

รายงานสัตว์ป่วย : การติดเชื้อ Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) ในลูกเสือดำ

สุภาพร จั๋งพานิช^{1*} ธวัชรัตน์ เกียรติยิ่งอังคสุลี¹ พชรี ทองคำคุณ¹ ดวงทอง บัจฉิมะศิริ¹ จุฬฉัตร จำปรัตน์²

¹ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900

² สวนสัตว์ฟาร์มโชคชัย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 025798908-14 โทรสาร 025798918 email: supapornj@dld.go.th

บทคัดย่อ

ลูกเสือดำ (*Panthera pardus*) เพศเมีย อายุประมาณ 2 เดือน ตายหลังจากป่วยด้วยอาการทางระบบทางเดินหายใจ 3 วัน ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบ alveolar emphysema, edematous fluid และ proteinaceous substance ใน alveolar space และ pleura รวมทั้ง pleuritis นอกจากนี้ยังพบเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบรูปแท่งสั้นจำนวนมากกระจายในช่องว่างของถุงลมปอด การเพาะแยกเชื้อจากปอดสด พบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (beta-hemolysis) เมื่อย้อมสีจะติดสีแกรมลบ รูปแท่งสั้น ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมียืนยันว่าเป็นเชื้อ hemolytic *Escherichia coli* (hemolytic *E. coli*) การตรวจหายีนที่สร้าง toxin (toxin genes) และยีนที่แสดงปัจจัยความรุนแรง (virulence factor genes) ด้วยวิธี PCR ผลไม่พบ toxin genes ชนิด Heat labile toxin (LT), Heat Stable toxin (ST1a, ST1b), Verotoxin (VT1, VT2, VT2e) แต่พบ virulence factor genes 8 ชนิด ได้แก่ *papG* alleles III, *hlyD*, *cnf1/2*, *sfaD-E*, *papC*, *iroN*, *fim* และ *papA* จากนั้นตรวจยืนยันด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่พบทำให้บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC) การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ 11 ชนิด พบว่าเชื้อไม่ดื้อต่อยาทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ สรุปได้ว่าการติดเชื้อ ExPEC เป็นสาเหตุที่ทำให้ลูกเสือดำปอดอักเสบ (pneumonia) และตายในที่สุด

คำสำคัญ: ลูกเสือดำ, ปอดอักเสบ, virulence factor genes, hemolytic *Escherichia coli*, Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC

บทนำ

Escherichia coli (*E. coli*) เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ (Bettelheim, 1997) จัดอยู่ใน Family Enterobacteriaceae การจำแนกชนิดของเชื้อ (serotype) *E. coli* จำแนกตามแอนติเจน 3 ชนิด ได้แก่ Somatic antigen (O-antigen) ซึ่งเป็นสารประกอบ lipopolysaccharide ที่ชั้นของผนังเซลล์, Capsular antigen (K-antigen) เป็นสารประกอบ polysaccharide ที่ห่อหุ้มเซลล์และ Flagella antigen (H-antigen) เป็นโปรตีนที่อยู่บน flagella นอกจากนี้ยังแบ่ง strains ของ *E. coli* จากลักษณะทางพันธุกรรมและการแสดงอาการทางคลินิกออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ Commensal strain, Intestinal pathogenic strains และ Extraintestinal pathogenic strains (Russo and Johnson, 2000) กลุ่มแรก Commensal strains พบอยู่ในทางเดินอาหารและขาดคุณลักษณะความรุนแรงเฉพาะที่จำเป็นในการก่อโรค (Johnson et al., 2001a) กลุ่มที่สอง Intestinal pathogenic strains มียีนที่ผลิตสารพิษ (toxin genes) ทำให้เกิด gastroenteritis ในคนและสัตว์ ถูกแบ่งเป็นหลายชนิด ได้แก่ enteropathogenic, enterotoxigenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, enteroaggregative and diffusely adherent *E. coli* กลุ่มสุดท้าย Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) เป็น *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคนอกทางเดินอาหาร ซึ่งปกติสามารถพบในทางเดินอาหารได้โดยไม่ก่อโรค แต่เมื่อเข้าไปอยู่อวัยวะอื่นจะก่อโรคได้ (Johnson and Russo, 2002) กลุ่มนี้มักก่อโรค Urinary Tract Infections (UTIs), meningitis, septicemia และ pneumonia ในคนและสัตว์ (Russo and Johnson, 2000)

ExPEC เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญเนื่องจากสามารถติดต่อได้ระหว่างคนและสัตว์ (zoonotic pathogens) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในคนหรือสัตว์ที่มีอายุน้อยหรืออายุมากหรือระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องจะสามารถติดเชื้อได้ง่ายและมีอาการรุนแรง นอกจากนี้ ExPEC ยังมีแนวโน้มที่จะดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดมากขึ้น ทำให้เกิดผลกระทบทางด้านสาธารณสุขและสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก แต่ปัจจุบันปัญหาที่เกิดจากเชื้อนี้ยังไม่ค่อยได้รับความสนใจ ในสหรัฐอเมริกา มีรายงานเชื้อ ExPEC ซึ่งก่อเฉพาะโรค UTIs, pneumonia, surgical site infection และ sepsis ถึงปีละประมาณ 6.7 – 8.6 ล้าน case คิดเป็น มูลค่าการสูญเสีย 1.5 – 2.3 พันล้านดอลลาร์ ทั้งนี้ยังไม่รวม case ที่แสดงอาการอื่นๆ และ case ที่ตายจากการติดเชื้อ ExPEC (Russo and Johnson, 2003) เมื่อเปรียบเทียบกับอาการของ *E. coli* กลุ่ม Enterohemorrhagic STEC O157 ต่อปี มี case ป่วย 73,000 ราย และ ตาย 61-65 คน มูลค่าการสูญเสีย 405 ล้านดอลลาร์ (Frenzen et al., 2005) การตรวจวินิจฉัย ExPEC สามารถยืนยันได้จาก virulence factor genes โดยปกติ ExPEC 1 ตัวจะมียีนดังกล่าว 2 ชนิดหรือมากกว่า เช่น *papA* (P fimbriae structural subunit) and/or *papC* (P fimbriae assembly), *sfa/foc* (S and F1C fimbriae subunits), *afa/dra* (Dr-antigen-binding adhesions), *kpsII* (group 2 capsular polysaccharide units), *iutA* (aerobactin receptor) (Johnson and Russo, 2005) ExPEC ที่พบในคนและสัตว์สามารถมี virulence factor genes เหมือนกันได้ แต่ ExPEC จะไม่จำเพาะต่อกลุ่มอาการ หรือโฮสต์ (Smith et al., 2007) ExPEC ในสุนัขและแมว พบ virulence factors ชนิด cytotoxic necrotizing factor 1 (*cnf 1*), P-fimbriae และ adhesions (Johnson et al., 2001b ; Freitag et al., 2005) เคยมีรายงาน ExPEC ทำให้เกิด acute respiratory disease เช่น ทำให้เกิดภาวะ pneumonia ในสุนัข (Handt et al., 2003), acute necrotizing pneumonia ในแมว (Sura et al., 2007), bronchopneumonia ในม้า (DebRoy et al., 2008) และ necrotizing pneumonia and pleuritis ในลูกเสือ *Panthera tigris* (Carvallo et al., 2010)

จากการพิสูจน์เชื้อ ExPEC ที่แยกได้จาก host ต่างชนิดกัน พบว่ามี virulence factors บางตัวที่เหมือนกัน (Johnson et al., 2001b ; Handt et al., 2003 ; Breitschwerdt et al., 2005)

รายงานสัตว์ป่วยตายในครั้งนี มีวัตถุประสงค์เพื่อรายงานการตรวจพบเชื้อ ExPEC ในลูกเสือดำดำ (*Panthera pardus*) เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการชันสูตรโรคโดยดูจากอาการสัตว์ป่วย การผ่าซากและอื่นๆ อันจะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังและการรักษาโรคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ประวัติสัตว์

ลูกเสือดำดำ (*Panthera pardus*) เพศเมีย อายุประมาณ 2 เดือน เลี้ยงบนฟืนปูน กินนมสำหรับสัตว์กำพร้า มีอาการไข้ต่ำ 102.6 °F มีน้ำมูกปนหนอง เยื่อเมือกซีด กินน้อยลง ไอประปราย หายใจลำบาก อ้าปากหายใจ จากการฟังปอด cranial lobe ทั้งด้านซ้ายและขวา มีเสียง crackle รักษาด้วยการให้ยา amoxicillin syrup และรักษาตามอาการ วันรุ่งขึ้นมีอาการดีขึ้นเล็กน้อย แต่ยังคงซึม นอนหมอบ (sternal recumbency) มีน้ำมูกปนหนอง อ้าปากหายใจ และตายในวันต่อมา สัตวแพทย์ประจำสวนสัตว์ตรวจดูรอยโรคภายนอกด้วยตาเปล่า (external examination) พบว่าเหงือก ลิ้น เยื่อปูด หู ใบหู ซีด มีของเหลวไหลออกจากปาก จากนั้นทำการผ่าซากลูกเสือดำดำเพื่อตรวจดูโรคด้วยตาเปล่า และเก็บตัวอย่างปอดสดเพื่อนำมาเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียและปอดบางส่วนนำไปแช่ในน้ำยา 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลินเพื่อตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ห้องปฏิบัติการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดที่แช่ในน้ำยา 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน มาผ่านกระบวนการทำสไลด์เนื้อเยื่อและย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) ตามวิธีมาตรฐานทางพยาธิวิทยา (Luna, 1968) แล้วนำมาตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

นำตัวอย่างปอดสดมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 7% defibrinated sheep blood agar (SBA) และ MacConkey agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วตรวจหาโคโลนีที่สงสัยเป็นเชื้อก่อโรคแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และ ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

การตรวจหา toxin genes และ virulence factor genes ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)

สกัด DNA จากเชื้อ *E. coli* ด้วยชุดสกัด instagene matrix[®] (Biorad, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต นำ DNA template ไปทดสอบหา toxin genes ของเชื้อ *E. coli* จำนวน 6 ชุด ด้วยวิธี PCR ซึ่ง toxin genes, primer sequences และวิธีการตรวจคัดแปลงจากวิธีการอ้างอิง ระบุในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 *E. coli* toxin tests by PCR

toxin genes	Primer sequence	PCR program*	Product size (bp)	Reference
LT	CCG TCT CTA TAT TCC CTG TT GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC	2	450	Stacy-Phipps et al. (1995)
ST1a	TCT GTA TTA TCT TTC CCC TC ATA ACA TCC AGC ACA GGC	1	186	Constance et al. (1994)
ST1b	CCC TCA GGA TGC TAA ACC AG TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC	2	166	Constance et al. (1994)
VT1	CAT TGT CTG GTG ACA GTA GCT CCC GTA ATT TGC GCA CTG AG	3	732	Gannon et al. (1997)
VT2	CCA TGA CAA CGG ACA GCA GTT CCT GTC AAC TGA GCA CTT TG	3	779	Gannon et al. (1997)
VT2e	CCT TAA CTA AAA TGA ATA TA CTG GTG GTG TAT GAT TAA TA	1	230	Blanco et al. (1997)

* PCR program (denature, annealing, extension, cycles)

1. 94 °C 45 sec, 50 °C 45 sec, 72 °C 1min, 35 cycles
2. 94 °C 45 sec, 55 °C 45 sec, 72 °C 1min, 35 cycles
3. 94 °C 45 sec, 58 °C 45 sec, 72 °C 1min, 35 cycles

ทดสอบหา virulence factor genes ที่เป็น common virulence genes จำนวน 16 ตัวของเชื้อ EXPEC ตามที่เคยมีรายงานในสัตว์ที่ป่วยตายจากโรคในระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินปัสสาวะด้วยวิธี PCR ซึ่ง ชื่อยีน, primer sequences และวิธีการตรวจคัดแปลงจากวิธีการอ้างอิง ระบุในตารางที่ 2 เตรียม PCR mixture ปริมาณตัวอย่างละ 25 µl ที่ประกอบด้วย Go taq green® (Promega, USA) 12.5 µl forward primer และ reverse primer 10 pmol อย่างละ 2 µl reaction ละ 1 คู่ น้ำกลั่น 6.5 µl และ DNA template 2 µl นำเข้าเครื่อง Thermal cycler (Hybaid®, Thermo electron, Germany) ตามโปรแกรม preheating 95 °C นาน 2 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation 94 °C นาน 45 วินาที, annealing ตามที่ระบุในตารางที่ 2 นาน 45 วินาที, extension 72 °C นาน 45 วินาที ต่อจากนั้นเป็น final extension 72 °C นาน 5 นาที จนเสร็จ ยกเว้นโปรแกรมของ *hlyD* มีดังนี้ preheating 95 °C นาน 2 นาที ตามด้วย 30 รอบของ denaturation 94 °C นาน 30 วินาที, annealing 63 °C นาน 30 วินาที, extension 68 °C นาน 30 วินาที ต่อจากนั้นเป็น final extension 72 °C นาน 5 นาที และโปรแกรมสำหรับ *papG* alleles I และ *papG* allelesIII คือ preheating 95 °C นาน 2 นาที ตามด้วย denaturation 94 °C นาน 1 นาที, annealing 68 °C นาน 2 นาที, extension 72 °C นาน 3 นาที 20 รอบ ต่อด้วย 94 °C นาน 1 นาที และ 72 °C นาน 3 นาที อีก 15 รอบ จากนั้นตรวจหาแถบของ PCR product โดยการผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose gel ที่ 100 volt ประมาณ 30 นาที อ่านผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation (GelDoc-It®, UVP, U.S.A) จากนั้นนำ PCR product ไปทำการหาลำดับเบสในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 2 Virulence factors of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) tested by PCR

Virulence factor genes	Primer sequence	Annealing temperature (°C) *	Product size (bp)	Reference
<i>cnf1/2</i>	TTA TAT AGT CGT CAA GAT GGA CAC TAA GCT TTA CAA TAT TGA	60 ^a	760	Van Bost et al. (2003)
<i>cnf2</i>	TAT CAT ACG GCA GGA GGA AGC ACC GTC ACA ATA GAC AAT AAT TTT CCG	60 ^a	1243	Van Bost et al. (2003)
<i>cdt-III</i>	GAA AAT AAA TGG AAT ATA AAT GTC CG TTT GTG TCG GTG CAG CAG GGA AAA	60 ^a	558	Van Bost et al. (2003)
<i>cdt-IV</i>	CCT GAT GGT TCA GGA GGC TGG TTC TTG CTC CAG AAT CTA TAC CT	60 ^a	350	Van Bost et al. (2003)
<i>sfaD-E</i>	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A	57 ^a	410	Van Bost et al. (2003)
<i>afaE-VIII</i>	CTA ACT TGC CAT GCT GTG ACA GTA TTA TCC CCT GCT TAG TTG TGA ATC	57 ^a	302	Van Bost et al. (2003)
<i>papC</i>	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	57 ^a	328	Van Bost et al. (2003)
<i>fim</i>	GCC GGA TTA TGG GAA AGA GAA TGT CGC CTG CCC ATT GCT	61 ^a	600	Roe et al. (2001)
<i>focG</i>	CAG CAC AGG CAG TGG ATA CGA GAA TGT CGC CTG CCC ATT GCT	61 ^a	360	Johnson and Stell (2000)
<i>clpG</i>	GGG CGC TCT CTC CTT CAA C CGC CCT AAT TGC TGG CGA C	58 ^a	402	Bertin et al. (1998)
<i>iucD</i>	TAC CGG ATT GTC ATA TGC AGA CCG AAT ATC TTC CTC CAG TCC GGA GAA G	58 ^a	602	Yamamoto et al. (1995)
<i>iroN</i>	AAG TCA AAG CAG GGG TTG CCC G GAC GCC GAC ATT AAG ACG CAG	60 ^a	665	Johnson et al. (2000)
<i>hlyD</i>	CTC CGG TAC GTG AAA AGG AC GCC CTG ATT ACT GAA GCC TG	63 ^b	904	Rodriguez-Siek et al. (2005)
<i>papA</i>	ATG GCA GTG GTG CTT TTG GTG CGT CCC ACC ATA CGT GCT CTT C	62 ^a	720	Johnson and Stell (2000)
<i>papG</i> alleles I	TCG TGC TCA GGT CCG GAA TTT TGG CAT CCC CCA ACA TTA TCG	68 ^c	461	Johnson et al. (1997)
<i>papG</i> alleles III	GGC CTG CAA TGG ATT TAC CTG G CCA CCA AAT GAC CAT GCC AGA C	68 ^c	258	Johnson et al. (1997)

* Annealing time : a=45sec, b=30sec, c=2min

การหาลำดับเบส (Sequencing) ของ PCR product ของเชื้อ *E. coli*

เนื่องจากไม่มีเชื้อที่เป็น Reference strain มาทำการตรวจยืนยัน (Positive control) ดังนั้นในกรณีที่ตัวอย่างให้ผลบวกและ PCR product มีขนาดตรงตามที่ระบุไว้ตาม primer แต่ละชนิด คาดว่าเชื้อ *E. coli* มี virulence factor genes ชนิดนั้นได้ จึงทำการยืนยันโดยนำ PCR product แต่ละชนิดไปหาลำดับเบส (sequencing) และเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

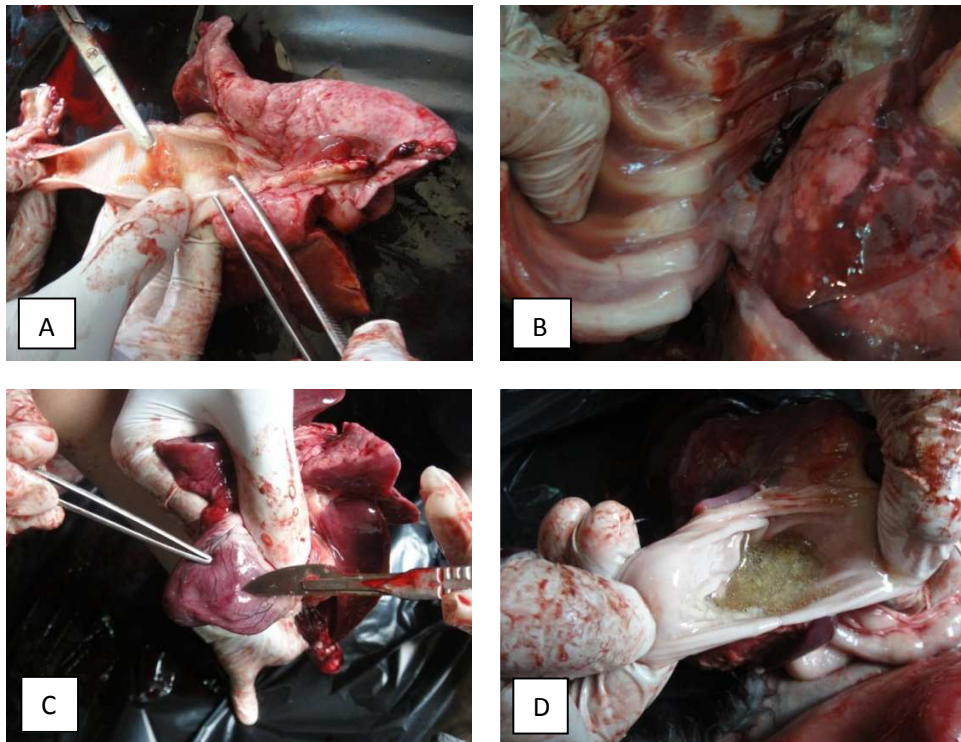
นำ PCR product ปริมาณ 50 µl ผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose gel ที่ 100 volt ประมาณ 30 นาที ตัดเจลตรงส่วนที่มี PCR product ภายใตแสง UV นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAquick[®] gel extraction kit (QIAGEN, Germany) และทำ sequence reaction ด้วยสาร BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต ทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้ ZR DNA sequencing clean up kit[™] (Zymo Research, USA) จากนั้นละลายด้วย HiDi formamide ปริมาตร 15 µl และนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (Genetic Analyzer) รุ่น ABI 3130 (HITACHI[®], Japan) นำผลที่ได้มาจัดเรียงลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม MEGA 5 ตรวจสอบ virulence factor gene ด้วยวิธี BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotide) จากฐานข้อมูล NCBI

ผล

ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา

รอยโรคที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

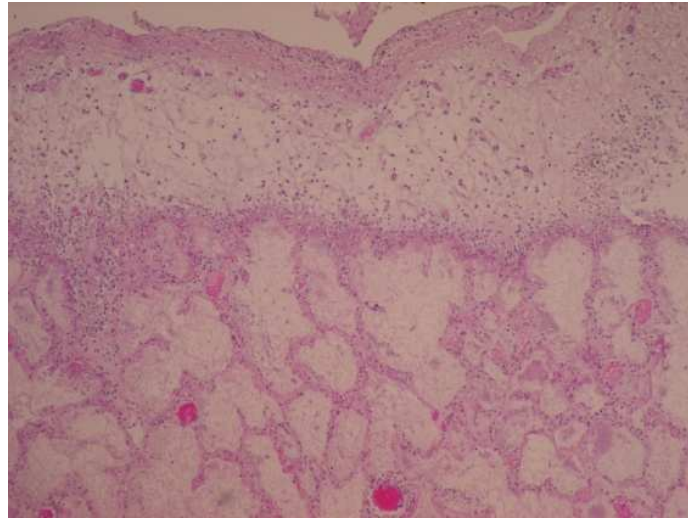
พบสิ่งผิดปกติในระบบต่างๆ ได้แก่ ที่ระบบทางเดินหายใจ โดยในจมูก พบน้ำมูกข้นปนหนอง หลอดลมส่วนต้นมีของเหลวเป็นฟอง (foamy exudate) หลอดลม (trachea) มีของเหลวเป็นเมือกปนเลือด (bloody mucous exudate) (รูปที่ 1A) ปอดส่วน caudal lobe ทั้งซ้ายและขวามีลักษณะแข็ง (consolidate) (รูปที่ 1B) ที่ระบบหมุนเวียนโลหิต กล้ามเนื้อหัวใจกลางด้านซ้ายพบจุดเลือดออกขนาดใหญ่ (ecchymotic hemorrhage) (รูปที่ 1C) ที่ระบบย่อยอาหาร ในช่องปากพบของเหลวลักษณะเป็นเมือกใส ในหลอดอาหารมีของเหลวเหนียวหนืดสีเหลือง ส่วนที่กระเพาะอาหารพบนมที่มีลักษณะเป็น curd และ oily droplet อยู่เต็มกระเพาะ (รูปที่ 1D) และที่ระบบขับถ่ายปัสสาวะ ไตด้านซ้ายขยายใหญ่จากการบวม



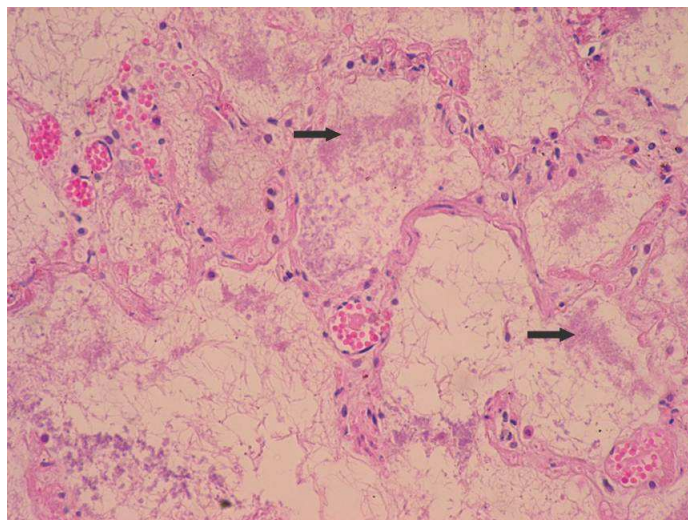
รูปที่ 1 รอยโรคที่มองเห็นด้วยตาเปล่าที่หลอดลม (A) ปอด (B) หัวใจ (C) กระเพาะอาหาร (D)

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

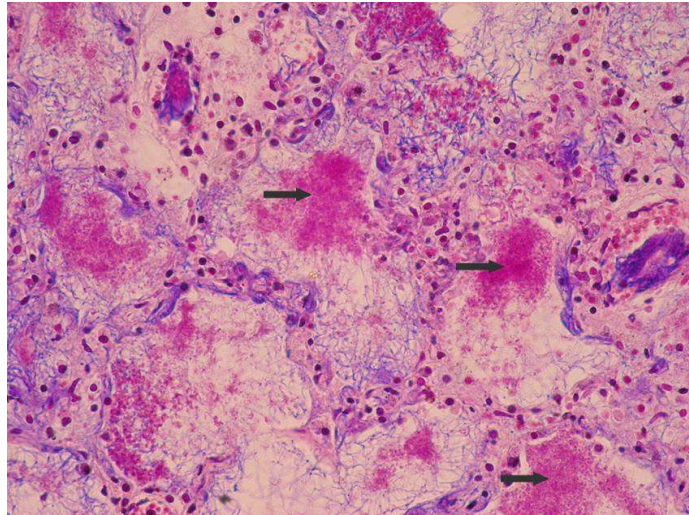
พบถุงลมโป่งพอง (alveolar emphysema) มี edematous fluid และ proteinaceous substance ในช่องว่างถุงลมปอด (alveolar space) และเยื่อหุ้มปอด (pleura) นอกจากนี้ยังพบเยื่อหุ้มปอดอักเสบ (pleuritis) โดยพบเยื่อหุ้มปอดหนาตัวมีเซลล์อักเสบแทรก (inflammatory cells infiltration) (รูปที่ 2) นอกจากนี้พบเชื้อแบคทีเรียรูปร่างสั้นจำนวนมากเป็นกลุ่มกระจายอยู่ใน alveolar space (รูปที่ 3) เมื่อนำเนื้อเยื่อปอดย้อมสีแกรมพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวติดสีแกรมลบ (รูปที่ 4)



รูปที่ 2 Alveolar emphysema มี edematous fluid และ proteinaceous substance ในช่องว่างถุงลมปอด และเยื่อหุ้มปอด รวมทั้ง pleuritis (H&E, 100x)



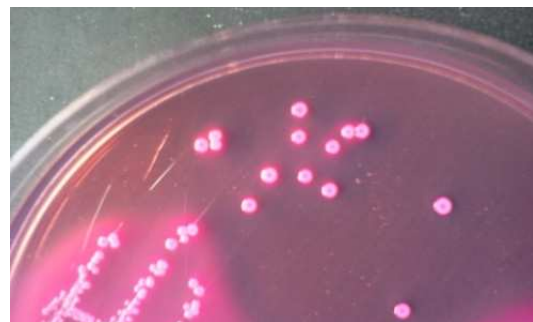
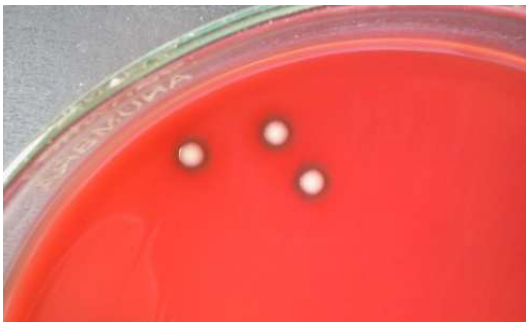
รูปที่ 3 ภาพขยายของรูปที่ 2 พบกลุ่มเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งจำนวนมาก (ครีซี) เป็นกลุ่มกระจายอยู่ในช่องว่างถุงลมปอด (H&E, 400x)



รูปที่ 4 กลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งสั้น (ติดสีแดง) จำนวนมาก (ครีซ)
เป็นกลุ่มกระจายอยู่ในช่องว่างถุงลมปอด (Gram stain, 400x)

ผลการเพาะแยกเชื้อจากปอดสด

ผลการเพาะแยกเชื้อจากปอดสด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 7%SBA พบเชื้อแบคทีเรียโคโลนีลักษณะกลมวาว สีน้ำตาลขุ่นที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ (beta hemolysis) และ บน MacConkey agar พบโคโลนีเล็กกลมสีชมพูเข้มตรงกลางเป็นหลุม (รูปที่ 5) เมื่อย้อมสีจะติดสีแดงแกรมลบ รูปแท่งสั้น ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมียืนยันว่าเป็นเชื้อ hemolytic *E. coli* (ภาคผนวก 1)



รูปที่ 5 เชื้อ hemolytic *E. coli* บน Blood Agar (ซ้าย) และบน MacConkey Agar (ขวา)

ผลการทดสอบความไวของเชื้อ hemolytic *E.coli* ต่อยาต้านจุลชีพ

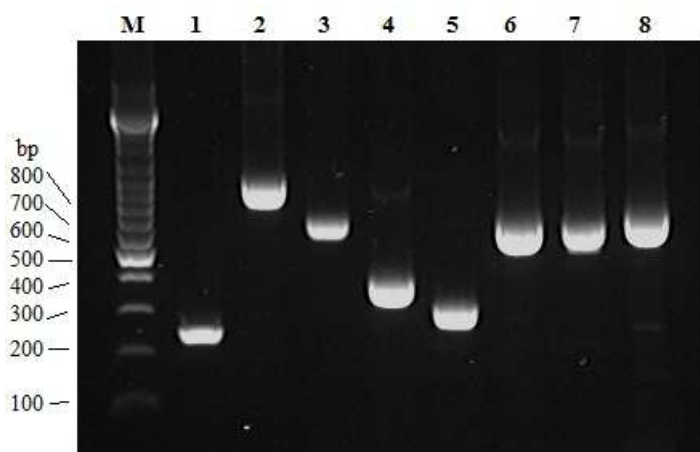
ดังตารางที่ 3 และภาคผนวก 2

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความไวของเชื้อ ต่อยาต้านจุลชีพ 11 ชนิด

ระดับความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ	ชนิดของยาต้านจุลชีพ
ไว (sensitive) 8 ชนิด	enrofloxacin, norfloxacin, amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, colistin, tetracycline, doxycycline, gentamicin
ไวปานกลาง (intermediate) 3 ชนิด	cephalothin, kanamycin, streptomycin
ดื้อยา (resistant)	ไม่มี

ผลการตรวจยืนยันด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

จากการตรวจหาชิ้นที่สร้าง toxin ชนิด Heat labile toxin (LT), Heat Stable toxin (STIa, STIb), Verotoxin (VT1, VT2, VT2e) ด้วยวิธี PCR ผลไม่พบชิ้นที่สร้าง toxin ทั้ง 6 ชนิด พบ virulence factor genes 8 ชนิด ได้แก่ *papG* allelesIII, *hlyD*, *cnf1/2*, *sfaD-E*, *papC*, *iroN*, *fim* และ *papA* (รูปที่6) จากนั้นนำ PCR product ไปตรวจหาลำดับเบสและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความถูกต้อง (96% - 99% homology) ตรงตามชนิดของ virulence factor genes ที่ทำการศึกษาทั้ง 8 ชนิด



รูปที่ 6 PCR products from virulence factor of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) by PCR assays, lane M, 100 bp molecular weight marker. lane1, *papG* allelesIII. lane 2, *hlyD*. lane 3, *cnf1/2*. lane 4, *sfaD-E*. lane 5, *papC*. lane 6, *iroN*. lane 7, *fim*. lane 8, *papA*

วิจารณ์และสรุป

การตายของลูกเสือดาวดำในวันที่สามหลังแสดงอาการของระบบทางเดินหายใจ อาจเนื่องจากการเป็นลูกเสือดาวอายุน้อยมีภูมิคุ้มกันต่ำเมื่อมีการติดเชื้อที่ปอด จึงพัฒนาอาการอย่างรวดเร็วและรุนแรง ทำให้ไม่สามารถรักษาได้ทันทั้งที่ รอยโรคที่มองเห็นด้วยตาเปล่า ส่วนใหญ่พบที่ปอด ซึ่งสอดคล้องกับรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่บ่งชี้ว่าการบวมอย่างรุนแรงกระจายทั่วปอดและเยื่อหุ้มปอด รวมถึงเยื่อหุ้มปอดอักเสบ ซึ่งทำให้หายใจลำบาก ขาดอากาศหายใจ นอกจากนี้ในช่องว่างของถุงลมปอดยังพบเชื้อแบคทีเรีย hemolytic *E. coli* จำนวนมาก

ผลการตรวจหา toxin genes พบว่าไม่มียีนที่สร้าง Heat labile toxin (LT), Heat Stable toxin (STIa, STIb), Verotoxin (VT1, VT2, VT2e) จึงคาดว่าเชื้อแบคทีเรีย hemolytic *E. coli* ดังกล่าวเป็นชนิด ExPEC เนื่องจากมีรายงานการเกิดโรคในระบบทางเดินหายใจโดยเชื้อ *E. coli* ชนิด ExPEC ที่ไม่สร้าง toxin เช่น acute necrotizing pneumonia ในแมว (Sura et al., 2007) และ bronchopneumonia ในม้า (DebRoy et al., 2008) จากการตรวจยืนยันชนิด ExPEC ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลเพื่อหาโปรไฟล์ของ virulence gene profiles โดยเทคนิค PCR และการหาลำดับเบส (sequencing) เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยวิธี BLASTn ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความเหมือนกัน (96 – 99% homology) กับ virulence factor genes ของ ExPEC 8 ชนิด ได้แก่ *papG* allelesIII, *hlyD*, *cnf1/2*, *sfaD-E*, *papC*, *iroN*, *fim* และ *papA* โดย virulence factor genes 6 ชนิด สอดคล้องกับ ExPEC ที่พบในลูกเสือดาว (*Panthera tigris*) ที่ป่วยตายด้วย necrotizing pneumonia และ pleuritis ซึ่งพบ *cnf1*, *sfa*, *papG* allelesIII, *fimH*, *iroN*, *hlyD*, *fyuA*, *malX*–“PAI”, *KpsII*, *UidA*, *Usp*, *traT* (Carvalho et al., 2010) virulence factor genes 3 ชนิด สอดคล้องกับ ExPEC ที่พบในม้าที่ป่วยตายด้วย bronchopneumonia ซึ่งพบ *cnf1*, *sfa*, *papG* allelesI, *fimA*, *foc* (DebRoy et al., 2008) virulence factor genes 5 ชนิด สอดคล้องกับ ExPEC ที่พบในแมวที่ป่วยตายด้วย acute necrotizing pneumonia ซึ่งพบ *cnf1*, *sfa*, *papG* allelesI, *papG* allelesIII, *fimH*, *hlyD* (Sura et al., 2007), virulence factor genes 3 ชนิด สอดคล้องกับ ExPEC ที่พบในสุนัขที่ป่วยตายจาก hemorrhagic pneumonia ซึ่งพบ *cnf1*, *papG* allelesIII และ *hlyD* (Breitschwerdt et al., 2005) virulence factor genes 7 ชนิด สอดคล้องกับ ExPEC ที่พบในลูกแมวที่ป่วยตายจาก pneumonia ซึ่งพบ *cnf1*, *papG* allelesI, *papA*, *papC*, *sfa*, *fim*, *hlyD*, *malX*, *iroN*, *fyuA*, *kpsII*, *ompT* (Highland et al., 2009) และ virulence factor genes 4 ชนิด สอดคล้องกับ ExPEC ที่พบในสุนัขและแมวที่ป่วยจากการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งพบ *cnf1*, *pap*, *sfa*, *hly* (Yuri et al., 1998) จะเห็นได้ว่าชนิดของ virulence factor genes ของเชื้อ *E. coli* ที่พบ ในสัตว์ต่างชนิดกันอาจเหมือนหรือแตกต่างกันและสามารถก่อโรคในระบบอื่นๆ นอกเหนือจากระบบทางเดินอาหารได้ และ การตรวจพบ virulence factor genes 2 ชนิดหรือมากกว่า จัดได้ว่าเป็นเชื้อ *E. coli* ชนิด ExPEC (Johnson and Russo, 2005) virulence factor genes ที่พบทั้ง 8 ชนิด แต่ละชนิดมีผลทำให้เกิดความล้มเหลวของการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องในร่างกายสัตว์ เช่น *cnf1* เป็นพิษต่อเซลล์และทำให้เกิดเนื้อตาย *hly* ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เป็นต้น

การรักษาด้วยการให้กิน amoxicillin syrup ไม่สามารถช่วยชีวิตลูกเสือดาวดำได้ทัน แม้ว่าจากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ amoxicillin จะให้ผลดีก็ตาม สาเหตุและกลไกของการติดเชื้อในครั้งนี้นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด จากการสอบประวัติเพิ่มเติมพบว่าลูกเสือดาวดำตัวนี้มีนิสัยชอบกัดจุนกมให้เป็นรูใหญ่ เพื่อให้น้ำนมไหลเร็วขึ้น เมื่อกินนมไม่ทันก็จะล้าล้อยู่เป็นประจำ อาจทำให้เชื้อ *E. coli* ที่เป็น ExPEC strain ซึ่งปกติอยู่ในลำไส้ได้โดยไม่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เปลี่ยนมาอยู่ที่ระบบทางเดินหายใจและก่อโรคจนกระทั่งตาย

อาหารได้ (Johnson and Rosso, 2002) นอกจากนี้ ลูกเสือดาวดำถูกเลี้ยงอยู่ใกล้ฟาร์มสุนัข สอดคล้องกับรายงานการพบเชื้อ ExPEC ในม้าที่ตายด้วย bronchopneumonia ก็เลี้ยงอยู่ใกล้คอกสุนัข แม้จะยังไม่ทราบความสัมพันธ์ระหว่างสุนัขกับ *E. coli* ที่แยกได้จากม้า (DebRoy et al., 2008) ทำให้มีข้อสงสัยว่า เป็นไปได้หรือไม่ที่ลูกเสือดาวดำอาจติดเชื้อนี้มาจากสุนัข ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาความสัมพันธ์ดังกล่าวต่อไป

จากประวัติ อาการ รอยโรคทางพยาธิวิทยา การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ผลการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้ผลที่สอดคล้องกัน จึงสรุปได้ว่าการติดเชื้อ ExPEC เป็นสาเหตุที่ทำให้ลูกเสือดาวดำปอดอักเสบโดยมีอาการไข้ต่ำ น้ำมูกปนหนอง เยื่อเมือกซีด กินน้อยลง ไอ ประปราย อ้าปากหายใจ หายใจลำบาก ปอดมีเสียง crackle นอนหมอบ และตายในที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณกำธร พรหมโต ที่ช่วยในการเพาะแยกเชื้อทางห้องปฏิบัติการ นายสัตวแพทย์วัชรชัย ณรงค์ศักดิ์ นายสัตวแพทย์ ดร.ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ และ น.ส.อภัสรา วรราช ที่ช่วยตรวจ เสนอแนะการแก้ไขรายงานในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bertin, Y., Martin, C., Girardeau, J.P., Pohl, P. and Contrepois, M. 1998. Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1- producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. FEMS. Microbiol. Lett. 162: 235-239.
- Bettelheim, K.A. 1997. *Escherichia coli* in the normal flora of humans and animals, *Escherichia coli* : Mechanisms of Virulence. Edited by M. Sussman. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p. 85-109.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Gonzalez, E.A., Mora, A., Jansen, W., Gomes, T.A.T., Xerbini, L.F., Yano, T., Pestana de Castro, A.F. and Blanco, J. 1997. Gene coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. J. Clin. Microbiol. 35:2958-2963.
- Breitschwerdt, E.B., DebRoy, C., Mexas, A.M., Brown, T.T. and Remick, A.K. 2005. Isolation of necrotogenic *Escherichia coli* from a dog with hemorrhagic pneumonia. J. Am. Vet. Med. Assoc. 226: 2016-2019.
- Carvalho, F.R., DebRoy, C., Baeza, E., Hinckley, L., Kelly, G., Choi, S.J., Risatti, G. and Smyth, J.A. 2010. Necrotizing pneumonia and pleuritis associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a tiger (*Panthera tigris*) cub. J. Vet. Diagn. Invest. 22:136-140.
- Constance, S., Giel, P.J., Ruud van, K., Wever de, B., Speelman, P. and Dankert, J. 1994. Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using non radioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. J. Clin. Microbiol. 32:2393-2397.

- DebRoy, C., Roberts, E., Jayarao, B.M. and Brooks, J.W. 2008. Bronchopneumonia associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a horse. J. Vet. Diagn. Invest. 20:661-664.
- Freitag, T., Squires, J.A., Schmid, J. and Elliott, J. 2005. Feline uropathogenic *Escherichia coli* from Great Britain and New Zealand have dissimilar virulence factor genotypes. Vet. Microbiol. 106: 79-86.
- Frenzen, P.D., Drake, A. and Angulo, F.J. 2005. Emerging infections program food net working group. Economic cost of illness due to *Escherichia coli* O157 infections in the United States. J. Food. Prot. 68: 2623-2630.
- Gannon, V.P., D'Souza, S., Graham, T., King, R.K., Rahn, K. and Read, S. 1997. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. J. Clin. Microbiol. 35(3):656-662.
- Handt, L.K., Stoffregen, D.A., Prescott, J.S., Pouch, W. J., Ngai, D.T., Anderson, C.A., Gatto, N.T., DebRoy, C., Fairbrother, J.M., Motzel, S.L. and Klein, H.J. 2003. Clinical and microbiologic characterization of hemorrhagic pneumonia due to extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in four young dogs. Comp. Med. 53:663-670.
- Highland, M.A., Byrne, B.A., DebRoy, C., Samitz, E.M., Peterson, T.S. and Oslund, K.L. 2009. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* induced pneumonia in three kittens and fecal prevalence in a clinically healthy cohort population. J. Vet. Diagn. Invest. 21:609-615.
- Johnson, J.R., Stapleton, A.F., Russo, T.A., Scheutz, F., Brown, J.J. and Maslow, J. N. 1997. Characteristics and prevalence within serogroup O4 of a J96-like clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing the class I and class III alleles of papG. Infect. Immun. 65: 2153-2159.
- Johnson, J.R. and Stell, A.L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J. Infect. Dis.181:261-272.
- Johnson, J.R., O'Bryan, T.T., Low, D.A., Ling, G., Delavari, P., Fasching, C., Russo, T.A., Carlino, U. and Stell, A.L. 2000. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express *papG* alleleIII. Infect. Immun. 68:3327-3336.
- Johnson, J.R., Stell, A.L. and Delavari, P. 2001a. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 69: 1306-1314.
- Johnson, J.R., Stell, A.L., Delavari, P., Murray, A.C., Kuskowski, M. and Gastra, W. 2001b. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. J. Infect. Dis. 183: 897-906.

- Johnson, J.R. and Russo, T.A. 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* : “The other bad *E.coli* ”. J. Lab. Clin. Med. 139:155-162.
- Johnson, J.R. and Russo, T.A. 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. Int. J. Med. Microbiol. 295: 383–404.
- Luna, L.G. 1968. Manual of histologic staining method of the Arm Forces. Institute of Pathology. 3rd ed. Mc-Graw-Hill Book company, NewYork. USA. p. 207-235.
- Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C. T., Johnson, J.R. and Nolan, L.K. 2005. Characterizing the APEC pathotype. Vet. Res. 36: 241-256.
- Roe, A.J., Currie, C., Smith, D.G. and Gally, D.L. 2001. Analysis of type I fimbriae expression in verotoxigenic *Escherichia coli*: a comparison between serotypes O157 and O26. Microbiology. 147:145-152.
- Russo, T.A. and Johnson, J.R. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* :ExPEC. J. Infect. Dis. 181: 1753-1754.
- Russo, T.A. and Johnson, J.R. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli* : focus on an increasingly important endemic problem. Microbes. Infect. 5(5): 449-456.
- Smith, J.L., Fratamico P.M. and Gunther, N.W. 2007. Review: Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. Foodborne. Pathog. Dis. 4(2):134-161.
- Stacy-Phipps, S., Mecca, J.J. and Weiss, J.B. 1995. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. J. Clin. Microbiol. 33:1054-1059.
- Sura, R., Van Kruiningen, H.J., DebRoy, C., Hinckley, L.S., Greenberg, K.J., Gordon, Z. and French, R.A. 2007. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* – induced Acute Necrotizing Pneumonia in Cats. Journal compilation. Zoonoses. Public. Health. 54:307-313.
- Van Bost, S., Jacquemin, E., Oswald, E. and Mainil, J. 2003. Multiplex PCRs for identification of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 41:4480-4482.
- Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y. and Yoshida, O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. Fems. Immunol. Med. Microbiol. 12:85-90.
- Yuri, K., Nakata, K., Katae, H., Yamamoto, S. and Hasegawa, A. 1998. Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. J. Vet. Med. Sci. 60(3): 287-290.

Case Report: Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) infection in a leopard kitten

Supaporn Juangphanich^{1*} Thawanrut Kiatyingangsulee¹ Pacharee Thongkamkoon¹
Tuangthong Patchimasiri¹ Jullachat Jumpeerat²

¹ National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

² Farm Chokchai Zoo, Pakchong, Nakhonratchasima, 30130

* Corresponding person: Tel. 025798908-14, Fax. 025798918, email: supapornj@dld.go.th

Abstract

A 2-month-old female leopard (*Pantera pardus*) kitten died at the third day after showing respiratory signs. Histopathological findings revealed alveolar emphysema, edematous fluid and proteinaceous substance in alveolar space and pleura including pleuritis. Besides, numerous small gram negative rods were found in the alveolar space. A pure culture of beta-hemolytic bacteria was isolated from fresh lung tissue and hemolytic *Escherichia coli* was confirmed by biochemical test. The hemolytic *E. coli* did not have Heat labile toxin (LT), Heat stable toxin (ST1a, ST1b) and Verotoxin (VT1, VT2, VT2e) by PCR technique. Moreover, hemolytic *E. coli* was analysed for virulence gene factor by PCR technique and then its products were confirmed to characterize for the presence of virulence factors by DNA sequencing. They carried 8 genes encoding for *papG* allelesIII, *hlyD*, *cnf1/2*, *sfaD-E*, *papC*, *iroN*, *fim* and *papA* which are known to be associated with ExPEC strains. Antimicrobial susceptibility of the strain against 11 antimicrobials was tested. The *E. coli* strain was not resistant to any tested drugs. We concluded that ExPEC infection caused pneumonia and death in the leopard kitten.

Keywords: leopard kitten, virulence factor genes, pneumonia, hemolytic *Escherichia coli*, Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC

ภาคผนวก 1

ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

Oxidase	Catalase	OF	IMViC	Citrate	Urease	TSI	MIL
-	+	fermentation	+ + - -	-	-	A/A gas H ₂ S -	Motile+ Indole+ Lysine+

ภาคผนวก 2

ผลการทดสอบความไวของเชื้อ ExPEC ต่อยาต้านจุลชีพ 11 ชนิด

ยาต้านจุลชีพ	ปริมาณยา (µg)	ผลการทดสอบ
		S = sensitivity, I = intermediate, R = resistance
Amoxicillin	10	S
Amoxicillin + clavulanic acid	30	S
Colistin	10	S
Doxycycline	30	S
Enrofloxacin	5	S
Gentamicin	10	S
Norfloxacin	10	S
Tetracycline	30	S
Cephalothin	30	I
Kanamycin	30	I
Streptomycin	10	I