

ศึกษาซีโรไทป์ของเชื้อ *Actinobacillus pleuropneumoniae* ระหว่างปี พ.ศ. 2543-2553 โดยวิธี PCR-RFLP และซีรัมวิทยา และความไวต่อยาต้านจุลชีพ

สมหมาย ยวพาณิซัมพันธ์ * วันทนี เนรมิตมานสุข
อภัสรา วรราช พชรี ทองคำคุณ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* ผู้รับผิดชอบบทความ โทร.02-5798908-14 E-mail: [sommai@dld.go.th](mailto:sommaiy@dld.go.th)

บทคัดย่อ

นำเชื้อ *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) จำนวน 61 สายพันธุ์ ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างปอดของสุกรป่วยที่สงสัยเป็นโรคปอดและเยื่อหุ้มปอดอักเสบ ที่ส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ตั้งแต่ ปี พ.ศ.2543-2553 มาจำแนกซีโรไทป์โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ร่วมกับวิธี agar gel immunodiffusion test โดยนำเชื้อมาทดสอบด้วยวิธี PCR แล้วนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Ase I ได้แบบแผนที่จำเพาะต่อกลุ่มซีโรไทป์ทั้ง 5 pattern พบ pattern 1 มากที่สุด 57.4 % (35/61) รองลงมาคือ pattern 2 และ 3 จำนวน 14.8 % (9/61) เท่ากัน จากนั้นจำแนกซีโรไทป์ โดยวิธีทางซีรัมวิทยาด้วยแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อซีโรไทป์ภายในกลุ่มเดียวกัน สามารถจำแนกได้ 8 ซีโรไทป์ ได้แก่ ซีโรไทป์ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 9 โดยพบซีโรไทป์ 1 มากที่สุด จำนวน 55.7% (34/61) รองลงมาคือ ซีโรไทป์ 2 จำนวน 14.8% (9/61) ซีโรไทป์ 5 จำนวน 8.2% (5/61) และซีโรไทป์ 3 จำนวน 6.6% (4/61) ตามลำดับ ซีโรไทป์ 1 พบมากที่สุดในจังหวัดราชบุรี (19/61) รองลงมาคือจังหวัดนครปฐม (6/61) และจังหวัดลพบุรี (3/61) จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion test พบว่า เชื้อส่วนใหญ่ไวต่อ ceftiofur (93.1%) รองลงมา ได้แก่ cephalothin (91.4%), amoxicillin/clavulanic acid (87.5%), colistin (81.2%) และ cephalixin (80.0%)

คำสำคัญ : *Actinobacillus pleuropneumoniae*, อุบัติการณ์, การจำแนกซีโรไทป์, PCR-RFLP, ความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

บทนำ

เชื้อ *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคปอดและเยื่อหุ้มปอดอักเสบในสุกร (swine pleuropneumonia) ซึ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นโรคระบาดที่รุนแรงในระบบทางเดินหายใจและก่อความเสียหายอย่างมากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก (Nicolet, 1992) การติดเชื้อครั้งแรกจะทำให้สุกรเป็นโรคแบบเฉียบพลันตายกะทันหันภายใน 24-48 ชั่วโมงจากอาการปอดบวมอย่างรุนแรง เชื้อจะแพร่ระบาดไปสู่สุกรตัวอื่นโดยทางระบบหายใจ ทำให้เกิดการระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้นสุกรที่ยังมีชีวิตอยู่จะแสดงของโรคแบบเรื้อรังหรือเป็นพาหะ

เชื้อ APP มี 2 biotype โดยอาศัยการใช้ Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) หรือ V-factor เป็นตัวแยก และแบ่งออกเป็น 15 ซีโรไทป์ คือ 1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 และ 15 (Blackall et al., 2002) การระบาดและความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับ ซีโรไทป์ ซึ่ง ซีโรไทป์ ที่ทำให้เกิดโรครุนแรงและทำให้สุกรเสียชีวิตมากที่สุด คือ ซีโรไทป์ 1 และ 5 ในประเทศไทย ซีโรไทป์ ที่พบคือ 1, 2, 3, 5 และ 7 และพบ ซีโรไทป์ 1 บ่อยที่สุด (วันทนีย์และคณะ 2543)

การวินิจฉัยโรค swine pleuropneumonia ในห้องปฏิบัติการจะใช้วิธี conventional method ซึ่งต้องเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษและต้องมี v-factor บ่มในสภาพที่ต้องมี 5% CO₂ ส่วนการแยก serotype (serovar) ใช้วิธี slide agglutination test (SAT) หรือ agar gel immunodiffusion test (AGID) ซึ่งมีความไวต่ำและเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ได้ ดังนั้นเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular biology) จึงถูกนำมาใช้เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจให้รวดเร็ว แม่นยำ และถูกต้อง เช่น Osaki et al. (1997) ใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ตรวจหาชิ้นที่สร้าง outer membrane lipoprotein (*oml A*) ซึ่งเชื้อ APP จะมี *oml A* gene ทุก ซีโรไทป์ และสามารถแยกซีโรไทป์ ได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อให้ได้แบบแผนที่จำเพาะของเชื้อแต่ละซีโรไทป์ ที่เรียกว่า restriction fragment length polymorphisms (RFLP) การนำวิธี RFLP มาใช้ร่วมกับวิธี SAT และ AGID ทำให้แยก ซีโรไทป์ ได้รวดเร็วขึ้น และช่วยในการศึกษาเชื้อตัวอย่างที่มีจำนวนมากได้เป็นอย่างดี

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาซีโรไทป์ของเชื้อ APP โดยวิธี PCR-RFLP ร่วมกับวิธีทางซีรัมวิทยา ทำให้ได้ข้อมูลทางระบาดวิทยาและความไวต่อยาต้านจุลชีพ สามารถนำไปใช้รักษาและควบคุมโรคในสุกร นอกจากนั้นยังนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนาการผลิตวัคซีนและการศึกษาวิจัยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อ *Actinobacillus pleuropneumoniae*

เชื้อ APP ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างปอดของสุกรป่วยที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ.2543-2553 จำนวน 61 สายพันธุ์ และเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน APP ทั้ง 12 ซีโรไทป์ ได้แก่ strains 4074 (ACTT27088), S1536 (ACTT27089), S1421, M32, K17, Femo, WF83, 405,

CVJ13261, D13390, 56153 และ S1096 จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ซึ่งเก็บที่ -80°C นำมาเพาะบน blood agar แล้วขีดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทับบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ V-factor แก่เชื้อ APP บ่มที่ 37°C 18-24 ชั่วโมง นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ APP จากนั้นนำมาเพาะบน chocolate agar บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง นำไปสกัด DNA เพื่อใช้เป็น DNA template

การทำ PCR-RFLP

สกัด DNA จากเชื้อ APP โดยนำ colony ของเชื้อ ที่เพาะใน chocolate agar ละลายใน PBS pH 7.2 ปริมาณ 1 มล. นำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 100 μL นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นลง แล้วปั่นที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที แยกเก็บส่วนน้ำใส ใช้เป็น DNA template

นำ DNA template 10 μL ใส่ในหลอด PCR ขนาด 0.2 mL ที่มี 82 μL ของ PCR mastermix (Qiagen, Germany) ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM (each) dNTP, 0.5 U Taq DNA polymerase และ Distilled water แล้วเติม Forward primer 5' CCT AAG GTT GAT ATG TCC GCA 3' และ Reverse primer 5' GTT GCC GTA GCA CCG ATT ACG 3' (Osaki et al., 1997) อย่างละ 0.4 μM โดยมี น้ำกลั่นและเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน APP เป็นตัวควบคุมลบและบวก ตามลำดับ จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง iCycler (BIO-RAD, U.S.A.) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ initial activation ที่ 95°C นาน 15 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturing 94°C นาน 1 นาที annealing 58°C นาน 30 วินาที extension 72°C นาน 1 นาที และ final extension 72°C นาน 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ PCR product ด้วย gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker

หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ให้ผลบวกจากเชื้อทั้ง 61 ตัวอย่างและเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง 12 serotype มาตกตะกอนด้วย ethanol เพื่อให้ได้ purified DNA จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Ase I นำไปวิเคราะห์ ด้วย gel electrophoresis เช่นเดียวกับการทำ PCR

การจำแนกซีโรไทป์ โดยวิธีทางซีรัมวิทยา

จำแนกซีโรไทป์เชื้อ APP จำนวน 61 สายพันธุ์ โดยวิธี slide agglutination test วิธีการโดยย่อ คือ ใช้ slide ที่สะอาด หยด hyperimmune serum 1 หยด ผสมกับเชื้อ 1-2 โคโลนี เพื่อดูการรวมกลุ่มของเชื้อและแอนติซีรัมที่จำเพาะ และวิธี agar gel immunodiffusion test วิธีการคือ เท 1% Noble agar บน slide ใหม่ที่สะอาด ปริมาณ 5 mL แล้วรอให้ agar แข็งตัว จากนั้นเจาะ agar เป็นหลุมด้วยที่เจาะ แล้วหยด antigen ที่ต้องการทดสอบ ที่หลุมกลาง ใส่ hyperimmune serum ที่หลุมรอบ ๆ หลุมละ 15-20 μL เพื่อดูการตกตะกอนที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion test (Bauer et al., 1966) โดยนำเชื้อ APP ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland no.0.5 เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษที่ใช้ทดสอบกับยาต้านจุลชีพ แล้ววางแผ่นยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulanic acid, Ampicillin, Ceftiofur, Cephalexin, Cephalothin, Colistin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Erythromycin, Gentamicin, Kanamycin, Nalidixic acid, Ofloxacin, Penicillin G, Streptomycin, Tetracycline และ Trimethoprim/Sulfamethoxazole และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม WHONET 5

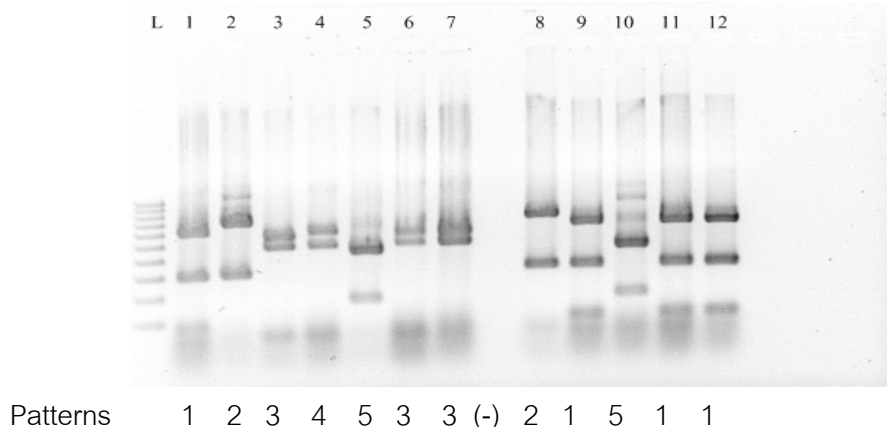
ผล

การทำ PCR-RFLP

ผลการทดสอบเชื้อ APP จำนวน 61 สายพันธุ์ ด้วยวิธี PCR พบว่าเชื้อทั้งหมดให้ PCR product ขนาด 970 bp เมื่อจำแนกสายพันธุ์ย่อยด้วยวิธี RFLP โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Ase I เปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน APP ทั้ง 12 ซีโรไทป์ พบว่าเชื้อ 61 สายพันธุ์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 รูปแบบ (pattern) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Osaki et al., 1997 ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ซีโรไทป์ 1, 9, 11, 12 เป็น pattern 1 กลุ่มที่ 2 ซีโรไทป์ 2, 8 เป็น pattern 2 กลุ่มที่ 3 ซีโรไทป์ 3, 6, 7 เป็น pattern 3 กลุ่มที่ 4 ซีโรไทป์ 4 เป็น pattern 4 และกลุ่มที่ 5 ซีโรไทป์ 5, 10 เป็น pattern 5 โดยขนาดของแถบ DNA แสดงในตารางที่ 1 และ รูปที่ 1 และจากการทดสอบตัวอย่างเชื้อทั้งหมด พบ pattern 1 มากที่สุด 57.4 % (35/61) รองลงมาคือ pattern 2 และ 3 จำนวน 14.8 % (9/61) เท่ากัน pattern 5 จำนวน 8.2 % (5/61) และ pattern 4 จำนวน 4.9 % (3/61) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *Actinobacillus pleuropneumoniae* ที่แยกได้ ระหว่างปี 2543 – 2553
โดยวิธี PCR-RFLP ขนาดของแถบดีเอ็นเอส่วนยีน *ompA* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ Ase I

กลุ่ม (RFLP pattern)	จำนวนเชื้อที่ให้ผลบวก / จำนวนเชื้อทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ (%)	PCR product (fragment sizes)
1	35 / 61	57.38	590, 290, 75, 15 bp
2	9 / 61	14.75	680, 290 bp
3	9 / 61	14.75	520, 450 bp
4	3 / 61	4.92	550, 450 bp
5	5 / 61	8.20	410, 405, 155 bp



รูปที่ 1 แบบแผน PCR-RFLP ของเชื้อ APP 1-12 ซีโรไทป์

การจำแนกสีโรไทป์โดยวิธีทางสีรั่มวิทยา

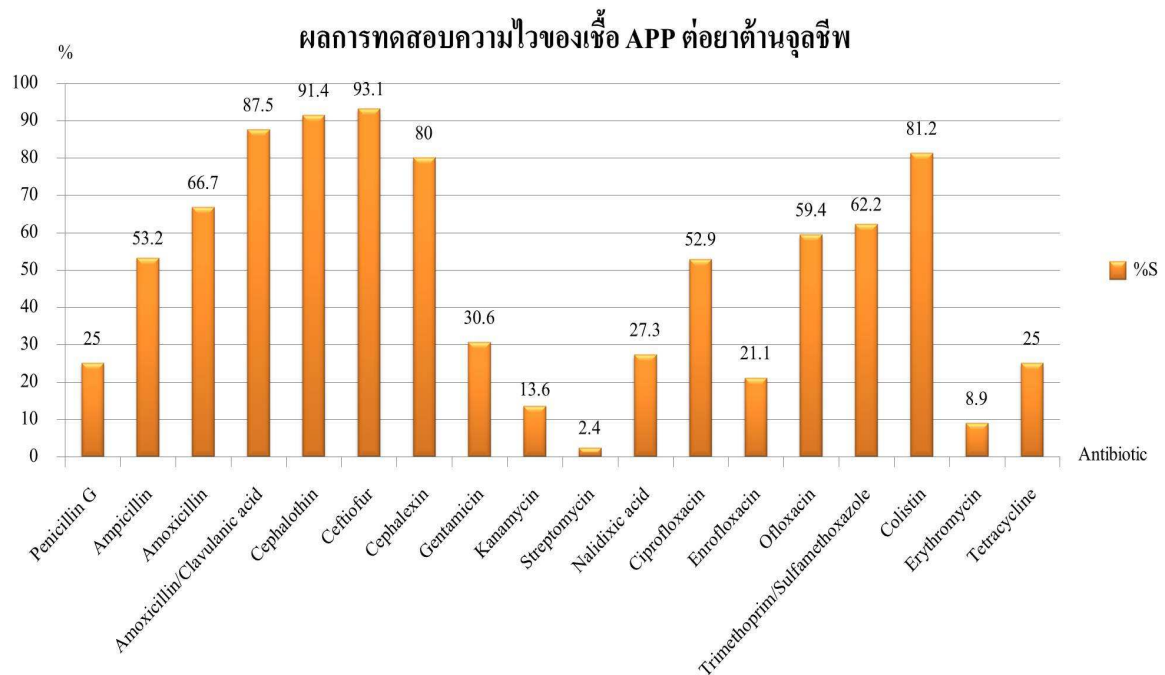
จากการจำแนกสายพันธุ์ย่อยโดยวิธีทางชีววิทยา พบเชื้อ APP ที่ก่อโรค 8 ซีโรไทป์ ได้แก่ ซีโรไทป์ 1,2,3,4,5,6,7 และ 9 ซีโรไทป์ 1 พบมากที่สุด จำนวน 55.7% (34/61) รองลงมาคือ ซีโรไทป์ 2 จำนวน 14.8% (9/61) ซีโรไทป์ 5 จำนวน 8.2% (5/61) และซีโรไทป์ 3 จำนวน 6.6% (4/61) ตามลำดับ ซีโรไทป์ 1 พบมากที่สุด ในจังหวัดราชบุรี (19/61) รองลงมาคือจังหวัดนครปฐม (6/61) และจังหวัดลพบุรี (3/61) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการจำแนกเชื้อโรพิษของเชื้อ *Actinobacillus pleuropneumoniae* ที่แยกได้ ระหว่างปี 2543 – 2553 โดยวิธีทางซีรั่มวิทยา แยกตามพื้นที่ที่ส่งตัวอย่าง

สัปดาห์	จังหวัด																		รวม	เปอร์เซ็นต์ (%)		
	กรุงเทพฯ	กาญจนบุรี	ขอนแก่น	ฉะเชิงเทรา	ชลบุรี	นครปฐม	นครราชสีมา	นนทบุรี	บุรีรัมย์	ประจวบคีรีขันธ์	พระนครศรีอยุธยา	พิษณุโลก	ราชบุรี	ลพบุรี	ลำพูน	เลย	สระบุรี	สิงห์บุรี			อุดรธานี	อุบลราชธานี
1				1	1	6		1		1	2		19	3							34	55.7
2		1		2	1								1	2	1		1				9	14.8
3			1	1			2														4	6.6
4			1						1					1							3	4.9
5				1									1					1	1	1	5	8.2
6				1									1			1					3	4.9
7	1											1									2	3.3
8																					0	0.0
9													1								1	1.6
10																					0	0.0
11																					0	0.0
12																					0	0.0
รวม	1	1	2	6	2	6	2	1	1	1	2	1	23	6	1	1	1	1	1	1	61	100.0

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion test พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ไวต่อ Cefotiofur คิดเป็น 93.1% รองลงมา ได้แก่ Cephalothin จำนวน 91.4% Amoxicillin/Clavulanic acid จำนวน 87.5% Colistin จำนวน 81.2% และ Cephalexin จำนวน 80.0% ตามลำดับ (รูปที่ 2) ยังพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ดื้อต่อยา Streptomycin มากที่สุด คิดเป็น 97.6% รองลงมา ได้แก่ Penicillin G 75.0% Enrofloxacin 73.7% Nalidixic acid 65.9% และ Gentamicin 53.1%



รูปที่ 2 แสดงผลความไวของเชื้อ APP ต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ

วิจารณ์

โรค swine pleuropneumonia มีการระบาดอยู่ทั่วโลก บริเวณไหนที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่น การระบาดจะมาก เชื้อบางซีโรไทป์มีความรุนแรงมาก เช่น ซีโรไทป์ 1 จะทำให้สุกรที่ติดโรคตายอย่างกะทันหันเป็นจำนวนมาก (Sorensen et al., 1998) ในสุกรที่เป็นโรคแบบเรื้อรังจะมีอัตราการเจริญเติบโตช้า ต้องเพิ่มเวลาเลี้ยงเพื่อส่งตลาด ลักษณะของปอดสุกรที่เป็นโรคจะมีเลือดคั่ง เยื่อหุ้มปอดและปอดอักเสบ มีหย่อมเนื้อตายที่ปอด (Nicolet, 1992) ซึ่งเป็นลักษณะที่ตลาดไม่ต้องการ การระบาดของโรคในแต่ละประเทศเกิดจากซีโรไทป์ที่แตกต่างกัน เช่น ประเทศเดนมาร์ก สวีเดน นอร์เวย์ และสวิตเซอร์แลนด์ พบซีโรไทป์ 2 มากที่สุด ในขณะที่สหรัฐอเมริกา พบซีโรไทป์ 1, 5 มากที่สุด ส่วนในญี่ปุ่น การระบาดส่วนใหญ่เกิดจากซีโรไทป์ 1 และ 2 อาจพบซีโรไทป์อื่นบ้างแต่น้อย (Dubreuil et al., 2000) สำหรับประเทศไทย จากการศึกษารั้วนี้ตรวจพบซีโรไทป์ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 9 โดยพบซีโรไทป์ 1 มากที่สุด ในขณะที่ผลการศึกษาของ วันทนีย และคณะ (2543) พบซีโรไทป์ 10 ด้วย นอกจากนี้มีรายงานการพบ

ซีโรไทป์ 1 – 9, 11 และ 12 (Assavacheep et al., 2003) และยังมีการตรวจพบสายพันธุ์คล้ายซีโรไทป์ 15 ด้วย (Tonpitak, 2010) จึงอาจสรุปได้ว่าซีโรไทป์ ของเชื้อ APP ที่ตรวจพบในประเทศไทย ได้แก่ ซีโรไทป์ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 โดยตรวจพบ ซีโรไทป์ 1 มากที่สุด และพบมากในจังหวัดราชบุรี

ส่วนยาต้านจุลชีพที่ใช้ได้ผลดี คือ cephalothin (100.0%) ampicillin (100.0%) และ colistin (95.2%) (รัชชัย 2536) cephalothin (90.6%) ampicillin (83.3%) และ colistin (70.7%) (วันทนี และคณะ 2543) สอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ที่พบว่า ยา colistin (81.2%) และ cephalothin (91.4%) ยังคงใช้ได้ผล การวิจัยครั้งนี้พบว่า ampicillin มีความไว 53.2% ซึ่งลดลงเมื่อเทียบกับงานวิจัยครั้งก่อน จึงไม่แนะนำให้เลือกใช้เพื่อการควบคุมโรค ดังนั้นยาต้านจุลชีพที่ควรเลือกใช้ในการควบคุมโรคมีดังนี้ ceftiofur, cephalothin, amoxicillin/clavulanic acid, colistin และ cephalixin ในทางตรงข้ามมีรายงานการดื้อของเชื้อ APP ต่อยา ampicillin, chloramfenicol, oxytetracycline, streptomycin และ sulfonamides (Yoshimura et al., 2002; Asawa et al., 1995; Dom et al., 1994) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้

เมื่อมีการระบาดของโรค เชื้อ APP จะแพร่ไปอย่างรวดเร็ว เพราะเป็นการติดเชื้อในทางระบบหายใจ แต่เนื่องจากเป็นเชื้อที่เจริญเติบโตค่อนข้างยาก ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี x-factor และ v-factor อีกทั้งยังต้องเลี้ยงไว้ในสภาพบรรยากาศที่มี 5% CO₂ ดังนั้นการรักษาและการควบคุมเชื้อจะทำได้ช้า ถ้าการเพาะแยกเชื้อและการพิสูจน์เชื้อใช้เวลานาน การจำแนกสายพันธุ์ย่อย (serotype) โดยวิธีทางซีรัมวิทยาที่ใช้ในการตรวจสัตว์ก่อนนำเข้าฝูงซึ่งมีหลายวิธี เช่น complement fixation test (Nicolet et al., 1971), tube agglutination test, 2-mercaptoethanol tube agglutination test (Mittal et al., 1984) and enzyme-linked immunoabsorbent assay (Nicolet et al., 1981) แต่ไม่นิยมใช้เพื่อการชันสูตรโรค เชื้อ APP บางสายพันธุ์มีส่วนของ lipopolysaccharide หรือโปรตีนที่ผนังเซลล์คล้ายกัน (Blackall et al., 2002) ทำให้มีการเกิดปฏิกิริยาข้ามจากการทดสอบทางซีรัมวิทยาระหว่างซีโรไทป์ได้ เช่น ซีโรไทป์ 1, 9, 11 ซีโรไทป์ 4, 7 และ ซีโรไทป์ 3, 6, 8 (Perry et al., 1990; Jaglic et al., 2004) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ในการแยกซีโรไทป์และศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับความแตกต่างของซีโรไทป์ เช่น *ompA* gene โดยเทคนิค PCR-RFLP (Osaki et al., 1997) การศึกษา *apxIVA* gene ด้วยเทคนิค PCR-REA (Jaglic et al., 2004) การศึกษาของ Sthitmatee et al. (2003) ด้วยเทคนิค PCR typing system อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวไม่สามารถใช้แยกซีโรไทป์ 2 กับ 8 ซีโรไทป์ 5A กับ 5B และ ซีโรไทป์ 9 กับ 11 ได้ ส่วน Tonpitak (2009) ใช้ multiplex PCR ร่วมกับ single PCR ไม่สามารถแยกซีโรไทป์ 5A กับ 5B ซีโรไทป์ 9 กับ 11 และ ซีโรไทป์ 12 กับ 13 ได้เช่นกัน จากการศึกษการแยกซีโรไทป์โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ร่วมกับวิธี agar gel immunodiffusion test ครั้งนี้ พบว่าสามารถลดปัญหาการตัดสินปฏิกิริยาข้ามที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากการใช้เทคนิค PCR-RFLP เป็นการจัดกลุ่มซีโรไทป์ตามแบบแผนที่เกิดขึ้นก่อนแล้วจึงใช้เทคนิค agar gel immunodiffusion test ตัดสินชนิดของซีโรไทป์จากการเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะ อย่างไรก็ตามเนื่องจากสายพันธุ์เชื้อมีจำนวนไม่มาก จึงควรมีการศึกษาวิจัยด้านเทคนิคการตรวจหาซีโรไทป์ที่ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้นต่อไป เพื่อช่วยให้การวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อทำได้อย่างรวดเร็ว อันจะเป็นประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยา การผลิตวัคซีน การควบคุมโรคและการพัฒนาด้านปศุสัตว์ของประเทศไทยในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.ดร.พรเพ็ญ พัฒนโสภณ ที่ช่วยให้คำปรึกษาและแก้ไขต้นฉบับ ดร.ทวีวัฒน์ ตีมะการ ที่ช่วยแก้ไขต้นฉบับ นางสาวหนึ่งฤทัย อารีย์มิตร ช่วยตรวจทานและจัดพิมพ์ นายชยภัค สีนุ่ นายกำธร พรมโต ช่วยเตรียมงานและเจ้าหน้าที่ในห้องแบคทีเรียและเชื้อราทุกท่าน ที่ช่วยปฏิบัติงาน ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้

เอกสารอ้างอิง

- ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อารม. 2536. ความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *Actinobacillus pleuropneumoniae* จากสุกร. วารสารวิทยาศาสตร์การแพทย์. 7(1): 13-19.
- วันทนีย์ เนรมิตมานสุข จิรา วายุโชติ ไพโรจน์ มินเด็น และรัชนี ศิลปะสิทธิ์. 2533. ซีโรไทป์ของเชื้อ ฮีโมฟิลัส พลุโรนิวโมนี ที่แยกได้ในประเทศไทย. เวชสารสัตวแพทย์. 20(2): 367-372.
- วันทนีย์ เนรมิตมานสุข อุบลรัตน์ แทนกลาง สมชัย เจียมพิทยานุวัฒน์ และทริกา จันทนีโชติ. 2543. โรคพลุโรนิวโมนีในสุกร ระหว่างปี พ.ศ.2530-2542. คู่มือมาตรฐานการชันสูตรโรคปอดและเยื่อหุ้มปอดอักเสบ. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ 21-23 พฤษภาคม 2546. หน้า 18-23.
- Asawa, T., Kobayashi, H., Mitani, K., Ito, N. and Morozumi, T. 1995. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from piglets with pleuropneumonia. J. Vet. Med. Sci. 57: 757-759.
- Assavacheep, P., Persson, M., Luengyosuechakul, S., Watanaphansak, S., Laohasinnarong, D., Pungkhun, P. and Wallgren, P. 2003. *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Thai pig herds. Prevalence of serum antibodies and relation to performance. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 80(8): 390-395.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am. J. Clin. Path. 45: 493-496.
- Blackall, P. J., Klaasen, H. L., Van Den Bosch, H., Kuhnert, P. and Frey, J. 2002. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. Vet. Microbiol. 84: 47-52.
- Dom, P., Hommeez, J., Castryck, F., Devriese, L.A. and Haesebrouck, F. 1994. Serotyping and quantitative determination of in vitro antibiotic susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated in Belgium (July 1991-August 1992). Vet. Quarterly 16: 10-13.
- Dubreuil, J. D., Jacques, M., Mittal, K.R. and Gottschalk, M. 2000. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. Animal Health Research Reviews 1: 73-93.

- Jaglic Z., Svastova P., Rychlik I., Nedbalcova K., Kucerova Z., Pavlik I. and Bartos M. 2004. Differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR-REA based on sequence variability of the *apxIVA* gene and by ribotyping. *Veterinary Microbiology*, 103: 63-69.
- Mittal, K. R., Higgins, R. Lariviere, S. and Leblanc, D. 1984. A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 45: 715-719.
- Nicolet, J., de Meuron, P. A. and Bachmann, P. 1971. IV. L'épreuve de fixation du complement, un test de dépistage des infections à *Haemophilus parahaemolyticus*. *Schweiz Arch Tierheilkd* 113: 191-200.
- Nicolet, J., Paroz, P. H., Krawinkler, M. and Baumgartner, A. 1981. An enzyme-linked immunosorbent assay, using an EDTA-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res.* 42: 2139-2142.
- Nicolet, J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae* In: Disease of swine. 7th ed. edited by Iowa state University Press, Ames, Iowa, pp. 401-408.
- Osaki, M., Sato, Y., Tomura, H., Ito, H. and Sekizaki, T. 1997. Genetic diversity of the genes encoding the outer membrane lipoprotein (*omlA*) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Vet. Med. Sci.* 59(3): 213-215.
- Perry, M. B., Altman, E., Brisson, J.-R., Beynon, L. M. and Richards, J. C. 1990. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.* 4: 299-308.
- Sorensen, V., Nielsen, J.P., Barfod, K. and Schirmer, A.L. 1998. Inoculation of pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, 5B, 6, 7, 8, 10 and 12: Clinical, serological, microbiological and pathological observation. Proceeding of the 15th IPVS Congress, Birming, England 5-9 July 1998.
- Sthitmatee, N., Sirinarumitr, T., Makonkewkeyoon, L., Sakpuaram, T., Tesaprateep, T. 2003 Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based-apx genes. *Molecular and Cellular Probes.* 17(6): 301-305.
- Tonpitak, W. 2009. Serovar Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by combination of multiplex PCR and single PCR based on *apx* and *cps* genes. *KKU. Vet. J.* 19(2): 151-160.
- Tonpitak, W. 2010. Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15-like strain from a porcine tonsil in Thailand : A case report. *Thai. J. Vet. Med.* 40(3): 343-348.
- Yoshimura, H., Takagi, M., Ishimura, M., Endoh, Y.S., 2002. Comparative in vitro activity of 16 antimicrobial agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Res. Commun.* 26: 11-19.
- WHONET 5, Microbiology Laboratory Database Software: World Health Organization, Geneva, Switzerland and WHO Collaborating Center for Surveillance of AMR, Microbiology Lab., Brigham and Women.s Hospital, Boston, MA, U.S.A.

Serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs during 2000-2010 by PCR-RFLP and serology and their antimicrobial susceptibilities

Somma Yuwapanichsampan *

Wantanee Neramitmansook

Apasara Worarach

Pacharee Thongkamkoon

National Institute of animal Health, DLD, Kasetklang, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding person Tel. 02-5798908-14 E-mail: sommaiy@dld.go.th

Abstract

Sixty one isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* obtained from lung samples submitted to bacteriology and mycology section, National Institute of Animal Health for diagnosis of swine pleuropneumonia during 2000-2010 were tested for serotyping by combination of two techniques, PCR-RFLP and agar gel immunodiffusion. After PCR testing, the PCR products of all isolates were digested by restriction enzyme *Ase I* showing 5 groups of RFLP patterns, of which pattern 1 was predominated at 57.4% (35/61), followed by pattern 2 and 3 both at 8.2% (5/61). Then, the serological test using specific antisera within each group was performed and totally 8 serotypes were identified including serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 9. The most common serotype among 61 isolates was serotype 1 at 55.7% (34/61), followed by serotype 2 at 14.8% (9/61), serotype 5 at 8.2% (5/61) and serotype 3 at 6.6% (4/61). The serotype 1 was mostly found in Ratchaburi (19/61) followed by Nakhonpathom (6/61) and Lopburi (3/61). The antimicrobial susceptibility test revealed that the isolates were sensitive to ceftiofur (93.1%), cephalothin (91.4%), amoxicillin/clavulanic acid (87.5%), colistin (81.2%) and cephalexin (80.0%).

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, incidence, serotyping, PCR-RFLP, antimicrobial susceptibilities