

การจำแนกสายพันธุ์และการตรวจหาอินที่เกี่ยวข้อกับความรุนแรงของเชื้อ
Pasteurella multocida ก่อโรค ที่เพาะแยกได้จากสุกร

Capsular Typing and Virulence-Associated Genes Detection in Pathogenic
Pasteurella Multocida Isolated from Swine

นพพร โต๊ะมี* ไนยานา หัสสร้างสี กำธร พรหมโต อภัสรา วรราช

Nopporn Tohmee* Naiyana Hussarangsi Gumtorn Promto Apasara Worarach

Abstract

Background: Since the severity of the swine pasteurellosis depends on the association of capsular serogroups and virulence factors, the identification of capsular types and the distribution of virulence-associated genes in pathogenic *Pasteurella multocida* by molecular technique could be used as one of deciding factors for an applicable vaccine strain selection.

Methods: A total of 62 strains of pathogenic *P. multocida* were isolated from the lungs and tonsils of pigs with respiratory infection. Capsular types (A, B, D, E, and F) and 12 virulence-associated genes (*ptfA*, *pfhA*, *toxA*, *hgbA*, *hgbB*, *nanB*, *nanH*, *pmHAS*, *ompA*, *ompH*, *oma87*, and *tbpA*) were identified using multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) and PCR technique, respectively. The results were statistically analyzed.

Results: Capsular typing of 62 strains showed three serogroups, A (80.65%), D (17.74%), and B (1.61%). From 61 strains, the distribution of *pfhA*, *nanB*, *nanH*, and *pmHAS* genes were statistically significantly different ($p < 0.05$). The *tbpA* and *toxA* genes were found only in one isolate of serogroup B and D, respectively.

Conclusions: This study shows that the *P. multocida* serogroup A contains more diverse virulence-associated genes than serogroup D and should be selected as a vaccine candidate for pigs in the studied area, with the expectation of cross-serogroup immunity production. The selection of suitable genes for recombinant protein production requires further study.

Keywords: capsular typing, virulence-associated gene, pathogenic *Pasteurella multocida*, swine

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เขตตลิ่งชัน กรุงเทพมหานคร 10900 ประเทศไทย

*ผู้รับผิดชอบ นายนพพร โต๊ะมี โทรศัพท์ 0897755494 e-mail: vetku_58@hotmail.com

National Institute of Animal Health, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

*Correspondence author: Nopporn Tohmee Tel. 0897766494 e-mail: vetku_58@hotmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: เนื่องจากความรุนแรงของโรค Pasteurellosis ในสุกรที่เกิดจากเชื้อ *Pasteurella multocida* ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของสายพันธุ์และรูปแบบการกระจายของยีนก่อความรุนแรง ดังนั้นการจำแนกสายพันธุ์และตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อก่อโรคด้วยวิธีชีวโมเลกุล สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกสายพันธุ์หรือยีนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตวัคซีนต่อไป

วิธีการ: นำเชื้อ *P. multocida* จำนวน 62 สายพันธุ์ที่เพาะแยกได้จากปอดและทอนซิลของสุกรป่วยจากการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ มาจำแนกชนิดของแคปซูล (A, B, D, E, และ F) โดยวิธี multiplex PCR และตรวจหายีนก่อความรุนแรง 12 ยีน (*ptfA*, *pfhA*, *toxA*, *hgbA*, *hgbB*, *nanB*, *nanH*, *pmHAS*, *ompA*, *ompH*, *oma87* และ *tbpA*) ด้วยวิธี PCR แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ

ผล: จากการจำแนกชนิดของแคปซูลจากเชื้อ 62 สายพันธุ์ พบ serogroup A (80.65%), D (17.74%) และ B (1.61%) ส่วนการกระจายของยีนก่อความรุนแรงจาก 61 สายพันธุ์ พบการกระจายของยีน *pfhA*, *nanB*, *nanH* และ *pmHAS* ในแต่ละ serogroup แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบยีน *tbpA* และ *toxA* ใน serogroup B และ D อย่างละ 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ

สรุป: การศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *P. multocida* serogroup A มียีนก่อความรุนแรงหลากหลายชนิดกว่าเชื้อใน serogroup D ซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำไปผลิตวัคซีนป้องกันโรคในสุกรเฉพาะในเขตพื้นที่ที่ทำการการศึกษา เพื่อคาดหวังให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันแบบข้าม serogroup ได้ส่วนการการเลือกยีนที่เหมาะสมเพื่อผลิต recombinant protein ต้องมีการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ: จำแนกสายพันธุ์, ยีนก่อความรุนแรง, เชื้อ *Pasteurella multocida* ก่อโรค, สุกร

บทนำ

Pasteurella multocida เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายโอกาสที่สำคัญในการทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์หลายชนิดแพร่กระจายทั่วโลก (Devi et al., 2018) โดยเฉพาะการติดเชื้อในสุกรทำให้เกิดโรคที่สำคัญทาง

เศรษฐกิจและเกิดการสูญเสียอย่างมาก เช่น โรคโพรงจมูกอักเสบชนิดรุนแรงในสุกร (porcine progressive atrophic rhinitis), porcine respiratory disease complex (PRDC) และโรคปอดบวม (pneumonia) (Harper et al., 2006; Arumugam et al., 2011; Wilkie et al., 2012) เชื้อ *P. multocida* จัดอยู่ใน Family Pasteurellaceae แบ่งออกเป็น 5 serogroups ตามชนิดของแคปซูลคือ A, B, D, E และ F และแบ่งออกเป็น 16 serotypes ตามชนิดของ lipopolysaccharide (LPS) บนผนังเซลล์ ปัจจุบันพบ serogroup A, B และ D ที่ก่อโรคในสุกร (Townsend et al., 2001; Harper et al., 2006; Arumugam et al., 2011) เมื่อสุกรติดเชื้อ serogroup A และ D สายพันธุ์ที่สร้างและไม่สร้าง toxin จะทำให้เกิดโรคปอดบวมโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่สร้าง toxin เมื่อติดเชื้อร่วมกับเชื้อ *Bordetella bronchiseptica* จะทำให้เกิดโรคโพรงจมูกอักเสบร่วมด้วย (Coward et al., 1989) ส่วน serogroup B ที่ทำให้เกิดภาวะโลหิตเป็นพิษ มีโอกาสพบได้น้อยในสุกร (Devi et al., 2018) แต่ Ujvári et al. (2015) รายงานว่าพบ serogroup B ในสุกรหลังบ้านจำนวนมาก ซึ่งไม่เคยตรวจพบมาก่อนในฮังการี

การก่อโรคของ *P. multocida* เป็นผลมาจากความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างโฮสต์กับปัจจัยความรุนแรงที่จำเพาะ (virulence factors; VFs) ต่าง ๆ เช่น LPS และ capsule protein ของเชื้อ (Harper et al., 2006) หรืออาจเกี่ยวข้องกับยีนที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ เช่น adhesins (filamentous hemagglutinin; *ptfA* และ *pfhA*), toxins (dermonecrotic toxin; *toxA*), siderophores (iron acquisition proteins; *hgbA* และ *hgbB*), sialidases (*nanB* และ *nanH*), hyaluronidase (*pmHAS*), outer membrane proteins (*ompA*, *ompH*, *oma87*) และ transferrin binding protein A (*tbpA*) เป็นต้น (Hat et al., 2010; Kat et al., 2014) โดย VFs เหล่านี้จะทำให้กลไกการป้องกันตนเองของโฮสต์เสียไป หรือกระตุ้นให้โฮสต์เกิดการตอบสนองต่อเชื้ออย่างรุนแรงแล้วทำลายตนเอง โดยพบว่า การมียีนก่อความรุนแรงหลายชนิดจะทำให้โรคมียุทธศาสตร์มากขึ้น (Arumugam et al., 2011) นอกจากนี้รูปแบบการกระจายตัวของยีนก่อความรุนแรงที่พบในแต่ละสายพันธุ์นั้นมีความสำคัญในการคัดเลือกตัวแทนของสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับผลิตวัคซีนหรือสายพันธุ์ที่สามารถกระตุ้น

ให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันข้าม serotype ได้ (Tomich *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2009; Hat *et al.*, 2010) หรือ การเลือกตำแหน่งของยีนที่สำคัญแล้วนำไปสังเคราะห์เป็น recombinant protein เพื่อใช้ผลิตวัคซีนหน่วยย่อย เช่น ประเทศเกาหลีมีการพัฒนาวัคซีน *P. multocida* โดยใช้ recombinant protein แทนการใช้ heat-inactivated whole bacteria แต่ก็พบว่ามี recombinant protein บางชนิดที่ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีพอ (Lee and Woo, 2010) ในส่วนของประเทศไทยไม่พบ รายงานการใช้วัคซีนป้องกันโรคนี้ในสุกรอย่างแน่ชัด แต่จากการรายงานของ E-kobon *et al.* (2017) ยังพบเชื้อ *P. multocida* ที่ก่อโรครุนแรงในสุกรอยู่ แสดงให้เห็นว่า ความรุนแรงของเชื้อก่อโรคนี้อาจแตกต่างกันไปในแต่ละ พื้นที่แต่ละช่วงเวลา ซึ่งการศึกษาการกระจายของยีนก่อ ความรุนแรงในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ *P. multocida* เป็นสิ่งจำเป็นในการเลือกสายพันธุ์หรือยีนที่เหมาะสม สำหรับเป็นตัวแทนในการผลิตวัคซีน (Harper *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2009) ดังนั้นการศึกษานี้ จึงได้ รวบรวมเชื้อ *P. multocida* ที่แยกได้จากปอดและทอนซิล ของสุกรป่วยตายส่งตรวจที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างปีพ.ศ. 2554 ถึง 2561 มาจำแนก serogroup และตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยก่อความรุนแรง โดย วิธีชีวโมเลกุลเพื่อใช้เป็นข้อมูลบ่งชี้ในการเลือกสายพันธุ์ ตัวแทนผลิตวัคซีนที่เหมาะสมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย: *P. multocida* จำนวน 62 สายพันธุ์ เพาะแยกได้จากปอดและทอนซิลของสุกรป่วยตาย เก็บที่ อุณหภูมิ -80 °C ที่กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพ สัตว์แห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2554–2561 เชื้อมาตรฐาน *P. multocida* serogroup A, B, D, E และ F ได้รับการ สนับสนุนจากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติประเทศญี่ปุ่น (National Institute of Animal Health, Japan) ใช้เป็น ตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ นำเชื้อแบคทีเรีย ทั้งหมดมาตรวจยืนยันโดยวิธีมาตรฐานทางแบคทีเรียวิทยา (Markey *et al.*, 2013) และนำโคโลนีเดียวที่ได้มาทำการ สกัด DNA ตามวิธีการศึกษาของ Gharibi *et al.* (2017) และเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนนำมาใช้ทดสอบต่อไป

การตรวจยืนยันเชื้อด้วยวิธี PCR: ดัดแปลงจาก

วิธีของ Townsend *et al.* (1998) โดยเติม DNA 2 µl ลง ในหลอดที่มี HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Germany) 18 µl ที่ประกอบด้วย PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 25 mM dNTP, 2 U HotStarTaq DNA polymerase, 0.4 µM primer KMT1 (ตารางที่ 1) จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง BIO-RAD T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD, Germany) โดยใช้โปรแกรม Pre-denature 95 °C 15 นาทีตามด้วย 35 รอบของ denature 94 °C 30 วินาที annealing 55 °C 30 วินาที extension 72 °C 30 วินาที และ Final extension 72 °C 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ PCR product ใน 1.5% agarose gel ด้วย Electrophoresis (Cosmo Bio, Japan) โดยมี DNA จากเชื้อมาตรฐาน และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม บวกและลบตามลำดับ

การตรวจหา serogroup ของเชื้อด้วย Multiplex PCR: ดัดแปลงจากวิธีของ Townsend *et al.* (2001) โดย เติม DNA 2 µl ลงในหลอดที่มี Multiplex PCR Master Mix Kit (QIAGEN, Germany) 10 µl โดยมี 0.2 µM primer mix ของ CAP A, B, D, E และ F (ตารางที่ 1) และเติมน้ำกลั่นให้ได้ 20 µl จากนั้นนำเข้าเครื่อง BIO-RAD T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD, Germany) โดยใช้ โปรแกรมดังนี้ Pre-denature 95 °C 15 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denature 94 °C 30 วินาที annealing 55 °C 1 นาที extension 72 °C 1.30 นาที และ Final extension 72 °C 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ PCR product ใน 2% agarose gel ด้วย Electrophoresis (Cosmo Bio, Japan) โดยมี DNA ของเชื้อมาตรฐานและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม บวกและลบตามลำดับ

การตรวจหายีนก่อความรุนแรง: ดัดแปลงจากวิธี ของ Devi *et al.* (2018) โดยนำ DNA ของเชื้อมาทดสอบ หายีนก่อความรุนแรง 12 ชนิด ได้แก่ adhesins (filamentous hemagglutinin; *ptfA* และ type 4 fimbriae; *pfhA*), toxins (dermonecrotic toxin; *toxA*), siderophores (iron acquisition proteins; *hgbA* และ *hgbB*), sialidases (*nanB* และ *nanH*), Hyaluronidase (*pmHAS*), outer membrane proteins (*ompA*, *ompH*, *oma87*) และ transferrin binding protein A (*tbpA*) ด้วยวิธี PCR โดยเติม DNA 2 µl ลงในหลอดที่มี HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Germany) 18 µl ที่ประกอบด้วย PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 25 mM dNTP, 2u HotstarTaq

DNA polymerase, 0.4 μ M primer (ตารางที่ 1) นำไปเข้าเครื่อง BIO-RAD T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD, Germany) โดยใช้โปรแกรม Pre-denature 95 °C 15 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denature 94 °C 45 วินาที annealing 54 °C 50 วินาที extension 72 °C 50 วินาที และ Final extension 72 °C 10 นาที และวิเคราะห์ PCR product ใน 1.5% agarose gel ด้วย Electrophoresis (Cosmo Bio, Japan) โดยมียีนก่อความรุนแรง 12 ยีนจาก DNA ของเชื้อมาตรฐานและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมบวกและลบตามลำดับ

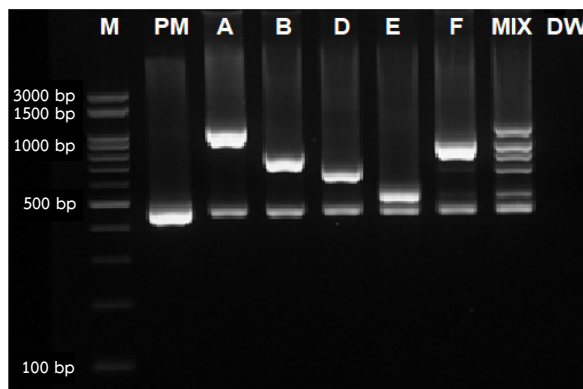
การวิเคราะห์ทางสถิติ: คำนวณหาสัดส่วนของ VFs ที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์และใช้การทดสอบไคสแควร์ หรือฟิชเชอร์ในการทดสอบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติโดยกำหนดค่า $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม R รุ่น 3.6.3 สำหรับ window (R Core Team, 2020)

ผลและวิจารณ์

ผลการยืนยันลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar พบว่าตัวอย่างเชื้อมีโคโลนีขนาดเล็ก กลม ผิวเรียบ มันวาว เหมือนหยดน้ำ ไม่เกิดการสลายเม็ดเลือดแดง และยืนยันด้วยวิธีทางชีวเคมีเป็นเชื้อ *P. multocida* จากนั้นทำการยืนยันด้วยวิธี PCR และ multiplex PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะและได้ผลผลิตที่ตำแหน่งยีน KMT1 ของเชื้อ *P. multocida* มีขนาด 460 bp ส่วน serogroup A, B, D, E, และ F มีขนาด 1044, 760, 657, 511 และ 851 bp ตามลำดับ (รูปที่ 1)

การตรวจหาชนิดของแคปซูลจากเชื้อ *P. multocida* 62 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรป่วยตายพบเป็น serogroup A จำนวน 50 (80.65%) สายพันธุ์ เป็น serogroup D จำนวน 11 (17.74%) สายพันธุ์ และพบเป็น serogroup B จำนวน 1 (1.61%) สายพันธุ์ โดยที่ตำแหน่งยีน KMT1 ทั้งสาม serogroup มีขนาดลำดับเบสเท่ากับของเชื้อมาตรฐาน (460 bp)

การกระจายของยีนก่อความรุนแรงจาก 61 สายพันธุ์ (ไม่รวม serogroup B) พบความชุกของยีน 12 ยีน ตั้งแต่ 1.64% (*toxA*) ถึง 100% (*ptfA*, *ompA* และ *oma87*) ในส่วนของ adhesins พบยีน *ptfA* ในทุกสายพันธุ์ ในขณะที่พบยีน *pfhA* ใน serogroup A และ D อย่างละ 26 (52%) และ 1 (9.09%) สายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกัน



รูปที่ 1 แสดงผลผลิตของ multiplex PCR ที่ได้จากเชื้อ *P. multocida* มาตรฐาน 5 serogroups ใน 2% agarose gel; Lane M คือ Marker 100 bp (biotechrabbit, Germany), Lane PM คือ ขนาดของ KMT1 ที่จำเพาะต่อ *P. multocida* (460 bp), Lane A, B, D, E, และ F คือ ขนาดของ *hyaD-hyaC* ที่จำเพาะต่อ serogroup A (1044 bp); *bcbD* ที่จำเพาะต่อ serogroup B (760 bp); *dcfF* ที่จำเพาะต่อ serogroup D (657 bp); *ecbJ* ที่จำเพาะต่อ serogroup E (511 bp) และ *fcfD* ที่จำเพาะต่อ serogroup F (851 bp) ตามลำดับ Lane MIX คือ รวม primer ที่จำเพาะต่อทุก serogroup, Lane DW คือ น้ำกลั่น

อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับ toxins ไม่พบยีน *toxA* ใน serogroup A แต่พบใน D เพียง 1 (9.09%) สายพันธุ์ ส่วนของ siderophores พบยีน *hgbA* ใน serogroup A และ D อย่างละ 48 (96%) และ 10 (90.90%) สายพันธุ์ ตามลำดับ และพบยีน *hgbB* ใน serogroup A และ D อย่างละ 34 (68.00%) และ 4 (36.36%) สายพันธุ์ ตามลำดับ การสร้าง sialidases พบยีน *nanB* ใน serogroup A และ D อย่างละ 33 (54.10%) และ 2 (18.18%) สายพันธุ์ ตามลำดับ และพบยีน *nanH* ใน serogroup A และ D อย่างละ 46 (92%) และ 4 (36.36%) สายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองยีนพบใน serogroup A มากกว่า D อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนการสร้าง hyaluronidase พบยีน *pmHAS* ใน serogroup A และ D อย่างละ 50 (100%) และ 2 (18.18%) สายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับ outer membrane proteins (OMP) พบยีน *ompA* และ *oma87* ในทุกสายพันธุ์ ส่วนยีน *ompH* พบใน serogroup A และ D 48 (96%) และ 11 (100%) สายพันธุ์ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนของ transferrin binding protein A ไม่พบยีน *tbpA* ในทั้งสองสายพันธุ์ (ตารางที่ 2) ในส่วนของ serogroup B ที่แยกได้ 1 สายพันธุ์ นั้น พบยีน *ptfA*, *pfhA*, *hgbA*, *nanB*, *ompA*, *ompH*, *oma87* และ *tbpA*

ตารางที่ 1 ลำดับของ oligonucleotides ที่ใช้ในการยืนยันชนิดเชื้อ จำแนกชนิดแคปซูลและตรวจหาชิ้นก่อความรุนแรงของเชื้อ *P. multocida*

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาด (bp)	เอกสารอ้างอิง
Species specific				
<i>KMT1</i>	KMT1T7 KMT1SP6	ATCCGCTATTACCCAGTGG GCTGTAAACGAACCTCGCCAC	460	Townsend <i>et al.</i> , 1998
Capsular serogroup				
<i>hyaDhyaC</i>	CAPA-FWD CAPA-REV	TGCCAAAATCGCAGTCAG TTGCCATCATTGTCTAGTG	1044	Townsend <i>et al.</i> , 2001
<i>bcbD</i>	CAPB-FWD CAPB-REV	CATTATCCAAAGCTCCACC GCCCCGAGAGTTTCAATCC	760	Townsend <i>et al.</i> , 2001
<i>dcfF</i>	CAPD-FWD CAPD-REV	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657	Townsend <i>et al.</i> , 2001
<i>ecbJ</i>	CAPE-FWD CAPE-REV	TCCGCGAAAAATTATTGACTC GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	511	Townsend <i>et al.</i> , 2001
<i>fcfD</i>	CAPF-FWD CAPF-REV	AATCGGAGAACGAGAAATCAG TTCCGCGCTCAATTACTCTG	851	Townsend <i>et al.</i> , 2001
Virulence-associated genes				
<i>ptfA</i>	F R	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC TCATGAATTCATTATGCGCAAAATCCT GCTG	488	Tang <i>et al.</i> , 2009
<i>pflA</i>	F R	TTCAGAGGGATCAATCTTCG AACTCCAGT TGGTTTGTCTG	286	Shayegh <i>et al.</i> , 2008
<i>toxA</i>	F R	TCT TAG ATG AGC GAC AAG G GAA TGC CAC ACC TCT ATA G	846	Shayegh <i>et al.</i> , 2008
<i>hgbA</i>	F R	TCAACGGCAGATAATCAGGG GCGGGAATGCTGAAGATAAG	267	Tang <i>et al.</i> , 2009
<i>hgbB</i>	F R	TCT TTG AGT ACG GCT TGA C CTT ACG TCA GTA ACA CTC G	540	Shayegh <i>et al.</i> , 2008
<i>nanB</i>	F R	CATTGCACCTAACACCTCT GGACACTGATTGCCCTGAA	555	Tang <i>et al.</i> , 2009
<i>nanH</i>	F R	GTGGGAACGGGAATTGTGA ACATGCCCAAGTTTGCCCTA	287	Tang <i>et al.</i> , 2009
<i>pmHAS</i>	F R	TCAATGTTTGGGATGTCCTGTTAG TGCGGAATGATCGGTGATAGA	430	Tang <i>et al.</i> , 2009
<i>ompA</i>	F R	CGCATAGCACTCAAGTTTCTCC CATAAACAGATTGACCGAAACG	201	Tang <i>et al.</i> , 2009
<i>ompH</i>	F R	CGCGTATGAAGTTTAGGT TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC	438	Tang <i>et al.</i> , 2009
<i>oma87</i>	F R	GGCAGCGAGCAACAGATAACG TGTTCTGCAAAATGTCGGGTGA	838	Tang <i>et al.</i> , 2009
<i>tbpA</i>	F R	TGG TTG GAA ACG GTA AAG C TAA CGT GTA CGG AAA AGC C	728	Shayegh <i>et al.</i> , 2008

การติดเชื้อ *P. multocida* ที่เกิดในสุกรทั่วโลกมี serogroup เฉพาะที่เกี่ยวข้องกับโรคทางเดินหายใจ (Pors *et al.*, 2013; Tigga *et al.*, 2014; Choudhary *et al.*, 2017) และรูปแบบการกระจายของ serogroup อาจแตกต่างกันได้ในพื้นที่เดียวกันเมื่อเวลาผ่านไป (Tang *et al.*, 2009; Varte *et al.*, 2014) โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อที่แยกได้จากปอดและทอนซิลของสุกรป่วยตายที่มีอาการของระบบทางเดินหายใจ จากพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทยในช่วงเวลา 8 ปี เมื่อทำการยืนยันแล้วพบ *P. multocida* serogroup A มากกว่า serogroup D เช่นเดียว

ตารางที่ 2 การกระจายของยีนก่อความรุนแรงแยกตามชนิด serogroup ของเชื้อ *P. multocida* 61 สายพันธุ์ที่เพาะแยกได้จากอวัยวะของสุกรป่วย

ยีนก่อความรุนแรง	จำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่พบ (%)	จำนวน (%) ของยีนก่อความรุนแรงในแต่ละ serogroup		P value	
		A (n=50)	D (n=11)	Chi ²	Fisher's exact
<i>ptfA</i>	61 (100)	50 (100)	11 (100)	N/A	N/A
<i>pflA</i>	27 (44.26)	26 (52)	1 (9.09)	0.017	0.033
<i>toxA</i>	1 (1.64)	0	1 (9.09)	0.023	0.164
<i>hgbA</i>	58 (95.08)	48 (96)	10 (90.90)	0.432	1
<i>hgbB</i>	38 (62.30)	34 (68)	4 (36.36)	0.112	0.157
<i>nanB</i>	35 (57.38)	33 (54.10)	2 (18.18)	0.009	0.014
<i>nanH</i>	50 (81.97)	46 (92)	4 (36.36)	<0.001	0.001
<i>pmHAS</i>	52 (85.25)	50 (100)	2 (18.18)	<0.001	<0.001
<i>ompA</i>	61 (100)	50 (100)	11 (100)	N/A	N/A
<i>ompH</i>	59 (96.72)	48 (96)	11 (100)	0.524	1
<i>oma87</i>	61 (100)	50 (100)	11 (100)	N/A	N/A
<i>tbpA</i>	0	0	0	N/A	N/A

N/A=ไม่สามารถคำนวณได้

กับการศึกษาของ Devi *et al.* (2018) ในประเทศอินเดีย (66.67% และ 33.33% ตามลำดับ) และการศึกษาของ Lee *et al.* (2016) ในประเทศเกาหลี (77.10% และ 22.90% ตามลำดับ) โดย Lee และคณะให้เหตุผลว่าในช่วงเวลานั้นประเทศเกาหลีมีการผลิตวัคซีนที่เป็น type D producing toxoid และ toxoid ออกมาใช้จำนวนมากเป็นผลให้พบ serogroup D ลดลง ในขณะที่ประเทศไทยขาดข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการใช้วัคซีนป้องกันโรคนี้และรายงานการศึกษาหลังการใช้จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าการใช้วัคซีนมีส่วนทำให้พบ serogroup A มากกว่า D ในทางตรงข้ามการศึกษาของ Tang *et al.* (2009) ในประเทศจีนพบ serogroup D มากกว่า A (54.94% และ 39.48% ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ewers *et al.* (2006) ในประเทศเยอรมนี (58.1% และ 34.9% ตามลำดับ) และการศึกษาของ Chandrasekaran and Yeap. (1982) ในประเทศมาเลเซีย (45% และ 20% ตามลำดับ) แต่ทั้งหมดไม่ได้รายงานถึงเหตุผลการพบ serogroup D มากกว่า A และในการศึกษานี้พบ serogroup B เพียง 1 สายพันธุ์เช่นเดียวกับการศึกษาของ Devi *et al.* (2018) แต่จากการศึกษาของ Ujvari

et al. (2015) กลับพบว่าการระบาดของโรคนี้ในฟาร์มสุกรหลังบ้านจำนวนมากในประเทศฮังการีเป็น serogroup B จากข้อมูลการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการแพร่กระจายของสามสายพันธุ์นี้อาจแตกต่างกันไปตามสถานที่ระยะเวลา หรือการใช้วัคซีนในพื้นที่นั้น ๆ

ส่วนการกระจายของยีนก่อความรุนแรงใน serogroup A ที่ทำการศึกษาทั้งหมด 12 ยีน พบว่ามี 6 ใน 10 ยีน (*ptfA*, *hgbA*, *hgbB*, *ompA*, *omph* และ *oma87*) ที่มีการกระจายอย่างใกล้เคียงกันกับที่พบใน serogroup D ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พิจารณาใช้รูปแบบการกระจายของยีนก่อความรุนแรงในพื้นที่เพื่อเลือกเชื้อตัวแทนในการผลิตวัคซีนให้สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันที่คล้ายคลึงกันได้โดยไม่ต้องคำนึงถึงชนิดของ serogroups (Tang et al., 2009; Lee et al., 2016; Devi et al., 2018) อย่างไรก็ตามมียีนก่อความรุนแรงบางชนิด เช่น ยีน *pfhA* (ควบคุมการยึดติดของเชื้อ *B. pertussis* ในเซลล์ของโฮสต์) ที่มีบทบาทสำคัญในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *P. multocida* (Harper et al., 2006) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง serogroup A กับ D ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษารั้งนี้ที่นอกจากจะพบยีน *pfhA* แล้วยังพบยีน *nanB*, *nanH* และ *pmHAS* ใน serogroup A มากกว่า serogroup D อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ส่วนยีน *toxA* และ *tbpA* อาจพบได้บ่อยมากหรือไม่พบเลยในทุก serogroup (Tang et al., 2009; Lee et al., 2016; Gharibi et al., 2017; Devi et al., 2018; Wang et al., 2019) ในการศึกษาที่พบยีน *toxA* ใน serogroup D และยีน *tbpA* ใน serogroup B อย่างละ 1 สายพันธุ์เท่านั้น โดย E-kobon et al. (2017) ได้แสดงความคิดเห็นไว้ว่าการพบยีน *toxA* จำนวนน้อยใน serogroup D ของประเทศไทยอาจเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะและวัคซีนอย่างมากในการกำจัดเชื้อสายพันธุ์ *toxA*-positive porcine ก่อนหน้านี้จึงทำให้ไม่พบยีน *toxA* ใน serogroup B แต่พบยีน *tbpA* แทน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษารั้งนี้และการศึกษาของ Verma et al. (2013) นอกจากนี้ Devi et al. (2018) ยังให้ความสำคัญกับยีนในกลุ่ม OMP ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคและมีศักยภาพในการสร้างภูมิคุ้มกันในแง่ของการใช้ inactivated whole bacteria ส่วนในแง่ของการพัฒนาเป็น recombinant

protein นั้น ประเทศไทยมีการพัฒนาการผลิต recombinant protein ในส่วนของยีน *ompH* เพื่อป้องกันโรคในโค กระบือ และสัตว์ปีกเท่านั้น (Tepsukulug et al., 2015; Sthitmetee et al., 2008) ต่อมา E-kobon et al. (2017) ได้ศึกษาเชิงลึกของยีนกลุ่ม OMP ในเชื้อ *P. multocida* ที่แยกได้จากโค กระบือ และสุกรป่วยของประเทศไทย โดยเสนอให้พิจารณาตำแหน่ง loop oligopeptides ของยีน *ompA* ใช้เป็นทางเลือกในการทำวัคซีนหน่วยย่อยในอนาคต ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตรวจหาการกระจายของยีนก่อความรุนแรงที่เกี่ยวข้องใน serogroup A และ D ของเชื้อ *P. multocida* ก่อโรคในสุกรในพื้นที่ที่ทำการศึกษานี้มีบทบาทสำคัญในการวางแผนการใช้วัคซีนเพื่อควบคุมโรคในพื้นที่นี้

สรุป และข้อเสนอแนะ

การศึกษาเชื้อ *P. multocida* ในครั้งนี้พบ serogroup A ในสัดส่วนที่มากกว่า D อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนรูปแบบการกระจายของยีนก่อความรุนแรงที่พบ 6 ยีนที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และมี 4 ยีนที่พบใน serogroup A มากกว่า D แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นั้นสามารถเลือก serogroup A เป็นตัวแทนในการผลิตวัคซีนกรณีเลือกใช้ whole bacteria ส่วนการเลือกยีนที่จำเพาะและเหมาะสมนำไปผลิตโปรตีนลูกผสมเพื่อใช้เป็นวัคซีนและการพิสูจน์ภูมิคุ้มกันแบบข้าม serogroup ต้องมีการศึกษาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ หัวหน้ากลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราที่สนับสนุนแนวคิดในการทำการศึกษารั้งนี้ รวมถึงข้าราชการและพนักงานทุกท่านในกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราที่ได้ช่วยเติมเต็มในงานส่วนของห้องปฏิบัติการ ข้อคิดเห็นและตรวจทานเอกสารต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

Arumugam, N.D., Ajam, N., Blackall, P.J., Asiah, N.M., Ramlan, M., Maria, J., Yuslan, S. and Thong, K.L. 2011. Capsular serotyping of *Pasteurella multocida* from various animal hosts a comparison of phenotypic and genotypic methods. *Trop. Biomed.* 28 (1): 55-63.

- Chandrasekaran, S. and Yeap, P.C. 1982. *Pasteurella multocida* in pigs: the serotypes and the assessment of their virulence in mice. *Br. Vet. J.* 138: 332–336.
- Choudhary, M., Ghosh, R.C., Malik, P., Choudhary, B.K. and Nety, S. 2017. Pathological changes associated with natural outbreak of swine pasteurellosis. *J. Pure. Appl. Microbiol.* 11: 237-240.
- Cowart, R.P., Backstrom, L. and Brim, T.A. 1989. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in Atrophic Rhinitis and Pneumonia in Swine. *Can. J. Vet. Res.* 53: 295-300.
- Devi, L.B., Bora, D.P., Das, S.K., Sharma, R.K., Mukherjee, S. and Hazarika, R.A. 2018. Virulence gene profiling of porcine *Pasteurella multocida* isolates of Assam. *Vet. World.* 11: 348-354.
- E-Kobon, T., Leeanan, R., Pannoi, S., Anuntasomboon, P., Thongkamkoon, P. and Thamchaipenet, A. 2017. OmpA protein sequence-based typing and virulence-associated gene profiles of *Pasteurella multocida* isolates associated with bovine haemorrhagic septicaemia and porcine pneumonic pasteurellosis in Thailand. *BMC. Vet. Res.* 13 (1): 243.
- Ewers, C., Lubke-Becker, A., Bethe, A., Kiebling, S., Filter, M. and Wieler, L.H. 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet. Microbiol.* 114: 304-317.
- Gharibi, D., Hajikolaei, M.R.H., Ghorbanpour, M. and Barzegar, S.K. 2017. Virulence gene profiles of *Pasteurella multocida* strains isolated from cattle and buffalo. *Vet. Arhiv.* 87 (6): 677-690.
- Harper, M., Boyce, J.D. and Adler, B. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS. Microbiol. Lett.* 265: 1–10.
- Hat, F., AL-Hasani, T.K., Boyce, J.D. and Adler, B. 2010. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 144: 1-17.
- Kat, O.C.H., Sharma, S.M., Pat, I.R.D., Kumar, S. And Verma, S. 2014. *In vitro* and *in vivo* pathogenicity studies of *Pasteurella multocida* strains harbouring different *ompA*. *Vet. Res. Commun.* 38: 183-191.
- Lee, J. and Woo, H.J. 2010. Antigenicity of partial fragments of recombinant *Pasteurella multocida* toxin. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20 (12): 1756-1763.
- Lee, K.E., Choi, H.W., Jo, H.Y., Kim, H.H. and Yang, D.K. 2016. *Pasteurella multocida* isolation from pigs with respiratory disease in Korea. *K. J. Vet. Res.* 56 (1): 37-40.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A. and Maguire, D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology*, 2nd ed. Mosby Ltd. 920 pp.
- Pors, S.E., Hansen, M.S., Bisgaard, M., Jensen, H.E. and Iburg, T.M. 2013. Immuno histochemical study of porcine lung lesions associated with *Pasteurella multocida*. *Vet. J.* 197: 483-488.
- R Development Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, Online Available: <http://www.Rproject.org>. Accessed on May 21. 2020.
- Shayegh, J., Atashpaz, S. and Hejazi, M.S. 2008. Virulence genes profile and typing of ovine *Pasteurella multocida*. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 3 (12): 206-213.
- Sthitmatee, N., Numees, S., Kawamoto, E., Sasaki, H., Yamashita, K., Takahashi, N., Kataoka, Y. and Sawada, T. 2008. Protection of chickens from fowl cholera by vaccination with recombinant adhesive protein of *Pasteurella multocida*. *Vaccine.* 26: 2398-2407.
- Tang, X., Zhao, Z., Hu, J., Wu, B., Cai, X., He, Q. and Chen, H. 2009. Isolation, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Pasteurella multocida* Strains from Swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 47: 951-958.
- Tepsukalag, P., Korkerd, U. Muangthai, K., Uthi, R., Rojanasthien, S. and Sthitmatee, N. 2015. Efficacy of Antibodies Conferred by the Recombinant Outer Membrane Protein H on Killing of *Pasteurella multocida* Strains by Complement-mediated Killing Assay. *J. Mahanakorn. Vet. Med.* 10 (1): 1-11.
- Tigga, M., Ghosh, R.C., Malik, P., Choudhary, B.K., Tigga, P. and Nagar, D.K. 2014. Isolation, characterization, antibiogram and pathology of isolated from pigs. *Vet. World.* 7: 363-368.
- Tomich, M., Planet, P.J. and Figurski, D.H. 2007. The tad locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 363-375.
- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y.A., Frost, J. and Adler, B. 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida cap* loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.* 39: 924-929.
- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M. and Dawkins, H.J. 1998. Development of PCR assays for species and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1096-1100.
- Ujvári, B., Szeredi, L., Pertl, L., Tóth, G., Erdélyi, K.K., Jánosi, S., Molnár, T. and Magyar, T. 2015. First detection of *Pasteurella multocida* Type B: 2 in Hungary associated with systemic pasteurellosis in backyard pigs. *Acta. Vet. Hung.* 63: 141-156.

- Varte, Z., Dutta, T.K., Roychoudhury, P., Begum, J. and Chandra, R. 2014. Isolation, identification, characterization and antibiogram of *Pasteurella multocida* isolated from pigs in Mizoram with special reference to progressive atrophic rhinitis. *Vet. World*. 7: 95-99.
- Verma, S., Sharma, M., Katoch, S., Verma, L., Kumar, S., Dogra, V., Chahota, R., Dhar, P. and Singh, G. 2013. Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. *Vet. Res. Commun.* 7 (1): 83-89.
- Wang, J., Sang, L., Sun, S., Chen, Y., Chen, D. and Xie, X. 2019. Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from dead rabbits with respiratory disease in Fujian, China. *BMC. Vet. Res.* 15: 438.
- Wilkie, I.W., Harper, M., Boyce, J.D. and Adler, B. 2012. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 361: 1-22.