

ศึกษาซีโรไทป์ของเชื้อ *Avibacterium paragallinarum* ในไก่ในประเทศไทย โดยวิธี Multiplex PCR

สมหมาย ยุวพานิชสัมพันธ์* พชร ทองคำคุณ พรเพ็ญ พัฒนโสภณ ชยภัค สิบู่

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 02-5798908-14 โทรสาร 02-5798919 E-mail: sommai@dld.go.th

บทคัดย่อ

โรคหวัดหน้าบวมในไก่ (Avian infectious coryza) เป็นโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่สำคัญที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Avibacterium paragallinarum* (*A. paragallinarum*) โรคนี้มีการระบาดอย่างรวดเร็วและรุนแรง อัตราการติดโรคสูง แต่อัตราการตายต่ำ และทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจทั่วโลกวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *A. paragallinarum* จำนวน 32 สายพันธุ์ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างไก่ป่วยซึ่งส่งมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2545-2555 ด้วยวิธี multiplex PCR และ RFLP เปรียบเทียบกับวิธี HA-HI พร้อมกับทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ ผลการจำแนกซีโรไทป์ ด้วยวิธี multiplex PCR และ RFLP พบซีโรไทป์ A มากที่สุดจำนวน 50.0% (16/32) ซีโรไทป์ B และ C จำนวน 25.0% (8/32) เท่ากัน ส่วนการจำแนกซีโรไทป์โดยวิธี HA-HI พบซีโรไทป์ A จำนวน 56.25% (18/32) ซึ่งมี 2 สายพันธุ์เมื่อตรวจด้วยวิธี multiplex PCR พบเป็นซีโรไทป์ B และพบซีโรไทป์ B และ C จำนวน 18.75% (6/32) เท่ากัน นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ให้ผลบวกทั้งซีโรไทป์ A และ C จำนวน 6.25% (2/32) เมื่อตรวจด้วยวิธี multiplex PCR พบเป็นซีโรไทป์ C การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีความไวสูงต่อยา amoxicillin/clavulanic acid (100.0%) รองลงมา ได้แก่ cephalothin และ gentamicin (84.4%) ceftiofur (81.2%) แต่มีความไวต่ำต่อยา streptomycin (6.2%) tetracycline (15.6%) และ erythromycin (18.8%) การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สามารถใช้เทคนิค multiplex PCR ร่วมกับ RFLP จำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *A. paragallinarum* ได้อย่างถูกต้อง รวดเร็วแม่นยำ และไม่ทำให้เกิด cross reaction

คำสำคัญ : *Avibacterium paragallinarum*, การจำแนกซีโรไทป์, multiplex PCR, RFLP, HA-HI

บทนำ

Avibacterium paragallinarum (*A. paragallinarum*) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหวัดหน้าบวมในไก่ มักพบในไก่อายุตั้งแต่ 5 สัปดาห์ ขึ้นไป โดยไก่ที่มีอายุมากจะมีความไวรับต่อโรคมกกว่าไก่ที่มีอายุน้อย อาการของโรคที่พบคือ หน้าบวม อ้าปากหายใจ น้ำมูกและน้ำตาไหล เยื่อตาขาวอักเสบ เบื่ออาหาร ท้องเสีย แกร็น อัตราการเจริญเติบโตต่ำ ไก่ไข่ที่ติดเชื้อมีน้ำมูกเหนียวข้น หน้าบวม เยื่อตาขาวอักเสบ และไข่ลดลงอย่างมาก ผลการชันสูตรมักจะพบ การอักเสบของเยื่อตาขาว เนื้อเยื่อรอบดวงตาบวม น้ำ มีก้อนหนองในไซนัส ใต้ตาและหลอดลมอักเสบ (Chukiatsiri et al., 2010) โรคนี้มีการระบาดได้ทั่วโลก มักพบในไก่พ่อแม่พันธุ์ ไก่เนื้อและไก่ไข่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยสามารถพบได้บ่อยในไก่พื้นบ้าน (เกรียงศักดิ์, 2536) โรคนี้มีการระบาดอย่างรวดเร็วและรุนแรง อัตราการติดโรคสูง (ประมาณ 30 – 70%) แต่อัตราการตายต่ำ (2 – 6%) ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ เนื่องจากไก่จะชะงักการเจริญเติบโต และในฝูงไก่ที่กำลังให้ไข่จะมีอัตราการไข่ลดลง (10 – 40%) (Terzolo et al., 1993) โรคนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นได้จากสภาวะความเครียดต่างๆ เช่น อากาศเปลี่ยน ฝนตก ความร้อน และความชื้นในบรรยากาศสูง แต่หากมีการติดเชื้ออื่นร่วมด้วย เช่น โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ และโรคติดเชื้อมัคโคพลาสมา ก็อาจส่งผลให้อาการรุนแรงและอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นได้ ไก่ที่หายป่วยยังสามารถแพร่เชื้อได้เป็นระยะเวลามากกว่า 4 เดือน (เกรียงศักดิ์, 2536)

การเพาะแยกเชื้อ *A. paragallinarum* ในห้องปฏิบัติการโดยวิธีดั้งเดิม ต้องเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษที่มี V-factor ช่วยในการเจริญเติบโต บ่มในสภาวะที่มี CO₂ 5% (Blackall, 1999) ส่วนการแยกซีโรไทป์ของเชื้อ *A. paragallinarum* ตามแบบของ Page scheme โดยวิธี Agglutination test ซึ่งได้ serotype A, B และ C (Page, 1962) และ Kume scheme โดยวิธี Hemagglutination-inhibition tests (HA-HI) ซึ่งได้ serotype A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 และ C-4 (Kume et al., 1983; Blackall et al., 1990a; 1990b) จะมีความไวต่ำและอาจเกิด cross reaction ได้ ดังนั้นเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular biology) จึงถูกนำมาใช้เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจให้ได้ผลรวดเร็วและแม่นยำ Chen et al. (1996) ได้นำเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) มาใช้เพื่อพิสูจน์เชื้อ แต่ไม่สามารถแยกซีโรไทป์ได้ ต่อมา Sakamoto et al. (2012) ได้พัฒนาเทคนิคการแยกซีโรไทป์โดยวิธี multiplex PCR และ restriction fragment length polymorphism (RFLP) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *A. paragallinarum* ด้วยวิธี multiplex PCR ร่วมกับ RFLP โดยเปรียบเทียบกับวิธี HA-HI แบบดั้งเดิมที่ใช้อยู่ เพื่อให้ได้ผลการตรวจจำแนกซีโรไทป์ที่รวดเร็วและแม่นยำ พร้อมทั้งศึกษาความไวของ เชื้อต่อยาต้านจุลชีพ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการรักษาและควบคุมโรคหวัดหน้าบวมในไก่

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อ *A. paragallinarum*

นำเชื้อ *A. paragallinarum* สายพันธุ์ท้องถิ่น จำนวน 32 สายพันธุ์ ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างไก่ป่วย ซึ่งส่งมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2545-2555 และเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *A. paragallinarum* จำนวน 3 ซีโรไทป์ 6 สเตรน ได้แก่ ซีโรไทป์ A (สเตรน 083, USA; 221, Japan) ซีโรไทป์ B (Sposs, Netherlands) ซีโรไทป์ B variant (S48, Netherlands) และ ซีโรไทป์ C (สเตรน M, H18, Japan) ซึ่งเก็บรักษาที่ -80°C มาเพาะบน blood agar ขีดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทับบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่ม V-factor บ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มี CO₂ 5% ตรวจดูลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีลักษณะเป็น satellite colony (วันทนิยและประภาส, 2528) และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *A. paragallinarum* (Kume et al., 1978) จากนั้นนำเชื้อมาเพาะบน chocolate agar บ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปสกัดเป็น DNA template ต่อไป

การพิสูจน์เชื้อ *A. paragallinarum* ด้วยวิธี PCR

ดัดแปลงจากวิธีของ Chen et al. (1996) โดยนำ colony ของเชื้อที่เพาะบน chocolate agar มาละลายใน phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 ปริมาตร 1 ml นำไปปั่นที่ 12,000 rpm (Kubota 1920[®], Japan) นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 100 µl นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นลง แล้วปั่นที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที แยกเก็บส่วนน้ำใสเพื่อใช้เป็น DNA template การทำปฏิกิริยา PCR เริ่มจากนำ DNA template 5 µl ใส่ในหลอด PCR ขนาด 0.2 ml ที่บรรจุ PCR mastermix 45 µl ซึ่งประกอบด้วย 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM (each) dNTP, 0.5 U Taq DNA polymerase Hotstart[®] (Qiagen, Germany) forward primer และ reverse primer ชุดที่ 1 ตามตารางที่ 1 อย่างละ 0.4 µM โดยมีน้ำกลั่นและเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *A. paragallinarum* เป็นตัวควบคุมลบและบวก ตามลำดับ จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง iCycler (BIO-RAD, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ initial activation ที่ 95°C นาน 15 นาที ตามด้วย denaturing 94°C นาน 45 วินาที annealing 58°C นาน 45 วินาที extension 72°C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension 72°C นาน 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ PCR product ด้วย gel electrophoresis ย้อมด้วย 1.5% ethidium bromide ดูแถบ DNA ภายใต้แสงยูวี เปรียบเทียบกับ 100 bp ladder DNA marker (Fermentus[®], Germany)

การจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *A. paragallinarum* ด้วยวิธี multiplex PCR

ดัดแปลงจากวิธีของ Sakamoto et al. (2012) ดังนี้ นำ DNA template ของเชื้อสายพันธุ์ท้องถิ่น ทั้ง 32 สายพันธุ์ และเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน 3 ซีโรไทป์ 6 สเตรน มาทำปฏิกิริยา multiplex PCR ตัวอย่างละ 2 µl ใส่ในหลอด PCR ขนาด 0.2 ml ที่บรรจุ PCR mastermix ซึ่งประกอบด้วย GoTaq[®] Green Master Mix (Promega, USA) จำนวน 12.5 µl primer 3 ชุด (Sakamoto et al., 2012) โดยใช้ชุดที่ 2 ตามตารางที่ 1 อย่างละ 0.2 µM โดยมีน้ำกลั่นและเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *A. paragallinarum* เป็นตัวควบคุมลบและบวก ตามลำดับ จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง iCycler (BIO-RAD, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ initial activation ที่ 98°C นาน 2 นาที ตามด้วย denaturing 98°C นาน 10 วินาที annealing 56°C นาน 10 วินาที extension 72°C นาน 2 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72°C นาน 7 นาที จากนั้นวิเคราะห์ PCR product ด้วย gel electrophoresis ย้อมด้วย 1.5% ethidium bromide ดูแถบ DNA ภายใต้แสงยูวี เปรียบเทียบกับ 1 kb ladder DNA marker (Fermentus[®], Germany)

ตารางที่ 1 แสดงชุด Primer sets ที่ใช้พิสูจน์และจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *A. paragallinarum* ด้วยวิธี PCR, multiplex PCR และ RFLP

Primer set	Primer sequence	Fragment length	reference
1 (PCR)	(F) 5'TGA GGG TAG TCT TGC ACG CGA AT 3'	0.5 kbp	Chen et al. (1996)
	(R) 5'CAA GGT ATC GAT CGT CTC TCT ACT 3'		
2 (multiplex PCR)	ABC (F) 5'GGC TCA CAG CTT TAT GCA ACG AA 3'	0.8 kbp	Sakamoto et al. (2012)
	(R) 5'CGC GGG ATT GTT GAT TTT GTT 3'		
	(R) 5'GGT GAA TTT CAC CAC ACC AC 3'		
	(R) 5'TAA TTT TCT TAT TCC CAG CAT CAA TAC CAT 3'		
3 (RFLP)	(F) 5'GAT GGC ACA ATT ACA TTT ACA 3'	1.6 kbp	Sakamoto et al. (2012)
	(R) 5'ACC TTG AGT GCT AGA TGC TGT AGG TGC 3'		

การจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ ด้วยวิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP)

ดัดแปลงจากวิธีของ Sakamoto et al. (2012) ดังนี้ นำ DNA ของเชื้อที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ชัดเจน มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer ชุดที่ 3 ตามตารางที่ 1 โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ initial activation ที่ 98°C นาน 1 นาที ตามด้วย denaturing 98°C นาน 10 วินาที annealing 55°C นาน 10 วินาที extension 72°C นาน 2 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72°C นาน 7 นาที จากนั้นนำ PCR product มาตกตะกอนด้วย ethanol เพื่อให้ได้ DNA บริสุทธิ์ แล้วนำมาตัดด้วย enzyme *Bgl II* (Sakamoto et al., 2012) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง โดยมีเชื้ออ้างอิงมาตรฐานทั้ง 3 ซีโรไทป์ เป็น control จากนั้นวิเคราะห์ restriction fragment ด้วย gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ 1 kb ladder DNA marker (Fermentus[®], Germany)

การจำแนกซีโรไทป์ โดย วิธี HA-HI

ดัดแปลงจากวิธีของ Blackall et al. (1990a) ดังนี้ นำเชื้อ *A. paragallinarum* ที่เพาะบน chocolate agar มาใส่ใน tryptose phosphate broth (TPB) เพื่อเตรียม antigen สำหรับทดสอบ HA-HI test โดยใช้ตัวอย่างเชื้อ 32 สายพันธุ์ และเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน 3 ซีโรไทป์ 3 สเตรน ได้แก่ ซีโรไทป์ A (สเตรน 083, USA) ซีโรไทป์ B (สเตรน Sposs, Netherlands) และ ซีโรไทป์ C (สเตรน M, Japan) โดยเชื้อ single colony ใส่ใน TPB 10 ml นำไปบ่มพร้อมเขย่า ที่ 250 rpm (Innova[®] 43, USA) อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อจาก TPB 10 ml ลงใน TPB 100 ml นำไปบ่มพร้อมกับเขย่าที่ 250 rpm อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ 4000 rpm (Hitachi[®] CR22GII, Japan) นาน 30 นาที แล้วล้างและปั่นด้วย PBS 3 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย PBS ที่มี thymerosol 0.01% ปริมาตร 25 ml แล้วนำไปตรวจ titer ด้วยวิธี HA test

การเตรียมแอนติซีรั่ม (วันทนีและคณะ, 2538) ใช้เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน 3 ซีโรไทป์ เช่นเดียวกับการเตรียม antigen โดยเตรียมเชื้อให้ได้ 4.2×10^8 CFU / ml แล้วนำไปฉีดในไก่ปลอดเชื้อ ตัวละ 0.1 ml เดือนละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 3 เดือน แล้วเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรั่ม ก่อนนำซีรั่มไปใช้ทดสอบต้อง absorb ซีรั่มด้วย 1% chicken red blood cell (CRBC) ในอัตราส่วน 1 : 5 นำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัด nonspecific reaction จากนั้นปั่นที่ 12,000 rpm (Kubota 1920[®], Japan) นาน 5 นาที เพื่อแยกเก็บแอนติซีรั่มไว้ และแยก CRBC ทิ้งไป

HA test

เตรียม microtiter plate v-shape แบบ 96 well เริ่มจากใส่ diluents ซึ่งเป็น phosphate buffered saline ที่มี 0.1% bovine serum albumin (PBS-BSA) ลงในแถวที่ 2 จนถึงแถวที่ 12 หลุมละ 50 µl จนครบทุกหลุม โดยเว้นแถวที่ 1 ไว้ นำ antigen ใส่ลงในแถวที่ 1 และ 2 หลุมละ 50 µl ทำ 2 - fold dilution จากแถวที่ 2 ไปแถวที่ 3 จำนวน 50 µl แล้วทำการ dilute ต่อไปจนครบแถวที่ 11 พอถึงแถวที่ 11 ให้ดูดทิ้งไป 50 µl แล้วนำ 1% chicken red blood cell (CRBC) ใส่ลงไปในทุกหลุมทุกหลุมละ 50 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง แล้วนำมาส่องดู ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) หลุมสุดท้ายที่พบการเกาะกลุ่ม จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 1 HA unit ถ้ายังเห็นปฏิกิริยาไม่ชัดเจน จะทิ้งไว้ข้ามคืนจึงอ่านผล

HI test

ใส่ PBS-BSA diluents ลงในแถวที่ 2 จนถึงแถวที่ 12 หลุมละ 25 µl จนครบทุกหลุม โดยเว้นแถวที่ 1 ไว้ ใส่แอนติซีรั่มต่อไทป์ A หรือ B หรือ C ลงในแถวที่ 1 และ 2 หลุมละ 25 µl แล้ว mix serum ทำ 2 - fold dilution จากแถวที่ 2 ต่อไปจนครบแถวที่ 10 พอถึงแถวที่ 10 ให้ดูดทิ้งไป 25 µl นำ 4 HA unit

antigen ใส่ในหลุมทุกหลุมละ 25 μ l จนถึงหลุมที่ 11 แล้วนำไปเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำ 1% CRBC มาใส่ลงในหลุมละ 50 μ l จนครบทุกหลุม หลุมที่ 11 คือ control antigen ส่วนหลุมที่ 12 คือ control CRBC ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง จึงอ่านผลต่อไป

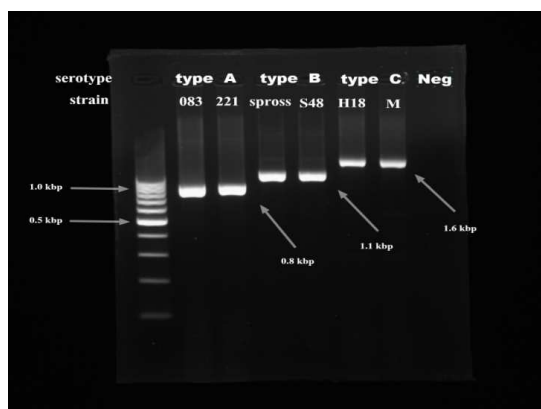
การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion method (Bauer et al., 1966) โดยนำเชื้อ *A. paragallinarum* ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 0.5 เกลี่ยบน chocolate agar ที่ใช้สำหรับทดสอบกับยาต้านจุลชีพ แล้ววางแผ่นยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, ceftiofur, cephalothin, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, nalidixic acid, streptomycin และ tetracycline แล้วนำไปบ่มในสภาวะที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลโดยวัดขนาดของ clear zone และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Microsoft Office Excel 2007

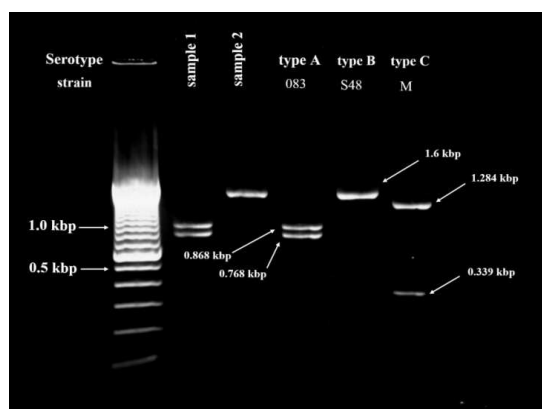
ผล

การพิสูจน์เชื้อ *A. paragallinarum* โดยวิธี PCR และจำแนกซีโรไทป์โดยวิธี multiplex PCR และ RFLP

ผลการทำ PCR พบว่าเชื้อทั้ง 32 สายพันธุ์ ให้ PCR product ที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. paragallinarum* ขนาด 0.5 kbp และเมื่อจำแนกซีโรไทป์โดยวิธี multiplex PCR พบว่า เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *A. paragallinarum* ซีโรไทป์ A, B และ C ให้ PCR product ขนาด 0.8, 1.1 และ 1.6 kbp ตามลำดับ (รูปที่ 1) แต่มีเชื้อจำนวน 2 สายพันธุ์ ที่มีแถบของซีโรไทป์ A และ B ไม่ชัด และมี non specific ร่วมด้วย จึงนำมาตรวจยืนยันเพื่อจำแนกซีโรไทป์ด้วยวิธี RFLP พบว่า เป็นซีโรไทป์ A และ B อย่างละ 1 สายพันธุ์ (รูปที่ 2) ดังนั้นจากการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อทั้ง 32 สายพันธุ์ พบว่าเป็นซีโรไทป์ A มากที่สุดจำนวน 16 สายพันธุ์ (50.0 %) รองลงมาคือ ซีโรไทป์ B และ C จำนวน 8 สายพันธุ์ (25.0 %) เท่ากัน (ตารางที่ 2)



รูปที่ 1 แสดงเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *A. paragallinarum*, 3 ซีโรไทป์ โดยวิธี multiplex PCR พบว่าเชื้อ สเตรน 083 และ 221 ให้แถบของ ซีโรไทป์ A ที่ 0.8 kbp เชื้อ สเตรน Sposs และ S48 ให้แถบของซีโรไทป์ B ที่ 1.1 kbp และเชื้อ สเตรน M และ H18 ให้แถบของ ซีโรไทป์ C ที่ 1.6 kbp



รูปที่ 2 แสดงการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *A. paragallinarum* โดยวิธี RFLP จากตัวอย่าง 2 สายพันธุ์ และเชื้อควบคุมอ้างอิงมาตรฐาน 3 ซีโรไทป์ พบว่าซีโรไทป์ A ให้ PCR product ขนาด 0.768 และ 0.868 kbp ซีโรไทป์ B ให้ PCR product ขนาด 1.6 kbp และ ซีโรไทป์ C ให้ PCR product ขนาด 1.284 และ 0.339 kbp และเชื้อตัวอย่าง 2 สายพันธุ์ พบว่า sample 1 เป็นซีโรไทป์ A และ sample 2 เป็นซีโรไทป์ B

การจำแนกซีโรไทป์ โดย วิธี HA-HI

จำแนกสายพันธุ์ย่อยของตัวอย่างเชื้อ *A. paragallinarum* โดยวิธี HA-HI ได้ซีโรไทป์ A จำนวน 18 สายพันธุ์ (56.25 %) ซีโรไทป์ B และ C จำนวน 6 สายพันธุ์ (18.75 %) เท่ากัน และซีโรไทป์ A ร่วมกับ C จำนวน 2 สายพันธุ์ (6.25 %) ทั้งนี้พบว่าการเกิด cross reaction ของตัวอย่างเชื้อเนื่องจากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมของทั้ง ซีโรไทป์ A และ C ทั้งนี้มีเชื้อ 18 สายพันธุ์ ที่ให้ผลเป็นซีโรไทป์ A โดยวิธี HA-HI ซึ่งมี 16 สายพันธุ์ ให้ผลตรงกันทั้งสองวิธี ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ ให้ผลเป็นซีโรไทป์ B โดยวิธี multiplex PCR (ตารางที่ 2) ส่วนเชื้อที่เกิด cross reaction ระหว่างซีโรไทป์ A และ C เมื่อตรวจด้วยวิธี multiplex PCR ให้ผลเป็นซีโรไทป์ C ทั้ง 2 สายพันธุ์

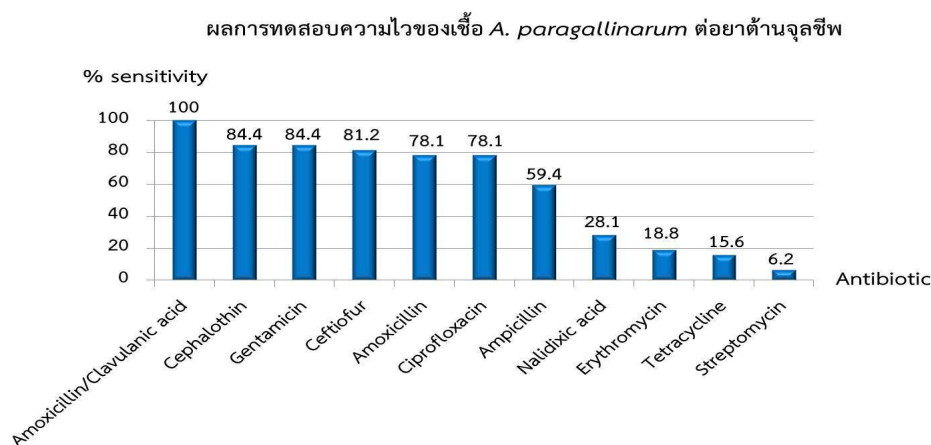
ตารางที่ 2 ผลการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *A. paragallinarum* ที่แยกได้ ระหว่างปี พ.ศ. 2545 – 2555 จำนวน 32 ตัวอย่างโดยวิธี multiplex PCR ร่วมกับ RFLP และ HA-HI test

วิธีทดสอบ	จำนวนซีโรไทป์ โดยวิธี multiplex PCR ร่วมกับ RFLP				
	ซีโรไทป์	A	B	C	รวม
จำนวนซีโรไทป์ โดยวิธี HA-HI	A	16	2	-	18 (56.25%)
	B	-	6	-	6 (18.75%)
	C	-	-	6	6 (18.75%)
	A+C*	-	-	2	2 (6.25%)
	รวม	16 (50%)	8 (25%)	8 (25%)	32 (100%)

* ไตเตอร์ต่อซีโรไทป์ A = 1:10; ไตเตอร์ต่อซีโรไทป์ C = 1:40

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion method พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ มีความไวสูงต่อยา amoxicillin/clavulanic acid (100.0%) รองลงมา ได้แก่ cephalothin และ gentamicin (84.4%) และ ceftiofur (81.2%) ตามลำดับ (รูปที่ 3) แต่มีความไวต่ำต่อยา streptomycin มากที่สุด (6.2%) รองลงมา ได้แก่ tetracycline (15.6%) erythromycin (18.8%) nalidixic acid (28.1%) และ ampicillin (59.4%)



รูปที่ 3 แสดงผลการทดสอบความไวของเชื้อ *A. paragallinarum* ต่อยาต้านจุลชีพ

วิจารณ์

จากการศึกษาการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *A. paragallinarum* โดยวิธี Agglutination test (Page, 1962) และวิธี Hemagglutination-inhibition tests (Blackall et al., 1990a) พบว่า มีขั้นตอนการเตรียม antigen ที่ใช้เวลานาน (2-4 วัน) ถ้าเตรียม antigen ไม่ดี อาจไม่สามารถกระตุ้นให้สร้าง titer หรือทำให้การอ่านผลตัดสินใจยาก จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการจำแนกซีโรไทป์ด้านชีวโมเลกุลขึ้นมา Soriano et al. (2004b) ได้นำเทคนิค ERIC-PCR มาใช้จำแนกซีโรไทป์ แต่พบว่า มีขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ยุ่งยาก ซับซ้อน และมีรูปแบบและขนาดของแถบดีเอ็นเอในผลวิเคราะห์ที่หลากหลายรูปแบบ ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ Sakamoto et al. (2012) จึงได้ศึกษาเทคนิคการจำแนกซีโรไทป์ โดยใช้ multiplex PCR พบว่ามีขั้นตอนการวิเคราะห์ที่สะดวกไม่ซับซ้อนนัก มีรูปแบบการอ่านผลที่ชัดเจนและใช้ระยะเวลาที่รวดเร็วกว่าวิธีอื่น สามารถแยกซีโรไทป์โดยใช้เวลาเพียง 6 – 12 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับวิธี HA-HI ที่ต้องใช้เวลาในการทดสอบ 3 – 5 วัน จากตารางที่ 2 พบว่าการจำแนกด้วย HA-HI มีผล cross reaction ที่ให้ผลบวกต่อซีโรไทป์ A และ C จำนวน 2 ตัวอย่าง แต่ multiplex PCR ให้ผลเป็นซีโรไทป์ C เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าวิธี HA-HI ให้ผลเป็นซีโรไทป์ A จำนวน 2 ตัวอย่าง ทั้งที่ multiplex PCR ซึ่งวิเคราะห์ถึงระดับยีน ให้ผลเป็นซีโรไทป์ B แสดงว่าวิธี multiplex PCR มีข้อได้เปรียบในการวิเคราะห์หาซีโรไทป์ของตัวเชื้อ ขณะที่วิธี HA-HI มีข้อดีที่สามารถตรวจได้ทั้งซีโรไทป์ของเชื้อ และ antibody จากซีรัมสัตว์ที่ได้รับเชื้อ ในกรณีที่เชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนเป้าหมาย อาจทำให้ไม่สามารถตรวจด้วยเทคนิค multiplex PCR ได้ ซึ่งสามารถนำวิธี RFLP มาวิเคราะห์ร่วมด้วยได้ แต่วิธี RFLP มีขั้นตอนที่ซับซ้อนกว่า multiplex PCR จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการจำแนกซีโรไทป์ด้วย multiplex PCR มี 2 ตัวอย่างที่ให้แถบ PCR product ของซีโรไทป์ A และ B ไม่ชัด เกิด non specific แต่เมื่อยืนยันด้วยวิธี RFLP พบว่าเป็นซีโรไทป์ A และ B ในบางกรณีผลที่ได้ก็ยังไม่ชัดเจนแม้จะใช้วิธี RFLP ร่วมด้วย (Sakamoto et al., 2012) จึงต้องมีการศึกษาพัฒนาเพื่อหาเทคนิคใหม่ๆต่อไป

จากการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อทั้ง 32 สายพันธุ์ พบว่าเป็นซีโรไทป์ A มากที่สุด เช่นเดียวกับการศึกษาการจำแนกซีโรไทป์ในประเทศเปรู (Mendoza-Espinoza et al., 2008) เอกวาดอร์ (Cabrera et al., 2011) อาร์เจนตินา (Sandoval et al., 1994) และอินโดนีเซีย (Poernomo et al., 2000) ที่พบเป็นซีโรไทป์ A มากที่สุด ขณะที่พบซีโรไทป์ C มากที่สุดในประเทศออสเตรเลีย (Thornton and Blackall, 1984) และญี่ปุ่น (Yamaguchi et al., 1990) และยังมีกรณีศึกษาถึงความรุนแรงของเชื้อในแต่ละ serovar ตามการจำแนกของ Kume scheme โดย Soriano et al. (2004a) พบว่าเชื้อ serovar C-1 มีความรุนแรงมากที่สุด ขณะที่ serovar C-4 มีความรุนแรงน้อยที่สุด ส่วนการศึกษาในประเทศอัฟริกาใต้ พบ serovar C-3 มีความรุนแรงมากกว่า serovar C-1, B-1 และ C-2 (Bragg, 2002)

ในส่วนของการต้านจุลชีพมีการใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคหวัดหน้าบวมในไก่ในประเทศไทย ยาที่นิยมใช้ในอดีตได้แก่ erythromycin, และ tetracycline จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้งานวิจัยนี้พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ดื้อต่อยา erythromycin และ tetracycline สอดคล้องกับงานวิจัยของประเทศเม็กซิโก (Fernandez et al., 2000) ไต้หวัน (Hsu et al., 2007) อินโดนีเซีย (Poernomo et al., 2000) สำหรับประเทศไทย Chukiatsiri et al. (2012) พบว่ามีการดื้อต่อยา erythromycin เช่นกัน ขณะที่ยาที่ยังใช้ได้ผลดี ได้แก่ amoxicillin/clavulanic acid นอกจากนี้ยังมีการใช้ enrofloxacin มาตั้งแต่ปี 2551 ทำให้เริ่มพบการดื้อต่อยา มากขึ้น (Chukiatsiri et al., 2012) ทั้งนี้มีการวิจัยการดื้อยาถึงระดับ multi-drug resistant plasmid ในไต้หวัน (Hsu et al., 2007) ซึ่งเป็นวิธีที่น่าจะนำมาใช้วิจัยการดื้อยาในประเทศไทย

จากการศึกษาการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *A. paragallinarum* โดยวิธี multiplex PCR เปรียบเทียบกับวิธีทางซีรัมวิทยา ทำให้ได้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็วและแม่นยำ แก้ไขปัญหาการเกิด cross reaction เมื่อนำมาใช้ร่วมกับวิธี RFLP ทำให้ผลตรวจวิเคราะห์มีความแม่นยำมากขึ้น จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในประเทศไทย และยังเป็นประโยชน์ทางระบาดวิทยา สามารถวางแผนทางในการควบคุมโรค และกำหนดชนิดของวัคซีนได้อย่างเหมาะสม จากการศึกษายังทำให้ทราบข้อมูลความไวของเชื้อต่อต้านจุลชีพ เป็นแนวทางในการศึกษาค้นคว้าและเลือกใช้ยาเพื่อการควบคุมโรคในไก่ นอกจากนี้ยังนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีนและการวิจัยพัฒนาเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.วันทนี เนรมิตมานสุข ที่ให้คำปรึกษา นางสาววันวิสาข์ สัตย์สำนึก นางสาวนัยนา หัสสรังสี ที่ช่วยงานวิจัย น.สพ.ไพฑูรย์ ก้อนทอง น.สพ.วัชรชัย ณรงค์ศักดิ์ สพ.ญ.ธวัชรรัตน์ เกียรติยิ่งอังสุลี นางสาวอภิสรา วรราช และนางสาวหนึ่งฤทัย อารีย์มิตร ช่วยแก้ไขต้นฉบับ และจัดพิมพ์ และเจ้าหน้าที่ในกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราทุกท่าน ที่ช่วยปฏิบัติงาน ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้

เอกสารอ้างอิง

- เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2536. โรคติดเชื้อในไก่. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ. หน้า 74-86.
- วันทนี เนรมิตมานสุข และประภาส เนรมิตมานสุข. 2528. เชื้อฮีโมฟิลัสพารากาลินารัม ที่พบจากโรคหวัดติดต่อในไก่. สัตวแพทยสาร. 36(2): 133-140.
- วันทนี เนรมิตมานสุข ประภาส เนรมิตมานสุข ทิพา ตันติเจริญยศ และลัดดา ตรวงศา. 2538. การศึกษาวัคซีนโรคหวัดติดต่อในไก่ที่ผลิตจากสายพันธุ์ท้องถิ่น. สัตวแพทยสาร. 46(4): 53-60.
- 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., Eaves, L.E. and Aus, G. 1990a. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page scheme: comparison of the use of agglutination and hemagglutination-inhibition tests. Avian Dis. 34(3): 643-645.
- Blackall, P.J., Eaves, L.E. and Rogers, D.G. 1990b. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin Scheme. J. Clin. Microbiol. 28(6): 1185-1187.

- Blackall, P.J. 1999. Infectious coryza: Overview of the disease and new diagnostic options. Clin. Microbiol. Reviews. 12(4): 627-632.
- Bragg, R.R. 2002. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 1 : NAD-dependent field isolates. Onderstepoort J. Vet. Res. 69: 163-169.
- Cabrera, A., Morales-Erasto, V., Salgado-Miranda, C., Blackall, P.J. and Soriano-Vargas, E. 2011. Hemagglutinin serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Ecuador. Trop Anim Health Prod. 43(3): 549-551.
- Chen, X., Mifflin, J.K., Zhang, P. and Blackall, P.J. 1996. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis. 40: 398-407.
- Chukiatsiri, K., Chotinun, S. and Chansiripornchai, N. 2010. An Outbreak of *Avibacterium paragallinarum* serovar B in a Thai Layer Farm. Thai J. Vet. Med. 40(4): 441-444.
- Chukiatsiri, K., Sasipreeyajan, J., Blackall, P.J., Yuwatanichsampan, S. and Chansiripornchai, N. 2012. Serovar identification antimicrobial sensitivity and virulence of *Avibacterium paragallinarum* isolated from chickens in Thailand. Avian Dis. 56: 359-364.
- Fernandez, R.P., Garcia-Delgado, P.G.A., Ochoa, P. and Soriano, V.E. 2000. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico. Avian Pathol. 29: 473-476.
- Hsu, Y.M., Shieh, H.K., Chen, W.H., Sun, T.Y. and Shiang, J.H. 2007. Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles and haemocin activities of *Avibacterium paragallinarum* strains. Vet. Microbiol. 124: 209-218.
- Kume, K., Sawata, A. and Nakase, Y. 1978. Haemophilus infections in chickens. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolated from chickens affected with coryza. Jpn. J. Vet. Sci. 40: 65-73.
- Kume, K., Sawata, A., Nakai, T. and Matsumoto, M. 1983. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. J. Clin. Microbiol. 17(6): 958-964.
- Mendoza-Espinoza, A., Koga, Y. and Zavaleta, A.I. 2008. Amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Avibacterium paragallinarum*. Avian Dis. 52: 54-58.
- Page, L.A. 1962. Haemophilus infections in chickens. I. Characteristics of 12 Haemophilus isolates recovered from diseased chickens. Am. J. Vet. Res. 23: 85-95.
- Poernomo, S., Sutarma, Rafiee, M. and Blackall, P.J. 2000. Characterisation of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia. Aust. Vet J Vol 78(11): 759-762.
- Sakamoto, R., Kino, Y. and Sakaguchi, M. 2012. Development of a Multiplex PCR and PCR-RFLP Method for Serotyping of *Avibacterium paragallinarum*. J. Vet. Med. Sci. 74(2): 271-273.
- Sandoval, V.E., Terzolo, H.R. and Blackall, P.J. 1994. Complicated infectious coryza outbreaks. Avian Dis. 38: 672-678.

- Soriano, V.E., Longinos, G.M., Fernandez, R.P., Velasquez, Q.E., Ciprian, C.A., Salazar-Garcia, F. and Blackall, P.J. 2004a. Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis. 48: 886-889.
- Soriano, V.E., Tellez, G., Hargis, B.M., Newberry, L., Salgado, M.C. and Vazquez, J.C. 2004b. Typing of *Haemophilus paragallinarum* strains by using enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction. Avian Dis. 48: 890-895.
- Terzolo, H.R., Paolicchi, F.A., Sandoval, V.E., Blackall, P.J., Yamaguchi, T. and Iritani, Y. 1993. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. Avian Dis. 37: 310-314.
- Thornton, A.M. and Blackall, P.J. 1984. Serological classification of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Aust. Vet. J. 61: 251-253.
- Yamaguchi, T., Kati K., Takigami, S., Iritani, Y. and Hayashi, Y. 1990. Serological classification of Japanese isolates of *Haemophilus paragallinarum* using two serovar-specific monoclonal antibodies. Avian Dis. 34: 364-368.

Study on serotypes of *Avibacterium paragallinarum* isolated from chicken in Thailand by Multiplex PCR

Somma Yuwapanichsampan* Pacharee Thongkamkoon
Pornpen Pathanasophon Chayaphak Siboo

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

*Corresponding person Tel : 02-5798908-14 Fax : 02-5798919 E-mail : sommai@dld.go.th

Abstract

Avian infectious coryza which caused by *Avibacterium paragallinarum* (*A. paragallinarum*) is an acute respiratory disease in chicken. The disease is characterized by rapid outbreak, high morbidity but low mortality rates. It occurs worldwide resulting in significant economic losses. The objective of this study is to identify serotypes of 32 *A. paragallinarum* strains isolated from diseased chicken samples submitted to Bacteriology and Mycology Section, National Institute of Animal Health during 2002 – 2012 by multiplex PCR and RFLP in comparison with HA-HI test. In addition, antimicrobial susceptibility test was also performed. Results of serotype identification by multiplex PCR in combination with RFLP technique revealed that the major serotype was serotype A (50%, 16/32), while serotypes B and C shared equal figure (25%, 8/32). The results of serotype identification by HA-HI test, serotype A was accounted for 56.25% (18/32) while serotype B and C were equal at 18.75% (6/32) and there were 2 isolates that showed positive for both serotype A and C (6.25%, 2/32) but both of them showed positive for serotype C by multiplex PCR. Besides, two isolates that showed positive for serotype B by multiplex PCR were positive for serotype A by HA-HI test. Results of antimicrobial sensitivity test by disk diffusion method revealed that *A. paragallinarum* isolates were highly sensitive to amoxicillin/clavulanic acid (100%), cephalothin (84.4%), gentamicin (84.4%) and ceftiofur (81.2%) but less sensitive to streptomycin (6.2%), tetracycline (15.6%) and erythromycin (18.8%). From this study, it was concluded that multiplex PCR in combination with RFLP technique is a rapid, accurate and specific method that can successfully provide the better results for serotype identification of *A. paragallinarum* field isolates without any cross reaction.

Keywords: *Avibacterium paragallinarum*, serotype identification, multiplex PCR, RFLP, HA-HI