่างกว้างขวางในจังหวัดต่างๆ ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ส่วนภาคกลางและภาคตะวันออกมีการระบาดเพียงเล็กน้อย สัตว์ส่วนใหญ่แสดงอาการ ซึม ไข้สูง ไม่กินอาหาร หายใจลำบาก หายใจแรงและมีเสียงดัง น้ำมูกน้ำลายไหล คอขาว ขาอ่อน ล้มและตายภายใน 1-3 วัน ตัวอย่างจากสัตว์ป่วยและตาย ได้แก่ อวัยวะภายใน เช่น ปอด ตับ ม้าม ไต หัวใจ เลือด รวมทั้ง สวอปมูกถูกนำไปยังห้องปฏิบัติการแบคทีเรียของ สสช. และ ศวพ. ประจำภูมิภาคต่างๆ ที่รับผิดชอบพื้นที่เกิดโรคนั้น เพื่อทำการเพาะแยกเชื้อ *P. multocida* serotype B ชนิดที่เป็นสาเหตุของโรค

การเพาะแยกเชื้อและการพิสูจน์เชื้อก่อโรค HS

ตัวอย่างอวัยวะภายในและสวอปมูกที่เก็บจากสัตว์ป่วยตาย นำมาเพาะลงบน 5-7% sheep blood agar (BA) และ MacConkey agar บ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีของเชื้อ *P. multocida* และพิสูจน์โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Quinn et al., 1994) รวมทั้งตรวจหาซีโรไทป์ตามชนิดของแคปซูล (A B D E F) โดยวิธี indirect haemagglutination test (Sawada et al., 1982) ซีโรไทป์ตามชนิดของ lipopolysaccharide (1-16) หรือ somatic serotyping โดยวิธี gel diffusion precipitin test (Brogden et al., 1977)

สกัด DNA จากเชื้อที่ให้ผลบวกทางชีวเคมีโดยการต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที และตรวจด้วยวิธี multiplex PCR เพื่อตรวจหาชนิดแคปซูลของเชื้อ *P. multocida* (พัชรี และคณะ 2557) และตรวจด้วย PCR อีกครั้งเพื่อยืนยันเชื้อก่อโรค HS ตามวิธีของ Townsend et al. (1998)

การศึกษาแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ โดยวิธี Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

เตรียม DNA plug ดัดแปลงจาก Khattak and Matthews (1993) โดยเพาะเชื้อ *P. multocida* ลงบน BA บ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อลงในสารละลาย TEEN (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl, pH 8) ให้มีค่าการดูดกลืนแสง (OD₆₁₀) เท่ากับ 0.6 ปั่นล้างเชื้อ 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 10,000 รอบ นาน 5 นาที แล้วจึงละลายตะกอนเชื้อในสารละลาย TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) เตรียมเป็น plug โดยผสมเข้ากับ 2% low melting agarose ในอัตราส่วน 1:1 สกัด chromosomal DNA โดยนำ plug แच्छลงใน lysis buffer I (6 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.5% (w/v) Brij 58, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium lauroyl sarcosine, 1 mg/ml of lysozyme) บ่มที่ 37°C นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็น lysis buffer II (0.25 M EDTA, 20 mM NaCl,

1% sodium lauroyl sarcosine, 1 mg/ml proteinase K) บ่มที่ 55°C ซ้ำมคีน ล้าง DNA plug ใน TE 3 ครั้ง เก็บที่ 4°C เพื่อรอทำขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอน PFGE ดัดแปลงจาก Gunawardana et al. (2000) โดย DNA plug ที่เตรียมไว้จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apal* (New England BioLabs, USA.) ความเข้มข้น 30 U ที่ 37°C ซ้ำมคีน แล้วชิ้นส่วนของ DNA ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะถูกแยกออกตามขนาดที่ต่างกันได้บน 1% pulsed field certified agarose (Bio-Rad, USA.) โดยการผ่านกระแสไฟฟ้า 6 V/cm switch time 1s – 25s ใน 0.5x Tris-Borate-EDTA ที่ 14°C นาน 22 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง CHEF-DR III (Bio-Rad, USA.) หลังจากนั้นชิ้นส่วนของ DNA บนแผ่น agarose จะถูกย้อมสีในสารละลาย 0.5 µg/ml ethidium bromide วิเคราะห์แบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ *P. multocida* โดยใช้โปรแกรม BioProfile (Vilber Lourmat, Germany)

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

ทำการทดสอบ minimal inhibitory concentration (MIC) เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพ 14 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค HS จำนวน 31 สายพันธุ์ โดยวิธี broth microdilution method (CLSI, 2013a) ยาที่ทดสอบ ได้แก่ ampicillin, ciprofloxacin, colistin, danofloxacin, enrofloxacin, erythromycin, gentamicin, nalidixic acid, oxytetracycline, penicillin G, tetracycline, streptomycin, trimethoprim และ sulfamethoxazole/trimethoprim (1:20) วิธีการโดยย่อคือ เตรียมสารละลายตั้งต้นของยาทั้ง 14 ชนิดใน cations adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) และทำ two-fold serial dilution ให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ แจกลงใน microtiter plate หลุม 1-11 เรียงความเข้มข้นจากน้อยไปมาก (0.125-128 µg/ml) หลุมละ 50 µl แล้วเติมเชื้อที่ทดสอบซึ่งปรับให้มีความเข้มข้น 10^6 CFU/ml หลุมละ 50 µl สายพันธุ์ละ 2 แถว ปิดฝาให้สนิท บ่มที่ 35°C นาน 18-24 ชั่วโมง จึงอ่านผล โดยหลุมที่มีความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ได้ จะถูกบันทึกเป็นค่า MIC ของยาต่อเชื้อสายพันธุ์นั้น วิเคราะห์ผลความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบกับค่า MIC breakpoint (CLSI, 2013b)

ผล

การระบาดของโรค HS

จำนวนครั้งการระบาดของโรค HS ที่มีการส่งตัวอย่างสัตว์ป่วยและตายเข้ามาชันสูตรและยืนยันโรคที่ สสช. และศพ. ประจําภูมิภาค โดยนับจากที่เริ่มมีการระบาดครั้งแรกของปี พ.ศ. 2557 คือ วันที่ 20 มิถุนายน ถึงวันที่ 11 พฤศจิกายน 2557 รวมทั้งสิ้น 26 ครั้ง ได้แก่ ครั้งที่ 2-27 (ตารางที่ 1) ในจำนวนนี้เป็น การระบาดในภาคตะวันตก ภาคกลาง และภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี ปทุมธานี และปราจีนบุรี เพียงแห่งละ 1 ครั้ง ตามลำดับ การระบาดส่วนใหญ่เกิดขึ้นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน รวม 14 ครั้ง ภาคเหนือตอนล่าง 4 ครั้ง ภาคเหนือตอนบน 3 ครั้ง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง 2 ครั้ง

ตารางที่ 1 วันที่ ชนิดสัตว์ จำนวนและพื้นที่การระบาดของโรคเฮโมรายิกเซปติซีเมียและเชื้อที่นำมาศึกษา

ครั้งที่ ที่	วันที่	ชนิดสัตว์	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนสัตว์ (ตัว)			ที่ตั้งฟาร์ม		เชื้อที่ส่งต่อ (สายพันธุ์)	ซีโรไทป์	รูปแบบ PFGE
				ทั้งหมด	ป่วย	ตาย	อำเภอ	จังหวัด			
1	8/8/56	กระป๋อง	อวัยวะ	29	NA	NA	พังโคน	สกลนคร	1	B:2,5	2
2	20/6/57	กระป๋อง	อวัยวะ	8	4	3	บรบือ	มหาสารคาม	1	B:2,5	1
3	26/6/57	กระป๋อง	อวัยวะ	3	-	1	บรบือ	มหาสารคาม	0		
4	26/6/57	กระป๋อง	อวัยวะ	NA	NA	NA	กุฉีกรัง	มหาสารคาม	1	B:2,5	1
5	27/6/57	กระป๋อง	เลือด	3	NA	NA	เมือง	มหาสารคาม	1	B:2,5	1
6	1/7/57	กระป๋อง	อวัยวะ	5	3	3	รัตนบุรี	สุรินทร์	0		
7	3/7/57	กระป๋อง	อวัยวะ	NA	NA	NA	เมือง	อุดรธานี	0		
8	17/7/57	กระป๋อง	อวัยวะ	6	1	1	เมือง	มุกดาหาร	1	B:2,5	1
9	24/7/57	โคเนื้อ	อวัยวะ	5	1	1	เมือง	กาฬสินธุ์	1	B:2,5	1
10	25/7/57	โคเนื้อ	อวัยวะ	170	8	7	บ้านลาด	เพชรบุรี	1	B:2,5	1
11	25/7/57	โคเนื้อ	อวัยวะ	NA	1	1	แม่ลาว	เชียงราย	1	B:2,5	2
12	30/7/57	กระป๋อง	อวัยวะ	6	2	2	เมือง	นครพนม	1	B:2,5	2
13	30/7/57	กระป๋อง	อวัยวะ	6	2	2	วาปีปทุม	มหาสารคาม	0		
14	5/8/57	กระป๋อง	อวัยวะ	8	3	3	เรณูนคร	นครพนม	1	B:2,5	1
15	29/8/57	กระป๋อง	อวัยวะ	10	-	1	เมือง	ปทุมธานี	1	B:2,5	1
16	2/9/57	กระป๋อง	อวัยวะ	NA	NA	NA	หนองหาน	อุดรธานี	1	B:2,5	1
17	6/9/57	กระป๋อง	อวัยวะ	4	2	2	กุฉีกรัง	สกลนคร	1	B:2,5	3

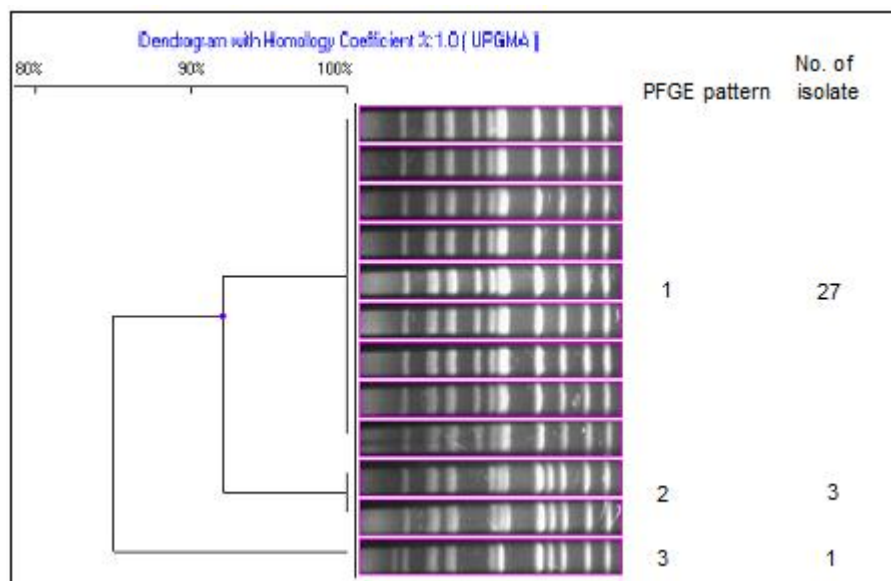
ครั้งที่ ที่	วันที่	ชนิดสัตว์	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนสัตว์ (ตัว)			ที่ตั้งฟาร์ม		เชื้อที่ส่งต่อ (สายพันธุ์)	ซีโรไทป์	รูปแบบ PFGE
				ทั้งหมด	ป่วย	ตาย	อำเภอ	จังหวัด			
18	11/9/57	กระบือ	อวัยวะสวอปจาก	552	-	120	น้ำปาด	อุดรดิตถ์	6	B:2,5	1
19	16/9/57	กระบือ	อวัยวะ	220	3	9	กบินทร์บุรี	ปราจีนบุรี	1	B:2,5	1
20	19/9/57	กระบือ	อวัยวะ	NA	NA	NA	ห้วยเม็ก	กาฬสินธุ์	0		
21	11/10/57	กระบือ	อวัยวะ	4	2	2	เมือง	หนองบัวลำภู	1	B:2,5	1
22	16/10/57	กระบือ	อวัยวะ	9	5	4	วังหิน	ศรีสะเกษ	2	B:2,5	1
23	30/10/57	กระบือ	อวัยวะ	20	4	4	ลับแล	อุดรดิตถ์	1	B:2,5	1
24	1/11/57	โคเนื้อ	อวัยวะ สวอปจาก	20	20	15	หนองขาหย่าง	อุทัยธานี	2	B:2,5	1
25	4/11/57	กระบือ	อวัยวะ	26	16	10	โกรกพระ	นครสวรรค์	1	B:2,5	1
26	7/11/57	กระบือ	อวัยวะ	53	53	53	เวียงชัย	เชียงราย	3	B:2; B:2,5	1
27	11/11/57	กระบือ	อวัยวะ	7	4	3	ท่าวังผา	น่าน	1	B:2,5	1

NA หมายถึง ไม่มีข้อมูล

เชื้อ *P. multocida* ก่อโรค HS ที่ส่งต่อมายังสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เพื่อศึกษาแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อและทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ มีจำนวน 31 สายพันธุ์ จากการระบาด 27 ครั้ง โดยมี 1 สายพันธุ์ เป็นเชื้อที่มาจากการระบาดในปี พ.ศ. 2556 (ตารางที่ 1) เมื่อตรวจหาชนิดแคปซูลของเชื้อโดยวิธี multiplex PCR และการยืนยันเชื้อก่อโรค HS โดยวิธี PCR ให้ผลเป็นเชื้อ *P. multocida* ชนิด B:2 หรือ B:2,5 ที่ก่อโรค HS ทั้ง 31 สายพันธุ์ สอดคล้องกับการทดสอบหาซีโรไทป์ของเชื้อโดยวิธีทางซีรัมวิทยา ซึ่งพบว่าจากเชื้อ 31 สายพันธุ์ มีเพียง 1 สายพันธุ์ เป็นซีโรไทป์ B:2 ส่วนเชื้ออีก 30 สายพันธุ์ เป็นซีโรไทป์ B:2,5 (ตารางที่ 1)

แบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อก่อโรค HS โดยวิธี PFGE

เทคนิค PFGE ที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apal* สามารถใช้ในการจำแนกแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ *P. multocida* ที่นำมาศึกษาครั้งนี้ได้ทั้ง 31 สายพันธุ์ โดยพบรูปแบบที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 รูปแบบ (pattern) ได้แก่ pattern 1 จำนวน 27 สายพันธุ์ pattern 2 จำนวน 3 สายพันธุ์ และ pattern 3 จำนวน 1 สายพันธุ์ pattern 1 และ 2 มีความใกล้เคียงกันมากกว่า 90% และทั้งสาม pattern มีความใกล้เคียงกันมากถึงประมาณ 85% (ตารางที่ 1; รูปที่ 1)



รูปที่ 1. แผนภูมิความเหมือนกันของแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อก่อโรค HS 31 สายพันธุ์ โดยวิธี PFGE ใช้การคำนวณวิธี Unweighted Pair Group Match Average ที่ Homology coefficient 1.0%

ความไวเชื้อก่อโรค HS ต่อยาต้านจุลชีพ 14 ชนิด

ค่า MIC range ของเชื้อก่อโรค HS 31 สายพันธุ์ต่อยา ampicillin, penicillin, streptomycin, gentamicin, tetracycline, oxytetracycline, nalidixic acid, enrofloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, erythromycin, colistin, trimethoprim และ sulfamethoxazole/trimethoprim คือ 0.25->128, 0.25-

>128, 8->128, 0.5-1, 1-16, 1-64, 1->128, ≤ 0.125 -2, ≤ 0.125 -2, ≤ 0.125 -1, ≤ 0.125 -1, 4-32, 1->128 และ 0.25-64 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ MIC breakpoint ของเชื้อ *P. multocida* หรือ *Pasteurella* spp. หรือเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ในโคหรือในสุกรตามที่กำหนดใน CLSI (2013b) พบว่ามีเชื้อจำนวนมากที่ดื้อ (resistant) ต่อยาต้านจุลชีพจากมากไปน้อย ดังนี้ 1) streptomycin และ nalidixic acid (30/31) 2) colistin (29/31) 3) tetracycline, oxytetracycline, trimethoprim และ sulfamethoxazole/trimethoprim (28/31) และ 4) ampicillin และ penicillin (27/31) ในทางตรงข้ามเชื้อส่วนใหญ่ก็มีความไว (susceptible) ต่อยา gentamicin (31/31) และ ciprofloxacin (27/31) เช่นกัน นอกจากนี้ ยังพบว่ายาด้านจุลชีพบางตัว มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ในระดับปานกลาง (intermediate) ได้แก่ danofloxacin, erythromycin และ enrofloxacin (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความไวของเชื้อก่อโรค HS 31 สายพันธุ์ ต่อยาต้านจุลชีพ 14 ชนิด

ยาต้านจุลชีพ	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	จำนวนเชื้อ (สายพันธุ์)			MIC breakpoint*		
		S	I	R	S	I	R
Ampicillin	0.25->128	4	0	27	≤ 0.5	-	-
Penicillin	0.25->128	4	0	27	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Streptomycin	8->128	1	0	30	≤ 8	-	-
Gentamicin	0.5-1	31	0	0	≤ 4	8	≥ 16
Tetracycline	1-16	3	0	28	≤ 2	4	≥ 8
Oxytetracycline	1-64	3	0	28	≤ 4	8	≥ 16
Nalidixic acid	1->128	1	0	30	≤ 16	-	≥ 32
Enrofloxacin	≤ 0.125 -2	2	11	18	≤ 0.25	0.5-1	≥ 2
Ciprofloxacin	≤ 0.125 -2	27	4	0	≤ 1	2	≥ 4
Danofloxacin	≤ 0.125 -1	2	29	0	≤ 0.25	-	-
Erythromycin	≤ 0.125 -1	1	25	5	≤ 0.5	1	≥ 2
Colistin	4-32	0	2	29	≤ 2	4	≥ 8
Trimethoprim	1->128	3	0	28	≤ 8	-	≥ 16
Sulfamethoxazole/trimethoprim	0.25-64	3	0	28	≤ 0.5	-	-

S = susceptible I = intermediate R = resistant

* CLSI (2013b)

รูปแบบความไว (antibiogram) ของเชื้อดื้อยา 14 ชนิด

จากผล MIC พบว่าเชื้อ *P. multocida* จำนวน 27 สายพันธุ์ที่มี PFGE pattern 1 เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดตั้งแต่ 9-11 ชนิด สามารถจำแนกรูปแบบความไว (antibiogram) ของเชื้อดื้อยา 14 ชนิดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ได้ถึง 6 แบบ คือรูปแบบ A, B, C, D, E และ F ในขณะที่เชื้อ *P. multocida* จำนวน 1 สายพันธุ์ที่มี PFGE pattern 3 เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 7 ชนิด ซึ่งแสดงผลความไวของเชื้อดื้อยา 14 ชนิด ในรูปแบบ G ส่วนเชื้อ *P. multocida* จำนวน 3 สายพันธุ์ที่มี PFGE pattern 2 เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพน้อยที่สุดเพียง 2-3 ชนิด โดยมีรูปแบบความไวเชื้อดื้อยา 14 ชนิด 3 แบบ คือ รูปแบบ H, I และ J (ตารางที่ 3)

รูปแบบความไวของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ A-F มีการดื้อยาเหมือนกัน 9 ชนิด คือ ampicillin, penicillin, streptomycin, tetracycline, oxytetracycline, nalidixic acid, colistin, trimethoprim และ sulfamethoxazole/trimethoprim แบบ A เชื้อดื้อยา enrofloxacin เพิ่มขึ้นรวมเป็น 10 ชนิด ส่วนแบบ C เชื้อดื้อยา enrofloxacin และ erythromycin เพิ่มขึ้นรวมเป็น 11 ชนิด ในขณะที่แบบ H ดื้อยา 3 ชนิด คือ streptomycin, colistin และ erythromycin แบบ I ดื้อยาเพียง 2 ชนิด คือ streptomycin และ nalidixic acid แบบ J ดื้อยา 2 ชนิดเช่นกัน คือ nalidixic acid และ erythromycin (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 รูปแบบความไว (antibiogram) ของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ 14 ชนิดของเชื้อก่อโรค HS 31 สายพันธุ์

รูปแบบความไวของเชื้อดื้อยา 14 ชนิด	จำนวนเชื้อ (สายพันธุ์)	ampicillin	penicillin	streptomycin	gentamicin	tetracycline	oxytetracycline	nalidixic acid	enrofloxacin	ciprofloxacin	danofloxacin	erythromycin	colistin	trimethoprim	Sulfamethoxazole	trimethoprim	PFGE pattern
A	15	R	R	R	S	R	R	R	R	S	I	I	R	R	R		1
B	4	R	R	R	S	R	R	R	I	I	I	I	R	R	R		1
C	3	R	R	R	S	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R		1
D	2	R	R	R	S	R	R	R	I	S	I	I	R	R	R		1
E	2	R	R	R	S	R	R	R	I	S	I	I	R	R	R		1
F	1	R	R	R	S	R	R	R	I	S	I	S	R	R	R		1
G	1	S	S	R	S	R	R	R	I	S	I	I	R	R	R		3
H	1	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S		2
I	1	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	I	I	S	S		2
J	1	S	S	S	S	S	S	R	I	S	I	R	I	S	S		2

S = susceptible I = intermediate R = resistant

วิจารณ์

ในปี พ.ศ. 2557 การระบาดของโรคเฮโมราจิกเซปติซีเมียเริ่มพบในเดือนมิถุนายนเป็นต้นมาจนถึงเดือนพฤศจิกายน (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังเกิดประปรายในเดือนธันวาคมและมกราคมของปี พ.ศ. 2558 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งใกล้เคียงกับในปี พ.ศ. 2554 ที่พบการระบาดในเดือนกรกฎาคมต่อเนื่องจนถึงเดือนธันวาคม แล้วลดลงในเดือนมกราคมถึงเดือนเมษายน 2555 ที่มีการระบาดเพียงเดือนละครั้ง จากนั้นจึงเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในเดือนพฤษภาคมเรื่อยไปจนถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2556 แต่รอบการระบาดใหม่ในปี พ.ศ. 2556 เริ่มในเดือนกรกฎาคมและสงบอย่างรวดเร็วในเดือนกันยายนเท่านั้น (วัฒนศักดิ์ จำละคร และเสกสิทธิ์ สิงห์แจ่ม, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) จนมาถึงการระบาดในเดือนมิถุนายน 2557 ที่รายงานในครั้งนี้อยู่ โดยมีการระบาดอย่างกว้างขวางเมื่อนับถึงเดือนพฤศจิกายนครอบคลุมถึง 17 จังหวัด ได้แก่ สกลนคร มหาสารคาม สุรินทร์ อุตรธานี มุกดาหาร กาฬสินธุ์ เพชรบุรี เชียงราย นครพนม ปทุมธานี อุดรดิตถ์ ปราจีนบุรี หนองบัวลำภู ศรีสะเกษ อุทัยธานี นครสวรรค์ และน่าน ในขณะที่ผลการชันสูตรโรค HS ตามข้อมูลระบาดวิทยาทางห้องปฏิบัติการรวบรวมไว้ในปี พ.ศ. 2555 ครอบคลุมพื้นที่ 12 จังหวัด ได้แก่ อุบลราชธานี ยโสธร ศรีสะเกษ สุรินทร์ อำนาจเจริญ ลำพูน เชียงราย เชียงใหม่ น่าน แม่ฮ่องสอน ลำปาง และพิษณุโลก และปี พ.ศ. 2556 ครอบคลุมพื้นที่เพียง 8 จังหวัด ได้แก่ อุบลราชธานี สุรินทร์ สกลนคร ลำพูน เชียงราย พิษณุโลก ประจวบคีรีขันธ์ และราชบุรี

โรค HS อยู่ในบัญชีโรคขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) ที่ประเทศสมาชิกควรรายงานสถานการณ์โรคในฐานะข้อมูล World Animal Health Information Database หรือ WAHID จากฐานข้อมูลพบว่า ประเทศสมาชิกในเอเชียที่พบโรคในช่วงปี 2011-2013 ได้แก่ อัฟกานิสถาน ภูฏาน บังกลาเทศ สาธารณรัฐประชาชนจีน อินโดนีเซีย อิรัก เมียนมาร์ มองโกเลีย ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ ซีเรีย และซาอุดีอาระเบีย ประเทศที่รายงานพบโรคจนถึงปี 2014 ได้แก่ กัมพูชา อินเดีย เนปาล เวียดนามและประเทศไทย ประเทศที่พบถึงปี 2012 ได้แก่ มาเลเซีย (WAHID, 2015) แสดงให้เห็นว่าหลายประเทศยังคงพบปัญหาการระบาดของโรค HS อยู่เป็นประจำ โดยเฉพาะยังมีการระบาดในประเทศเพื่อนบ้านของประเทศไทยอีกด้วย ดังนั้นมาตรการควบคุมโรคโดยการฉีดวัคซีนเป็นประจำ สม่ำเสมอ ครอบคลุมทั้งสัตว์ในประเทศ รวมทั้งในสัตว์ที่เคลื่อนย้ายจากประเทศเพื่อนบ้านเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึง

การระบาดของโรค HS ในครั้งนี้มีอัตราการป่วยและตายของสัตว์ในแต่ละฝูงแตกต่างกันมากตั้งแต่ 5.4-100% และ 4.1-100% ตามลำดับ เช่นเดียวกับที่รายงานในอินเดียและฟิลิปปินส์ที่อัตราการตายมีช่วงกว้าง 5-90% (Saini et al., 1991; Molina et al, 1994) อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่อัตราการป่วยและตายมักจะค่อนข้างสูง (ตารางที่ 1) เช่นเดียวกับที่มีรายงานในประเทศปากีสถาน (Khan et al., 2006; Farooq et al., 2007)

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อก่อโรค HS ที่ระบาดในปัจจุบัน ส่วนใหญ่จะเป็น PFGE pattern 1 ซึ่งมีมากถึง 27 สายพันธุ์ ส่วน pattern 2 และ 3 มีเพียง 3 และ 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อมี

ความแตกต่างกันและเปลี่ยนแปลงไปจากอดีต ดังรายงานของ Worarach et al. (2014) ที่ศึกษาเชื้อก่อโรค HS สายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้จากสัตว์ป่วยตาย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532-2554 จำนวน 87 สายพันธุ์ พบว่า 81 สายพันธุ์ เป็น PFGE type 4 เช่นเดียวกับสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตวัคซีนของประเทศไทย และสปป. ลาว ส่วน type 1, 2 และ 3 พบในเชื้ออย่างละ 4, 1 และ 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ เนื่องจาก pattern 1 และ 2 ของการศึกษาค้างนี้มีรูปแบบชิ้นส่วนของ chromosomal DNA ที่ถูกตัดย่อยตรงกับ type 3 และ 4 ของ Worarach et al. (2014) ตามลำดับ ดังนั้นในการระบาดครั้งนี้จึงไม่พบรูปแบบ type 1 และ 2 ซึ่งเคยพบในเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2532-2544 ส่วน type 4 ที่เดิมพบในเชื้อส่วนใหญ่ แต่ในครั้งนี้เป็น pattern 2 ที่พบเพียง 3 สายพันธุ์ โดย 1 สายพันธุ์เป็นเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2556 ในทางตรงข้าม type 3 ที่เดิมพบเพียง 1 สายพันธุ์ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2549 กลับเป็น pattern 1 ที่พบมากที่สุดในเชื้อที่ระบาดในปัจจุบัน ส่วน pattern 3 ของการศึกษาค้างนี้เป็นรูปแบบที่พบใหม่ ถึงแม้ว่าเชื้อจะเปลี่ยนแปลงไป แต่ pattern 1 และ 2 ยังคงมีความเหมือนกันสูงมากกว่า 90% ซึ่งหมายความว่าวัคซีนป้องกันโรค HS น่าจะยังคงมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ดี เนื่องจากเชื้อส่วนใหญ่ที่ระบาดในปัจจุบันยังคงมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงอย่างมากกับเชื้อที่ใช้ในการผลิตวัคซีน อย่างไรก็ตามควรเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อก่อโรค HS อย่างเป็นระยะและต่อเนื่อง

เชื้อก่อโรค HS ที่ระบาดในปัจจุบันมีการดื้อยาสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Worarach et al. (2014) เนื่องจากค่า MIC_{max} ของยา penicillin สูงขึ้นมากกว่า 2 เท่า จาก 64 เป็น >128 µg/ml และ MIC_{max} ของยา enrofloxacin สูงขึ้นถึง 8 เท่า จาก 0.25 เป็น 2 µg/ml ทำให้การดื้อยาชนิดนี้เพิ่มขึ้นจาก 0% เป็น 58% (18/31) สำหรับยา tetracycline แม้ค่า MIC range จะเท่าเดิม คือ 1-16 µg/ml แต่พบว่าอัตราการดื้อยาของเชื้อเพิ่มขึ้นมากจาก 7.8% เป็น 90.3% (28/31) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพระหว่างเชื้อในปัจจุบันกับเชื้อในอดีตที่รายงานไว้ (Worarach et al., 2014) ทำได้ยาก เนื่องจากชนิดยาที่นำมาใช้ทดสอบมีจำนวนต่างกัน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาค้างนี้พบข้อสังเกตคือ เชื้อที่มีรูปแบบ PFGE pattern 2 ที่ตรงกับ type 4 ของเชื้อส่วนใหญ่ในอดีต มีรูปแบบความไวเชื้อต่อยา 14 ชนิดที่นำมาทดสอบในครั้งนี้เป็นแบบ H, I หรือ J ซึ่งมีการดื้อยาเพียง 3 ชนิด (streptomycin, colistin และ erythromycin) 2 ชนิด (streptomycin และ nalidixic acid) หรือ 2 ชนิด (nalidixic acid และ erythromycin) ตามลำดับนั้น อาจเป็นเหตุผลของการรักษาโรค HS ในอดีตอันเป็นที่ประจักษ์ว่า สามารถใช้ยาต้านจุลชีพหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในทางตรงข้ามเชื้อส่วนใหญ่ที่พบในปัจจุบันมี PFGE pattern 1 ที่แม้ว่าจะมีรูปแบบความไวเชื้อต่อยา 14 ชนิดถึง 6 แบบ แต่ทุกแบบมีการดื้อยาต้านจุลชีพสูงถึง 9-11 ชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อในปัจจุบันมีการดื้อยาต้านจุลชีพมากขึ้น รวมทั้งความเข้มข้นของยาที่มีผลในการยับยั้งเชื้อมีแนวโน้มที่สูงขึ้นด้วย ดังนั้นการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่มีผลต่อการรักษาโรคได้อย่างถูกต้องจึงมีความสำคัญมากเช่นกัน นอกจากนี้การให้ยาแก่สัตว์ป่วยในขนาดและระยะเวลาที่ถูกต้องตามฉลากยา พร้อมทั้งติดตาม

ผลการรักษา ตลอดจนเก็บตัวอย่างเพื่อทำการเพาะเชื้อและทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ จึงมีความจำเป็นที่ต้องทำทุกครั้งที่พบการระบาด

โดยสรุปเชื้อก่อโรค HS ที่ระบาดในปี พ.ศ. 2557 มีรูปแบบทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมแต่ไม่มากนัก วัคซีนที่ใช้อยู่ในปัจจุบันน่าจะยังคงมีผลในการป้องกันโรคได้ แต่เชื่อว่าการดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากขึ้น เกษตรกรและเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์จึงควรระมัดระวังในการเลือกใช้อายุน้ำที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้อย่างถูกต้อง รวมทั้งส่งตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ทุกครั้งที่เกิดโรค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ. สุภาพร จัวงพานิช และ น.สพ. วัชรชัย ณรงค์ศักดิ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูล คุณนัยนา หัสสงวังสี คุณกัมกร พรหมโต และคุณตลวัฐ์ สีบุญ ที่ช่วยงานในห้องปฏิบัติการด้านชีววิทยา ชีวโมเลกุล และแบคทีเรียวิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มแบคทีเรียวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ทุกท่านที่มีส่วนร่วมให้งานนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- พัชรี ทองคำคุณ อภัสรา วรราช และพรเพ็ญ พัฒนโสภณ. 2557. การพัฒนา multiplex PCR สำหรับตรวจหาเชื้อโรไทป์และความรุนแรงของเชื้อพาสเทลเลลล่า มัลโตซิเดา ที่แยกได้จากสุกร. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 9(2): 42-57.
- ราชกิจจานุเบกษา. 2558. พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘. เล่มที่ 132 ตอนที่ 14 ก วันที่ 2 มีนาคม 2558. หน้า 22-41.
- Benkirane, A. and De Alwis, M.C.L. 2002. Haemorrhagic septicaemia, its significance, prevention and control in Asia. Vet. Med. Czech. 47: 234-240.
- Brogden, K.A., Rhoades, K.R. and Heddleston, K.L. 1977. A new serotype of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. Avian Dis. 22: 185-190.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013a. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. 4th edition, VET01-A4, Vol 33 No.7, Wayne, PA. 80 p.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013b. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; second information supplement. VET01-S2, Vol 33 No.8, Wayne, PA. 70 p.
- De Alwis, M.C.L. 1999. Haemorrhagic septicaemia. Australia Center for International Agricultural Research (ACIAR) Monograph No. 57, Canberra, Australia. p. 1-34.

- De Alwis, M.C.L., Wijewardana, T.G., Gomis, A.I. and Vipulasiri, A.A. 1990. Persistence of the carrier status in haemorrhagic septicaemia (*Pasteurella multocida* serotype 6:B infection) in buffaloes. Trop. Anim. Health Product. 22: 185-194.
- Farooq, U., Hussian, M., Irshad, H., Badar, N., Munir, R. and Ali, Q. 2007. Status of haemorrhagic septicaemia based on epidemiology in Pakistan. Pak. Vet. J. 27: 67-72.
- Gunawardana, G.A., Townsend, K. M. and Frost, A. J. 2000. Molecular characterization of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. Vet. Microbiol. 72: 97-109.
- Harper, M., Boyce, J.D. and Adler, B. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbiol. Lett. 265: 1-10.
- Khan, A., Saddique, U., Ahmed. R., Mohammed, Y. and Zubair, M. 2006. Serosurveillance of hemorrhagic septicemia in cattle and buffaloes in district Malakan, NWFP. J. Anim. Vet. Adv. 5: 912-915.
- Khattak, M.N. and Matthews, R.C. 1993. Genetic relatedness of *Bordetella* species as determined by macrorestriction digests resolved by pulsed-field gel electrophoresis. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 659-664.
- Molina, H.A., Delapena, E., Camer, G. and Padilla, M.A. 1994. An outbreak of hemorrhagic septicemia among carabaos in Northern Samar. Phillippine J. Vet. Med. 31: 27-33.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. 1994. *Pasteurella* species. In: Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, Spain. p. 254-258.
- Saini, S.S., Sharma, D.R., Gill, B.S., Kwarts, M.S., Singh, J., Sharma, J.K., Dhillon, S.S. and Ramneek, R. 1991. Re-emerging of hemorrhagic septicemia in Punjab. Indian J. Anim. Sci. 61: 1178-1180.
- Sawada, T., Rimler, R.B. and Rhoades, K.R. 1982. Indirect hemagglutination test that uses glutaraldehyde-fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of *Pasteurella* antibody. J. Clin. Microbiol. 15: 752-756.
- Shafarin, M.S., Zamri-Saad, M., Khairani, S.B. and Saharee, A.A. 2009. Pathological changes in the respiratory tract of goats infected by *Pasteurella multocida* B:2. J. Comp. Pathol. 140: 194-197.

- 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.
- Worarach, A., Prompt, G. and Pathanasophon, P. 2014. Molecular characterization of *Pasteurella multocida* isolates that cause haemorrhagic septicaemia in Thailand using pulsed-field gel electrophoresis. Thai J. Vet. Med. 44(1): 23-29.
- World Animal Health Information Database (WAHID). 2015. "WAHID homepage, Info by single region, Region: Asia, Disease: Haemorrhagic septicaemia. Start year: 2011, End year: 2015." [Online]. Available: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Countrytimelines. Accessed March 12, 2015.
- 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. p. 1-13. [Online]. Available: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual>. Accessed March 12, 2015.

Genetic characterization and antimicrobial susceptibilities of haemorrhagic septicaemia causing agents in 2014 outbreaks

Pacharee Thongkamkoon*¹ Netchanok Jiwakanon²

Seksit Singhjam³ Wattanasak Chamlakhorn⁴

1 National Institute of Animal Health, Chatuchak, Bangkok.

2 Upper Northeastern Veterinary Research and Development Center, Muang, Khon Kean.

3 Lower Northern Veterinary Research and Development Center, Wangthong, Pitsanulok.

4 Upper Northern Veterinary Research and Development Center, Hang Chat, Lampang

* Corresponding author: Tel. 02 5798909 Fax. 02 5798919 email: thongkamkoon@msn.com

Abstract

In 2014, there were outbreaks of Haemorrhagic septicaemia (HS) in buffaloes and beef cattle. Number of outbreaks, as counted by diagnostic cases that have been sent to National Institute of Animal Health and Regional Veterinary Research and Development Centers since June to November 2014, was totally 26 outbreaks. The highest number of outbreak was 14 in upper northeastern region, followed by 4 in lower northern region, 3 in upper northern region, 2 in lower northeastern region and 1 outbreak each in western, central and eastern region of Thailand.

The study on genetic characterization of 31 isolates obtained from sick and dead HS infected animals by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) revealed 3 PFGE patterns. Pattern 1 consisted of 27 isolates, whereas pattern 2 and 3 consisted of 3 and 1 isolate, respectively. In addition, pattern 1 and 2 had 90% homology. Antimicrobial susceptibilities of HS causing agents against 14 drugs presented as minimal inhibitory concentration (MIC) range ($\mu\text{g/ml}$) were as follows: ampicillin (0.25->128), penicillin (0.25->128), streptomycin (8->128), gentamicin (0.5-1), tetracycline (1-16), oxytetracycline (1-64), nalidixic acid (1->128), enrofloxacin (≤ 0.125 -2), ciprofloxacin (≤ 0.125 -2), danofloxacin (≤ 0.125 -1), erythromycin (≤ 0.125 -1), colistin (4-32), trimethoprim (1->128) and sulfamethoxazole/trimethoprim (0.25-64).

Twenty seven of HS causing agents showing PFGE pattern 1 resisted to 9-11 antimicrobials and displayed totally 6 types (A, B, C, D, E or F) of antibiogram. In addition, the agent showing PFGE pattern 3 was resistant to 7 antimicrobials with antibiogram type G. In contrast, the agents showing PFGE pattern 2 were resistant to only 2-3 antimicrobials shown in antibiogram type H, I or J.

Key words: genetic characterization, antimicrobial susceptibilities, haemorrhagic septicaemia