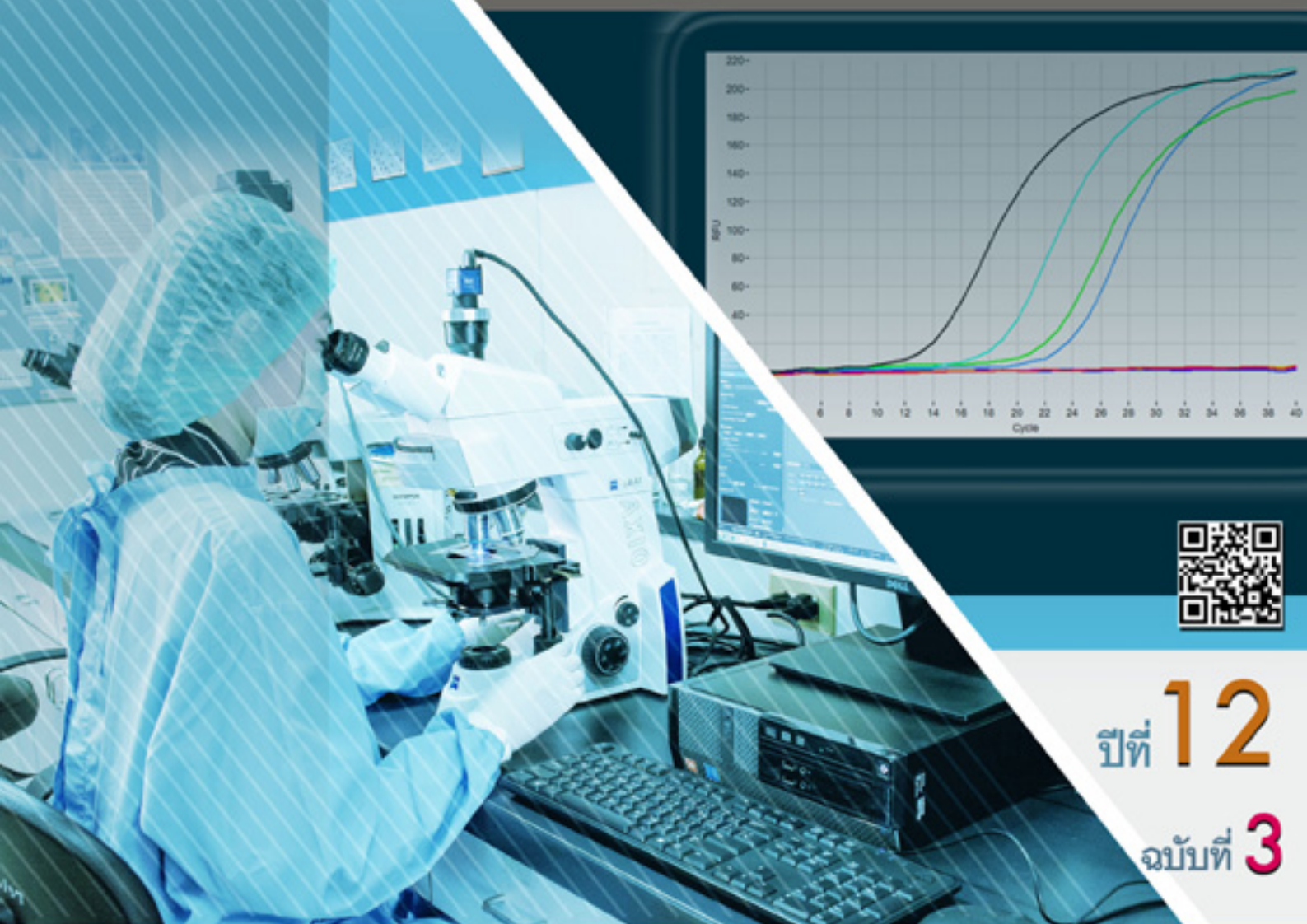


วารสาร

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

ISSN 1905-5048



ปีที่ 12

ฉบับที่ 3

การแยกเชื้อ Avian coronaviruses ในเปิดครั้งแรกในประเทศไทย

นฤพล พร้อมขุนทด^{1*} ชัยณรงค์ กุลฉิม¹ ขนิษฐา รัตนบุรี²

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: เชื้อไวรัส Avian coronaviruses (AvCoVs) หรือแต่เดิมรู้จักกันในชื่อเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ (avian infectious bronchitis virus, IBV) เป็นเชื้อไวรัสที่ส่งผลกระทบต่อระบบต่างๆ ในไก่ นอกจากไก่จะติดเชืไวรัสนี้ได้แล้ว ปัจจุบันมีรายงานการพบการติดเชื้อในสัตว์ปีกชนิดอื่นๆ มากขึ้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อ AvCoVs ในเปิดที่เลี้ยงในภาคใต้และภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

วิธีการ: ทำการศึกษาตัวอย่างเปิดป่วยทั้งหมด 271 ตัวอย่าง โดยวิธีการฉีดเชื้อเข้าไขไก่ฟัก พิสูจน์เชื้อโดยวิธี immunofluorescent assay (IFA) และวิธี RT-PCR ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในส่วน of full-length S1 gene และศึกษาการเกิด recombination ในส่วนของ S1 gene นอกจากนี้ได้ศึกษา virus tropism บนสไลด์เนื้อเยื่อของไก่และเปิดโดยวิธี virus histochemistry

ผล: สามารถแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อ AvCoVs ได้จำนวน 2 ตัวอย่าง (AvCoV/Du/Thailand/128/2015 และ AvCoV/Du/Thailand/165/2016) เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งสองพบว่าเป็นเชื้อ AvCoV สายพันธุ์ QX ซึ่งเคยมีรายงานการตรวจพบในไก่ในประเทศไทย ไม่พบการเกิด recombination กับเชื้อ AvCoV สายพันธุ์อื่นๆ และพบว่าเชื้อ AvCoV สายพันธุ์ QX ที่แยกได้ในเปิดสามารถจับกับเยื่อผิวของหลอดลม ม้าม กระเพาะแท้ ไต และลำไส้เล็กของไก่ ซึ่งสอดคล้องกับการติดเชื้อตามธรรมชาติในไก่ที่เคยมีรายงาน อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่าเชื้อไวรัส AvCoV สายพันธุ์ QX สามารถจับได้เฉพาะกับเยื่อผิวของลำไส้เล็กของเปิด

สรุป: การศึกษานี้เป็นรายงานการพบเชื้อ AvCoV ในเปิดเป็นครั้งแรกในประเทศไทยจากการแยกเชื้อโดยการฉีดไขไก่ฟัก และพิสูจน์เชื้อโดยวิธี IFA และวิธี RT-PCR และจากผลการทำ sequencing สรุปได้ว่าเชื้อ AvCoV ที่แยกได้จากเปิดนี้เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ QX ที่เคยมีรายงานการติดเชื้อมาก่อนในไก่ ดังนั้นสามารถนำเชื้อไวรัสนี้ไปศึกษาความรุนแรงของโรคในเปิดและสัตว์ปีกอื่นๆ นอกจากนี้ควรมีการสำรวจหาเชื้อ AvCoV ในเปิดอย่างต่อเนื่องเพื่อใช้เป็นข้อมูลศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ AvCoVs ในประเทศไทย

คำสำคัญ: เชื้อ avian coronavirus เปิด การแยกเชื้อไวรัส ประเทศไทย

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง อ.วังทอง จ.พิษณุโลก 65130

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110

* ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์และโทรสาร 055 313137 055 313139 อีเมล naruepolp@dld.go.th

Isolation of avian coronaviruses in ducks in Thailand: the first report

Naruepol Promkuntod^{1*} Chainarong Kulchim¹ Khanistar Rattanaburee²

Abstract

Background: Avian coronaviruses (AvCoVs), previously referred to as the well-known avian infectious bronchitis virus (IBV), mainly affect chicken associated with a wide range of disease conditions. At present, there is increased evidence that AvCoVs can infect species of birds other than chicken. This study, we aimed at identifying AvCoVs that might be present in domestic free grazing ducks in the south and the lower north of Thailand.

Methods: We performed virus isolation and identification by egg inoculation, indirect immunofluorescent assay (IFA) and RT-PCR from 271 clinical samples. Next, the viruses were subjected to genotype sequencing of the full-length AvCoVs S1 subunit sequence. We further analyzed the recombination events of the isolates. The virus histochemistry was also performed to demonstrate the attachment of viruses to epithelial tissues of chicken and duck.

Results: Two virus isolates were confirmed as AvCoVs, designated AvCoV/Du/Thailand/128/2015 and AvCoV/Du/Thailand/165/2016. Phylogenetic analysis revealed that both duck isolates are of the QX genotype that has been previously isolated in chickens. No potential recombination events and recombination breakpoints of these two QX viruses with other genotypes occurred. Binding of the duck isolate QX type (AvCoV/Du/Thailand/165/2016) to chicken tissues including trachea, spleen, proventriculus, kidney and small intestine was consistent with the previously reported pathogenicity in chicken *in vivo*. Interestingly, the bound QX-type virus was only observed in duck small intestine.

Conclusions: These findings confirm the first report of AvCoV isolation in ducks by egg inoculation and virus identification by IFA and RT-PCR. The AvCoV-duck isolates are of chicken origin which was categorized into the QX genotype by sequencing. The pathogenicity of these QX viruses can be further investigated in duck and other bird species. In addition, long-term continual surveillance is very much important for identification of AvCoV infection in ducks in Thailand.

Keyword: avian coronavirus, duck, isolation, Thailand

¹Veterinary Research and Development Center (Lower Northern Region), Wangthong, Phitsanulok, 65130

²Veterinary Research and Development Center (Upper Southern Region), Thungsong, Nakhon Si Thammarat, 80110

*Corresponding author: Tel. & Fax. 055 313137, 055 313139; email: naruepol@dld.go.th

บทนำ

ปัจจุบันคณะกรรมการด้านอนุกรมวิธาน (World taxonomy committee) มีมติให้เปลี่ยนชื่อเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ (avian infectious bronchitis virus) ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (*Gallus gallus*) ทั่วโลก (Jackwood, 2012) เป็นชื่อ Avian coronavirus (AvCoV) (Ducatez, 2016) เชื้อ AvCoVs จัดอยู่ใน genus *Gammacoronavirus* จีโนมของเชื้อไวรัสประกอบด้วย single-stranded RNA ที่มีโปรตีนโครงสร้างสี่ชนิด หนึ่งในนั้นที่สำคัญคือ spike (S) glycoprotein ซึ่งมีลักษณะเป็น club-shaped projections โดยแยกออกเป็นโปรตีนย่อยสองส่วนคือ S1 และ S2 โปรตีนส่วน S1 ทำหน้าที่จับกับตัวรับ (receptor) ของโฮสต์ ส่วนโปรตีนส่วน S2 มีหน้าที่กระตุ้นการรวมกัน (fusion) ของเชื้อไวรัสเข้ากับผนังเซลล์ของโฮสต์ นอกจากนี้โปรตีนส่วน S1 มีส่วนประกอบของ epitopes ซึ่งทำหน้าที่เป็น virus neutralizing antibodies ในการสร้าง protective immunity ดังนั้น การวิเคราะห์โปรตีนส่วน S1 จึงถูกนำมาใช้ในการแยกสายพันธุ์ (genotype) ของเชื้อ AvCoVs (Cavanagh and Gelb, 2008)

อวัยวะเป้าหมายแรกของเชื้อ AvCoVs คือระบบทางเดินหายใจส่วนต้น (Cavanagh and Gelb, 2008) แต่ในปัจจุบันพบว่าเชื้อ AvCoV-IBV หลายๆ สายพันธุ์ก่อให้เกิดปัญหาของระบบต่างๆ ในไก่นอกเหนือจากระบบทางเดินหายใจ เช่น สายพันธุ์ nephropathogenic ทำให้เกิดโรคไตและมีปัญหาด้านผลผลิต (Reddy et al., 2016) ซึ่งสายพันธุ์ QX ที่เป็นสายพันธุ์ nephropathogenic มีรายงานการเกิดโรคครั้งแรกในไก่ไข่ในประเทศจีนโดยก่อปัญหาต่อระบบทางเดินหายใจ ไส้ลด การอักเสบของกระเพาะแท้ และก่อโรคไต (Yudong et al., 1998) ในปัจจุบันพบว่าเชื้อ AvCoV สายพันธุ์ QX นี้มีการแพร่กระจายไปทั่วโลก

ปัจจุบันมีรายงานการติดเชื้อ AvCoVs ในสัตว์ปีกอื่นๆ (non-galliformes) เช่น ไก่ต๊อก (guinea fowl) (Ito et al., 1991) นกพิราบ (Jonassen et al., 2005; Qian et al., 2006) นกยูงและนกเป็ดน้ำ (Sun et al., 2007) เป็ด mallard และห่าน (Jonassen et al., 2005) ส่วนการเกิดโรคในเป็ดมีรายงานพบทั้งในเป็ดป่าและเป็ดเลี้ยงทั้งที่แสดงอาการของโรคและอาจเป็นแหล่งรังโรคที่จะแพร่กระจายเชื้อไวรัสทั้งรูปแบบ co-circulation และ recombination ไปสู่สัตว์ปีกอื่น (Chen et al., 2013; Zhuang et al., 2015)

ในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคหลอดลมอักเสบติดต่อครั้งแรกในไก่ในระหว่างปี พ.ศ. 2496-2497 (Chindavanig, 1962) ต่อมาพบการระบาดของโรคในภูมิภาคต่างๆ ที่เกิดจากเชื้อ AvCoVs หลายสายพันธุ์ เช่น สายพันธุ์ Massachusetts (M41) และ Massachusetts-derived variants สายพันธุ์ nephropathogenic และ สายพันธุ์ QX ทั้งในภาคใต้และภาคกลางของประเทศ (Antarasena et al., 2008; Pohuang et al., 2009; Pohuang et al., 2011; Promkuntod et al., 2015)

ส่วนการเกิดโรคในเป็ดในประเทศไทยยังไม่เคยมีการรายงาน โดยรายงานนี้ทำการศึกษาการแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อ AvCoVs ในเป็ดที่เลี้ยงอยู่ในภาคใต้และภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย นอกจากนี้ยังศึกษาถึงลักษณะทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของเชื้อ AvCoVs ที่แยกได้เปรียบเทียบกับเชื้อ AvCoVs ที่แยกได้ในไก่ในช่วงระยะเวลาเดียวกัน และศึกษา virus tropism โดยวิธี virus histochemistry

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ประวัติสัตว์ป่วย และการแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อไวรัส

นำตัวอย่างซากเป็ดทั้งหมด 271 ตัวอย่าง ที่ส่งมาทำการชันสูตรโรคที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ (ศวพ.) ภาคใต้ตอนบน แบ่งเป็น 189 ตัวอย่าง ในปี 2558 และ 61 ตัวอย่าง ในปี 2559 และที่ศวพ. ภาคเหนือตอนล่างจำนวน 21 ตัวอย่าง ในปี 2560 ทำการแยกเชื้อ AvCoVs จากตัวอย่างอวัยวะภายในโดยวิธีฉีดเชื้อในไข่ไก่ฟักที่อายุ 9-11 วันทาง allantoic sac และยืนยันผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสโดยวิธี indirect immunofluorescent test (IFA) และวิธี RT-PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์สำหรับตรวจหายีนส่วน 3' UTR ที่ให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 385 bp ซึ่งเป็นการตรวจแบบคัดกรองสำหรับพิสูจน์เชื้อ AvCoVs (Adzhar et al., 1996) การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ รหัสโครงการ EA-007/61 (R)

2. Indirect immunofluorescence

ทำการเก็บ CAM ของไข่ไก่ฟักหลังจากฉีดตัวอย่างไปแล้ว 48 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาไวรัสแอนติเจนของเชื้อ AvCoV ใน CAM ด้วยวิธี IFA โดยตัดเนื้อเยื่อแช่แข็ง (frozen tissue section) ตามวิธีของ Promkuntod et al. (2015) ดังนี้

บ่มสไลด์ด้วย nucleoprotein monoclonal antibody (clone IB95, HyTest, Finland) แล้วล้างสไลด์ด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง จากนั้นบ่มสไลด์ด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G (Dako, Denmark) แล้วล้างสไลด์ด้วยสารละลาย PBS อีก 3 ครั้ง การจับของแอนติบอดีต่อไวรัสแอนติเจนบน CAM ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์ (Nikon, Tokyo) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี IFA ทำการเก็บตัวอย่าง allantoinic fluid (AF) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปใช้แยกสายพันธุ์ของเชื้อ AvCoVs ต่อไป

3. การสกัด RNA และ reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

นำตัวอย่าง AF ที่ให้ผลบวกด้วยวิธี IFA และ RT-PCR มาสกัด viral genomic RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy (Qiagen, USA) นำ purified viral RNA มาเข้าปฏิกิริยา reverse-transcription โดยใช้ SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, USA) เพื่อให้เปลี่ยนเป็น cDNA และใช้ชุดไพรเมอร์ full-length S1 ตามวิธีของ Pohuang et al. (2011) ซึ่งจะให้ผลผลิตดีเอ็นเอมีขนาด 1,593 bp การศึกษานี้ใช้วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นต้นที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ (GenBank accession number MG272492) เป็นกลุ่มควบคุมบวก ปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตร 50 µl ประกอบด้วย Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 0.2 U (Invitrogen, USA), 10x High Fidelity PCR buffer ปริมาตร 5 µl, forward และ reverse primers 0.2 uM, MgSO₄ 2mM, dNTP 0.2 mM, และเติม DEPC-treated water ให้ได้ปริมาตรรวม 50 µl นำส่วนผสมเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ ขั้นตอน pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 2 นาที ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 55°C นาน 30 วินาที และขั้นตอน extension ที่ 68°C นาน 2 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 68°C นาน 7 นาที นำผลผลิต PCR มาเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอของ full-length S1 gene เชื้อ AvCoVs บน 0.8% agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจดูผลภายใต้แสง UV

4. การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมส่วน full-length S1 และการวิเคราะห์การเกิด recombination

ทำการ purify ผลผลิตดีเอ็นเอด้วย DNA Gel

extraction Kit (Qiagen, USA) จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมด้วย Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystem, Foster City, USA) และ ABI PRISM 310 (Applied Biosystem, Foster City, USA) ทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันและความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับเชื้อไวรัส AvCoVs ที่แยกได้ในโกในช่วงระยะเวลาเดียวกันจำนวน 5 ตัวอย่างรวมทั้งวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อเชื้อเป็นต้นที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ และเชื้อไวรัส AvCoVs ที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank อีก 168 ตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม BioEdit software version 7.0.5.3. จากนั้นสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ด้วยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA version 7.0.26 (Kumar et al., 2016) สร้าง Bayesian trees ด้วยโปรแกรม MrBayes 3.2.6 (<http://mrbayes.sourceforge.net>) และ Kakusan version 4.4.0 (Tanabe, 2007) และทำการสร้างแผนภูมิ phylogeny โดยการกำหนดสีเพื่อจำแนก lineage ของเชื้อ AvCoVs ที่ทำการเปรียบเทียบด้วย FigTree version 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>)

ศึกษาการเกิด recombination โดยใช้โปรแกรม Recombination Detection Program (RDP) version 4.95 ซึ่งดูลักษณะการเกิด potential recombination และ recombination breakpoints โดยการเปรียบเทียบกับ parental strains ที่ถูกกำหนดโดยวิธี RDP, MaxChi, BootScan, SiScan และ GENECONV โดยมีค่า *P* value < 0.05 (Martin et al., 2015)

5. Virus Histochemistry

เปรียบเทียบการจับ (bind) ของเชื้อ AvCoVs กับผนังเยื่อหุ้มของอวัยวะเป้าหมายของไก่และเป็ดได้แก่ หลอดลม ม้าม ลำไส้ ไต กระเพาะแท้ โดยวิธี virus histochemistry ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Mork et al. (2014) ดังนี้ นำเนื้อเยื่อปกติของไก่และเป็ดอายุ 6 สัปดาห์ เตรียมเป็นสไลด์ frozen section บ่มสไลด์ด้วยเชื้อไวรัสที่ได้จาก infected-AF ที่มีเชื้อไวรัส ปริมาณ 3×10^5 fluorescent focus unit (FFU) หลังจากถูกทำให้เข้มข้นโดยการกรองด้วย 0.45 µm polyethersulfone membrane filter บ่มสไลด์ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 คืน ใน moisture chamber จากนั้นล้างสไลด์ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง แล้วบ่มสไลด์ด้วย ด้วย nucleoprotein antibody ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างสไลด์ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง แล้วบ่มสไลด์ด้วย FITC-labeled secondary antibody (เช่นเดียวกับวิธี IFA) ที่

อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง ขั้นตอนสุดท้ายล้างสไลด์ด้วยสารละลาย PBS ดังวิธีข้างต้น ตรวจสอบการจับของเชื้อไวรัสบนเยื่อหุ้มด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ส่วนตัวอย่างควบคุมเนื้อเยื่อไก่และเปิดทำการบ่มสไลด์ด้วยสารละลาย PBS แทนการบ่มด้วย infected-AF เพื่อพิจารณาว่าผลการทดสอบไม่เกิด non-specific staining

ผลและวิจารณ์

จากตัวอย่างทั้งหมดสามารถแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อ AvCoVs ได้ 2 ตัวอย่าง (AvCoV/Du/Thailand/128/2015 และ AvCoV/Du/Thailand/165/2016) โดยวิธี IFA และ RT-PCR (Table 1) ลักษณะของ CAM ที่ติดเชื้อไวรัสจะพบการเรืองแสงของ nucleoprotein ในส่วนของไฮโดพลาสมหลังการติดเชื้อ 48-72 ชั่วโมง (Figure 1A) เมื่อเปิดดูเอ็มบริโอภายหลังการติดเชื้อนาน 7 วัน ตรวจพบรอยโรคที่เป็นลักษณะ

จำเพาะของการติดเชื้อ AvCoVs ได้แก่ เอ็มบริโอชดกลมและแคระแกร็น (Figure 1B)

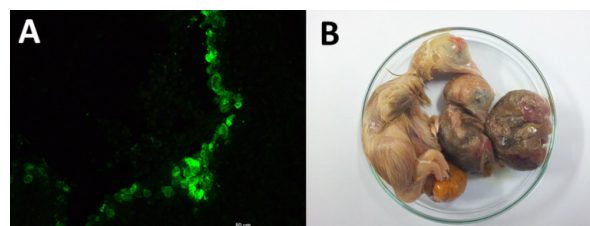


Figure 1. Avian coronavirus-QX strain-infected embryos. A. Cytoplasmic fluorescent staining of CAM epithelia detected after 48 hours inoculation using a monoclonal antibody against AvCoV nucleoprotein. B. Curling and stunting embryos (right) were typically characteristic of AvCoV infection compared to a normal embryo (left) after 7 days inoculation.

Table 1. Two AvCoVs isolated from ducks from flocks in different provinces. The chicken isolates and a vaccine strain were also included for genetic comparison.

Isolate designation*	Year of isolation	Province	Bird type	Age	Clinical signs***	Other birds in the raising area	GenBank accession no.
AvCoV/Du/Thailand/128/2015 ^a	2015	Songkhla	Meat **	30 d	D, R, E	Duck breeders (Parent stock)	MG272487
AvCoV/Du/Thailand/165/2016	2016	Krabi	Meat	40 d	D, S	Native chickens	MG272489
AvCoV/Ch/Thailand/308/2015	2015	N.Sithammarat	Broiler	7 d	D, R	-	MG272485
AvCoV/Ch/Thailand/480/2015	2015	Yala	Native	60 d	D	-	MG272486
AvCoV/Ch/Thailand/724/2017	2017	Uttaradit	Native	4 m	D	-	MG272490
AvCoV/Ch/Thailand/725/2017	2017	Uttaradit	Native	4 m	D	-	MG272491
AvCoV/Ch/Thailand/1351/2017	2017	Uthai Thani	Broiler	21 d	-	-	MG272488
AvCoV/Ch/Thailand/Vaccine/2017	2017	-	-	-	-	-	MG272492

* according to Recommendations for a Standardized Avian Coronavirus Nomenclature (Ducatez, 2016)

** Muscovy ducks

*** Clinical signs; D: depress E: enteric, R: respiratory, S: sudden death

^a co-infection with Muscovy duck parvovirus (MDPV) by egg inoculation and confirmed by IFA test

เมื่อทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันและความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับเชื้อ AvCoVs อื่นๆ พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้ทั้งสองตัวอย่างจัดอยู่ในสายพันธุ์ QX และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัส AvCoV-IBV ที่แยกได้ในไก่ในช่วงระยะเวลาเดียวกันกับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในเป็ดพบว่าเชื้อ AvCoV/Ch/Thailand/480/2015, AvCoV/Ch/Thailand/724/2017 และ AvCoV/Ch/Thailand/ 725/2017 จัดอยู่ในสายพันธุ์ QX เช่นเดียวกัน ส่วนเชื้อ AvCoV/Ch/Thailand/308/2015 จัดอยู่ในสายพันธุ์วัคซีน M41 ในขณะที่เชื้อ AvCoV/Ch/Thailand/1351/ 2017 อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์

Chinese derived M41 (Figure 2) ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนพบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากเป็ดและจากไก่ทั้ง 7 ตัวอย่างไม่มีความสัมพันธ์กับวัคซีนที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์ (% similarity < 0.9)

ทำการศึกษา recombination ของเชื้อไวรัสโดยคัดเลือก putative parental strains ที่คาดว่าจะเป็สายพันธุ์ต้นกำเนิดของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ จากผลของการวิเคราะห์ด้วยวิธี RDP analysis พบว่าเชื้อ AvCoVs ที่แยกได้จากเป็ดทั้งสองตัวอย่างไม่มีการเกิด recombination กับเชื้อไวรัส AvCoV สายพันธุ์อื่น ขณะเดียวกันเชื้อไวรัสทั้งสองมีความ

เหมือนกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ QX ที่เคยแยกได้ในไก่ จากผลการศึกษาจึงสรุปได้ว่าเชื้อ AvCoVs ในเป็ดเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกันกับที่เคยตรวจพบในไก่ และการศึกษานี้เป็นรายงานการตรวจพบเชื้อ AvCoV สายพันธุ์ QX ครั้งแรกในเป็ด

ทำการศึกษา virus tropism โดยใช้เชื้อ AvCoV/Du/Thailand/165/2016 เป็นตัวแทนในการศึกษา เนื่องจากเชื้อ AvCoV/Du/Thailand/128/2015 ตรวจพบว่ามีการติดเชื้อพาร์โวไวรัสในเป็ด (MDPV) ร่วมด้วย (Table 1) ซึ่งอาจมีผลต่อการศึกษากันจับกันของเชื้อ AvCoVs บนเยื่อปูดของสัตว์ทดลอง จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัสสายพันธุ์ QX จากเป็ดสามารถจับกับเยื่อปูดในส่วนหลอดลม กระเพาะแท้ ม้าม ไต และลำไส้เล็กของไก่ ส่วนในเนื้อเยื่อเปิดพบการเกาะจับของเชื้อไวรัสเฉพาะที่เยื่อปูดในส่วนลำไส้เล็ก (Figure 3)

ในปัจจุบันมีรายงานการแยกเชื้อ AvCoVs ได้ในเป็ด ซึ่งสามารถก่อโรคได้ทั้งในเป็ดป่าและเป็ดเลี้ยง (Cavanagh, 2005; Chu et al., 2011) ในรายงานฉบับนี้เป็นรายงานการแยกเชื้อ AvCoVs ในเป็ดเป็นครั้งแรกในประเทศไทย เชื้อ AvCoV/Du/Thailand/128/2015 ที่แยกได้ในเป็ดมีการติดเชื้อร่วมกับเชื้อพาร์โวไวรัสในเป็ด ในขณะที่เชื้อ AvCoV/Du/Thailand/165/2016 แยกได้จากเป็ดที่เลี้ยงร่วมกับไก่พื้นเมือง ผลการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมพบว่าเป็ดเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ QX ซึ่งมีความคล้ายกับเชื้อไวรัสที่แยกได้ในไก่ที่จังหวัดยะลาและอุดรดิตถ์ แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากเป็ดนี้น่าจะเป็นเชื้อไวรัสที่มาจากไก่โดยเฉพาะหากมีการเลี้ยงสัตว์ปีกหลายชนิดร่วมกัน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเกิดการติดเชื้อข้ามกันระหว่างสปีชีส์ (Promkuntod, 2016) เช่นเดียวกันกับการติดเชื้อข้ามกันในโรคไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก (Teinsin, 2011)

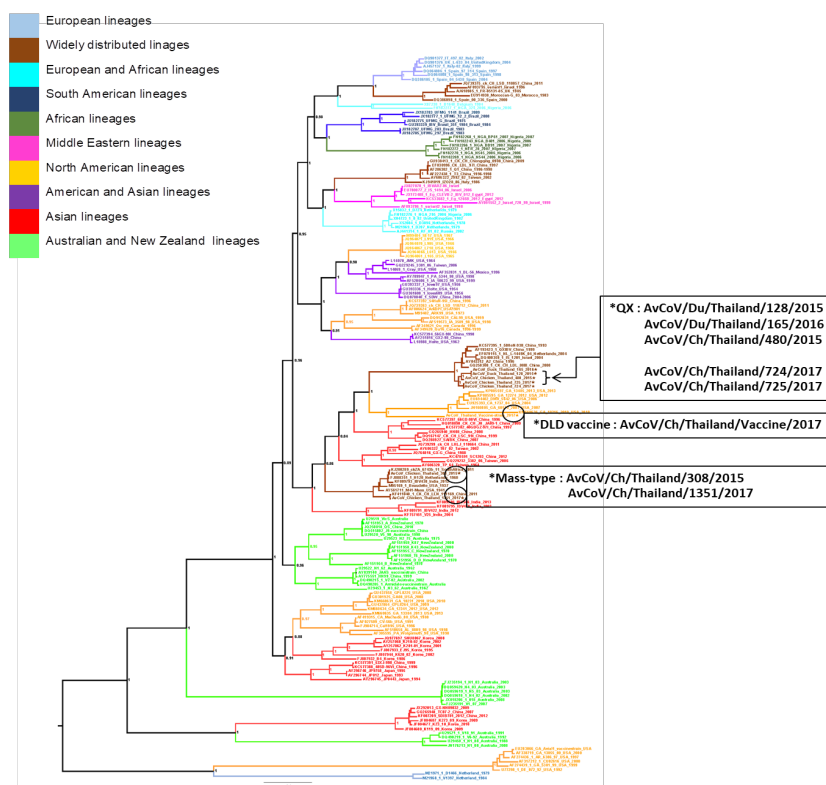


Figure 2. Phylogenetic tree of the S1 protein. Full-length S1 sequences of AvCoV accessed from GenBank and 8 deposited sequences from this study (★) were aligned as indicated in materials and methods. The tree is midpoint-rooted, nodes are labelled with posterior probability value. Branches and taxon are highlighted with alternative colors corresponded to the lineages. Arrow and Circles indicated AvCoV genotypes of the field isolates from this study.

ในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมโดยการเกิด recombination โดยเฉพาะเชื้อ AvCoVs ซึ่งเป็นไวรัสชนิด RNA มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์สูงทั้งการเกิดการเพิ่ม

(insertion) หรือลด (deletion) ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของโปรตีนส่วน S1 ซึ่งใช้ในการแยกสายพันธุ์จึงมีโอกาสดังกล่าวเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ๆขึ้นตลอดเวลา (Hewson et al., 2014) ใน

ประเทศไทยมีรายงานการพบ recombination ของเชื้อ AvCoVs ในไก่ (Pohuang et al., 2011) ส่วนในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเกิด recombination ของเชื้อไวรัสที่แยกได้ในเป็ด อาจกล่าวได้ว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้นี้มีอยู่แล้วในพื้นที่โดยอาจมีการติดเชื้อในไก่หรือสัตว์ปีกชนิดอื่นๆ รวมทั้งเป็ด

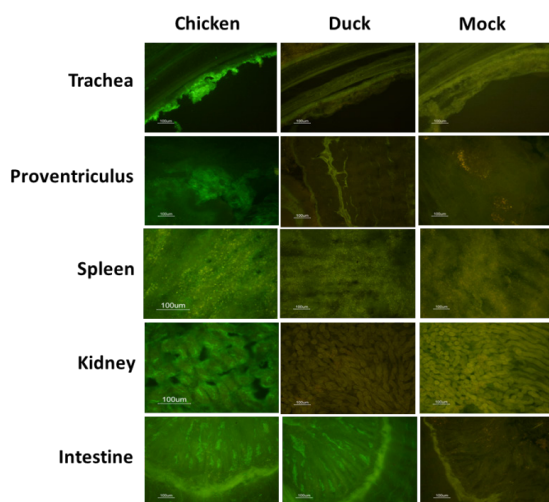


Figure 3. Virus histochemistry. Binding of virus particles to epithelial cells of selected chicken and duck tissues. Binding was detected with a monoclonal antibody against AvCoV nucleoprotein. Mock represented duck tissues incubated with PBS.

สำหรับการศึกษา virus tropism มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการจับของเชื้อไวรัสบนเยื่อผิวของโฮสต์นั้นสัมพันธ์กับความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสในสัตว์ปีก (Costa et al., 2012; Mork et al., 2014; Wickramasinghe et al., 2011) จากผลการศึกษาในรายงานฉบับนี้สอดคล้องกับที่เคยมีในรายงานอื่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดสอบ virus tropism บนเนื้อเยื่อไก่ ส่วนการทดสอบ virus tropism ในเป็ดตรวจพบการจับของเชื้อไวรัสเพียงเยื่อผิวของผนังลำไส้เล็ก อาจเป็นเพราะว่าเป็ดมี receptors อยู่บนเยื่อผิวของผนังลำไส้เล็ก มีรายงานการค้นพบ protein receptors ของเชื้อไวรัสใน genus *Alphacoronaviruses* และ *Betacoronaviruses* (Masters, 2006) ส่วนใน genus *Gammacoronaviruses* ยังไม่เคยมีรายงาน แต่มีการศึกษาหา sugar receptor ของเชื้อ AvCoVs ซึ่งพบว่าประกอบด้วยโมเลกุลน้ำตาลชนิด alpha (2,3)-linked sialic acid (Promkuntod et al., 2014; Wickramasinghe et al., 2011; Winter et al., 2006) โดยในส่วนของ mucus-producing goblet cells ที่อยู่ในเยื่อผิวของลำไส้ของสัตว์ปีกจะมีน้ำตาลชนิดนี้อยู่เป็นจำนวนมาก (Wickramasinghe et al., 2011)

ผลการศึกษาครั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าเป็ดอาจเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อ AvCoVs เป็ดอาจได้รับเชื้อ AvCoVs มาจากไก่หรือได้รับเชื้อไวรัสเข้าสู่ระบบอวัยวะภายใน จากนั้นเชื้อไวรัสสามารถไปจับกับ receptor ที่อยู่บนเยื่อผิวในผนังลำไส้ จึงทำให้เชื้อไวรัสสามารถถูกขับออกมาทางอุจจาระได้ นอกจากนี้ อาจมีการแพร่กระจายเชื้อไวรัสไปสู่เป็ดตัวอื่นๆ รวมฝูงหรือสู่เกษตรกรชนิดอื่นได้

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

รายงานฉบับนี้เป็นรายงานการแยกเชื้อ AvCoVs ในเป็ดได้เป็นครั้งแรกซึ่งเป็นเป็ดที่เลี้ยงอยู่ในภาคใต้ของประเทศไทย แสดงให้เห็นว่าเชื้อ AvCoVs นั้นสามารถพบได้ในสัตว์ปีกอื่น ๆ สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานในต่างประเทศ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการแพร่กระจายของเชื้อ AvCoVs ในสัตว์ปีกต่างๆว่าเป็นเชื้อไวรัสที่มาจากไก่หรือว่าสัตว์ปีกอื่นๆ สามารถเป็นโฮสต์ตามธรรมชาติของเชื้อ AvCoVs ได้ โดยการศึกษาเชื้อ AvCoVs อย่างต่อเนื่องในสัตว์ปีกอื่นๆ รวมทั้งเป็ด และการศึกษาความรุนแรงของโรคในเป็ดเพื่อศึกษาว่าเป็ดสามารถเป็นสัตว์นำโรคที่เกิดจากเชื้อ AvCoVs ได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ (ศวพ.) ภาคใต้ตอนบนที่สนับสนุนการศึกษานี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาและชีวโมเลกุล ศวพ. ภาคใต้ตอนบนและ ศวพ. ภาคเหนือตอนล่างที่ช่วยปฏิบัติการทดสอบให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Adzhar, A., Shaw, K., Britton, P. and Cavanagh, D. 1996. Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 25(4): 817–836.
- Antarasena, C., Thongmee, S., Nuansrichay, B. and Intarasarn, M. 2008. S1 glycoprotein gene analysis of avian infectious bronchitis virus strains isolated in southern Thailand. *Kasetsart Vet. Bangkok, Thailand.* pp. 147-150.
- Cavanagh, D. 2005. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* 34(6): 439-448.
- Cavanagh, D. and Gelb, J. Jr. 2008. Infectious bronchitis. In Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan and D.E. Swayne, eds. *Diseases of poultry* 12th ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, U.S.A. pp. 117–135.
- Chen, G.Q., Zhuang, Q.Y., Wang, K.C., Liu, S., Shao, J.Z., Jiang, W.M., Hou, G.Y., Li, J.P., Yu, J.M., Li, Y.P. and Chen, J.M. 2013. Identification and survey of a novel avian coronavirus in ducks. *PLoS One.* 8(8): e72918.

- Chu, D.K.W., Leung, C.Y.H., Gilbert, M., Joyner, P. Ng, E.M., Tsemay, M.T., Guan, Y., Peiris, J.S.M. and Poon, L.L.M. 2011. Avian coronavirus in wild aquatic birds. *J. Virol.* 85(23): 12815-12820.
- Chindavanig, P. 1962. Studies on the attenuated on infectious bronchitis virus. *J. Thai Vet. Med. Assoc.* 12: 1-7.
- Costa, T., Chaves, A.J., Valle, R., Darji, A., van Riel, D., Kuiken, T., Majó, N. and Ramis, A. 2012. Distribution patterns of influenza virus receptors and viral attachment patterns in the respiratory and intestinal tracts of seven avian species. *Vet. Res.* 43(1): 28.
- Ducatez, M.F. 2016. Recommendations for a standardized avian coronavirus (AvCoV) nomenclature: outcome from discussions within the framework of the European Union COST Action FA1207: "towards control of avian coronaviruses: strategies for vaccination, diagnosis and surveillance". *Avian Pathol.* 45(5): 602-603.
- Hewson, K.A., Noormohammadi, A.H., Devlin, J.M., Browning, G.F., Schultz, B.K. and Ignjatovic, J. 2014. Evaluation of a novel strain of infectious bronchitis virus emerged as a result of spike gene recombination between two highly diverged parent strains. *Avian pathol.* 43(3): 249-257.
- Ito, N.M.K., Miyaji, C.I. and Capellaro, C.E.M.P.D.M. 1991. Studies on broiler's IBV and IBV-like from guinea fowl, In Kaleta, E.F. and Heffels-Redmann, U. Proceedings edition II: *International Symposium on Infectious Bronchitis*. Giessen: Justus-Leibig University, Germany. pp. 302-307.
- Jackwood, M.W. 2012. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* 56(4): 634-641.
- Jonassen, C.M., Kofstad, T., Larsen, I.L., Løvland, A., Handeland, K., Follestad, A. and Lillehaug, A. 2005. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *J. Gen. Virol.* 86(6): 1597-607.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7): 1870-1874.
- Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. and Muhire, B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1(1): vev003.
- Masters, P. 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66: 193-292.
- Mork, A-K., Hesse, M., Abd El Rahman, S., Rautenschlein, S., Herrler, G. and Winter, C. 2014. Differences in the tissue tropism to chicken oviduct epithelial cells between avian coronavirus IBV strains QX and B1648 are not related to the sialic acid binding properties of their spike proteins. *Vet. Res.* 45(1): 67.
- Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A. and Sasipreeyajan, J. 2009. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand. *J. Vet. Sci.* 10(3): 219-223.
- Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A. and Sasipreeyajan, J. 2011. Sequence analysis of S1 genes of infectious bronchitis virus isolated in Thailand during 2008-2009: identification of natural recombination in the field isolates. *Virus Genes.* 43(2): 254-260.
- Promkuntod, N., Van Eijndhoven, R.E.W., De Vrieze, G., Gröne, A. and Verheije, M.H. 2014. Mapping of the receptor-binding domain and amino acids critical for attachment in the spike protein of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology.* 448: 26-32.
- Promkuntod, N., Thongmee, S. and Yoidam, S. 2015. Analysis of the S1 gene of the avian infectious bronchitis virus (IBV) reveals changes in the IBV genetic groups circulating in southern Thailand. *Res. Vet. Sci.* 100: 299-302.
- Promkuntod, N. 2016. Dynamics of avian coronavirus circulation in commercial and non-commercial birds in Asia—a review. *Vet. Quart.* 36(1): 30-44.
- Qian, D.H., Zhu, G.J., Wu, L.Z. and Hua, G.X. 2006. Isolation and characterization of a coronavirus from pigeons with pancreatitis. *Am. J. Vet. Res.* 67: 1575-1579.
- Reddy, V.R., Trus, I., Desmarests, L.M., Li, Y., Theuns, S. and Nauwynck, H.J. 2016. Productive replication of nephropathogenic infectious bronchitis virus in peripheral blood monocyctic cells, a strategy for viral dissemination and kidney infection in chickens. *Vet. Res.* 47(1): 70.
- Sun, L., Zhang, G., Jiang, J., Fu, J., Ren, T., Cao, W., Xin, C. Liao, M. and Liu, W. 2007. A Massachusetts prototype like coronavirus isolated from wild peafowls is pathogenic to chickens. *Virus Res.* 130(1-2): 121-128.
- Tanabe, A.S. 2007. Kakusan: a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Mol. Ecol. Resour.* 7(6): 962-964.
- Tiensin T. 2011. Epidemiology and control of avian influenza H5N1 virus in Thailand. [PhD dissertation] Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, 149 p.
- Wickramasinghe, I.N.A., de Vries, R.P., Gröne, A., de Haan, C.A.M., Verheije, M.H. 2011. Binding of avian coronavirus spike proteins to host factors reflects virus tropism and pathogenicity. *J. Virol.* 85(17): 8903-8912.
- Winter, C., Schwegmann-Weßels, C., Cavanagh, D., Neumann, U. and Herrler, G. 2006. Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian Infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.* 87(5): 1209-1216.
- Yudong, W., YongLin, W., Zichun, Z., GenChe, F., Yihai, J., Xiang, L., Jiang, D. and Shushuang, W. 1998. Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chin. J. Anim. Quarantine.* 15: 1-3.
- Zhuang, Q.Y., Wang, K.C., Liu, S., Hou, G.Y., Jiang, W.M., Wang, S.C., Li, J.P., Yu, J.M. and Chen, J.M. 2015. Genomic analysis and surveillance of the coronavirus dominant in ducks in China. *PLoS One*, 10(6): e0129256.

Isolation of avian coronaviruses in ducks in Thailand: the first report

Naruepol Promkuntod^{1*} Chainarong Kulchim¹ Khanistar Rattanaburee²

Abstract

Background: Avian coronaviruses (AvCoVs), previously referred to as the well-known avian infectious bronchitis virus (IBV), mainly affect chicken associated with a wide range of disease conditions. At present, there is increased evidence that AvCoVs can infect species of birds other than chicken. This study, we aimed at identifying AvCoVs that might be present in domestic free grazing ducks in the south and the lower north of Thailand.

Methods: We performed virus isolation and identification by egg inoculation, indirect immunofluorescent assay (IFA) and RT-PCR from 271 clinical samples. Next, the viruses were subjected to genotype sequencing of the full-length AvCoVs S1 subunit sequence. We further analyzed the recombination events of the isolates. The virus histochemistry was also performed to demonstrate the attachment of viruses to epithelial tissues of chicken and duck.

Results: Two virus isolates were confirmed as AvCoVs, designated AvCoV/Du/Thailand/128/2015 and AvCoV/Du/Thailand/165/2016. Phylogenetic analysis revealed that both duck isolates are of the QX genotype that has been previously isolated in chickens. No potential recombination events and recombination breakpoints of these two QX viruses with other genotypes occurred. Binding of the duck isolate QX type (AvCoV/Du/Thailand/165/2016) to chicken tissues including trachea, spleen, proventriculus, kidney and small intestine was consistent with the previously reported pathogenicity in chicken *in vivo*. Interestingly, the bound QX-type virus was only observed in duck small intestine.

Conclusions: These findings confirm the first report of AvCoV isolation in ducks by egg inoculation and virus identification by IFA and RT-PCR. The AvCoV-duck isolates are of chicken origin which was categorized into the QX genotype by sequencing. The pathogenicity of these QX viruses can be further investigated in duck and other bird species. In addition, long-term continual surveillance is very much important for identification of AvCoV infection in ducks in Thailand.

Keyword: avian coronavirus, duck, isolation, Thailand

¹Veterinary Research and Development Center (Lower Northern Region), Wangthong, Phitsanulok, 65130

²Veterinary Research and Development Center (Upper Southern Region), Thungsong, Nakhon Si Thammarat, 80110

*Corresponding author, Tel. 055 313139, Fax 055 313137, email: naruepolp@dld.go.th

การแยกเชื้อ Avian coronaviruses ในเปิดครั้งแรกในประเทศไทย

นฤพล พร้อมขุนทด^{1*} ชัยณรงค์ กุลฉิม¹ ขนิษฐา รัตนบุรี²

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: เชื้อไวรัส Avian coronaviruses (AvCoVs) หรือแต่เดิมรู้จักกันในชื่อเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ (avian infectious bronchitis virus, IBV) เป็นเชื้อไวรัสที่ส่งผลกระทบต่อระบบต่างๆ ในไก่ นอกจากไก่จะติดเชื้อไวรัสนี้ได้แล้ว ปัจจุบันมีรายงานการพบการติดเชื้อในสัตว์ปีกชนิดอื่นๆ มากขึ้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อ AvCoVs ในเปิดที่เลี้ยงในภาคใต้และภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

วิธีการ: ทำการศึกษาตัวอย่างเปิดป่วยทั้งหมด 271 ตัวอย่าง โดยวิธีการฉีดเชื้อเข้าไขไก่ฟัก พิสูจน์เชื้อโดยวิธี immunofluorescent assay (IFA) และวิธี RT-PCR ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในส่วนของ full-length S1 gene และศึกษาการเกิด recombination ในส่วนของ S1 gene นอกจากนี้ได้ศึกษา virus tropism บนสไลด์เนื้อเยื่อของไก่และเปิด โดยวิธี virus histochemistry

ผล: สามารถแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อไวรัส AvCoVs ได้จำนวน 2 ตัวอย่าง (AvCoV/Du/Thailand/ 128/2015 และ AvCoV/Du/Thailand/165/2016) เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งสองพบว่าเป็นเชื้อ AvCoV สายพันธุ์ QX ซึ่งเคยมีรายงานการตรวจพบในไก่ในประเทศไทย ไม่พบการเกิด recombination กับเชื้อ AvCoV สายพันธุ์อื่นๆ และพบว่าเชื้อ AvCoV สายพันธุ์ QX ที่แยกได้เปิดสามารถจับกับเนื้อเยื่อ epithelium ของหลอดลม ม้าม กระเพาะแท้ ไต และลำไส้เล็กของไก่ ซึ่งสอดคล้องกับการติดเชื้อตามธรรมชาติในไก่ที่เคยมีรายงาน อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่าเชื้อ AvCoV สายพันธุ์ QX สามารถจับได้เฉพาะกับเยื่อบุผิวของลำไส้เล็กของเปิด

สรุป: การศึกษานี้เป็นรายงานการพบเชื้อ AvCoVs ในเปิดเป็นครั้งแรกในประเทศไทยจากการแยกเชื้อโดยการฉีดไขไก่ฟัก และพิสูจน์เชื้อโดยวิธี IFA และวิธี RT-PCR และจากผลการทำ sequencing สรุปได้ว่าเชื้อ AvCoVs ที่แยกได้จากเปิดนี้เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ QX ที่ เคยมีรายงานการติดเชื้อมาก่อนในไก่ ดังนั้นสามารถนำเชื้อไวรัสนี้ไปศึกษาความรุนแรงของโรคในเปิด และสัตว์ปีกอื่นๆ นอกจากนี้ควรมีการสำรวจหาเชื้อ AvCoVs ในเปิดอย่างต่อเนื่องเพื่อใช้เป็นข้อมูลศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ AvCoVs ในประเทศไทย

คำสำคัญ: เชื้อ avian coronavirus เปิด การแยกเชื้อไวรัส ประเทศไทย

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง อ.วังทอง จ.พิษณุโลก 65130

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110

* ผู้รับผิดชอบบทความ โทร 055 313139 แฟกซ์ 055 313137 อีเมล naruepolp@dld.go.th

Introduction

Recently, according to the Recommendations for a Standardized Avian Coronavirus Nomenclature (Ducatez, 2016), the name of avian coronavirus (AvCoV) replaces the previously well-known avian infectious bronchitis virus (IBV), causing infectious bronchitis (IB) in chickens, that circulates worldwide (Jackwood, 2012).

AvCoVs are representative of the genus *Gammacoronavirus*. AvCoV genome consists of a single-stranded RNA that encodes four structural proteins; one of which is spike (S) glycoprotein. The S protein forms large club-shaped projections and is formed by two non-covalently bound polypeptides, S1 and S2 subunits. The function of the S1 is to attach to host cell receptors while the S2 subunit mediates fusion of the virus and the host cell membrane. Moreover, the S1 consists of epitopes and determinants for virus neutralizing antibodies that provide protective immunity. Thus, S1 gene analysis has been widely used to differentiate AvCoV-IBV genotypes (Cavanagh and Gelb, 2008).

The primary target organ of AvCoVs is the upper respiratory tract (Cavanagh and Gelb, 2008). Currently, there are many AvCoV-IBV genotypes (or strains) that are associated with a wide range conditions. For instance, many nephropathogenic strains cause kidney disease and production problem (Reddy et al., 2016). The recent genotype, the QX-type virus, is among the AvCoVs that are pathogenic in layers particularly diminishing egg production and also causing respiratory problem, proventriculitis and severe kidney damage (Yudong et al., 1998). However, not only chicken but other avian species have recently been reported to be susceptible for AvCoV-infection such as guinea fowl (Ito et al., 1991), pigeon (Jonassen et al., 2005; Qian et al., 2006), peafowl and teal (Sun et al., 2007), mallard and geese (Jonassen et al., 2005). At present, AvCoV identification has already been reported in both wild and

domestic ducks in term of either causing disease or behaving as a carrier for possible co-circulation and recombination of the viruses in particular sphere (Chen et al., 2013; Zhuang et al., 2015).

In Thailand, the occurrence of AvCoV-IBV was firstly reported in chickens between 1953 and 1954 (Chindavanig, 1962). Later, several studies have been demonstrated that AvCoV-IBV is present throughout Thailand mainly caused by a Massachusetts and its-derived variants, nephropathogenic and QX genotypes (Antarasena et al., 2008; Pohuang et al., 2009; Pohuang et al., 2011; Promkuntod et al., 2015). However, the occurrence of AvCoVs in duck in Thailand has not yet been reported. In this study, we investigated AvCoV evidence in duck and its situation in the south and the lower north of Thailand by isolating and identifying the virus, determining genetic characterization of the isolates compared to those of AvCoVs that have been isolated from chickens and achieving virus tropism on selected tissue sections.

Materials and methods

1. History, virus isolation and identification

Total of 271 clinical carcass samples from free-grazing meat-type and egg-type ducks submitted to The Veterinary Research and Development Center (The Upper Southern [189 samples and 61 samples in 2015 and 2016, respectively] and The Lower Northern [21 samples in 2017] Regions) were tested for AvCoVs in order to discover whether ducks might harbor the viruses either as “a natural host” or “a carrier”. Virus isolation and propagation were achieved by inoculating pooled and homogenized suspected tissues into the allantoic cavity of 9-to-11 day-old embryonated chicken eggs (ECE). After inoculation, the allantoic fluid (AF) and chorioallantoic membrane (CAM) were harvested. Following three to five blind passages, indirect immunofluorescence (IFA) was tested for AvCoVs. Furthermore, a single-step

RT-PCR was performed using a commercial kit (Qiagen, USA), according to the manufacturer's instruction to amplify a fragment of the AvCoV specific 3'UTR gene (Adzhar et al., 1996) harvested from infected AF. This study was approved by the Committee of the Care and Use of Laboratory Animals, National Institute of Animal Health [Project number: EA-007/61 (R)].

2. Indirect immunofluorescence

Antigen detection of AvCoV-IBV by IFA on frozen infected CAM sections was described according to Promkuntod et al. (2015). Briefly, the slides were incubated with a monoclonal antibody directed against the nucleoprotein (clone IB95, HyTest, Finland). After three washing steps with Phosphate Buffered Saline (PBS), the slides were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G (Dako, Denmark). Next, the sections were washed in a similar manner and examined the antibody binding using fluorescence microscopy (Nikon, Tokyo). The AF harvested from the inoculated ECE that were AvCoV-IBV positive, by IFA on infected-CAMs, were kept at -80°C until use.

3. RNA Extraction and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

After AvCoV-IBV infection was verified by both IFA and RT-PCR, viral genomic RNA was extracted from the AF using a viral RNA extraction kit (RNeasy, Qiagen, USA). The purified viral RNA was reverse-transcribed with SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, USA) into cDNA synthesis. The 2 µl of cDNA was amplified by PCR using two sets of the specific S1 glycoprotein gene primers. The vaccine strain (accession number MG272492) was used as the positive control. These allowed amplifying a 1,593 bp fragment of the full-length S1 gene (Pohuang et al., 2011). The RT-PCR protocol was done in 50 µl reaction mixture containing 0.2 U Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, USA), 5 µl 10x High Fidelity PCR buffer, 0.2 uM forward and reverse primers, 2mM MgSO₄, 0.2 mM dNTP, and adjusted to final volume

with DEPC-treated water. The RT-PCR cycling condition was done into the followings: heating at 94°C for 2 min, 40 repetitions of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, extension at 68°C for 2 min, and a final extension at 68°C for 7 min. The RT-PCR products were initially visualized on 0.8% agarose gel electrophoresis under UV illumination.

4. Full-length S1-AvCoV sequencing and recombination analysis

The amplicons were subsequently purified using DNA Gel extraction Kit (Qiagen, USA). DNA sequencing was generated using the Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystem, Foster City, USA). The products of the sequencing reaction were cleaned-up using ethanol precipitation method and sequenced in an ABI PRISM 310 (Applied Biosystem, Foster City, USA). Sequence data were assembled and edited with BioEdit software v7.0.5.3 (www.mbio.ncsu.edu).

The full-length S1 spike protein gene coding sequences comprised the sequences of the local Thai AvCoV-isolates from this study including the duck isolates, five chicken isolates (selected from areas during the period when the duck-viruses were isolated) and a DLD vaccine strain along with other 168 sequences from GenBank. A complete alignment of the 176 sequences was made using MUSCLE available in the MEGA version 7.0.26 (Kumar et al., 2016). Bayesian trees were generated from coding sequences with MrBayes 3.2.6 (<http://mrbayes.sourceforge.net>) using parameters selected by Akaike's Information Criterion (AIC) with the GTR+G model selected as the best model by Kakusan version 4.4.0 (Tanabe, 2007). MrBayes was run for 5,000,000 generations with four simultaneous Metropolis-coupled Monte Carlo Markov chains (MCMC) sampled every 500 generation. The average standard deviation of split frequencies dropped to less than 0.01. The first 25% of the trees were discarded as burn-in with the remaining samples used to generate the consensus

tree. The trees were visualized and color-coded with FigTree version 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Moreover, all sequences were tested for recombination using Recombination Detection Program (RDP) version 4.95. Potential recombination events and recombination breakpoints were identified using RDP, MaxChi, BootScan, SiScan and GENECONV methods to identify putative parental sequences with significance set at P value < 0.05 (Martin et al., 2015).

5. Virus Histochemistry on tissue sections (*ex vivo*)

Attachment of the AvCoV-duck isolate to epithelial tissues of the respiratory and the digestive tracts of ducks and chickens was visualized by virus histochemistry modified from previously described (Mork et al., 2014). To do this, the viruses were propagated in a same manner described in the IFA test. The infected-AF containing 3×10^5 fluorescent focus unit (FFU) was concentrated via $0.45 \mu\text{M}$ polyethersulfone membrane filter and was applied on acetone-fixed frozen histologically normal tissue sections: trachea, spleen, proventriculus, kidney and small intestine of 6-week old chicken and duck included. Next, the tissue sections were incubated in a moisture chamber at 4°C overnight. After three washing steps, the nucleoprotein antibody was applied on the tissue sections followed by incubating at 4°C for 1 hr. Attachment of viruses was visualized by labeling the bound virus particles with FITC-labeled secondary antibody as described in IFA test, incubating at 4°C for 1 hr. Then, the sections were washed in a similar manner and examined the virus binding using fluorescence microscopy. Mock tissue slides included both chicken and duck tissues incubated with PBS.

Results and discussion

Of total, AvCoVs have been isolated and identified from two duck samples by RT-PCR and IFA (Table 1). AvCoV-infection revealed nucleoprotein fluorescent cytoplasmic staining in the epithelial cells of CAMs after inoculating the homogenized tissue

suspension via allantoic cavity for 48-72 hr (Figure 1A). The typical stunting and curling embryos were also recognized at 7 days post inoculation (Figure 1B).

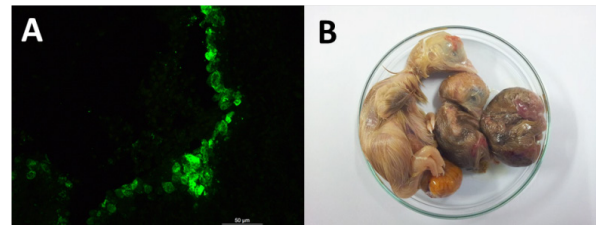


Figure 1. Avian coronavirus-QX strain-infected embryos.

A. Cytoplasmic fluorescent staining of CAM epithelia detected after 48 hours inoculation using a monoclonal antibody against AvCoV nucleoprotein. B. Curling and stunting embryos (right) were typically characteristic of AvCoV infection compared to a normal embryo (left) after 7 days inoculation.

Next, we constructed phylogenetic tree using nucleotide sequences of the complete S1 genes. Our finding revealed that both duck AvCoV isolates were categorized into a QX genotype. We also compared these two viruses to those of five chicken AvCoVs isolated during the period overlapping when the duck isolates were identified (Table 1). The chicken isolates including the AvCoV/Ch/Thailand/480/2015, the AvCoV/Ch/Thailand/724/2017 and the AvCoV/Ch/Thailand/725/2017 were also classified into the QX strain. The AvCoV/Ch/Thailand/308/2015 belonged to the M41 vaccine while the AvCoV/Ch/Thailand/1351/2017 correlated to a Chinese derived M41 (Figure 2). The percentage of nucleotide and amino acid sequence identities indicated that neither duck nor chicken AvCoV-isolates shared high identity to the DLD-vaccine (% similarity < 0.9).

Next, we carried out the recombination analysis. The strains of viruses would be considered as recombinants if any crossover event took place between two putative parental strains. The RDP analysis showed that no potential recombination events and recombination breakpoints were identified. The QX virus of duck isolates resembled to those previously reported in chickens. This can be concluded

Table 1. Two AvCoVs isolated from ducks from flocks in different provinces. The chicken isolates and a vaccine strain were also included for genetic comparison.

Isolate designation*	Year of isolation	Province	Bird type	Age	Clinical signs***	Other birds in the raising area	GenBank accession no.
AvCoV/Du/Thailand/128/2015 ^a	2015	Songkhla	Meat **	30 d	D, R, E	Duck breeders (Parent stock)	MG272487
AvCoV/Du/Thailand/165/2016	2016	Krabi	Meat	40 d	D, S	Native chickens	MG272489
AvCoV/Ch/Thailand/308/2015	2015	N.Sithammarat	Broiler	7 d	D, R	-	MG272485
AvCoV/Ch/Thailand/480/2015	2015	Yala	Native	60 d	D	-	MG272486
AvCoV/Ch/Thailand/724/2017	2017	Uttaradit	Native	4 m	D	-	MG272490
AvCoV/Ch/Thailand/725/2017	2017	Uttaradit	Native	4 m	D	-	MG272491
AvCoV/Ch/Thailand/1351/2017	2017	Uthai Thani	Broiler	21 d	-	-	MG272488
AvCoV/Ch/Thailand/Vaccine/2017	2017	-	-	-	-	-	MG272492

* according to Recommendations for a Standardized Avian Coronavirus Nomenclature (Ducatez, 2016)

** Muscovy ducks

*** Clinical signs; D: depress E: enteric, R: respiratory, S: sudden death

^a co-infection with Muscovy duck parvovirus (MDPV) by egg inoculation and confirmed by IFA test

that the duck QX isolates are the same viruses previously found in chicken flocks in Thailand and this is the first report that QX strain was present in duck.

We analyzed virus tropism of the duck isolated-QX strain to chicken and duck organs. To prevent interference of AvCoV-binding, only the AvCoV/Du/Thailand/165/2016 was used for virus histochemistry since there was co-MDPV infection for the AvCoV/Du/Thailand/128/2015 (Table 1). Binding of the QX-virus particles to chicken epithelial tissues was detected in trachea, proventriculus, spleen, kidney and small intestine. Interestingly, only binding to small intestinal epithelium of duck was observed (Figure 3).

As previous reports, AvCoVs could be isolated and is able to cause disease in domestic and wild ducks (reviewed in Cavanagh, 2005; Chu et al., 2011). Here we reported the first case of AvCoVs isolated from Muscovy ducks raised in the south of Thailand. AvCoV/Du/Thailand/128/2015 was isolated from ducks co-infected with MDPV while AvCoV/Du/Thailand/165/2016 was isolated from ducks raised within native chicken community. The genotype sequencing revealed that they are both of QX virus and they also

shared similarity of nucleotide and protein structure to those of the viruses isolated in chickens in the south (Yala province) and in the lower north (Uttaradit province) of Thailand. This indicated that the AvCoV-duck isolates may be of chicken origin especially in case of ducks infected with AvCoV/Du/Thailand/165/2016 that were raised in the same area of native chickens. This suggests the possible inter-avian species transmission (reviewed in Promkuntod, 2016) which is similar to the case of avian influenza viruses (Tiensin, 2011). The QX-type virus was first reported in China and mainly caused atrophic oviducts, which resulted in a decrease in egg production (Yudong et al., 1998). In Thailand, the QX viruses have been reported previously either in southern and central parts of Thailand (Antarasena et al., 2008; Pohuang et al., 2009; Pohuang et al., 2011; Promkuntod et al., 2015).

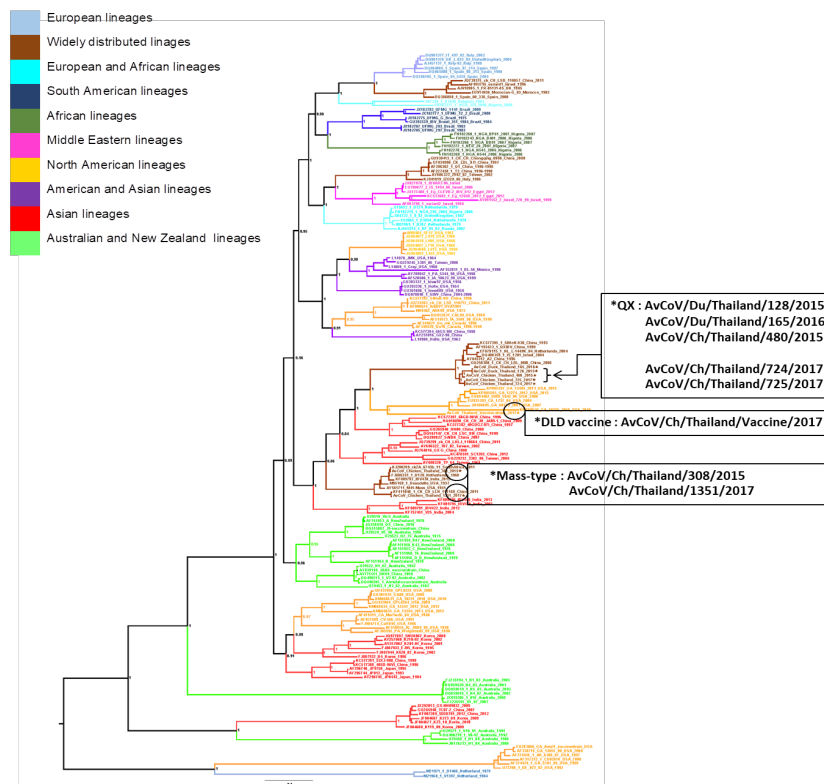


Figure 2. Phylogenetic tree of the S1 protein. Full-length S1 sequences of AvCoV accessed from GenBank and 8 deposited sequences from this study (★) were aligned as indicated in materials and methods. The tree is midpoint-rooted, nodes are labelled with posterior probability value. Branches and taxon are highlighted with alternative colors corresponded

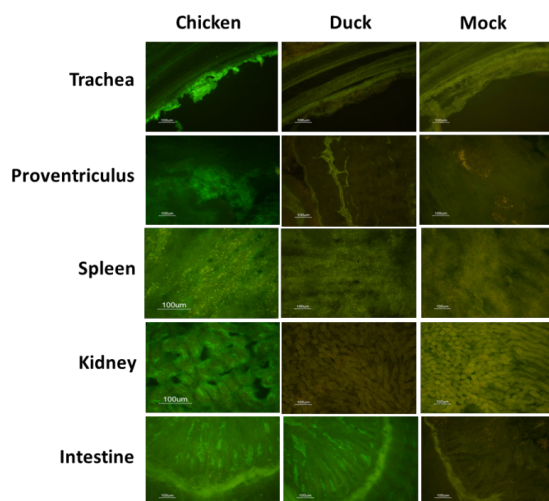


Figure 3. Virus histochemistry. Binding of virus particles to epithelial cells of selected chicken and duck tissues. Binding was detected with a monoclonal antibody against AvCoV nucleoprotein. Mock represented duck tissues incubated with PBS.

to the lineages. Arrow and Circles indicate AvCoV genotypes of the field isolates from this study.

For genetic diversity of the AvCoVs, recombination among AvCoV-IBV, coupled with point mutation, insertion, and deletion occurred in the genome especially in the S1 protein, is thought to contribute to the emergence of new variants (Hewson et al., 2014). The recombination events have already been demonstrated in AvCoV-chicken isolates in Thailand (Pohuang et al., 2011). This study, we could not find the recombination of duck isolates with other AvCoV genotypes. These viruses might already be present in such area either in chickens or other bird species including ducks.

For virus histochemistry, it has been reported that virus attachment to host tissues resembles the pathogenicity of virus infection in avian species (Costa

et al., 2012; Mork et al., 2014; Wickramasinghe et al., 2011). The binding property in chicken tissues from our study was also comparable to that of previously reported pathogenicity in chicken, undoubtedly. But more interestingly, the QX attachment was found only to duck small intestinal epithelium. This might be implied that there are receptors for AvCoVs located in the intestinal epithelium of ducks. The proposed protein receptors have well been reported (Masters, 2006). Protein receptor among *Gammacoronaviruses* has not yet been recognized but the alpha (2,3)-linked sialic acid is so far known to be a sugar receptor for AvCoVs (Promkuntod et al., 2014; Wickramasinghe et al., 2011; Winter et al., 2006). Avian intestinal epithelium contains rich of mucus-producing goblet cells that have already been shown to accommodate the alpha (2,3)-linked sialic acid (Wickramasinghe et al., 2011).

Our study suggests that duck might be a carrier for AvCoVs. In natural circumstance, ducks may get infection from chickens or even the viruses may enter to the internal system of ducks. Then the viruses are capable of attaching to the susceptible epithelia in the intestine, thereby subsequent spread of the viruses via feces may occur. Moreover, AvCoV transmission either to other ducks in the same flock or to other bird species is also possible.

Conclusions and recommendations

Recently, the contribution of avian species other than poultry to the transmission of AvCoVs has been reported worldwide. Here, we report the first case of AvCoVs in ducks that were raised in the south of Thailand indicating the evidence of AvCoVs in avian species other than chickens. Therefore, AvCoV circulation in those birds needs to be discovered, whether the circulating viruses are of chicken origins or they exist naturally in other birds. Ultimately, continual identification of AvCoVs in duck and other birds should be considered. As well as, pathogenicity study in ducks should also be further investigated if

this bird species might play an important role in AvCoV transmission.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge director of Veterinary Research and Development Center (VRDC, Upper Southern Region) for research support. We also would like to thank staff members of Virology and Molecular laboratory of the VRDC from both Upper Southern Region and Lower Northern Region for excellent technical assistance.

References

- Adzhar, A., Shaw, K., Britton, P. and Cavanagh, D. 1996. Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 25(4): 817–836.
- Antarasena, C., Thongmee, S., Nuansrichay, B. and Intarasarn, M. 2008. S1 glycoprotein gene analysis of avian infectious bronchitis virus strains isolated in southern Thailand. *Kasetsart Vet. Bangkok, Thailand.* pp. 147-150.
- Cavanagh, D. 2005. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* 34(6): 439-448.
- Cavanagh, D. and Gelb, J. Jr. 2008. Infectious bronchitis. In Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan and D.E. Swayne, eds. *Diseases of poultry* 12th ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, U.S.A. pp. 117–135.
- Chen, G.Q., Zhuang, Q.Y., Wang, K.C., Liu, S., Shao, J.Z., Jiang, W.M., Hou, G.Y., Li, J.P., Yu, J.M., Li, Y.P. and Chen, J.M. 2013. Identification and survey of a novel avian coronavirus in ducks. *PLoS One.* 8(8): e72918.
- Chu, D.K.W., Leung, C.Y.H., Gilbert, M., Joyner, P. Ng, E.M., Tsemay, M.T., Guan, Y., Peiris, J.S.M. and Poon, L.L.M. 2011. Avian coronavirus in wild aquatic birds. *J. Virol.* 85(23): 12815-12820.
- Chindavanig, P. 1962. Studies on the attenuated on infectious bronchitis virus. *J. Thai Vet. Med. Assoc.* 12: 1–7.
- Costa, T., Chaves, A.J., Valle, R., Darji, A., van Riel, D., Kuiken, T., Majó, N. and Ramis, A. 2012. Distribution patterns of influenza virus receptors and viral attachment patterns in the respiratory and intestinal tracts of seven avian species. *Vet. Res.* 43(1): 28.
- Ducatez, M.F. 2016. Recommendations for a standardized avian coronavirus (AvCoV) nomenclature: outcome from discussions within the framework of the European

- Union COST Action FA1207: “towards control of avian coronaviruses: strategies for vaccination, diagnosis and surveillance”. *Avian Pathol.* 45(5): 602-603.
- Hewson, K.A., Noormohammadi, A.H., Devlin, J.M., Browning, G.F., Schultz, B.K. and Ignjatovic, J. 2014. Evaluation of a novel strain of infectious bronchitis virus emerged as a result of spike gene recombination between two highly diverged parent strains. *Avian pathol.* 43(3): 249-257.
- Ito, N.M.K., Miyaji, C.I. and Capellaro, C.E.M.P.D.M. 1991. Studies on broiler’s IBV and IBV-like from guinea fowl, In Kaleta, E.F. and Heffels-Redmann, U. Proceedings edition II: *International Symposium on Infectious Bronchitis*. Giessen: Justus-Leibig University, Germany. pp. 302–307.
- Jackwood, M.W. 2012. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* 56(4): 634–641.
- Jonassen, C.M., Kofstad, T., Larsen, I.L., Løvland, A., Handeland, K., Follestad, A. and Lillehaug, A. 2005. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *J. Gen. Virol.* 86(6): 1597-607.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7): 1870-1874.
- Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. and Muhire, B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1(1): vev003.
- Masters, P. 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66: 193-292.
- Mork, A-K., Hesse, M., Abd El Rahman, S., Rautenschlein, S., Herrler, G. and Winter, C. 2014. Differences in the tissue tropism to chicken oviduct epithelial cells between avian coronavirus IBV strains QX and B1648 are not related to the sialic acid binding properties of their spike proteins. *Vet. Res.* 45(1): 67.
- Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A. and Sasipreeyajan, J. 2009. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand. *J. Vet. Sci.* 10(3): 219–223.
- Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A. and Sasipreeyajan, J. 2011. Sequence analysis of S1 genes of infectious bronchitis virus isolated in Thailand during 2008–2009: identification of natural recombination in the field isolates. *Virus Genes.* 43(2): 254-260.
- Promkuntod, N., Van Eijndhoven, R.E.W., De Vrieze, G., Gröne, A. and Verheije, M.H. 2014. Mapping of the receptor-binding domain and amino acids critical for attachment in the spike protein of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology.* 448: 26-32.
- Promkuntod, N., Thongmee, S. and Yoidam, S. 2015. Analysis of the S1 gene of the avian infectious bronchitis virus (IBV) reveals changes in the IBV genetic groups circulating in southern Thailand. *Res. Vet. Sci.* 100: 299-302.
- Promkuntod, N. 2016. Dynamics of avian coronavirus circulation in commercial and non-commercial birds in Asia—a review. *Vet. Quart.* 36(1): 30-44.
- Qian, D.H., Zhu, G.J., Wu, L.Z. and Hua, G.X. 2006. Isolation and characterization of a coronavirus from pigeons with pancreatitis. *Am. J. Vet. Res.* 67: 1575–1579.
- Reddy, V.R., Trus, I., Desmarests, L.M., Li, Y., Theuns, S. and Nauwynck, H.J. 2016. Productive replication of nephropathogenic infectious bronchitis virus in peripheral blood monocyctic cells, a strategy for viral dissemination and kidney infection in chickens. *Vet. Res.* 47(1): 70.
- Sun, L., Zhang, G., Jiang, J., Fu, J., Ren, T., Cao, W., Xin, C. Liao, M. and Liu, W. 2007. A Massachusetts prototype like coronavirus isolated from wild peafowls is pathogenic to chickens. *Virus Res.* 130(1-2): 121–128.
- Tanabe, A.S. 2007. Kakusan: a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Mol. Ecol. Resour.* 7(6): 962-964.
- Tiensin T. 2011. Epidemiology and control of avian influenza H5N1 virus in Thailand. [PhD dissertation] Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, 149 p.
- Wickramasinghe, I.N.A., de Vries, R.P, Gröne, A., de Haan, C.A.M., Verheije, M.H. 2011. Binding of avian coronavirus spike proteins to host factors reflects virus tropism and pathogenicity. *J. Virol.* 85(17): 8903-8912.
- Winter, C., Schwegmann-Weßels, C., Cavanagh, D., Neumann, U. and Herrler, G. 2006. Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian Infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.* 87(5): 1209-1216.
- Yudong, W., YongLin, W., Zichun, Z., GenChe, F., Yihai, J., Xiang, L., Jiang, D. and Shushuang, W. 1998. Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chin. J. Anim. Quarantine.* 15: 1-3.
- Zhuang, Q.Y., Wang, K.C., Liu, S., Hou, G.Y., Jiang, W.M., Wang, S.C., Li, J.P., Yu, J.M. and Chen, J.M. 2015. Genomic analysis and surveillance of the coronavirus dominant in ducks in China. *PLoS One*, 10(6): e0129256.

การวินิจฉัยแยกโรกระหว่างโรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อและโรคฝีดาษเปือกในไก่ โดยวิธี multiplex PCR

นฤพล พร้อมขุนทด^{1*} ขวัญศนี สุขเนาว์² ขนิษฐา รัตนบุรี²

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: ไก่ที่ติดเชื้อไวรัสกล่องเสียงอักเสบติดต่อ (infectious laryngotracheitis virus, ILTV) และเชื้อไวรัสฝีดาษเปือก (fowlpox virus, FPV-wet form) จะพบรอยโรคที่คล้ายคลึงกันโดยมีลักษณะเนื้อตายแบบ diphtheritic lesion ที่บริเวณทางเดินหายใจส่วนต้นโดยเฉพาะที่หลอดลมและในผนังช่องปาก การศึกษาค้นคว้านี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยแยกโรคที่เกิดจากเชื้อ ILTV และ FPV ออกจากกันโดยวิธี single-step multiplex PCR

วิธีการ: ใช้ตัวอย่างเชื้อไวรัสอ้างอิงและเชื้อไวรัสที่แยกได้จากท้องที่ ILTV และ FPV นำมาแยกเชื้อโดยการฉีดเข้าไปในไข่ไก่ฟักอายุ 9 วัน ทาง chorioallantoic membrane (CAM) ตรวจดูรอยโรค pock lesions บน CAM และเปรียบเทียบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ทำการตรวจหาชิ้นส่วน thymidine kinase สำหรับเชื้อ ILTV และชิ้นส่วน 4b core protein ของเชื้อ FPV จากตัวอย่าง CAM ของไข่ไก่ฟักที่ฉีดเชื้อไวรัสทั้งสองโดยวิธี multiplex PCR

ผล: ตรวจพบ pock lesions ที่เกิดจากการฉีดเชื้อไวรัส ILTV และ FPV ที่มีขนาดแตกต่างกัน รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบ intranuclear inclusions ในเนื้อเยื่อ CAM ที่ติดเชื้อไวรัส ILTV ส่วน CAM ที่ติดเชื้อ FPV ตรวจพบ intracytoplasmic inclusions ส่วนผลผลิตดีเอ็นเอจาก CAM ที่ติดเชื้อ ILTV มีขนาด 395 bp และ/หรือ 647 bp ในขณะที่เชื้อ FPV มีขนาดของแถบดีเอ็นเอ 579 bp บน agarose gel electrophoresis

สรุป: จากผลการศึกษาสามารถแยกเชื้อไวรัสทั้งสองออกจากกันได้จากตัวอย่าง infected-CAMs ที่ติดเชื้อ ILTV และเชื้อ FPV โดยการนำวิธี multiplex PCR มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแยกโรคทั้งสอง ซึ่งทำได้ง่าย ใช้ระยะเวลาการตรวจเพียง 1-3 วัน จากตัวอย่างโดยตรง สามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกในการวินิจฉัยแยกโรค ซึ่งแบบเดิมใช้วิธีทางจุลพยาธิวิทยา

คำสำคัญ ไวรัสกล่องเสียงอักเสบติดต่อ ไวรัสฝีดาษ ไก่ multiplex PCR การวินิจฉัยแยกโรค

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือ (ตอนล่าง) อ.วังทอง จ.พิษณุโลก 65130

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ (ตอนบน) อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110

* ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์และโทรสาร 055 313137 055 313139 อีเมลล์ naruepolp@dld.go.th

Differential diagnosis of avian infectious laryngotracheitis and diphtheritic form of fowlpox by multiplex PCR

Naruepol Promkuntod^{1*} Khwansanee Suknao² Khanistar Rattanaburee²

Abstract

Background: Infectious laryngotracheitis virus (ILTV) and wet form of fowlpox virus (FPV) cause diphtheritic lesions in the upper respiratory tract in chickens especially in trachea and buccal cavity. For this study, we aimed at developing a single-step multiplex PCR diagnosis to differentiate these two causative viruses.

Methods: The reference and the field isolates, ILTVs and FPVs, were inoculated on chorioallantoic membrane (CAM) of 9-day-old embryonated chicken eggs for virus isolation. Pock lesions and histopathological examination of infected CAMs were observed and compared between two virus infections. Thymidine kinase gene was used as specific gene detection for Gallid herpesvirus-1 ILTV while 4b core protein gene was used for detection of the FPV envelope glycoprotein G obtained from infected CAMs inoculated with ILTV and FPV by multiplex-PCR.

Results: Various sizes of pock lesions were detected both from ILTV- and FPV-infected CAMs. Intranuclear inclusions were observed in epithelial cells of ILTV-infected CAMs while intracytoplasmic inclusions were found in CAMs infected with FPV. A 395-bp and/or a 647-bp DNA product of ILTV thymidine kinase gene could be distinguished from a 579-bp DNA product of FPV 4b core protein gene by agarose gel electrophoresis.

Conclusions: As a result, ILTV and FPV can be separated on agar gel electrophoresis by a multiplex PCR. It is an easy technique and a useful tool in order to differentiate both viruses within 1-3 days from direct samples. This can eventually be an alternative test compared to that of histopathological findings.

Keywords: Infectious laryngotracheitis virus, fowlpox virus, chickens, multiplex PCR, differential diagnosis

Veterinary Research and Development Center (Lower Northern Region), Phitsanulok 65130

² Veterinary Research and Development Center (Upper Southern Region), Nakhon Si Thammarat, 80110

* Corresponding author Tel. and Fax. +66 55 313137 +66 55 313139; email: naruepolp@dld.go.th

บทนำ

โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนต้นที่เป็นปัญหาสำคัญในการเลี้ยงไก่ นอกจากโรคนิวคาสเซิล และโรคไขหวัดนกแล้วยังมีโรคอื่นๆที่สร้างความเสียหายในฟาร์มไก่ได้ เช่น โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ โรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อในไก่ และโรคฝีดาษเป็กในไก่ ฯลฯ โรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อในไก่เกิดจากเชื้อ Gallid herpesvirus type 1 (infectious laryngotracheitis virus, ILTV) (Garcia et al., 2013) เชื้อ ILTV อาจก่อปัญหารุนแรงในไก่ได้เนื่องจากอัตราการตายซึ่งอาจสูงถึง 70% และไก่มีผลผลิตไข่ลดลง อาการของโรคขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อไวรัส ชนิดไม่รุนแรงพบไก่อาพาธหายใจและอาจมีเลือดปนจากโพรงจมูก เยื่อตาอักเสบ ไข่ลด ส่วนอาการชนิดรุนแรง พบหายใจลำบากและมีเลือดปนออกมาจากหลอดลม พบการอักเสบของหลอดลมชนิด diphtheritic form โดยเป็นแผ่นเนื้อตายตามความยาวของหลอดลม ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับโรคฝีดาษเป็กในไก่ (fowlpox,) (Tripathy and Reed, 2013)

โรคฝีดาษในไก่เกิดจากเชื้อ fowlpox virus (FPV) เป็นโรคที่เกิดขึ้นได้บ่อยโดยเฉพาะในไก่พื้นเมืองที่เลี้ยงแบบปล่อยหลังบ้านซึ่งมีการสุขาภิบาลไม่ดีและไม่ได้รับวัคซีน ส่วนในไก่ไข่อาจพบมีไข่ลดร่วมด้วย โรคที่เกิดขึ้นได้สองชนิด คือ ชนิดแห้ง (dry or cutaneous form) และชนิดเปียก (wet or diphtheritic form) โดยที่ชนิดแห้งมักพบรอยโรคแบบตุ่มนูนที่บริเวณผิวหนังส่วนที่ไม่มีขน อาจมีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน จนเกิดตุ่มหนอง ขณะที่รอยโรคแบบชนิดเปียกจะพบลักษณะคล้ายกับรอยโรคของโรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อที่พบได้บริเวณหลอดลม เยื่อหุ้มบริเวณทางเดินหายใจส่วนต้นและช่องปาก (Tripathy and Reed, 2013)

รอยโรคที่เกิดจากโรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อและโรคฝีดาษเป็กในไก่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน ทำให้ไม่สามารถวินิจฉัยแยกโรคโดยดูจากลักษณะอาการและการตรวจดูรอยโรคด้วยตาเปล่าได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบโรคทั้งสองร่วมกัน (Davidson et al., 2015; Diallo et al., 2010; Tadese et al., 2007; Tripathy et al., 1975) ในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อตั้งแต่ปี พ.ศ. 2505 (Sananvoravej, 1963) ส่วนโรคฝีดาษในประเทศไทยพบได้ประปรายโดยเฉพาะโรคฝีดาษชนิดแห้ง

นอกจากนี้ยังพบได้ในสัตว์ปีกชนิดอื่นๆ เช่น นกกระทาและเป็ด กากี (Promkuntod et al., 2001; Promkuntod et al., 2002) โดยมีแมลงดูดเลือด เช่น ยุง เป็นพาหะสำคัญในการติดเชื้อ (Promkuntod et al., 2001; Tripathy and Reed, 2013)

การวินิจฉัยแยกโรคทำได้โดยการตรวจดูชนิดของ inclusion bodies โดยเซลล์ที่ติดเชื้อ ILTV จะพบ intranuclear inclusions และพบ intracytoplasmic inclusions ในเซลล์ที่ติดเชื้อ FPV สามารถดูชนิดของ inclusion bodies จากรอยโรคได้โดยตรงด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยาซึ่งอาจใช้เวลาเพียง 3 วัน แต่ปัญหาที่พบส่วนใหญ่คือ ตัวอย่างส่งตรวจไม่เหมาะสมหรือเนื้อเยื่อถูกทำลายมากจึงอาจตรวจไม่พบ inclusion bodies นอกจากนี้อาจทำการแยกเชื้อโดยการฉีดไข่ไก่ฟักแล้วตรวจดูชนิดของ inclusion bodies จากหย่อมเนื้อตาย (pock lesion) บน chorioallantoic membrane (CAM) ซึ่งการตรวจอาจใช้เวลา 7-10 วัน ในปัจจุบันเทคนิค PCR และ multiplex PCR เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคต่างๆ โดยสามารถเลือกใช้ไพรเมอร์ที่สามารถตรวจหาชนิดที่มีความจำเพาะกับทั้งเชื้อ ILTV และ FPV ได้และมีความรวดเร็ว

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการนำเทคนิค multiplex PCR มาใช้ในการวินิจฉัยแยกโรคระหว่างโรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อและโรคฝีดาษเป็กในไก่ ซึ่งมีอาการและรอยโรคที่คล้ายคลึงกัน เพื่อให้การตรวจวินิจฉัยแยกโรคมีความสะดวก รวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำ

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อไวรัส

ใช้เชื้อ ILTV 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ ILTV T-20 เชื้อท้องที่ ILTV CH/NK328/35 และ ILTV CH/NK992/45 ส่วนเชื้อ FPV 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อท้องที่ FPV CH/NK691/41, FPV CH/NK805964/59 และ FPV CH/NK1282/42 เชื้อ ILTV และ FPV เป็นเชื้อไวรัสควบคุมบวกที่ได้จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน โดยผ่านการแยกเชื้อไวรัสโดยวิธีฉีดไข่ไก่ฟักและพิสูจน์เชื้อไวรัสโดยวิธีจุลพยาธิวิทยาและตรวจดูอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน นำเชื้อ ILTV และ FPV แต่ละสายพันธุ์มาฉีดเข้าไข่ไก่ฟักทาง CAM เพื่อตรวจหารอยโรคบน CAM และนำ CAM มาตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยวิธี PCR และ multiplex PCR

Table 1. PCR primers used for molecular diagnosis of ILTV and FPV.

Viruses	Target sequences	Primers	Sequences (5' → 3')	Product size (bp)	References
GaHV-1	Thymidine kinase gene	ILT GaHV-1 FW	ACG ATG ACT CCG ACT TTC	395	Magouz, 2015
		ILT GaHV-1 RV	CGT TGG AGG TAG GTG GTA		Pang et al., 2002
GaHV-1	Thymidine kinase gene	ILT TK FW	ACC TAC CTC CAA CGT ACA T	647	Diallo et al., 2010
		ILT TK RV	CCC ATA TCA GCA TTC TAG CG		
FPV	4b core protein gene	Pox 4b FW	TCA GCA GGT GCT AAA CAA CA	579	Lee et al., 1997
		Pox 4b RV	CGG TAG CTT AAC GCC GAA TA		

การแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อ ILTV และ FPV

การแยกเชื้อไวรัสเข้าไขไก่ฟัก

แบ่งกลุ่มการทดลองฉีดเชื้อไวรัสดังนี้ กลุ่มที่ 1 ฉีดเชื้อ ILTV กลุ่มที่ 2 ฉีดเชื้อ FPV กลุ่มที่ 3 ฉีดเชื้อ ILTV CH/NK328/35 และ FPV CH/NK691/41 กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุมลบ ฉีดสารละลาย PBS เข้าไขไก่ฟัก โดยในแต่ละกลุ่มทำการฉีดตัวอย่างเชื้อไวรัสละ 5 ฟอง ฉีดตัวอย่างเชื้อไวรัสเข้าไขไก่ฟักที่อายุ 9 วัน ลงบน CAM ปริมาณ 0.1 ml ต่อฟอง นำเข้าตู้ฟักที่อุณหภูมิ 37°C แล้วส่องตรวจดูความผิดปกติของไขไก่ฟักนาน 7 วัน จากนั้นนำไขฟักแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 4-6 ชั่วโมง ตามวิธีการของ World Organisation for Animal Health (OIE, 2014, 2016) และ Policy for use of avian embryos (Florida State University, 2005) ตรวจดูรอยโรค pock lesion บน CAM (OIE, 2014, 2016; Tripathy, 1998; Tripathy and Reed, 1998) การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่อนานทางวิทยาศาสตร์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ รหัสโครงการ EA-008/61 (R)

การตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

นำ infected CAM จากไขไก่ฟักหลังฉีดเชื้อที่พบ pock lesion ล้างด้วย PBS แล้วแช่ใน 10% buffered formalin นาน 24 ชั่วโมง เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำ CAM มาแช่ในเอทานอล 70% นาน 24 ชั่วโมง และนำเนื้อเยื่อไปตัดแต่งผ่านขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา และเตรียมเป็นสไลด์ย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี Hematoxylin & Eosin (H&E) นำไปตรวจดูรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Tripathy, 1998; Tripathy and Reed, 1998)

การตรวจโดยวิธี PCR และ multiplex PCR

นำ infected CAM ที่พบ pock lesion มาบดทำเป็น 10% (w/v) tissue suspension ปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 3,000 rpm ที่ 4°C นาน 5 นาที แยกเอาน้ำใส ส่วนบน (supernatant) มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Viral DNA Kit (Omega Bio-Tek, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต เพื่อตรวจหาชิ้นส่วน thymidine kinase gene ซึ่งเป็นส่วนของ DNA polymerase gene ของ Gallid Herpesvirus-1 (GaHV-1) สำหรับเชื้อ ILTV และตรวจหาชิ้นส่วนของโปรตีนโครงสร้างส่วน 4b core protein gene สำหรับเชื้อ FPV (Table 1)

ส่วนผสม master mix ในการทำปฏิกิริยา PCR ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ (Table 1) ปริมาตรรวม 20 µl โดยใช้ชุด Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Germany) ซึ่งประกอบด้วย 10x buffer ปริมาตร 2.0 µl, 10 mM dNTPs ปริมาตร 0.4 µl, 50 mM MgCl₂ ปริมาตร 0.6 µl, 0.2 µM forward primer ปริมาตร 0.4 µl, 0.2 µM reverse primer ปริมาตร 0.4 µl, Platinum Taq ปริมาตร 0.08 µl, DEPC water ปริมาตร 14.12 µl และ DNA template ปริมาตร 2.0 µl

สำหรับส่วนผสม mater mix ในการทำ multiplex PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ 2 คู่ (เพื่อแยกแยะระหว่างเชื้อ ILTV และ FPV) ปริมาตรรวม 25 µl ดังนี้ 10x buffer ปริมาตร 2.5 µl, 10 mM dNTPs ปริมาตร 0.5 µl, 50 mM MgCl₂ ปริมาตร 0.75 µl สามารถเลือกใช้ไพรเมอร์สำหรับเชื้อ ILTV ได้แก่ 0.2 µM ILT GaHV-1 FW และ 0.2 µM ILT GaHV-1 RV หรือใช้ 0.2 µM ILT TK FW และ 0.2 µM ILT TK RV ปริมาตรละ 0.5 µl ส่วนไพรเมอร์ของเชื้อ FPV ใช้ 0.2 µM Pox 4b FW และ 0.2 µM Pox 4b RV ปริมาตรละ 0.5 µl, Platinum Taq ปริมาตร 0.1 µl, DEPC water ปริมาตร 16.65 µl และ DNA

template ปริมาตร 2.5 µl ในกรณีที่ใช้ชุดไพรเมอร์ทั้งสามชุด ให้ปรับปริมาตรของ DEPC water เพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 25 µl นำส่วนผสมดังกล่าวเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสาร

พันธุกรรมภายใต้สภาวะที่ทำการปฏิกิริยา PCR และ multiplex PCR ดังนี้ ขั้นตอน pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 1 นาที ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 45 วินาที และขั้นตอน extension ที่ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย ขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 7 นาที นำผลผลิต PCR มาเปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดบน 2% agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย 0.5 µg/ml ethidium bromide แล้วตรวจดูผลภายใต้แสง UV

การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

ใช้เชื้อ herpes virus ในกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ เชื้อไวรัสมาเร็กซ์ (Gallid herpesvirus 2 หรือ Marek's disease virus 1, MDV-1) (Maiya et al., 1998) และเชื้อไวรัสกากาโรเซบีด (Anatid herpesvirus 1, duck viral enteritis) (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก)

การทดสอบความไว (sensitivity)

ทดสอบปริมาณของไวรัสดีเอ็นเอในระดับที่สามารถตรวจสอบได้บน agarose gel electrophoresis ประกอบด้วย การเตรียม DNA template โดยทำการเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า ซึ่งใช้ปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ ILTV และ FPV ตั้งแต่ 10 pg ถึง 10^{-6} pg ในการทดสอบ ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมวิธีเดียวกับที่กล่าว ข้างต้นใน 1X PCR buffer โดยใช้ Sheared Salmon Sperm DNA (SSS DNA) (Invitrogen, Germany) ที่มีความเข้มข้น 2 ng/µl เป็น carrier DNA เพื่อลดผลกระทบของ plastic charge และเพื่อให้ได้ค่า repeatability ที่ดีและมีความถูกต้องในกรณีที่ทำการเจือจางดีเอ็นเอปริมาณน้อยๆ วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Qubit Fluorometric Quantitation (Invitrogen, USA) ด้วยชุด Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, USA)

ผลและวิจารณ์

ผลการแยกเชื้อ ILTV และ FPV ในไขไก่ฟัก

หลังการฉีดเชื้อ ILTV สายพันธุ์ T-20 ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของ CAM ของไขไก่ฟัก โดยพบหย่อมเนื้อตายมีสีขาวออกเหลือง (yellowish pocks) ลักษณะกลม รี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มม. ขณะที่ CAM ที่ติดเชื้อ ILTV CH/

NK328/35 พบการหนาตัวร่วมกับการเกิด plaque ขนาดใหญ่ ส่วนการติดเชื้อ ILTV CH/NK992/45 พบ CAM บวมน้ำและ มีปื้นเลือดออก (Figure 1: A-1, A-2, A-3)

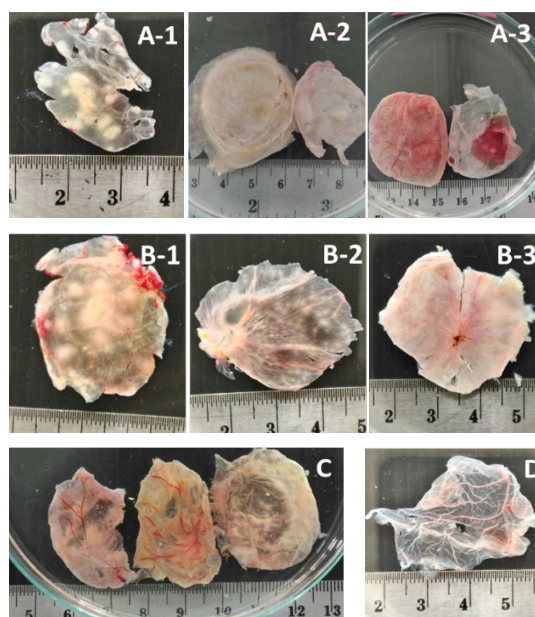


Figure 1. Variety of pock formation from CAMs inoculated with different isolates of ILTV, FPV and co-infected FPV&ILTV at 5-7 days p.i.

- A. ILTV-infected CAMs. A-1. ILTV T-20 strain, A-2. ILT CH/NK328/35, A-3. ILT CH/NK992/45
- B. FPV-infected CAMs. B-1. CH/NK691/41, B-2. CH/NK805964/59, B-3. CH/NK1282/42
- C. FPV and ILTV co-infected CAMs.
- D. Uninfected CAM.

ส่วนการฉีดเชื้อ FPV CH/NK691/41 พบ CAM มีลักษณะบวมน้ำและพบหย่อมเนื้อตายลักษณะกลมรี สีเทาหรือขาวขุ่น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มม. ในส่วน CAM ที่ติดเชื้อ FPV CH/NK805964/59 พบ pocks มีขนาดเล็กจำนวนมาก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มม. กระจายอยู่ทั่ว CAM ขณะที่ CAM ที่ติดเชื้อ FPV CH/NK1282/42 พบ pock หนาแน่นจนรวมเป็นเนื้อเดียวกัน (Figure 1: B-1, B-2, B-3) ลักษณะรอยโรคของ CAM ที่ติดเชื้อร่วม ILTV และ FPV พบ CAM หนาตัวและบวม น้ำเกิด plaque ขนาดใหญ่ (Figure 1C) ลักษณะของ CAM ที่ปกติแสดงไว้ใน Figure 1D

ผลการตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

จุลพยาธิวิทยาของ ILTV-infected CAM พบการหนาตัวในส่วนของเยื่อหุ้มทั้งส่วน allantoic membrane, chorionic membrane และ mesenchymal layer (Figure 2: A-1) และ

ตรวจพบ intranuclear inclusions ใน epithelial cells (Figure 2: A-2)

จุลพยาธิวิทยาของ FPV-infected CAM พบการหนาตัวของเยื่อโดยเฉพาะในส่วนของ chorionic epithelium ภายใน epithelial cells เกิด ballooning degeneration และพบ eosinophilic intracyto-plasmic inclusion bodies ซึ่งเรียกชื่อว่า Bollinger bodies อยู่ภายในไซโตพลาสซึม เป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์ที่ติดเชื้อ poxvirus (Figure 2: B-1, B-2)

จุลพยาธิวิทยาของ CAM ที่ติดเชื้อร่วม ILTV และ FPV พบเยื่อหนาตัว บางเซลล์ที่เกิด hyperplasia มีการรวมกันของ

ผนังเซลล์ข้างเคียงเกิดเป็น multinucleated cells และตรวจพบ intranuclear และ intracytoplasmic inclusion bodies ใน epithelial cells นอกจากนี้ยังพบการเกิด destruction และ desquamation ของ epithelial cells ร่วมกับการเกิดการฉีกขาดของ blood capillaries ส่วน CAM ที่ติดเชื้อรุนแรงตรวจพบห่อเนื้อตาย (necrosis) (Figure 2: C-1, C-2, C-3)

ลักษณะของ CAM ที่ปกติประกอบด้วยเยื่อ allantoic membrane, chorionic membrane และ mesenchymal layer ดังแสดงใน Figure 2D

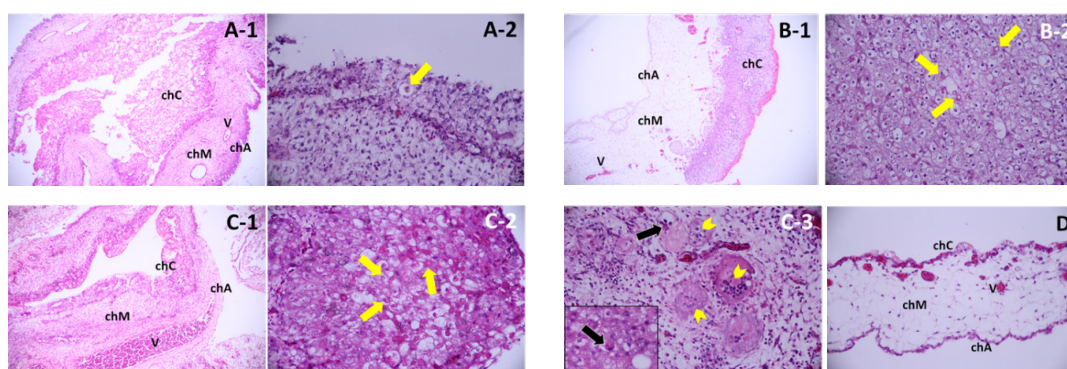


Figure 2. Photomicrographs of infected-CAMs. H&E staining

A-1. ILTV-infected CAM (X100). A-2. Epithelial proliferation containing intranuclear inclusion (yellow arrow) (X400).

B-1. FPV-infected CAM (X100). B-2. Hyperplastic cells (ballooning degeneration) containing eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies (Bollinger inclusions) (arrows) (X400).

C-1. ILTV and FPV co-infected CAM (X100). C-2. Intracytoplasmic inclusions (yellow arrows). C-3. Intracytoplasmic (yellow arrows) and intranuclear (black arrows) inclusions both observed in the infected cells of hyperplastic CAM epithelia. Swelling of epithelial cells and cytoplasmic fusion resulting in formation of multinucleated cells (arrow heads) (X400).

D. Uninfected CAM. CAM consisting of chorionic epithelium (chC), intermediate mesenchymal layer (chM), blood vessels (v) and allantoic epithelium (chA). (X100)

ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ILTV และ FPV

ตรวจพบแถบดีเอ็นเอบน agarose gel electrophoresis ดังนี้ เชื้อ ILTV ทั้งสามตัวอย่าง มีขนาด 395 bp เมื่อใช้ชุดไพรเมอร์ ILT GaHV-1 และขนาด 647 bp สำหรับชุดไพรเมอร์ ILT TK (Figure 3A: lane 1-3 และ Figure 3B: lane 1-3) นอกจากนี้ยังไม่พบแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อไวรัสมาเร็กซ์และเชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ด ที่นำมาทดสอบความจำเพาะของการทดสอบ (Figure 3A lane 4 และ lane 5 และ Figure 3B: lane 4 และ lane 5)

สำหรับเชื้อท้องที่ FPV ทั้งสามตัวอย่าง ตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดผลผลิต 579 bp ซึ่งจำเพาะต่อยีนส่วน 4b core protein (Figure 3C: lane 1-3) และมีขนาดตรงกับเชื้อที่ทดสอบ

สำหรับปฏิกิริยา multiplex-PCR ตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่ให้ขนาดจำเพาะกับชุดไพรเมอร์ที่ทำการทดสอบจากตัวอย่าง CAM ที่ติดเชื้อ ILTV หรือ FPV รวมทั้ง CAM ที่ติดเชื้อ ILTV และ FPV ร่วมกัน (Figure 3D) ส่วนความไวของการทดสอบพบว่าปริมาณของดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอต่อเชื้อไวรัสทั้งสองคือ 10^{-5} pg (Figure 4)

การตรวจดูรอยโรค pock lesions บน CAM หลังการฉีดเชื้อ ILTV และ FPV รวมถึงการติดเชื้อไวรัสร่วมกันนั้น ลักษณะของ pocks อาจมีความคล้ายคลึงกัน ไม่สามารถวินิจฉัยแยกโรคด้วยตาเปล่าได้ อย่างไรก็ตามลักษณะของ pocks อาจมีความแตกต่างกันได้ เช่น ขนาดและสี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ ความรุนแรงและปริมาณของเชื้อไวรัส รวมทั้งการติดเชื้อไวรัสในสัตว์ต่างชนิดกัน (Bolt et al., 1999; Tripathy,

1998) การตรวจวินิจฉัยแยกโรคออกจากกันทางจุลพยาธิวิทยา โดยการตรวจดูลักษณะของ inclusion bodies ที่แตกต่างกัน สามารถทำได้โดยตรงจากรอยโรคที่ตรวจพบจากทางเดินหายใจ และช่องปาก หรือจาก CAM ของไข่ฟักหลังฉีดเชื้อไวรัสโดยที่ การติดเชื้อ ILTV จะตรวจพบ intranuclear inclusion bodies ใน epithelial cells ในระยะแรกประมาณ 1-5 วันหลังการติดเชื้อ หลังจากนั้น inclusions อาจหายไปจน epithelial cells เกิดการเปลี่ยนแปลงและถูกทำลายจนเกิด necrosis (Guy et al., 1992; Purcell, 1971; VanderKop, 1993) ส่วนการตรวจหา inclusion bodies ใน epithelial cells ที่มีการติดเชื้อ FPV สามารถตรวจหา intracytoplasmic inclusions ได้ซึ่งสามารถ วินิจฉัยแยกโรคได้แต่ใช้เวลานานโดยปกติจะพบ pock lesions บน CAM หลังจากฉีดไข่ไก่ฟักประมาณ 5-7 วัน

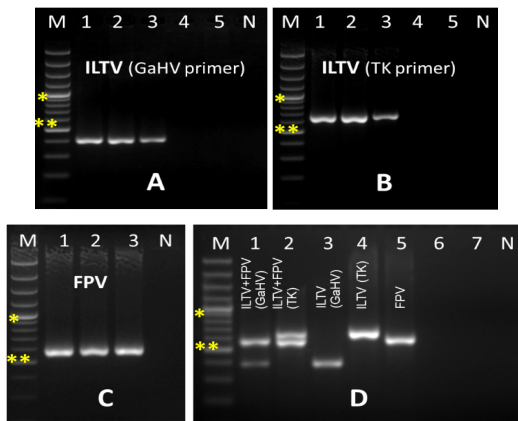


Figure 3. Specificity of PCR and multiplex PCR. PCR amplification of 395bp and 647bp of ILTV TK gene and 579bp of FPV 4b core protein gene obtained from infected samples. A. PCR detection. DNA products of 395bp of ILT GaHV1 primer. 1: ILTV T-20; 2: ILTV CH/NK/328/35; 3: ILTV CH/NK992/45; 4: Gallid herpesvirus 2; 5: Anatid herpesvirus 1. B. PCR detection. DNA products of 647bp of ILT TK primer. 1: ILTV T-20; 2: ILTV CH/NK/328/35; 3: ILTV CH/NK992/45; 4: Gallid herpesvirus 2; 5: Anatid herpesvirus 1. C. PCR detection. DNA products of 579bp of Pox 4b primer. 1: FPV CH/NK691/41; 2: FPV CH/NK805964/59; 3: FPV CH/NK1282/42. D. Multiplex PCR of all genes tested for both ILTV and FPV. 1: FPV (579bp) + ILTV (395bp of ILT GaHV1 primer); 2: FPV (579bp) + ILTV (647bp of ILT TK primer); 3: ILTV (395bp of ILT GaHV1 primer); 4: ILTV (647bp of ILT TK primer); 5: FPV (579bp); 6: Gallid herpesvirus 2; 7: Anatid herpesvirus 1. Lane M: 100bp DNA ladder (** = 500bp; * = 1Kb; Lane N: negative control

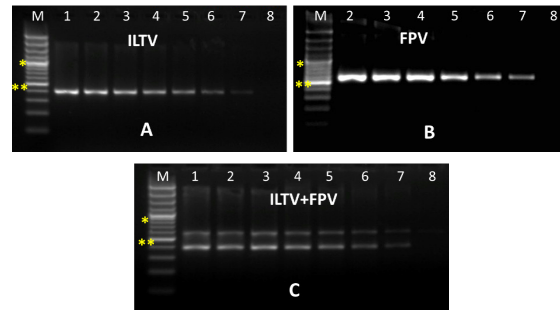


Figure 4. Sensitivity of PCR and multiplex PCR. A. DNA products of 395bp of ILT GaHV1 primer. B. DNA products of 579bp of Pox 4b primer. C. DNA products of 395bp of ILT GaHV1 primer and 579bp of Pox 4b primer. Lane M: 100 bp DNA ladder (** = 500 bp; * = 1Kb); Lane 1: 10 pg of DNA each of 395 bp of ILT GaHV1 primer and 579 bp of Pox 4b primer; Lane 2: 1 pg; Lane 3: 0.1 pg; Lane 4: 10-2 pg 10 fg; Lane 5: 10-3 pg; Lane 6: 10-4 pg; Lane 7: 10-5 pg; Lane 8: 10-6 pg

วิธีการวินิจฉัยโรคกล้องเสียงอกเสียดติดต่อและโรคฝีดาษ เปียกในไก่ตามวิธีของ OIE คือการดูรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา และการตรวจหาชนิดของ inclusion bodies เพื่อแยกเชื้อไวรัส ทั้งสอง แต่การตรวจหาสารพันธุกรรมต่อเชื้อ ILTV และ FPV เป็นวิธีการวินิจฉัยแยกโรคที่สามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่ง ทำให้ลดระยะเวลาการตรวจลง อีกทั้งการเลือกใช้ชุดไพรเมอร์ ที่จำเพาะต่อยีนของเชื้อไวรัสนั้นๆ ทำให้ผลการวินิจฉัยโรคมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น มีรายงานการตรวจหาสารพันธุกรรมต่อเชื้อ ILTV โดยนิยมตรวจหาในส่วน thymidine kinase gene (Magouz, 2015; Pang et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีการ ตรวจหาในส่วนอื่นๆ ได้แก่ ส่วน conserved region ของ infected cell protein 4 gene (ICP4 gene) (Chacon and Ferreira, 2009) หรือตรวจหาในส่วน p32 gene ซึ่งเป็นส่วนของ surface glycoprotein (Sivaseelan et al., 2014) สำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมต่อเชื้อ FPV นิยมตรวจหาในส่วน 4b core protein gene ซึ่งเป็นส่วน envelope glycoprotein-G (Lee and Lee, 1997) ซึ่งยีนเหล่านี้เป็นโปรตีน โครงสร้างที่สำคัญที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจแยกชนิดของเชื้อ ILTV และ FPV สำหรับการตรวจวินิจฉัยแยกโรคโดยใช้วิธี multiplex PCR มีข้อแนะนำคือควรเลือกใช้ขนาดของยีนที่ให้ ผลผลิตของสายดีเอ็นเอให้มีขนาดต่างกันไม่น้อยกว่า 100 bp จะทำให้สามารถตรวจดูแถบดีเอ็นเอบน agarose gel electrophoresis ได้ง่ายและมองเห็นด้วยตาเปล่าชัดเจนภายใต้แสง UV

การศึกษาความจำเพาะของวิธี PCR และ multiplex PCR พบว่าไพรเมอร์ที่เลือกใช้มีความจำเพาะต่อเชื้อ ILTV ซึ่ง

เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่ม GaHV-1 และไม่สามารถตรวจพบได้ในเชื้อ herpes virus อื่นๆ ส่วนการทดสอบความไวของวิธี PCR และ multiplex PCR สามารถตรวจดูแถบดีเอ็นเอได้โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดไม่น้อยกว่า 10^{-5} pg ดังนั้นวิธีการทดสอบในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทางไวรัสวิทยาที่มีเครื่องมือพื้นฐานด้านชีวโมเลกุล โดยอาจตรวจจากตัวอย่างโดยตรงที่มีรอยโรคที่สงสัยว่าติดเชื้อ ILTV และ FPV รวมถึงการตรวจวินิจฉัยแยกโรคภายหลังการฉีดตัวอย่างเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟักเข้าทาง CAM

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยแยกโรคกล้องเสียงอักเสบติดต่อและโรคฝีดาษเป็ยกในไก่โดยวิธี multiplex PCR เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ซึ่งหากทำการตรวจจากตัวอย่างรอยโรคโดยตรงโดยวิธี multiplex PCR นี้จะใช้เวลาในการตรวจเพียง 1 วัน หรือหากตรวจจากรอยโรค pocks จะใช้เวลาประมาณ 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาซึ่งต้องใช้เวลาไม่น้อยกว่า 10 วันหลังการฉีดไข่ไก่ฟัก ถึงแม้ว่าการตรวจจากตัวอย่างรอยโรคโดยตรงทางจุลพยาธิวิทยาซึ่งใช้เวลาเพียง 3 วัน แต่ในบางครั้งอาจไม่พบ inclusion body เนื่องจากเซลล์ถูกทำลาย แต่วิธี multiplex PCR เป็นการตรวจหาชนิดที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ ILTV และ FPV สามารถวินิจฉัยแยกโรคไปพร้อมๆ กันได้ในเวลาเดียวกัน ให้ผลการตรวจที่มีความแม่นยำ และมีความไวต่อการทดสอบสูง ดังนั้น จึงอาจใช้เป็นทางเลือกในการวินิจฉัยแยกโรคในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือพื้นฐานทางชีวโมเลกุล ส่งผลให้เกิดการวางแผนควบคุมป้องกันโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สว.ญ. ช้องมาศ อันตรเสน ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ (ศวพ.) ภาคตะวันตก ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ด นายชัยณรงค์ กุลฉิม นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ ศวพ. ภาคเหนือตอนล่าง ที่ให้คำแนะนำทางด้านเทคนิคทางชีวโมเลกุล และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาและพยาธิวิทยา ศวพ. ภาคใต้ตอนบน และ ศวพ. ภาคเหนือตอนล่าง สำหรับการเตรียมตัวอย่างทดสอบและช่วยเหลือให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Bolte, A.L., Meurer, J. and Kaleta, E.F. 1999. Avian host spectrum of avipoxviruses. *Avian Pathol.* 28: 415-432.
- Chacon, J.L. and Ferreira, A.J. 2009. Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. *Vaccine.* 27: 6731-6738.
- Davidson, I., Raibstein, I. and Altory, A. 2015. Differential diagnosis of fowlpox and infectious laryngotracheitis viruses in chicken diphtheritic manifestations by mono and duplex real-time polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 44(1): 1-4.
- Diallo, I.S., Taylor, J., Gibson, J., Hoad, J., de Jung, A., Hewitson, G., Corney, B.G. and Rodwell, B.J. 2010. Diagnosis of a naturally occurring dual infection of layer chickens with fowlpox virus and gallid herpesvirus 1 (ILTV). *Avian Pathol.* 39: 25-30.
- Garcia, M., Spatz, S. and Guy, J.S. 2013. Infectious Laryngotracheitis. In D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R., McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez and V.L. Nair, eds. *Diseases of Poultry* 13th ed. Ames: Wiley-Blackwell, USA. pp. 161-134.
- Guy, J.S., Barnes, H.J. and Smith, L.G. 1992. Rapid diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure. *Avian Pathol.* 21(1):77-86.
- Lee, L.H. and Lee, K.H. 1997. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *J. Virol. Methods.* 63(1-2): 113-119.
- Magouz, A. 2015. Isolation and molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus from naturally infected layer chicken flocks in Egypt. *Glob. Vet.* 14(6): 929-934.
- Maiya, N., Antarasena, A., Jearasuk, P., Detdechasanun, P. and Prommuang, P. 1998. Outbreaks of Marek's disease in chickens in the southern part of Thailand. *Proceedings of the 36th Kasetsart University Annual Conference.* Bangkok, Thailand. pp. 152-162
- Pang, Y., Wang, H. Girshick, T., Xie, Z. and Khan, M.I. 2002. Development and Application of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for Avian Respiratory Agents. *Avian Dis.* 46(3): 691-699.
- Florida State University. 2005. Policy for use of avian embryos. Animal Care and Use Committee Guidelines. [Online]. Available: http://www.research.fsu.edu/acuc/Policies_Guidelines/Avian%20Embryo%20Policy.pdf. [Accessed 29 December 2017].

- Promkuntod, N., Prommuang, P., Thongnoon, P., Antarasena, C., Trongwongsa, L., Rujikwan, S. and Prommuang, P. 2001. Duckpox virus: Virus isolation and identification, transmission and protection test of ducks immunized with fowlpox vaccine. *Proceedings of the 39th Kasetsart University Annual Conference: Animals*, Veterinary Medicine, Bangkok, Thailand. pp. 527-536.
- Promkuntod, N., Antarasena, C., Prommuang, P., Thiptara, A., Trongwongsa, L. and Prommuang, P. 2002. Isolation of avian poxvirus from Japanese quail and cross-protection studies in experimental quails, chickens and ducks. *J. Thai Vet. Med. Assoc.* 53(3): 21-32.
- Purcell, D.A. 1971. Histopathology of infectious laryngotracheitis in fowl infected by an aerosol. *J. Comp. Pathol.* 81(3): 421IN21431-30IN25.
- Sananvoravej, S. 1963. Avian infectious laryngotracheitis. *Proceedings of the 2nd Annual Conference: Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. pp. 330-334.
- Sivaseelan, S., Rajan, T., Malmarugan, S., Balasubramaniam, G.A. and Madheswaran, R. 2014. Tissue tropism and pathobiology of infectious laryngotracheitis virus in natural cases of chickens. *Israel J. Vet. Med.* 69: 197-202.
- Tadese, T., Potter, A.E., Fitzgerald, S. and Reed, W.M. 2007. Concurrent infection in chickens with fowlpox virus and infectious laryngotracheitis virus as detected by immunohistochemistry and a multiplex polymerase chain reaction technique. *Avian Dis.* 51(3): 719-724.
- Tripathy, D.N. 1998. Infectious laryngotracheitis. In D.E. Swayne et al., eds. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. 4thed. American Association of Avian Pathologists, Rose Printing, Tallahassee, Florida, USA. pp. 111-115.
- Tripathy, D.N. and Reed, W.M. 1998. Pox. In D.E. Swayne et al., eds. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 4thed. American Association of Avian Pathologists, Rose Printing, Tallahassee, Florida, USA. pp. 137-143.
- Tripathy, D.N. and Reed W.M. 2013. Pox. In D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez and V.L. Nair, eds. *Diseases of Poultry*, 13thed. Ames: Wiley-Blackwell, USA. pp. 333-349.
- Tripathy, D.N., Sells, D.M. and Hanson, L.E. 1975. Natural pox and herpes as a dual viral infection in chickens. *Avian Dis.* 19: 75-81.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2014. Avian infectious laryngotracheitis. The manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). [Online]. Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.03_AVIAN_INF_LARYNGO.pdf. [Accessed 15 December 2017].
- World Organization for Animal Health (OIE). 2016. Fowlpox. The manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). [Online]. Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.10_FOWLPOX.pdf. [Accessed 15 December 2017].
- VanderKop, M.A. 1993. Infectious laryngotracheitis in commercial broiler chickens. *Canadian Vet. J.* 34(3): 185.

ความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Enterococcus* spp. และยีนดื้อยาที่พบในมูลสุกร ระหว่างฟาร์มที่มีระบบการเลี้ยงปกติและฟาร์มกึ่งอินทรีย์

กมลสิริ ภูมิภมร^{1*}, ประภัสสร เขาวนสกุล¹, ประสพพร ทองนุ่น¹ อัญญรัตน์ ทิพย์ธารา¹

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: การเลี้ยงสัตว์ในระบบปศุสัตว์อินทรีย์ซึ่งหลีกเลี่ยงการใช้ยาและสารเคมี เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถชะลอการเกิดปัญหาเชื้อดื้อยาได้ ปัจจุบันมีฟาร์มรูปแบบหนึ่งที่แม้ยังไม่สามารถทำตามหลักเกณฑ์ของปศุสัตว์อินทรีย์ได้ทั้งหมด แต่มีการจัดการฟาร์มโดยใช้ยาและสารเคมีน้อยกว่าการเลี้ยงในระบบปกติซึ่งอาจเรียกได้ว่าเป็นการเลี้ยงสัตว์ระบบกึ่งอินทรีย์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความชุกของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อและยีนดื้อยาในมูลสุกรจากฟาร์มที่มีการเลี้ยงแบบปกติและฟาร์มกึ่งอินทรีย์

วิธีการ: เก็บตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มที่มีระบบการเลี้ยงแบบปกติ 33 ตัวอย่างและจากฟาร์มที่มีระบบการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์ 31 ตัวอย่าง ทำการเพาะเชื้อ *Escherichia coli* และ *Enterococcus* spp. ทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อและสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ตรวจหายีนดื้อยาโดยวิธี Multiplex PCR เปรียบเทียบความชุกของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อและยีนดื้อยาที่พบระหว่างฟาร์มที่มีการเลี้ยงแบบปกติและฟาร์มกึ่งอินทรีย์

ผล: ในฟาร์มที่มีระบบการเลี้ยงแบบปกติพบความชุกการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ต่อยา cefotaxime 9.09%, ciprofloxacin 8.08%, colistin 6.06% และ nalidixic acid 47.47% ความชุกการดื้อยาของเชื้อ *Enterococcus* spp. ต่อยา ampicillin 56.57%, erythromycin 100%, gentamicin 29.30%, streptomycin 100% และ tetracycline 100% และการพบยีน *sul1* 100% และ *Int1* 100% ในดีเอ็นเอที่สกัดจากมูลสุกรสูงกว่าฟาร์มที่มีระบบการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยไม่พบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ meropenem และ teicoplanin ในระบบการเลี้ยงทั้ง 2 แบบ

สรุป: การลดการใช้ยาต้านจุลชีพในฟาร์มที่มีการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์ในการศึกษาครั้งนี้อาจส่งผลให้การดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อลดลง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่างที่มากขึ้นเพื่อนำข้อมูลมาใช้สนับสนุนและส่งเสริมการเลี้ยงสัตว์แบบกึ่งอินทรีย์ และเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนให้เกิดการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

คำสำคัญ: ความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ, ยีนดื้อยา, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., ฟาร์มสุกร

1. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110

2. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนล่าง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

* ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์: 075770128-9 โทรสาร: 075770128-9 ต่อ 102 E-mail: gamonsiri@gmail.com

Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. and Resistant Genes in Swine Feces from Conventional and Semi-organic Pig Farms

Gamonsiri Bhumibhamon^{1*}, Prapassorn Chaowanasakul¹,
Prasobporn Thongnoon² Anyarat Thipthara¹

Abstract

Backgrounds: Organic farming, an agricultural system that restricts using antimicrobials and other chemicals, has shown to slow down antimicrobial resistance problem. Nevertheless, there is also an animal production type, namely semi-organic, that could not meet all requirements of organic farming but tend to use less antimicrobials and chemicals than conventional farm. This study aimed to compare the prevalence of antimicrobial resistances and resistant genes in swine feces between conventional and semi-organic farming.

Methods: 33 and 31 swine fecal samples were collected from conventional and semi-organic pig farms respectively. *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. were cultured and tested for antimicrobial susceptibility. Fecal DNA was extracted from swine feces and detected for resistance genes by Multiplex PCR. Then the prevalence of antimicrobial resistances and resistant genes detected from fecal DNA were compared.

Results: In conventional farm, the percentage of *E. coli* resistance to cefotaxime 9.09%, ciprofloxacin 8.08%, colistin 6.06% and nalidixic acid 47.47%, the percentage of *Enterococcus* spp. resistance to ampicillin 56.57%, erythromycin 100%, gentamicin 29.30%, streptomycin 100% and tetracycline 100% and the detection of *sul1* 100% and *Int1* 1 genes 100% in fecal DNA were higher than semi-organic farm significantly ($p < 0.05$). Noticeably, no meropenem and teicoplanin resistance found in both type of pig productions.

Conclusions: Reducing antimicrobial consumption of semi-organic in this study might contribute to reduce the emergence of antimicrobial resistance. Future study in larger sample size is needed to get the information to promote semi-organic farming which could be an alternative way to slow down the resistance problem and to support the prudent use of antimicrobials in livestock.

Keywords: antimicrobial susceptibility, resistant genes, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., pig farm

1. Veterinary research and development center (upper southern region), Thungsong, Nakhonsithammarat 80110.

2. Veterinary research and development center (lower southern region), Hadyai, Songkhla 90110.

* Corresponding author: tel: 075770128-9 fax: 075770128-9 ext. 102 E-mail: gamonsiri@gmail.com

บทนำ

การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัยทั้งการดื้อยาที่เกิดตามธรรมชาติและจากปัจจัยภายนอก การใช้ยาต้านจุลชีพเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การดื้อยาของเชื้อเกิดขึ้นเร็วขึ้นโดยการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพให้คงอยู่และเพิ่มจำนวนขึ้นมาจนกลายเป็นกลุ่มประชากรหลัก การเลี้ยงสัตว์ในระบบออร์แกนิกฟาร์มที่มีชื่อเรียกว่าปศุสัตว์อินทรีย์ ซึ่งมุ่งถึงความปลอดภัยของผู้ผลิตและผู้บริโภคโดยเน้นการป้องกันโรคโดยการจัดการฟาร์มที่ดี หลีกเลี่ยงการใช้ยาและสารเคมี (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2554) พบว่าทำให้เกิดการตกค้างของสารพิษต่างๆ รวมถึงแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพน้อยกว่าการเลี้ยงสัตว์ในระบบปกติอย่างมีนัยสำคัญ (Luangtongkum et al., 2006; Miranda et al., 2007) ทั้งนี้ยังมีฟาร์มที่มีการนำเอาหลักการของการเลี้ยงสัตว์แบบอินทรีย์มาใช้บางส่วนโดยอาจเรียกได้ว่าเป็นการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์ (semi-organic) เช่นการเลือกใช้สมุนไพรเพื่อทดแทนการใช้ยาต้านจุลชีพ ส่งผลให้มีการใช้ยาต้านจุลชีพในฟาร์มลดลงซึ่งอาจทำให้การดื้อยาของแบคทีเรียลดลงได้อย่างไรก็ตามการศึกษาในระบบการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์ยังมีอยู่น้อย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความชุกของการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) และ *Enterococcus* spp. ที่มาจากระบบการเลี้ยงปกติและฟาร์มกึ่งอินทรีย์โดยเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้จัดเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ที่มีความเหมาะสมในการศึกษาเพื่อเป็นการเฝ้าระวังการดื้อยาในสัตว์ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลที่เฉพาะเจาะจงสำหรับเชื้อ 2 ชนิดนี้แต่ในมูลสัตว์ยังมีเชื้ออีกจำนวนมาก รวมถึงมีเชื้อจำนวนหนึ่งที่ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อได้ ดังนั้นการศึกษารังนี้จึงศึกษาเพิ่มเติมถึงยีนดื้อยาที่มีอยู่ในมูลสุกรโดยศึกษาในดีเอ็นเอที่สกัดจากมูลโดยตรง (fecal DNA) ซึ่งจะได้ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในมูล โดยข้อมูลที่ได้จะเป็นภาพรวมของยีนดื้อยาที่ทำการศึกษาจากแบคทีเรียทั้งหมดที่มีในมูลสัตว์ โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษายีน *sul1*, *sul2*, *tetM*, *tetO* และ *tetS* ซึ่งเป็นยีนที่ดื้อต่อยากลุ่ม sulfonamides และกลุ่ม tetracyclines (Byrne-Bailey et al., 2009; Sapunaric et al., 2005) ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพที่มีการใช้อย่างแพร่หลายและใช้มาในระยะเวลาอันยาวนานเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการพบยีนดื้อยา และศึกษายีนที่มีความเชื่อมโยงกับการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (*Int1*) (Martinez-Freijo et al., 1998) เพื่อป้องกันถึงแนวโน้มความรุนแรงของปัญหา

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

คัดเลือกฟาร์มสุกรจำนวน 2 ฟาร์มที่มีขนาดฟาร์มใกล้เคียงกันโดยฟาร์มที่ 1 มีลักษณะการเลี้ยงแบบปกติ (conventional) มีแม่พันธุ์ 30 ตัว สุกรขุน 160 ตัว เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูป มีการใช้ยาต้านจุลชีพทันทีเมื่อพบสุกรป่วยโดยยาที่ใช้ในฟาร์มคือ amoxicillin, cephalosporin, enrofloxacin, gentamicin และ tiamulin แบบฉีด ฟาร์มที่ 2 มีลักษณะการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์ (semi-organic) มีสุกรแม่พันธุ์ 30 ตัว สุกรขุน 150 ตัว ใช้อาหารสำเร็จรูปผสมกับหญ้าเนเปียร์ และใช้สมุนไพร เช่น ขิง ข่า ตะไคร้เพื่อการป้องกันและรักษาโรค ทั้งนี้ยังคงมีการใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาเมื่อการใช้สมุนไพรไม่ได้ผล ยาที่ใช้ในฟาร์มคือ amoxicillin, oxytetracycline และ sulfamethoxazole แบบฉีด โดยทั้ง 2 ฟาร์มไม่มีบันทึกรายละเอียดการใช้ยา

ทำการเก็บตัวอย่างมูลสุกร 1 ครั้งในเดือนเมษายน 2558 รวมทั้งหมด 64 ตัวอย่าง เป็นมูลสุกรจากฟาร์มที่มีระบบการเลี้ยงแบบปกติ 33 ตัวอย่าง (สุกรขุน 16 สุกรแม่พันธุ์ 17 ตัวอย่าง) และเป็นมูลสุกรจากฟาร์มที่มีระบบการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์ 31 ตัวอย่าง (สุกรขุน 15 สุกรแม่พันธุ์ 16 ตัวอย่าง) การเก็บมูลสุกรทำโดยเก็บมูลในส่วนที่ไม่สัมผัสพื้น สด ใหม่ ตัวอย่างละประมาณ 300 กรัม ใส่ถุงพลาสติกสองชั้น รัดปากถุงให้แน่น และใส่ในถังที่เก็บรักษาอุณหภูมิที่ 4-8°C ส่งศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบนภายใน 1 วัน เพื่อทำการเพาะแยกเชื้อและสกัดดีเอ็นเอ

การเพาะแยกเชื้อ และการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ

เพาะแยกเชื้อ *E. coli* และ *Enterococcus* spp. โดยวิธี conventional method และทำการทดสอบยืนยันเชื้อตามวิธีของ Quin et al. (1994) เก็บเชื้อใน 20% skim milk โดยเก็บ 3 isolates ต่อเชื้อต่อตัวอย่าง (1 isolate ต่อ 1 หลอด) เก็บรักษาไว้ที่ -80°C เพื่อรอการทดสอบต่อไป

คัดเลือกยาต้านจุลชีพ (Oxoid, Basingstoke, UK) 10 ชนิด สำหรับทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* และ 9 ชนิด สำหรับ *Enterococcus* spp. ด้วยวิธี agar disc diffusion ตามมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016) โดยทดสอบจำนวน 3 isolates ต่อเชื้อต่อตัวอย่างเพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบการดื้อยาของเชื้อ (Cavaliere et al., 2005)

การสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี multiplex PCR

สกัด DNA จากตัวอย่างมูลสุกรโดยใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) และตรวจหาเชื้อด้วยวิธี multiplex PCR จำนวน 2 ชุด คือชุดที่ 1 เพื่อทดสอบหา *sul1*, *sul2* และ *Int1* 1 ตามวิธีของ Kern et al. (2002) ชุดที่ 2 เพื่อทดสอบหา *tetM*, *tetO* และ *tetS* ตามวิธีของ Ng et al. (2001) โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น negative control และ *sul1*, *sul2*, *Int1*, *tetM*, *tetO* และ *tetS* genes ที่โคลนใน vector pGEM®-T Easy ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยอุเทน ประเทศเนเธอร์แลนด์เป็น positive control ของแต่ละยีนและตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis (2% gel, 100 volt, 90 นาทีโดยย้อมดีเอ็นเอด้วย SYBR safe)

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความชุกของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* และ *Enterococcus* spp. และยีนดื้อยาในมูลสุกรจากระบบการเลี้ยงปกติและระบบกึ่งอินทรีย์โดยใช้สถิติทดสอบ Fisher's exact test คำนวณด้วยโปรแกรม R กำหนดให้ความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ และเปรียบเทียบความหลากหลายของรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อในฟาร์มทั้ง 2 ระบบโดยคำนวณค่าดัชนีความหลากหลาย Simpson's diversity index และ 95% confidence interval (95% CI) ค่าดัชนีที่สูงกว่าแสดงถึงความหลากหลายที่มากกว่า โดยความแตกต่างมีนัยสำคัญหากค่า 95% CI ไม่ซ้อนทับกัน

ผลและวิจารณ์

ผลการเพาะแยกเชื้อและทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

เพาะแยกเชื้อ *E. coli* และ *Enterococcus* spp. ได้จากทุกตัวอย่าง การทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อทั้ง 2 ชนิดจำนวน 3 isolates ต่อเชื้อต่อตัวอย่างโดยเป็นเชื้อ *E. coli* และ *Enterococcus* spp. ชนิดละ 99 isolates จากระบบการเลี้ยงแบบปกติ และ 93 isolates จากระบบการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์ ปรากฏผลดัง Table 1 และ Table 2 โดยเชื้อ *E. coli* จากระบบการเลี้ยงแบบปกติมีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ampicillin, tetracycline และ nalidixic acid สูงเป็นสามอันดับแรก (97.98%, 71.71% และ 47.47% ตามลำดับ) โดยไม่ดื้อต่อยา meropenem ชนิดเดียวกันนั้น ส่วนเชื้อจากฟาร์มแบบกึ่งอินทรีย์มีการดื้อต่อ ampicillin, tetracycline

และ trimethoprim/sulfamethoxazole สูงเป็นสามอันดับแรก (97.85%, 81.72% และ 68.82% ตามลำดับ) โดยไม่ดื้อต่อยา cefotaxime, ciprofloxacin, colistin และ meropenem ซึ่งเปอร์เซ็นต์การดื้อยาของเชื้อ *E. coli* จากระบบการเลี้ยงแบบปกติมีการดื้อยาด้านจุลชีพ cefotaxime, ciprofloxacin, colistin และ nalidixic acid สูงกว่าแบบกึ่งอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่าการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ในระบบการเลี้ยงแบบปกติต่ำกว่าแบบกึ่งอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน trimethoprim/sulfamethoxazole ($p\text{-value} < 0.05$)

เชื้อ *Enterococcus* spp. จากการเลี้ยงทั้งสองแบบมีการดื้อยาด้านจุลชีพสูงที่สุดในสามอันดับแรกเหมือนกันคือ erythromycin, streptomycin และ tetracycline ซึ่งเชื้อที่มาจากระบบการเลี้ยงแบบปกติมีการดื้อยาทั้ง 3 ชนิดเป็น 100% ส่วนเชื้อที่มาจากระบบการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์มีการดื้อยาเป็น 93.55%, 90.32% และ 84.95% ตามลำดับ และพบว่าเชื้อมีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดยกเว้น teicoplanin ชนิดเดียวกันนั้น โดยเปอร์เซ็นต์การดื้อยาของเชื้อจากระบบการเลี้ยงแบบปกติมีการดื้อ ampicillin, erythromycin, gentamicin, streptomycin และ tetracycline สูงกว่าแบบกึ่งอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการศึกษาพบการดื้อต่อยาสูงเป็นอันดับต้นของเชื้อในการเลี้ยงทั้ง 2 ระบบค่อนข้างเหมือนกันคือการดื้อต่อ ampicillin และ tetracycline ของเชื้อ *E. coli* และการดื้อต่อ erythromycin, streptomycin และ tetracycline ของเชื้อ *Enterococcus* spp. อาจเนื่องมาจากการใช้ยาเหล่านี้บ่อยครั้งแพร่หลายมาเป็นเวลานานทั้งเพื่อการเร่งการเจริญเติบโตหรือการป้องกันและรักษาโรค การศึกษาในครั้งนี้โดยทั่วไปพบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดจากระบบการเลี้ยงแบบปกติมีการดื้อยาด้านจุลชีพสูงกว่าระบบการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาที่เปรียบเทียบระหว่างระบบการเลี้ยงแบบปกติและระบบอินทรีย์ (Bunner et al., 2007) ซึ่งอาจแสดงได้ว่าระบบการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์ที่มีการเลือกใช้สมุนไพรทดแทนการใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อการป้องกันและรักษาโรคอาจส่งผลให้การดื้อยาด้านจุลชีพลดลงได้

การพบการดื้อยา trimethoprim/sulfamethoxazole ของเชื้อ *E. coli* ในระบบกึ่งอินทรีย์สูงกว่าระบบปกติ สอดคล้องกับข้อมูลจากการสอบถามการใช้ยาและชนิดยาด้านจุลชีพที่มีการใช้ในฟาร์ม ซึ่งการดื้อยาที่สูงกว่าอาจมาจากฟาร์มกึ่งอินทรีย์ใช้ยาชนิดนี้เป็นส่วนใหญ่เมื่อจำเป็นต้องมีการใช้ยาต้านจุลชีพ

Table 1. Antimicrobial resistance rates of *E. coli* isolates from conventional and semi-organic pig farms.

Antimicrobial agent	No. resistance isolates (%)	
	Conventional (n=99)	Semi-organic (n=93)
Ampicillin (AMP)	97 (97.98)	91 (97.85)
Cefotaxime (CTX)	9 (9.09)	0 (0) *
Chloramphenicol (CHL)	41 (41.41)	38 (40.86)
Ciprofloxacin (CIP)	8 (8.08)	0 (0) *
Colistin (COL)	6 (6.06)	0 (0) *
Gentamicin (GEN)	16 (16.16)	21 (22.58)
Meropenem (ME)	0 (0)	0 (0)
Nalidixic acid (NA)	47 (47.47)	10 (10.75) *
Tetracycline (TET)	71 (71.71)	76 (81.72)
Trimethoprim/ sulfamethoxazole (SXT)	43 (43.43)	64 (68.82) *

*Significant differences between the two operation types ($p<0.05$) by Fisher's exact test

Table 2. Antimicrobial resistance rates of *Enterococcus* spp. isolates from conventional and semi-organic pig farm.

Antimicrobial agent	No. resistance isolates (%)	
	Conventional (n=99)	Semi-organic (n=93)
Ampicillin (AMP)	56 (56.57)	28 (30.11) *
Chloramphenicol (CHL)	12 (12.12)	11 (11.83)
Erythromycin (E)	99 (100)	87 (93.55) *
Gentamicin (GEN)	29 (29.30)	15 (16.13) *
Streptomycin (STR)	99 (100)	84 (90.32) *
Teicoplanin (TEI)	0 (0)	0 (0)
Tetracycline (TET)	99 (100)	79 (84.95) *
Tigecycline (TIG)	14 (14.14)	10 (10.75)
Vancomycin (V)	9 (9.09)	7 (7.53)

*Significant differences between the two operation types ($p<0.05$) by Fisher's exact test

ในกรณีที่ใช้สมุนไพรไม่ได้ผล ในขณะที่ฟาร์มที่มีระบบการเลี้ยงแบบปกติมียาต้านจุลชีพที่หลากหลายจึงมีความถี่ในการใช้ยาชนิดนี้น้อยกว่า ดังการศึกษาของ Docic and Bilkei (2003) และ Akwar et al. (2008) ที่พบว่าการใช้ยาต้านจุลชีพชนิดเดิมบ่อยๆจะเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาชนิดนั้น ทั้งนี้ไม่พบการดื้อยาต้านจุลชีพที่วงการแพทย์ให้ความสำคัญและเฝ้าระวังการดื้อยาอย่างใกล้ชิดได้แก่ Meropenem และ Teicoplanin จากการเลี้ยงทั้ง 2 ระบบ

รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพ (antimicrobial resistance pattern)

รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* และ *Enterococcus* spp. ดังแสดงใน Table 3 และ Table 4 โดยพบว่าเชื้อ *E. coli* ในระบบการเลี้ยงแบบปกติและระบบการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์มีจำนวน รูปแบบการดื้อยา 17 และ 13 แบบตามลำดับ สำหรับเชื้อ *Enterococcus* spp. มีรูปแบบการดื้อยา 13 และ 17 แบบตามลำดับ เมื่อคำนวณค่าดัชนีความหลากหลายของรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ (Simpson's diversity index) และ 95% CI พบว่าไม่มีความแตกต่างของรูปแบบการดื้อยาเนื่องจากค่า 95% CI ซ้อนทับกัน อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อจากฟาร์มที่มาจากระบบการเลี้ยงแบบปกติมีการดื้อต่อยาจำนวนกลุ่มยาต้านจุลชีพสูงกว่าเชื้อที่มาจากระบบกึ่งอินทรีย์โดยเชื้อ *E. coli* และ *Enterococcus* spp. จากระบบการเลี้ยงแบบปกติมีการดื้อยาสูงสุด 8 และ 7 กลุ่มตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *E. coli* และ *Enterococcus* spp. จากระบบการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์มีการดื้อยาสูงสุด 5 และ 6 กลุ่มตามลำดับ

Table 3. Resistance patterns of *E. coli* isolates from conventional and semi-organic pig farm.

Resistance patterns	No. ABO class	No. resistance isolates (%)	
		Conventional (n=99)	Semi-organic (n=93)
pan susceptible	0	2 (2.02)	2 (2.15)
AMP	1	22 (22.22)	4 (4.30)
AMP, GEN	2	2 (2.02)	2 (2.15)
AMP, SXT	2	0 (0)	3 (3.23)
AMP, TET	2	12 (12.12)	19 (20.43)
AMP, CHL, SXT	3	2 (2.02)	6 (6.45)
AMP, NAL, TET	3	11 (11.11)	2 (2.15)
AMP, SXT, TET	3	2 (2.02)	14 (15.05)
AMP, CHL, SXT, TET	4	10 (10.10)	16 (17.20)
AMP, CTX, NAL, TET	4	2 (2.02)	0 (0)
AMP, GEN, SXT, TET	4	0 (0)	7 (7.53)
AMP, NAL, SXT, TET	4	5 (5.05)	0 (0)
AMP, CHL, GEN, SXT, TET	5	0 (0)	10 (10.75)
AMP, CHL, NAL, SXT, TET	5	12 (12.12)	6 (6.45)
AMP, GEN, NAL, SXT, TET	5	0 (0)	2 (2.15)
AMP, CHL, CIP, GEN, NAL, TET	6	2 (2.02)	0 (0)
AMP, CHL, CIP, NAL, SXT, TET	6	3 (3.03)	0 (0)
AMP, CHL, GEN, NAL, SXT, TET	6	2 (2.02)	0 (0)
AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, TET	7	3 (3.03)	0 (0)
AMP, CTX, CHL, GEN, NAL, SXT, TET	7	4 (4.04)	0 (0)
AMP, CTX, CHL, COL, GEN, NAL, SXT, TET	8	3 (3.03)	0 (0)
No. resistance profile		17	13
Simpson's diversity index (95% CI)		0.89 (0.87, 0.92)	0.88 (0.86,0.91)

Table 4. Resistance patterns of *Enterococcus* spp isolates from conventional and semi-organic pig farm.

Resistance pattern	No. ABO class	No. resistance isolates (%)	
		Conventional (n=99)	Semi-organic (n=93)
pan susceptible	0	0 (0)	3 (3.23)
E	1	0 (0)	3 (3.23)
STR	1	0 (0)	3 (3.23)
E, STR	2	0 (0)	2 (2.15)
AMP, E, STR	3	0 (0)	3 (3.23)
E, STR, TET	3	19 (19.20)	36 (38.71)
AMP, E, STR, TET	4	32 (32.32)	17 (18.28)
CHL, E, STR, TET	4	5 (5.05)	5 (5.37)
E, STR, TET, TIG	4	2 (2.02)	2 (2.15)
GEN, E, STR, TET	4	11 (11.11)	2 (2.15)
GEN, E, TET, V	4	0 (0)	3 (3.23)
AMP, E, STR, TET, TIG	5	3 (3.03)	0 (0)
AMP, E, STR, TET, V	5	7 (7.07)	1 (1.08)
AMP, GEN, E, STR, TET	5	6 (6.06)	2 (2.15)
CHL, E, STR, TET, TIG	5	2 (2.02)	0 (0)
CHL, GEN, E, STR, TET	5	0 (0)	3 (3.23)
GEN, E, STR, TET, TIG	5	4 (4.04)	0 (0)
AMP, CHL, GEN, E, STR, TET	6	3 (3.03)	0 (0)
AMP, E, STR, TET, TIG, V	6	0 (0)	3 (3.23)
AMP, GEN, E, STR, TET, TIG	6	3 (3.03)	2 (2.15)
CHL, GEN, E, STR, TET, TIG	6	0 (0)	3 (3.23)
AMP, CHL, GEN, E, STR, TET, V	7	2 (2.02)	0 (0)
No. resistance profile		13	17
Simpson's diversity index (95% CI)		0.83 (0.79,0.88)	0.80 (0.75,0.88)

Table 5. Resistant genes detected from conventional and semi-organic pig farm.

Genes	No. sample (%) [*]	
	Conventional (n=33)	Semi-organic (n=31)
sul1	33 (100)	12 (38.71) *
sul2	33 (100)	31 (100)
Int1 1	33 (100)	22 (70.97) *
tetM	31 (93.94)	31 (100)
tetO	33 (100)	31 (100)
tetS	1 (3.03)	2 (6.45)

^{*}Significant differences between the two operation types ($p < 0.05$) by Fisher's exact test

ผลการตรวจหายีนดื้อยา (resistant genes)

การตรวจพบยีนดื้อยาจาก fecal DNA ที่สกัดจากมูลของสุกรดังแสดงใน Table 5 โดยพบยีน *sul2*, *Int1 1*, *tetM* และ *tetO* สูงในการเลี้ยงทั้ง 2 ระบบ บ่งบอกถึงการกระจายตัวของยีนดื้อยานี้ในทั้ง 2 ระบบการเลี้ยงซึ่งเป็นข้อมูลสนับสนุนให้ควรมีการตระหนักถึงการใช้อยาต้านจุลชีพในการเลี้ยงสัตว์อย่างถูกต้องและเหมาะสม โดยเฉพาะการพบยีน *Int1 1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดการดื้อยาหลายชนิดของเชื้อและเป็นยีนที่สามารถถ่ายทอดไปยังเชื้อตัวอื่นได้ผ่านทาง horizontal gene transfer ซึ่งจะทำให้การดื้อยามีการกระจายอย่างรวดเร็วรวมถึงเกิดการถ่ายทอดการดื้อยานั้นให้กับเชื้อที่ก่อโรค (Djordjevic et al., 2013) เมื่อเปรียบเทียบความชุกของการพบยีนแต่ละชนิดในการเลี้ยงทั้ง 2 แบบพบว่ายีน *sul1* และ *Int1 1* ในมูลสุกรจากระบบการเลี้ยงแบบปกติสูงกว่าระบบการเลี้ยงแบบกึ่งอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเลี้ยงสัตว์ในระบบกึ่งอินทรีย์มีผลทำให้ยีนดื้อยาลดลงได้

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การพบความชุกของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* และ *Enterococcus* spp. และการพบยีน *sul1* และ *Int1 1* ที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญในระบบการเลี้ยงสุกรแบบกึ่งอินทรีย์เมื่อเปรียบเทียบกับระบบการเลี้ยงแบบปกติในการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลที่เพิ่มพูนความตระหนักถึงปัญหาการเกิดการดื้อยาของเชื้อและนำไปสู่การให้ความร่วมมือในการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างถูกต้องและเหมาะสมของเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ อีกทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงว่าการเลี้ยงสัตว์แบบระบบ

กึ่งอินทรีย์อาจทำให้การดื้อยาของเชื้อลดลงได้ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับเกษตรกรในการจัดการฟาร์ม ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่างที่มากขึ้นเพื่อเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการกำหนดนโยบายภาครัฐ และการสนับสนุนและส่งเสริมการเลี้ยงสัตว์แบบกึ่งอินทรีย์เพื่อชะลอการเกิดปัญหาเชื้อดื้อยาในปศุสัตว์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ว่าที่ ร.ต. สุวิวัฒน์ ภิญโญทรัพย์ เจ้าหน้าที่จากสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดระนอง เจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน และเจ้าของฟาร์มสุกรทั้ง 2 ฟาร์มที่ให้ข้อมูลและความร่วมมือในการเก็บตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช). 2554. มาตรฐานสินค้าเกษตร. ปศุสัตว์อินทรีย์ (มกษ. 9000) เล่ม 2" [Online]. Available: [http://certify.dld.go.th/certify/images /project /organic /2organic%20Livestock.pdf](http://certify.dld.go.th/certify/images/project /organic /2organic%20Livestock.pdf). [1 เมษายน 2560].
- Akwar, H.T., Poppe, C., Wilson, J., Reid-Smith, R.J., Dyck, M., Waddington, J., Shang, D. and McEwen, S.A. 2008. Prevalence and patterns of antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* among pigs on 47 farrow-to-finish farms with different in-feed medication policies in Ontario and British Columbia. *Can. J. Vet. Res.* 72(2): 195-201.
- Bunner, C.A., Norby, B., Bartlett, P.C., Erskine, R.J., Downes, F.P. and Kaneene, J.B. 2007. Prevalence and pattern of antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* isolated from pigs reared under antimicrobial-free and conventional production methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231(2): 275-283.
- Byrne-Bailey, K.G., W.H. Gaze, P. Kay, A.B. Boxall, P.M. Hawkey, and E.M. Wellington. 2009. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(2): 696-702.
- Cavalieri, S.J., Harbeck, R.J., McCarter, Y.S., Ortez, J.H., Rankin, I.D., Sautter, R.L., Sharp, S.E. and Spiegel, C.A. 2005. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. ASM. USA. 241 p.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-sixth informational supplement. CLSI document M100-S26. Wayne, PA., U.S.A. 251 p.

- Djordjevic, S.P., Stokes, H.W. and Chowdhury, P.R. 2013. Mobile elements, zoonotic pathogens and commensal bacteria: conduits for the delivery of resistance genes into humans, production animals and soil microbiota. *Front. Microbiol.* 4: 86.
- Docic, M. and Bilkei, G. 2003. Differences in antibiotic resistance in *Escherichia coli*, isolated from East-European swine herds with or without prophylactic use of antibiotics. *Zoonoses and Public Health.* 50(1): 27-30.
- Kern, M.B., Klemmensen, T., Frimodt-Moller, N. and Espersen, F. 2002. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 50(4): 513-516.
- Luangtongkum, T., T.Y. Morishita, A.J. Ison, S. Huang, P.F. McDermott, and Q. Zhang. 2006. Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. *Appl. Environ. microbiol.* 72(5): 3600-3607.
- Martinez-Freijo, P., A.C. Fluit, F.J. Schmitz, V.S. Grek, J. Verhoef, and M.E. Jones. 1998. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J. Antimicrob. Chemother.* 42(6): 689-696.
- Miranda, J.M., M. Guarddon, A. Mondragon, B.I. Vazquez, C.A. Fente, A. Cepeda, and C.M. Franco. 2007. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. strains isolated from organic chicken, conventional chicken, and turkey meat: a comparative survey. *J. food prot.* 70(4): 1021-1024.
- Ng, L.K., Martin, I., Alfa, M. and Mulvey, M. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell. Probes.* 15(4): 209-215.
- Quin, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. 1994. The Streptococci and related cocci and Enterobacteriaceae. Clinical Veterinary Microbiology. 9th edition. Wolfe Publishing, Spain. pp. 127-136, 209-236.
- Sapunaric F, Aldema-Ramos M, McMurry L. 2005. Tetracycline Resistance: Efflux, Mutation, and Other Mechanisms. In White D, Alekshun M, McDermott P (ed), *Frontiers in Antimicrobial Resistance*. ASM Press, Washington, DC. ch1. pp 3-18.