

ระบาดวิทยาและการศึกษาพันธุกรรมของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* สายพันธุ์ที่แยกได้จากแพะ กวาง สุกร และดินในจังหวัดราชบุรี ด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis

เจษฎา จุลไวัลสุจริต* รัตติยา นาคสุวรรณ และ เพชรรัตน์ ศักดินันท์

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก ตู้ ปณ.18 อ. จอมบึง จังหวัดราชบุรี 70150

* ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ โทร. 0-3222-8379 โทรสาร 0-3222-8379 ต่อ 114 e-mail: jesda@dld.go.th

บทคัดย่อ

จากการศึกษาย้อนหลังตั้งแต่ปี 2549 ถึง 2555 พบสัตว์ป่วยและตายจากการติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) ในพื้นที่จังหวัดราชบุรี จำนวน 32 ตัว โดยพบในแพะ (14) กวาง (11) และสุกร (7) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย อายุตั้งแต่ 1 เดือน 10 วัน จนถึง 13 ปี สัตว์แต่ละชนิดจะมีอาการดังนี้ แพะและกวางมีลักษณะผอม ซึม ไม่กินอาหาร อ่อนเพลีย ไอ และมีน้ำมูก ส่วนสุกรพบอาการท้องเสียและพบฝีที่ผิวหนัง ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาส่วนใหญ่พบรอยโรคแบบฝีหนอง ขนาดตั้งแต่ 0.1-7.0 เซนติเมตร ที่หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต ต่อมท่อน้ำเหลือง ลำไส้ อวัยวะเต้านม และผิวหนัง รอยโรคอื่นที่พบ ได้แก่ จุดเนื้องอกตาย จุดเลือดออก เลือดคั่ง เกิดถุงน้ำ และเยื่อหุ้มอวัยวะบางส่วนหนากว่าปกติ ผลการเพาะเชื้อสามารถแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ได้จากอวัยวะเดียวและหลายอวัยวะ ทั้งในอวัยวะที่พบรอยโรคและไม่พบรอยโรค รวม 47.06% (80/170) พบเชื้อมากที่สุดที่ปอดและม้ามเท่ากัน (62.50%, 20/32) รองลงมาคือไต (46.88%, 15/32) และตับ (34.38%, 11/32) โดยเป็นเชื้อจากบริเวณที่เป็นฝี 75.81% (47/62) ฝีที่ปอดพบเชื้อมากที่สุด (86.67%, 13/15) รองลงมาคือที่ม้าม (80.00%, 16/20) และที่ไต (77.77%, 7/9) ส่วนกลุ่มรอยโรคอื่นพบเชื้อ 34.21% (13/38) และสามารถเพาะแยกเชื้อได้ 28.57% (20/70) จากอวัยวะที่ไม่พบรอยโรค ผลการตรวจสอบแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากสัตว์ 32 สายพันธุ์ และดิน 14 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากสัตว์มีรูปแบบทางพันธุกรรม 10 รูปแบบ (P1-P10) โดยสายพันธุ์ที่แยกได้จากแพะมีรูปแบบทางพันธุกรรมต่างกัน 4 รูปแบบ (P2, P3, P8, P9) จากกวางมี 5 รูปแบบ (P1, P4, P7, P8, P10) และจากสุกรมี 3 รูปแบบ (P5, P6, P7) แบบแผนทางพันธุกรรมจากสัตว์ที่พบมากที่สุดคือ P8 (48.8%, 15/32) รองลงมา ได้แก่ P7 และ P5 เท่ากัน (12.5%, 4/32) ส่วนสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินรอบโรงเรือนเลี้ยงแพะทั้ง 14 สายพันธุ์ มีแบบแผนทางพันธุกรรมเดียวกัน (P8) ซึ่งเหมือนกับที่พบในแพะและกวาง ผลจากการศึกษานี้บ่งชี้ว่า *B. pseudomallei* ซึ่งก่อโรคในสัตว์มีลักษณะทางพันธุกรรมหลายรูปแบบ และการที่เชื้อที่เพาะแยกได้จากสัตว์และเชื้อที่เพาะแยกได้จากดินมีแบบแผนทางพันธุกรรมแบบเดียวกัน แสดงให้เห็นว่ามีการส่งผ่านเชื้อระหว่างกัน ดังนั้นจึงเป็นเรื่องสำคัญที่ต้องระมัดระวังและมีมาตรการในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจากดินสู่สัตว์และคน

คำสำคัญ: *Burkholderia pseudomallei*, pulsed field gel electrophoresis, แพะ กวาง สุกร ดิน

บทนำ

Burkholderia pseudomallei (*B. pseudomallei*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิดแท่งที่ก่อให้เกิดโรคเมลลิออยด์ ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่พบได้ทั้งในคนและสัตว์หลายชนิด ได้แก่ อูฐ ม้า แพะ แกะ สุนัข โคะละล่า และสัตว์น้ำ (Forbes-Faulkner et al., 1992; Hicks et al., 2000; Ketterer et al., 1986; Ladds et al., 1981; Ladds et al., 1990; Thomas et al., 1988) เชื้อนี้พบได้ทั่วไปในดินและแหล่งน้ำธรรมชาติ ตัวเชื้อมีความคงทนสามารถปรับตัวและเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีค่า pH 5-8 ในช่วงอุณหภูมิ 24-32°C และสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ภายในดินที่มีความชื้นต่ำกว่า 10% นานถึง 70 วัน (Tong et al., 1996) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* มีชีวิตอยู่ได้ภายใต้ชั้นดินที่ระดับความลึกต่างๆ จนถึง 90 เซนติเมตร (Wuthiekanun et al., 1995) คนและสัตว์สามารถติดเชื้อได้ทางบาดแผลที่ผิวหนัง การหายใจ และการกิน (Cheng and Currie, 2005) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานถึงอัตราการพบเชื้อนี้สูงทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย (Currie et al., 2000) และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น มาเลเซีย เวียดนาม สิงคโปร์ อินโดนีเซีย เกาหลี พม่า เขมร ลาว และไทย (Dance, 1991) โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีรายงานผู้ป่วยด้วยโรคเมลลิออยด์ ประมาณ 2,000-3,000 คนต่อปี (Leelarasamee, 2000) ส่วนใหญ่มักเป็นชาวไร่ ชาวนา เนื่องจากมีความเสี่ยงที่จะสัมผัสเชื้อในดินได้สูง ซึ่งสัมพันธ์กับการพบเชื้อจากการสำรวจดินในทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยที่พบว่าตัวอย่างดินจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอัตราการพบเชื้อสูงสุด 50.10% (Vuddhakul et al., 1999)

โรคติดเชื้อ *B. pseudomallei* ถือเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข ผู้ป่วยมักมีความเสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ ซึ่งในช่วงปี 2540 ถึง 2549 มีรายงานว่าผู้ป่วยติดเชื้อนี้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึง 42.60% ซึ่งสูงเป็นอันดับสามรองจากโรคเอดส์และวัณโรค (Limmathurotsakul et al., 2010) ในระยะเวลาที่ผ่านมาทางด้านสาธารณสุขมีการศึกษาถึงอุบัติการณ์ของการติดเชื้อในผู้ป่วยรวมถึงการตรวจสอบเชื้อจากสิ่งแวดล้อมอย่างต่อเนื่อง อีกทั้งมีการพัฒนาการศึกษาในระดับโมเลกุลของเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินเพื่อหาความเชื่อมโยงการเกิดโรคระหว่างผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม (Wuthiekanun et al., 2009) ในขณะที่ข้อมูลการศึกษาด้านระบาดวิทยาการติดเชื้อรวมถึงระบาดวิทยาทางโมเลกุลของเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากสัตว์มีค่อนข้างจำกัด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการวินิจฉัยโรคในสัตว์ทำได้ยากเนื่องจากลักษณะอาการทางคลินิกของโรคเมลลิออยด์มีความคล้ายคลึงกับโรคอื่นๆ อีกทั้งสัตว์ป่วยมักไม่แสดงอาการให้เห็นอย่างชัดเจน การวินิจฉัยโรคในสัตว์ปัจจุบันยังนิยมใช้การตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธี indirect hemagglutination (IHA) ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้คัดกรองโรคในระดับฝูง แต่อาจไม่เหมาะสมสำหรับพื้นที่ที่เป็น endemic area เพราะอาจพบผลบวกในเลือดจากการที่สัตว์สัมผัสเชื้อในสิ่งแวดล้อมตั้งแต่เกิด ส่วนการแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจต่างๆ เช่น nasal swab, throat swab, rectal swab, ปัสสาวะ และอุจจาระ ทำได้ค่อนข้างยากเนื่องจากสิ่งส่งตรวจจากสัตว์ดังกล่าวมักพบการปนเปื้อนเชื้ออื่นๆ จากสิ่งแวดล้อมและจากตัวสัตว์เป็นจำนวนมากซึ่งเชื้อต่างๆ เหล่านี้มีความคงทนและ

สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เกิดความยุ่งยากและเป็นอุปสรรคอย่างมากต่อการเพาะแยกเชื้อ อย่างไรก็ตามในช่วงปี 2549 ถึง 2555 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตกได้รับซากสัตว์ส่งตรวจเพื่อชันสูตรสาเหตุการป่วยตาย ซึ่งผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการพบการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในกลุ่มสัตว์ซึ่งประกอบด้วยแพะ กวาง และสุกร ซึ่งสัตว์ดังกล่าวเลี้ยงอยู่ในพื้นที่บริเวณใกล้เคียงกัน ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตกได้ดำเนินการติดตามเพื่อเฝ้าระวังด้านระบาดวิทยาในช่วงเวลาต่อมา โดยทำการศึกษากาการปนเปื้อนและตรวจสอบการแพร่กระจายของเชื้อ *B. pseudomallei* ในดินภายในบริเวณแปลงหญ้ารอบโรงเรือนเลี้ยงแพะเนื้อที่พบการติดเชื้อมากที่สุดและสามารถแยกเชื้อนี้ได้ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรายงานข้อมูลด้านระบาดวิทยาของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่แยกได้จากการตรวจชันสูตรซากกวาง แพะ และสุกร รวมถึงศึกษารูปแบบความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากสัตว์และดินในบริเวณที่พบสัตว์ติดเชื้อ และเป็นข้อมูลด้านวิชาการแก่เจ้าหน้าที่ปศุสัตว์และเกษตรกร สามารถนำไปใช้วางแผนบริหารจัดการ เฝ้าระวัง ควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อและการติดเชื้อระหว่างสัตว์ในฝูงหรือการแพร่กระจายไปยังสัตว์ฝูงอื่นในบริเวณใกล้เคียง การแพร่กระจายของเชื้อจากสัตว์สู่คน รวมถึงการติดเชื้อจากการสัมผัสและได้รับเชื้อโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์และวิธีการ

ประวัติสัตว์

ซากสัตว์ป่วยและตายด้วยโรคเมลิออยด์จากพื้นที่จังหวัดราชบุรี จำนวน 32 ตัว ส่งชันสูตรโรค ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก ระหว่างปี 2549 ถึง 2555 จำแนกเป็นซากแพะ กวาง และสุกร 14, 11 และ 7 ตัว ตามลำดับ สัตว์ทั้งสามชนิดดังกล่าวส่วนใหญ่เลี้ยงอยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกันในรัศมี 5 กิโลเมตร โดยลักษณะการเลี้ยงและการจัดการภายในฝูงแพะและกวางเป็นการเลี้ยงแบบปล่อยแปลงหญ้า ส่วนสุกรเลี้ยงแบบขังคอกในโรงเรือนยกพื้นปูน ข้อมูลประวัติสัตว์แต่ละชนิดโดยย่อดังนี้

แพะเนื้อ จำนวน 13 ตัว แยกเป็นพันธุ์แองโกลโนเบียน 4 ตัว บอร์ 6 ตัว ลูกผสม 2 ตัว และไม่ทราบพันธุ์ 1 ตัว อายุ 1 เดือน 10 วัน ถึง 3 ปี 8 เดือน เลี้ยงบนโรงเรือนยกพื้นสูงและปล่อยลงแปลงหญ้าซึ่งอยู่ในบริเวณเดียวกันกับโรงเรือน ในขณะที่แพะนมพันธุ์ลูกผสมชาแนน จำนวน 1 ตัว อายุ 2 ปี เลี้ยงห่างจากฝูงแพะเนื้อมีระยะทางมากกว่า 30 กิโลเมตร แพะป่วย 10 ตัว แสดงลักษณะอาการทางคลินิกหลากหลายแตกต่างกันโดยทั่วไปพบแสดงอาการซึม ไม่กินอาหารและหญ้า น้ำมูกไหล และไอ บางตัวแสดงอาการคอแข็ง ขาแข็ง ขาอ่อนแรง ปัสสาวะไม่ออก เต้านมอักเสบ และ 4 ตัว ไม่แสดงอาการ

กวาง จำนวน 11 ตัว แยกเป็นพันธุ์ฟอลโล 8 ตัว รูซ่า 1 ตัว ลูกผสมแซมบ้า-รูซ่า 2 ตัว อายุ 3 ถึง 13 ปี สภาพการเลี้ยงเป็นแบบปล่อยทุ่งหญ้าซึ่งอยู่ในบริเวณใกล้เคียงกัน โดยพื้นที่ดังกล่าวมีระยะทางห่างจากโรงเรือนเลี้ยงแพะเนื้อประมาณ 2 กิโลเมตร สัตว์ป่วย 5 ตัว แสดงอาการซึมและมีสภาพร่างกายซูบผอม และ 6 ตัว ไม่แสดงอาการ

สุกร จำนวน 7 ตัว จำแนกเป็นสุกรแม่พันธุ์ลูกผสมลาร์จไวท์-แลนด์เรซ จำนวน 4 ตัว อายุ 1 ปี 8 เดือน ถึง 4 ปี 9 เดือน เลี้ยงแบบขังคอกในโรงเรือนยกพื้นปูนซึ่งห่างจากโรงเรือนเลี้ยงแพะเนื้อและกวางประมาณ 3 กิโลเมตร ทั้งหมดมีสภาพร่างกายแข็งแรงเป็นปกติ ส่วนสุกรอีก 3 ตัว เป็นพันธุ์แลนด์เรซ 1 ตัว อายุ 2 เดือน และพันธุ์สามสาย 2 ตัว อายุ 2 เดือน 23 วัน และ 3 เดือน 13 วัน ทั้งหมดเลี้ยงแบบปล่อยคอกพื้นปูนห่างจากกลุ่มสุกรที่กล่าวถึงเบื้องต้นประมาณ 25 กิโลเมตร โดยลูกสุกรพันธุ์สามสาย 2 ตัว มีอาการท้องเสียและพันธุ์แลนด์เรซหนึ่งตัวไม่แสดงอาการป่วย

การตรวจทางพยาธิวิทยา

ทำการตรวจสอบลักษณะรอยโรคหลังการผ่าซากด้วยตาเปล่า (gross lesion) เก็บตัวอย่างอวัยวะภายใน ได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ม้าม และไต รวมถึงอวัยวะอื่นที่ตรวจพบรอยโรค เช่น ต่อมน้ำเหลือง อัณฑะ ลำไส้ เต้านม และผิวหนัง เพื่อส่งเพาะแยกเชื้อที่ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียและเชื้อรา จำแนกกลุ่มการพบลักษณะรอยโรค วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบรอยโรคในแต่ละอวัยวะร่วมกับผลการเพาะแยกเชื้อจากห้องปฏิบัติการ พรรณนาเป็นร้อยละของกลุ่มลักษณะรอยโรคและการตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* จากอวัยวะต่างๆ

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

นำตัวอย่างอวัยวะภายในและอวัยวะอื่นที่ตรวจพบรอยโรคมาเพาะแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar และ MacConkey agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48-72 ชั่วโมง นำตัวอย่างดินซึ่งเก็บที่ระดับความลึก 15, 30 และ 45 เซนติเมตร จากพื้นที่ 150 x 300 ตารางเมตร บริเวณแปลงหญ้ารอบโรงเรือนเลี้ยงแพะเนื้อกลุ่มที่พบการป่วยและตายจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 459 ตัวอย่าง เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ashdown broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเพาะแยกเชื้อด้วย MacConkey agar ที่ประกอบด้วย gentamicin 5 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48-72 ชั่วโมง

เชื้อ *B. pseudomallei*

นำเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 46 สายพันธุ์ จำแนกเป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากซากแพะ กวาง และสุกร 32 ตัว จำนวน 32 สายพันธุ์ และเชื้อที่เพาะแยกได้จากดิน 459 ตัวอย่าง จำนวน 14 สายพันธุ์ ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้วยืนยันชนิดเชื้อโดยการตรวจสอบสารพันธุกรรมด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ก่อนนำไปใช้สำหรับการศึกษาทางพันธุกรรม โดยวิธี pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

การเตรียม chromosomal DNA และการทำ pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

เตรียม DNA และ agarose block โดยดัดแปลงจากวิธีของ Thong et al. (1994) ตามขั้นตอนดังนี้ นำเชื้อ *B. pseudomallei* จากที่เก็บรวบรวมไว้ที่อุณหภูมิ -80°C มาเพาะให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ละลายเชื้อด้วยสารละลาย cell suspension buffer (10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl pH 7.5) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่

ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ค่าประมาณ 1.20 เตรียม plug ซึ่งมีส่วนผสมระหว่าง cell suspension กับ 2% low melting agarose ในอัตราส่วน 1:1 ใส่ใน plug mold แหะเย็นให้แข็งตัวที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที จากนั้นนำ agarose plug ที่แข็งตัวแล้วใส่ในหลอดที่บรรจุด้วยสารละลาย chemical lysis buffer (6mM Tris-HCl, 1mM NaCl, 100 mM EDTA, 0.5% Brij 58, 0.22% sodium deoxycholate, 0.5% sarcosine) ที่มีส่วนผสมของ lysozyme 2 mg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง เทสารละลาย chemical lysis buffer เดิมออก เปลี่ยนเป็นสารละลาย chemical lysis buffer (0.5 M EDTA, 0.5% sarcosine) ที่มีส่วนผสมของ proteinase K 1 mg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นล้าง plug โดยเทสารละลาย chemical lysis buffer ออกและใส่ TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) ปริมาณ 5 มิลลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที ทำซ้ำ 4 ครั้ง เสร็จแล้วเท TE buffer ที่จากรนั้ลดดยอย genomic DNA โดยใส่ restriction enzyme *SpeI* (10U) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำมคิน ดุด restriction enzyme ออก และเติมด้วย TE buffer 100 μ l ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำ plug ใส่ลงในหลุมบนแผ่น 1% PFGE agarose gel และนำเข้าเครื่อง CHEF DRIII (Biorad, USA) โดยตั้งค่า initial switch time 3 วินาที final switch time 50 วินาที ใช้ pulse ramp 6v/cm กระแสไฟฟ้า 120-140 mA อุณหภูมิ 14°C นาน 30 ชั่วโมง ใน 0.5% Tris-boric acid-EDTA (TBE buffer) เสร็จแล้วย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (EtBr) 0.5 μ g/ml นาน 30 นาที อ่านผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง GelDoc.It (UVP, USA) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Bio1D⁺⁺ (Vilber Lourmat, Germany)

ผล

การตรวจชันสูตรซากแพะ 14 ตัว กวาง 11 ตัว และสุกร 7 ตัว รวมจำนวนทั้งสิ้น 32 ตัว ระหว่างปี 2549 ถึง 2555 ซึ่งทั้งหมดพบการติดเชื้อ *B. pseudomallei* การติดเชื้อดังกล่าวพบในสัตว์ทั้งเพศผู้และเพศเมียคละกันซึ่งในจำนวนนี้พบเป็นเพศผู้จำนวน 9 ตัว และเพศเมียจำนวน 23 ตัว ในแพะพบการติดเชื้อตั้งแต่อายุ 1 เดือน 10 วัน จนถึงวัยเจริญพันธุ์ที่มีอายุ 3 ปี 8 เดือน ส่วนสุกรพบติดเชื้อตั้งแต่อายุ 2 เดือน จนถึงสุกรแม่พันธุ์ที่มีอายุ 4 ปี 9 เดือน และกวางพบการติดเชื้อในช่วงอายุ 3 ถึง 13 ปี ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาจากอวัยวะต่างๆ ได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ม้าม และไต ส่วนใหญ่พบรอยโรคแบบฝีหนอง (abscesses) มีขนาดตั้งแต่ 0.1-7.0 เซนติเมตร บางซากพบฝีที่ต่อมน้ำเหลือง ลำไส้ อวัยวะ ต่อม และผิวหนัง นอกจากนี้ยังพบลักษณะรอยโรคอื่นๆ ร่วมด้วย ได้แก่ จุดเนื้อตาย (necrotic foci) จุดเลือดออก (petechial hemorrhage) เลือดคั่ง (congestion) เกิดถุงน้ำ (serous cyst) รวมทั้งมีเยื่อหุ้มอวัยวะบางส่วนหนากว่าปกติ (thick capsule) ลักษณะการติดเชื้อในสัตว์กลุ่มที่ศึกษาคั้งนี้พบทั้งแบบแพร่กระจายในหลายอวัยวะ (multiple organ involvement) และแบบติดเชื้อเพียงอวัยวะเดียว (single organ involvement) รวมทั้งอวัยวะที่ไม่พบรอยโรค (no lesion) ก็พบการติดเชื้อด้วยเช่นกัน (Table 1, Fig. 1)

Table 1 Organs involved and cultural results of melioidosis cases in goats, deer and pigs in Ratchaburi province during 2006-2012

Animal species	Sex	Age	Gross lesions in organ of involvement and <i>B. pseudomallei</i> positive isolation					
			Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Others
goats n=14	M	1M10D	NL	As 0.1-0.2 cm [⊕]	NL	cysts 1.5 cm [⊕]	NL [⊕]	NL-lymph node [⊕] & NL-Brain [⊕]
	F	2M15D	NL	As [⊕]	NL	As 0.5 cm [⊕]	NL [⊕]	-
	M	1Y4M	PH	As [⊕]	As 0.5 cm [⊕]	As [⊕]	As [⊕]	-
	F	2Y	PH [⊕]	NL [⊕]	NL [⊕]	NL	congestion	As 5 cm-udder [⊕]
	M	2Y	NL	As 0.2-0.5 cm [⊕]	As 0.3 cm	As 0.3-1 cm [⊕]	As 0.3-1 cm [⊕]	As-testis [⊕] & As-lymph node [⊕]
	F	2Y1M	PH	congestion	NL	NL	NL	As 1-2 cm : small intestine [⊕]
	M	2Y1M	NL [⊕]	As 0.2-0.3 cm [⊕]	NF [⊕]	As 0.2-0.3 cm [⊕]	As 0.3 cm	-
	F	2Y6M	As	As	As 0.1-1 cm	As 0.2-1 cm [⊕]	congestion	-
	F	2Y6M	PH	NL [⊕]	NF	As 0.1-0.2 cm	As 0.1-0.2 cm [⊕]	-
	F	2Y10M	NL	NL	NF	As [⊕]	As [⊕]	-
	F	3Y	NL	PH [⊕]	NF [⊕]	NL [⊕]	NF [⊕]	-
	F	3Y	NL [⊕]	NL [⊕]	NL [⊕]	NL [⊕]	NL [⊕]	-
	F	3Y5M	PH	As [⊕]	NL [⊕]	As [⊕]	As [⊕]	-
	F	3Y8M	NL	NL [⊕]	As 0.5 cm [⊕]	As 0.5 cm [⊕]	As [⊕]	-
deer n=11	F	3Y	NL	As 0.5-1.0 cm [⊕]	As	As 0.5 cm [⊕]	NL [⊕]	-
	F	3Y	NL	NF [⊕]	NL	Thick capsule [⊕]	NL	-
	F	5Y	NL	As [⊕]	NF	PH	congestion	-
	M	8Y	congestion [⊕]	As 1-6 cm [⊕]	As 0.2-1 cm [⊕]	As 0.2-1 cm [⊕]	congestion [⊕]	-
	F	8Y	congestion	As 0.1-0.3 cm	As 0.1-0.3 cm	As 0.1-0.5 cm [⊕]	As 0.1-0.5 cm [⊕]	-
	F	9Y	NL	PH	congestion [⊕]	As 3 cm	NL	-
	F	9Y	NL	NF [⊕]	NL	NL	NL	-
	F	9Y	PH	As 0.5-2 cm [⊕]	As 0.5-1.0 cm	As 5-7 cm	As 2 cm	-
	F	10Y	NL	As [⊕]	As 0.5 cm [⊕]	As [⊕]	NL [⊕]	-
	M	11Y	PH	As [⊕]	NL	NL	NL	-
pigs n=7	F	13Y	NL	As 0.5-1 cm [⊕]	congestion	As 0.5-1 cm [⊕]	NL	-
	M	2M	NL	congestion	NF	NL	NL	As-skin [⊕] & NL-lymph node [⊕]
	M	2M23D	NL	congestion	NF	NL	NF [⊕]	-
	M	3M13D	NL	congestion	NF	PH	NL	As 0.3 cm-large intestine [⊕]
	F	1Y8M	NL	NL	NF 0.5 cm	As 1-2 cm [⊕]	NL	-
	F	2Y10M	NL	NL	As 0.2-1.5 cm	As 0.3-0.7 cm [⊕]	NL	-
	F	3Y	NL	NL	As 0.2-1cm [⊕]	As 0.2-0.9 cm	NL	-
	F	4Y9M	NL	NL	NL	As 0.5-1.5 cm [⊕]	NL	NL-lymph node [⊕]

⊕ : positive cultured, As : abscess, NF : necrotic foci, NL : no lesion, PH : petechial hemorrhage

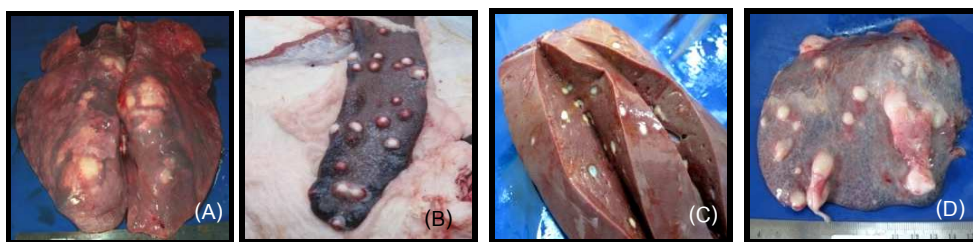


Fig. 1 Various abscesses lesion forms of melioidosis in organs of involvement; (A) multiple abscesses in pulmonary caudal lobe of 8 years old deer; (B) splenic abscesses in pig age of 4 years and 9 months; (C) and (D) showed hepatic and splenic abscesses in goat with 2 years and 6 months.

ผลการเพาะเชื้อสามารถแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ 47.06% (80/170) โดยพบเชื้อมากที่สุดที่ปอดและม้ามเท่ากัน (62.50%, 20/32) รองลงมาคือไต (46.88%, 15/32) และตับ (34.38%, 11/32) พบเชื้อจากอวัยวะที่เป็นฝีสูง 75.81% (47/62) โดยพบที่ปอดมากที่สุด (86.67%, 13/15) รองลงมาพบที่ม้าม (80.00%, 16/20) และที่ไต (77.77%, 7/9) ส่วนกลุ่มรอยโรคอื่นพบเชื้อ 34.21% (13/38) ในขณะที่อวัยวะที่ไม่พบรอยโรค สามารถเพาะแยกเชื้อได้ 28.57% (20/70) (Table 2)

Table 2 Frequency of organs involved gross lesion and *B. pseudomallei* positive isolation

Animal	Lesions	Number of cultural positive for melioidosis / number of organs involved						Total (%)
		Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Other organs *	
goats	abscess	0/1	6/7	2/4	8/9	6/7	4/4	26/32 (81.25)
	other lesions	1/5	1/2	2/4	1/1	1/3	0	6/15 (40.00)
	no lesion	2/8	4/5	3/6	2/4	3/4	2/2	16/29 (55.17)
	Total	3/14	11/14	7/14	11/14	10/14	6/6	48/76 (63.16)
deer	abscess	0	7/8	2/5	5/7	1/2	0	15/22 (68.18)
	other lesions	1/4	2/3	1/3	1/2	1/2	0	6/14 (42.86)
	no lesion	0/7	0	0/3	0/2	2/7	0	2/19 (10.53)
	Total	1/11	9/11	3/11	6/11	4/11	0	23/55 (41.82)
pigs	abscess	0	0	1/2	3/4	0	2/2	6/8 (75.00)
	other lesions	0	0/3	0/4	0/1	1/1	0	1/9 (11.11)
	no lesion	0/7	0/4	0/1	0/2	0/6	2/2	2/22 (9.09)
	Total	0/7	0/7	1/7	3/7	1/7	4/4	9/39 (23.08)
Total	abscess	0/1 (0)	13/15 (86.67)	5/11 (45.45)	16/20 (80.00)	7/9 (77.77)	6/6 (100)	47/62 (75.81)
	(%) other lesions**	2/9 (22.22)	3/8 (37.50)	3/11 (27.27)	2/4 (50.00)	3/6 (50.00)	0/0 (0)	13/38 (34.21)
	no lesion	2/22 (9.09)	4/9 (44.44)	3/10 (30.00)	2/8 (25.00)	5/17 (29.41)	4/4 (100)	20/70 (28.57)
Total (%)		4/32 (12.50)	20/32 (62.50)	11/32 (34.38)	20/32 (62.50)	15/32 (46.88)	10/10 (100)	80/170 (47.06)

* lymph node, udder, testis, large intestine and brain ** necrotic foci, petechial hemorrhage, congestion, cyst and thick capsule

การตรวจสอบแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เพาะแยกได้จากสัตว์จำนวน 32 สายพันธุ์ และจากดิน 14 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อที่แยกได้จากสัตว์ 31 สายพันธุ์ มีรูปแบบทางพันธุกรรมค่อนข้างหลากหลายถึง 10 รูปแบบ (P1-P10) และอีก 1 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากกวางระบุรูปแบบทางพันธุกรรมไม่ได้ (un-typed) ส่วนเชื้อซึ่งแยกได้จากดินมีลักษณะทางพันธุกรรมเพียงแบบเดียว (P8) โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดทั้งจากสัตว์และดินคือรูปแบบ P8 ซึ่งพบรวมทั้งสิ้น 29 สายพันธุ์ นอกนั้นเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อซึ่งแยกได้จากสัตว์ โดยรูปแบบที่พบมารองลงมาเป็นแบบ P5 และ P7 พบรูปแบบละ 4 สายพันธุ์ ในขณะที่แบบ P6 พบ 2 สายพันธุ์ และรูปแบบ P1, P2, P3, P4, P9 และ P10 พบอย่างละ 1 สายพันธุ์ (Table 3)

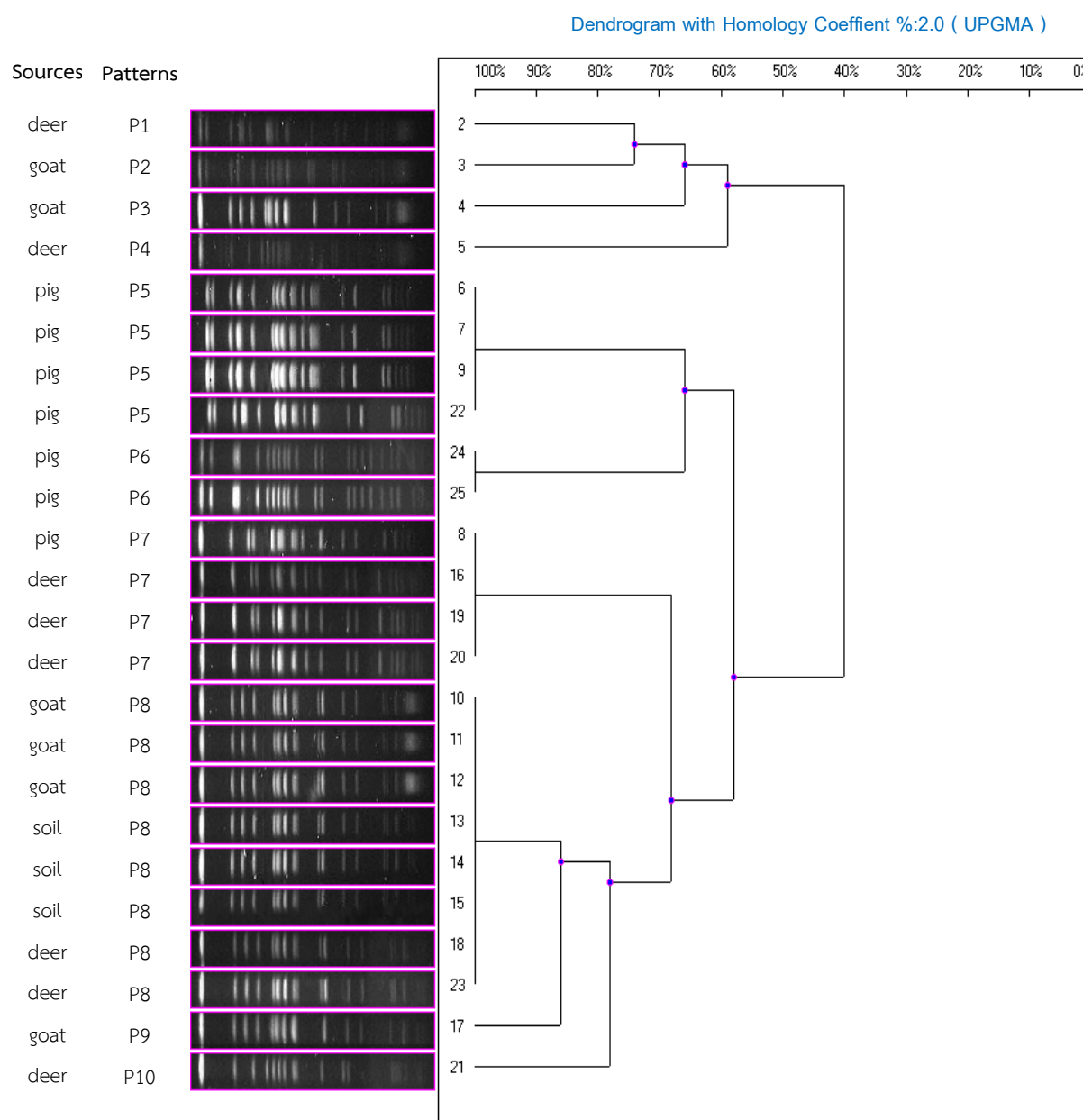
เชื้อที่แยกได้จากซากแพะ จำนวน 14 สายพันธุ์ มีรูปแบบทางพันธุกรรมต่างกัน 4 รูปแบบ (P2, P3, P8, P9) โดยเชื้อ 13 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากแพะเนื้อที่เลี้ยงอยู่ในบริเวณเดียวกันมีแบบแผนทางพันธุกรรมต่างกัน 3 รูปแบบ (P2, P3, P8) ส่วนเชื้ออีก 1 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากแพะนมซึ่งมีพื้นที่การเลี้ยงห่างจากฝูงแพะเนื้อดังกล่าวข้างต้นมากกว่า 30 กิโลเมตร (ไม่ได้แสดงในตาราง) มีรูปแบบทางพันธุกรรมเป็นแบบ P9 อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ 11 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 13 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากแพะเนื้อในกลุ่มเดียวกันมีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ P8 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับแบบ P9 ประมาณ 87% ในขณะที่แบบ P2 และ P3 มีรูปแบบทางพันธุกรรมคล้ายกันประมาณ 66% แต่ทั้งสองแบบดังกล่าวมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายแบบ P8 เพียง 40% ทั้งที่เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากแพะเนื้อกลุ่มเดียวกัน (Table 3, Fig. 2)

เชื้อที่แยกได้จากซากกวางทั้งหมด 11 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ 1 สายพันธุ์ ระบุรูปแบบทางพันธุกรรมไม่ได้ ในขณะที่ 10 สายพันธุ์ มีลักษณะพันธุกรรมที่ต่างกัน 5 รูปแบบ (P1, P4, P7, P8, P10) รูปแบบที่พบมากเป็นแบบ P8 (4 สายพันธุ์) และ P7 (3 สายพันธุ์) ทั้งสองรูปแบบมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายกันประมาณ 67% ในขณะที่แบบ P1, P4 และ P10 พบอย่างละ 1 สายพันธุ์ และมีแบบแผนทางพันธุกรรมแตกต่างกันค่อนข้างมาก (Table 3, Fig. 2)

เชื้อที่แยกได้จากซากสุกร จำนวน 7 สายพันธุ์ พบรูปแบบทางพันธุกรรมต่างกัน 3 รูปแบบ (P5, P6, P7) โดยเชื้อที่แยกได้จากซากสุกร 4 สายพันธุ์ ซึ่งเลี้ยงแบบขังคอกและอยู่ในบริเวณใกล้เคียงกันกับพื้นที่การเลี้ยงแพะเนื้อและกวางในรัศมี 5 กิโลเมตร (ไม่ได้แสดงในตาราง) มีแบบแผนทางพันธุกรรมแบบ P5 (3 สายพันธุ์) และ P7 (1 สายพันธุ์) ทั้งสองรูปแบบมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายกัน 60% ส่วนเชื้ออีก 3 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากสุกรที่เลี้ยงห่างจากกลุ่มแรกประมาณ 25 กิโลเมตร (ไม่ได้แสดงในตาราง) มีแบบแผนทางพันธุกรรมแบบ P6 (2 สายพันธุ์) และ P7 (1 สายพันธุ์) ทั้งสองแบบดังกล่าวมีพันธุกรรมคล้ายกันประมาณ 66% อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อซึ่งแยกได้จากซากสุกรทั้ง 3 รูปแบบ พบว่ามีความคล้ายกันประมาณ 60% (Table 3, Fig. 2)

Table 3 Number of *B. pseudomallei* isolates and PFGE pattern types isolated from goats, deer, pigs and soil in Ratchaburi province during 2006-2012

Sources	Number of isolates	Number of PFGE pattern isolates											Total number of PFGE pattern types
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	Un-typed	
goats	14	-	1	1	-	-	-	-	11	1	-	-	4
deer	11	1	-	-	1	-	-	3	4	-	1	1	5
pigs	7	-	-	-	-	4	2	1	-	-	-	-	3
soil	14	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-	-	1
Total	46	1	1	1	1	4	2	4	29	1	1	1	10

**Fig. 2** Dendrogram of dominating *B. pseudomallei* PFGE patterns isolated from goats, deer, pigs and soil in Ratchaburi province during 2006-2012

สรุปและวิจารณ์

โรคเมลิออยด์พบได้ในสัตว์หลากหลายชนิดโดยมีรายงานพบมากสุดในแพะ แกะ และสุกร ซึ่งอยู่ทางตอนเหนือของออสเตรเลีย (Sprague and Neubauer, 2004) การศึกษาในประเทศไทยโดยวิธีตรวจระดับแอนติบอดีในปัสสาวะซึ่งประกอบด้วยโค แพะ แกะ สุกร และควาย ช่วงระหว่างปี 2548-2549 พบให้ผลบวกต่อโรคนี้สูงในสุกรและควาย (7.23%) รองลงมาคือแกะ (6.83%) ส่วนแพะซึ่งเลี้ยงเป็นจำนวนมากในพื้นที่ภาคตะวันตกและภาคใต้ มีอัตราการตรวจพบต่ำเพียง 0.33% (Srikawkheaw and Lawhavinit, 2007) อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์ของการเกิดโรคเมลิออยด์ในปัสสาวะโดยเฉพาะพื้นที่ภาคตะวันตกซึ่งเป็นแหล่งผลิตปศุสัตว์ขนาดใหญ่ทั้งโค สุกร แพะ และแกะ คาดว่าอาจสูงกว่าที่เคยมีรายงานไว้ก็เป็นได้ ทั้งนี้ ประเมินจากการตรวจชันสูตรซาก ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก ระหว่างปี 2549 ถึง 2555 เฉพาะในจังหวัดราชบุรีพบการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในแพะ 14 ตัว ควาย 11 ตัว และสุกร 7 ตัว แสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของเชื้อในพื้นที่และการแพร่ตัวอยู่ในฝูงสัตว์ต่างๆ มาโดยตลอด ซึ่งจากการตรวจชันสูตรซากทั้งหมดดังกล่าวพบสัตว์ติดเชื้อทั้งแบบคละเพาะและคละพันธุ์ด้วยอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียโดยประมาณ 1:3 ช่วงอายุที่พบการติดเชื้อตั้งแต่ 1 เดือน 10 วัน จนถึง 13 ปี แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทางซีรัมวิทยาในแพะซึ่งเลี้ยงอยู่ในพื้นที่ภาคใต้ของไทยโดยพรทิพย์ และอรรถพร (2555) พบว่าเพศและอายุไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบโรคเมลิออยด์แต่อย่างใด

สัตว์ที่ป่วยด้วยโรคเมลิออยด์พบแสดงอาการได้หลากหลายลักษณะ เห็นได้จากการศึกษาของเนตรชนก และคณะ (2548) ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่มักแสดงอาการแบบเรื้อรัง ได้แก่ ซึม ไม่กินอาหาร ผอมลง ขาไม่มีแรง ไอ หอบ หายใจลำบาก และมีน้ำมูกขึ้น ในแพะและสุกรพบแสดงอาการเฉพาะที่ เช่น ท้องเสีย แท้งลูก และลูกอัมตะบวม บางรายมีอาการด้านมออักเสบหรือพบเฉพาะฝีที่ผิวหนังโดยไม่แสดงอาการอย่างอื่นให้เห็น อย่างไรก็ตามการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการเป็นเรื่องธรรมดาที่พบได้ในสัตว์ (CFSPH, 2007) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบสัตว์ติดเชื้อแสดงอาการป่วย 17 ตัว และติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ (subclinical infections) 15 ตัว อาการป่วยที่สังเกตได้ส่วนใหญ่คล้ายกับที่พบจากการศึกษาของเนตรชนก และคณะ (2548) ในกลุ่มแพะป่วยมักพบแสดงอาการแบบเรื้อรัง ได้แก่ ซึม กินอาหารได้น้อยหรือไม่กินอาหาร ชูบผอม อ่อนเพลีย และขาอ่อนแรง แพะบางตัวพบอาการทางเดินหายใจ ได้แก่ มีน้ำมูกและไอ ในขณะที่บางตัวพบอาการแบบเฉพาะที่ เช่น ด้านมออักเสบ ส่วนควายแสดงอาการป่วยเรื้อรัง ซึม และผอม ในขณะที่สุกรพบแสดงอาการแบบเฉพาะที่ ได้แก่ ท้องเสีย พบฝีที่ผิวหนังและลำไส้ อย่างไรก็ตามสุกรเป็นสัตว์ที่ทนต่อโรคนี้และมักไม่แสดงอาการหากมีการเลี้ยงและการจัดการที่ดี (CFSPH, 2007)

จากการพิสูจน์ซากพบพยาธิสภาพทั้งในสัตว์ที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ ลักษณะรอยโรคที่พบได้บ่อยอยู่ในรูปแบบการเกิดฝีที่อวัยวะ (abscesses formation) โดยพบทั้งแบบเฉพาะที่ในอวัยวะเดียวและแบบกระจายในหลายๆ อวัยวะ และพบได้ในทุกระบบอวัยวะไม่ต่างจากที่พบในคน เช่น หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต สมอง ต่อมไทรอยด์ ระบบสืบพันธุ์ รวมถึงผิวหนัง การแยกเชื้อในอวัยวะต่างๆ พบเชื้อจาก

บริเวณที่มีลักษณะรอยโรคเป็นส่วนใหญ่แต่บริเวณที่ไม่พบรอยโรค ก็พบเชื้อได้เช่นกัน บางอวัยวะไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* จากบริเวณที่มีลักษณะรอยโรคแต่พบการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นแทรกซ้อน เช่น *Arcanobacterium pyogenes* และ *Pseudomonas aeruginosa* สำหรับซากแพะและกวางอวัยวะที่พบการเกิดฝีได้บ่อยและมีความไวต่อการติดเชื้อคือปอด ม้าม และไต ซึ่งสัมพันธ์กับการศึกษาของ Soffler et al., (2012) จากการทดลองฟันเชื้อ *B. pseudomallei* เข้าระบบทางเดินหายใจของแพะซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวพบการเกิดฝีมากที่สุดที่ปอด ม้าม และไต ดังนั้นสันนิษฐานว่าการเกิดโรคในแพะและกวางกลุ่มที่ศึกษาครั้งนี้อาจได้รับเชื้อผ่านทางทางหายใจเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามทั้งแพะและกวางเป็นกลุ่มสัตว์ที่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โอกาสที่จะสัมผัสและติดเชื้อทางบาดแผลหรือการกลืนกินโดยตรงมีความเป็นไปได้สูงเช่นเดียวกัน ส่วนสุกรจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความผิดปกติและไม่แสดงอาการบ่งชี้ให้เห็นถึงภาวะการติดเชื้อ จากการพิสูจน์ซากพบการติดเชื้อจากการเกิดฝีแบบแพร่กระจายในม้ามสูงกว่าอวัยวะอื่นๆ อย่างไรก็ตามการติดเชื้อในสุกรสามารถพบได้ในหลายระบบอวัยวะเช่นเดียวกับสัตว์อื่นๆ แต่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเมลิอยด์มักพบสุกรป่วยโดยไม่แสดงอาการแต่ตรวจพบฝีได้บ่อยที่ม้าม (CFSPH, 2007)

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค pulse field gel electrophoresis (PFGE) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการตรวจสอบแบบแผนทางพันธุกรรมของเชื้อ *B. pseudomallei* เนื่องจากมีความถูกต้อง เหมาะสม และสามารถบ่งชี้ถึงความแตกต่างตลอดจนความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญที่ใช้ในการศึกษาด้านระบาดวิทยาของเชื้อดังกล่าว (Chua et al., 2011) ซึ่งจากผลการศึกษาพบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อที่เพาะแยกได้จากซากสัตว์ จำนวน 32 สายพันธุ์ พบว่า 31 สายพันธุ์ มีรูปแบบต่างกัน 10 รูปแบบ (P1-P10) ขณะที่ 1 สายพันธุ์ ไม่สามารถจำแนกรูปแบบทางพันธุกรรมได้ การพบลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งแพร่ระบาดและทำให้เกิดการติดเชื้อภายในฝูงสัตว์กลุ่มดังกล่าว ในขณะที่เชื้อซึ่งปนเปื้อนอยู่ในดินจากทั้งหมด 14 สายพันธุ์ มีรูปแบบทางพันธุกรรมเพียงรูปแบบเดียวและเหมือนกับเชื้อที่เพาะแยกได้จากแพะ เนื่องจากเชื้อดังกล่าวเก็บจากดินในแปลงหญ้ารอบโรงเรือนที่เลี้ยงแพะจึงเป็นข้อพิสูจน์อีกอย่างหนึ่งว่าเชื้อจากสัตว์และดินมีความสัมพันธ์ต่อกัน ที่ผ่านมามีรายงานในภาคตะวันออกเฉียงเหนือว่าพบเชื้อที่ปนเปื้อนในตัวอย่างดินจากพื้นที่ที่ปล่อยทิ้งร้าง (disused land) มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันมากถึง 12 รูปแบบ (Chantratita et al., 2008) ในขณะที่เชื้อซึ่งมีอยู่ในดินจากแปลงข้าวในทุ่งนา (rice paddy) มีรูปแบบทางพันธุกรรมต่างกัน 10 รูปแบบ (Wuthiekanun et al., 2009) อย่างไรก็ตามเชื้อ *B. pseudomallei* มีการแพร่กระจายอยู่ในดินในทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยและพบมากสุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Vuddhakul et al., 1999) ดังนั้นจึงเป็นปกติที่จะพบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อซึ่งมีอยู่ในดินในพื้นที่ที่เป็น endemic areas ของเชื้อดังกล่าว ในขณะที่เดียวกันการศึกษานี้ทำในพื้นที่ขนาดเล็กและจำกัดเฉพาะในแปลงหญ้าบริเวณรอบ

โรงเรือนที่เลี้ยงแพะไม่กระจายครอบคลุมถึงพื้นที่เลี้ยงสัตว์อื่นๆ ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุของการไม่พบความหลากหลายของสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามการพบเชื้อในดินสันนิษฐานได้ว่าอาจเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งมีอยู่ในธรรมชาติบริเวณนั้น โดยประเมินได้จากผลการเพาะแยกเชื้อจากดินในบริเวณดังกล่าวที่พบว่าเชื้อฝังตัวอยู่ในดินที่ระดับความลึกตั้งแต่ 15 จนถึง 45 เซนติเมตร หรืออาจเป็นสายพันธุ์ที่มาพร้อมกับการนำสัตว์ซึ่งเป็นพาหะเข้ามาเลี้ยงและเชื้อแพร่กระจายจากสัตว์สู่สิ่งแวดล้อม เนื่องจากในโรงเรือนดังกล่าวเป็นพื้นที่เลี้ยงแพะมานาน 10 ปี และมีการเคลื่อนย้ายสัตว์เข้าออกอยู่เสมอ

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์เชื้อที่ศึกษาทั้งหมด พบว่าเชื้อซึ่งเพาะแยกได้จากซากแพะจำนวน 14 สายพันธุ์ มีรูปแบบทางพันธุกรรมต่างกัน 4 รูปแบบ (P2, P3, P8, P9) เชื้อที่แยกได้จากซากแพะเนื้อเป็นสายพันธุ์เดียวกันเกือบทั้งหมด (11/13) โดยมีรูปแบบทางพันธุกรรมแบบ P8 เช่นเดียวกับเชื้อซึ่งแยกได้จากดินในแปลงหญ้ารอบโรงเรือน แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการแพร่กระจายและส่งผ่านระหว่างสัตว์กับสิ่งแวดล้อมในพื้นที่ดังกล่าว ในขณะที่เชื้ออีกหนึ่งสายพันธุ์ซึ่งแยกได้จากแพะนมที่เลี้ยงห่างจากกลุ่มแพะเนื้อระยะทางเกินกว่า 30 กิโลเมตร มีรูปแบบทางพันธุกรรมแบบ P9 ซึ่งใกล้เคียงกับแบบ P8 ประมาณ 87% ลักษณะทางพันธุกรรมมีความคล้ายกันค่อนข้างสูงอาจเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกันซึ่งเกิดการกลายพันธุ์หรืออาจเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์แต่มีพันธุกรรมคล้ายกันก็เป็นได้ ส่วนอีกสองสายพันธุ์ซึ่งมีรูปแบบทางพันธุกรรมแบบ P2 และ P3 พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายกันไม่ถึง 70% และที่สำคัญคล้ายกับแบบ P8 เพียง 40% ทั้งที่เป็นเชื้อซึ่งแยกได้จากซากแพะเนื้อในกลุ่มเดียวกัน แสดงให้เห็นค่อนข้างชัดเจนว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แพร่ระบาดและเป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อและตายในกลุ่มแพะดังกล่าวมีมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์

ส่วนเชื้อที่แยกได้จากซากกวางทั้งหมด 11 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ 1 สายพันธุ์ ไม่สามารถจำแนกรูปแบบทางพันธุกรรมได้ ส่วนอีก 10 สายพันธุ์ มีความหลากหลายของสายพันธุ์มากถึง 5 รูปแบบ (P1, P4, P7, P8, P10) แต่ละแบบมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันค่อนข้างมาก โดยรูปแบบที่ใกล้เคียงกันมากที่สุดเป็นแบบ P7 และ P8 แต่ทั้งสองรูปแบบดังกล่าวมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายกันไม่ถึง 70% คาดว่าอาจเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์กัน สำหรับเส้นทางการแพร่กระจายของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เป็นสาเหตุของการตายในกวางกลุ่มนี้ยังไม่ชัดเจน เชื้ออาจมีอยู่ในตัวสัตว์ซึ่งถูกนำเข้ามาจากแหล่งอื่นและแพร่กระจายภายในฝูง หรืออาจมีเชื้อหลากหลายสายพันธุ์แพร่กระจายอยู่ในสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นอยู่แล้วและติดต่อสู่สัตว์ก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อที่แยกได้จากซากกวางมีรูปแบบทางพันธุกรรมที่พบมากที่สุดเป็นแบบ P8 (4/11) สายพันธุ์เดียวกับเชื้อที่แยกได้จากซากแพะเนื้อและจากดินในแปลงหญ้ารอบโรงเรือน สันนิษฐานได้ว่าเชื้อที่พบอาจแพร่กระจายจากแปลงหญ้าซึ่งมีสภาพเป็นพื้นที่ลุ่ม มีเส้นทางน้ำไหลผ่านเป็นวงกว้างสู่บริเวณใกล้เคียงรวมถึงทุ่งหญ้าที่เลี้ยงกวาง ซึ่งเชื้อที่มีอยู่ในดินสามารถจะแพร่กระจายไปตามพื้นที่ต่างๆ ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงน้ำหลากในระหว่างฤดูฝน (Strauss et al., 1969; Haase et al., 1995; Struelens, 1996)

สำหรับเชื้อซึ่งแยกได้จากซากสุกร จำนวน 7 สายพันธุ์ โดยเชื้อ 4 สายพันธุ์ แยกได้จากซากสุกรกลุ่มแม่พันธุ์ซึ่งเลี้ยงอยู่ใกล้ทุ่งหญ้าที่เลี้ยงกวาง ส่วนอีก 3 สายพันธุ์ อยู่ห่างจากกลุ่มแรกประมาณ 25 กิโลเมตร เชื้อทั้ง 7 สายพันธุ์ พบรูปแบบทางพันธุกรรมต่างกัน 3 รูปแบบ (P5, P6, P7) โดยเชื้อจากสุกรกลุ่มแม่พันธุ์เป็นสายพันธุ์เดียวกัน 3 สายพันธุ์ และอีก 1 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์เดียวกับที่พบติดเชื้อในกวาง ทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าวมีรูปแบบพันธุกรรมแบบ P5 และ P7 ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อซึ่งแยกได้จากซากสุกรอีกกลุ่ม (3 สายพันธุ์) เป็นสายพันธุ์เดียวกัน 2 สายพันธุ์ มีรูปแบบพันธุกรรมแบบ P6 ส่วนอีก 1 สายพันธุ์ มีพันธุกรรมแบบ P7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่พบติดเชื้อในกวางและในสุกรกลุ่มแรก เชื้อที่พบทั้ง 3 รูปแบบดังกล่าวน่าจะต่างสายพันธุ์กันเนื่องจากมีลักษณะพันธุกรรมคล้ายกันไม่ถึง 70% อย่างไรก็ตามเป็นการยากที่จะคาดเดาถึงเส้นทางการติดเชื้อระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ เนื่องจากสุกรทั้งสองกลุ่มมีลักษณะการเลี้ยงแบบขังคอกในโรงเรือนพื้นปูน ไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อจากการสัมผัสดินและน้ำตามธรรมชาติแบบแพะและควาญ อีกทั้งในการศึกษาครั้งนี้ก็ไม่พบว่าสุกรติดเชื้อสายพันธุ์เดียวกับที่พบจากดิน ซึ่งความเป็นไปได้ของการติดเชื้อในสุกรอาจเกิดจากการนำสุกรพ่อพันธุ์ที่มีเชื้อเข้ามาผสม การนำสัตว์ติดเชื้อจากแหล่งอื่นเข้ามาเลี้ยง การสูดดมละอองเชื้อในอากาศ หรือแม้กระทั่งการดื่มกินเชื้อซึ่งปนเปื้อนในน้ำประปาโดยตรงก็อาจเป็นไปได้ (Currie et al., 2001) ทั้งนี้การคาดการณ์เกี่ยวกับเส้นทางการแพร่ระบาดอาจทำได้ด้วยการศึกษาเชื้อที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเช่นดินหรือน้ำ และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมกับสายพันธุ์ที่พบจากการติดเชื้อ รูปแบบทางพันธุกรรมที่เหมือนกันระหว่างสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถจะประเมินให้เห็นถึงความเชื่อมโยงระหว่างเชื้อในสิ่งแวดล้อมกับการเกิดโรคได้ (Chen et al., 2010) ดังนั้นข้อมูลด้านระบาดวิทยาตลอดจนรูปแบบความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนับเป็นสิ่งสำคัญ สามารถจะนำไปใช้วางแผนบริหารจัดการ เฝ้าระวัง ควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายเชื้อและการติดเชื้อระหว่างสัตว์ในฝูงหรือการแพร่กระจายไปยังสัตว์ฝูงอื่นในบริเวณใกล้เคียง การติดเชื้อจากสัตว์สู่คน รวมถึงการติดเชื้อจากการสัมผัสและได้รับเชื้อโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สัตวแพทย์หญิงพัชรี ทองคำคุณ และคุณกัมธกร พรหมโต กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการตรวจวิเคราะห์ PFGE และขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในกลุ่มงานแบคทีเรียและเชื้อราวิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยา และกลุ่มงานระบาดวิทยาและสารสนเทศ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก ที่ให้ความร่วมมือด้านการเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

เนตรชนก จิวากานนท์ อุดม เจือจันทร์ พิเชษฐ ทองปัน ชาติชาย แก้วเรือง และนิยมศักดิ์ อุปทุม. 2548. โรคเมลิออยโดซิสในปศุสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือระหว่างปี 2541-2548. วารสารวิชาการปศุสัตว์ เขต 4. 9(20): 1-9.

- พรทิพย์ ชูเมฆ และอรรณพ จินพันธ์. 2555. การศึกษาทางชีววิทยาของโรคบรูเซลโลสิสและเมลิอยโดสิสในแพะที่เลี้ยงในภาคใต้ของประเทศไทย. เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50. สาขาสัตวศาสตร์ สัตวแพทย์ และประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. ระหว่างวันที่ 31 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2555. หน้า 329-338.
- CFSPH (The Center for Food Security and Public Health). 2007. "Meliodosis". [Online]. Available: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/melioidosis.pdf>. Accessed October 1, 2013.
- Chantratita, N., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Vesaratchavest, M., Thanwisai, A., Amornchai, P., Tumapa, S., Feil, E.J. Day, N.P. and Peacock, S.J. 2008. Genetic diversity and microevolution of *Burkholderia pseudomallei* in the environment. PLoS Negl Trop Dis. 2(2): e182.
- Chen, Y.S., Lin, H.H., Mu, J.J., Chiang, C.S., Chen, C.H., Buu, L.M., Lin, Y.E. and Chen, Y.L. 2010. Distribution of melioidosis cases and viable *Burkholderia pseudomallei* in soil: evidence for emerging melioidosis in Taiwan. J Clin Microbiol. 48(4): 1432-1434.
- Cheng, A.C. and Currie, B.J. 2005. Melioidosis: Epidemiology, pathophysiology and management. Clin Microbiol Rev. 18(2): 383-416.
- Chua, K.H., See, K.H., Thong, K.L. and Puthucheary, S.D. 2011. SpeI restriction enzyme displays greater discriminatory power than XbaI enzyme does in a pulsed-field gel electrophoresis study on 146 clinical *Burkholderia pseudomallei* isolates. Jpn J Infect Dis. 64: 228-233.
- Currie, B.J., Fisher, D.A., Howard, D.M., Burrow, J.N., Lo D Selva-Nayagam, S., Anstey, N.M., Huffam, S.E., Snelling, P.L., Marks, P.J., Stephens, D.P., Lum, G.D., Jacups, S.P. and Krause, V.L. 2000. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. Clin Infect Dis. 31: 981-986.
- Currie, B.J., Mayo, M., Anstey, N.M., Donohoe, P., Haase, A. and Kemp, D.J. 2001. A cluster of melioidosis cases from an endemic region is clonal and is linked to the water supply using molecular typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates. Am J Trop Med Hyg. 65(3): 177-179.
- Dance, D.A.B. 1991. Melioidosis: the tip of the iceberg. Clin Microbiol Rev. 4(1): 52-60.
- Forbes-Faulkner, J.C., Townsend, W.L. and Thomas, A.D. 1992. *Pseudomonas pseudomallei* infection in camels. Aust Vet J. 69(6): 148.
- Haase, A., Smith-Vaughan, H. and Melder, A. 1995. Subdivision of *Burkholderia pseudomallei* ribotypes into multiple types by random amplified polymorphic DNA analysis provides new insights into epidemiology. J Clin Microbiol. 33: 1687-1690.

- Hicks, C.L., Kinoshita, R. and Ladds, P.W. 2000. Pathology of melioidosis in captive marine mammals. Aust Vet J. 78: 193-195.
- Ketterer, P.J., Webster, W.R., Shield, J., Arthur, R.J., Blackall, P.J. and Thomas, A.D. 1986. Melioidosis in intensive piggeries in South-Eastern Queensland. Aust Vet J. 63: 146-149.
- Ladds, P.W. Thomas, A.D. and Pott, B. 1981. Melioidosis with acute meningoencephalomyelitis in a horse. Aust Vet J. 57: 36-38.
- Ladds, P.W., Thomas, A.D., Speare, R. and Brown, A.S. 1990. Melioidosis in a koala. Aust Vet J. 67: 304-305.
- Leelarasamee, A. 2000. Melioidosis in Southeast Asia. Acta Trop. 74: 129-132.
- Limmathurotsakul, D., Wongratanacheewin, S., Teerawattanasook, N., Wongsuvan, G., Chaisuksant, S., Chetchotisakd, P., Chaowakul, W., Day, N.P.J. and Peacock, S.J. 2010. Increasing incidence of human melioidosis in northeast Thailand. Am J Trop Hyg. 72(6): 1113-1117.
- Soffler, C., Bosco-Lauth, A.M., Aboellail T.A., Marolf A.J. and Bowen R.A. 2012. Development and characterization of a caprine aerosol infection model of melioidosis. Plos ONE. 7(8): e43207.
- Sprague, L.D. and Neubauer, H. 2004. Melioidosis in animals: a review on epizootiology, diagnosis and clinical presentation. J Vet Med. B 51: 305-320.
- Srikawkheaw, N. and Lawhavinit, O. 2007. Detection of antibodies against melioidosis from animal sera in Thailand by Indirect haemagglutination test. Kasetsart J (Nat. Sci.). 41: 81-85.
- Strauss, J.M., Groves, M.G., Mariappan, M. and Ellison, D.W. 1969. Melioidosis in Malaysia: II. Distribution of *Pseudomonas pseudomallei* in soil and surface water. Am J Trop Med Hyg. 18(5): 698-702.
- Struelens, M.J. 1996. The Members of the European Study Group on Epidemiological Markers. Consensus guidelines for appropriate use and evolution of microbial epidemiologic typing system. J Clin Microbiol Infect. 2: 2-11.
- Thong, K.L., Cheong, Y.M., Puthucheary, S., Koh, C.L. and Pang, T. 1994. Epidemiologic analysis of sporadic *Salmonella* Typhi isolates and those from outbreaks by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J Clin Microbiol. 32(5): 1135-1141.
- Thomas, A.D., Spinks, G.A., D'Arcy, T.L., Norton, J.H. and Trueman, K.F. 1988. Evaluation of four serological tests for the diagnosis of caprine melioidosis. Aust Vet J. 65: 261-264.

- Tong, S., Yang, S., Lu, Z. and He, W. 1996. Laboratory investigation of ecological factors influencing the environmental presence of *Burkholderia pseudomallei*. Microbiol Immunol. 40(6): 451-453.
- Vuddhakul, V., Tharavichitkul, P., Na-Engam, N., Jitsurong, S. and Kunthawa, B. 1999. Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand. Am J Trop Med Hyg. 60(3): 458-461.
- Wuthiekanun, V., Smith, M.D., Dance, D.A. and White, N.J. 1995. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil in the north-eastern Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg. 89: 41-43.
- Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Chantratita, N., Feil, E.J., Day, N.P.J. and Peacock, S.J. 2009. *Burkholderia pseudomallei* is genetically diverse in agricultural land in northeast Thailand. PLoS Negl Trop Dis. 3(8): e496.

Epidemiology and genetic diversity of *Burkholderia pseudomallei* strains isolated from goats, deer, pigs and soil in Ratchaburi province by Pulsed Field Gel Electrophoresis

Jasda Julagiwansujarit^{*} Rattiya Naksuwan and Petcharat Sakdinun

Veterinary Research and Development Center (western region), PO. Box 18 Chombung, Ratchaburi 70150, Thailand

^{*}Corresponding author Tel. 0-3222-8419 Fax. 0-3222-8379 e-mail: jesda@dld.go.th

Abstract

A retrospective study was performed on case reports of 32 animals died from *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) infection from 2006 to 2012 in Ratchaburi province. The dead animals included goats (14), deer (11) and pigs (7), both male and female, age from 1 month and 10 days to 13 years old. The clinical signs found in goats and deer were emaciation, depression, inappetite, dyspnea, coughing and nasal discharge, whereas those found in pigs were diarrhea and subcutaneous abscess. Gross pathological examination revealed that abscesses, diameter 0.1-7.0 cm found in heart, lung, liver, spleen, kidney, lymph node, intestine, testis, udder and skin were the most prominent lesion. Moreover, many organs showed other lesions such as, necrotic foci, petechial hemorrhage, congestion, serous cyst and some organs with thickening of capsule membrane. *B. pseudomallei* could be isolated, single or multiple, from 47.06% (80/170) of the organs, obtained from pathological lesions or without lesions, mostly from lung and spleen (62.50%, 20/32) followed by kidney (46.88%, 15/32) and liver (34.38%, 11/32). In addition, *B. pseudomallei* could be frequently isolated from 75.81% (47/62) of abscess lesions from lung (86.67%, 13/15), spleen (80.00%, 16/20) and kidney (77.77%, 7/9). The organism was also isolated from other pathological lesions (34%, 13/38) as well as without lesion (28.57%, 20/70). The pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *B. pseudomallei* isolates from animals (32) and soil (14) revealed 10 PFGE patterns (P1-P10). There were 4 patterns from goat (P2, P3, P8, P9), 5 patterns (P1, P4, P7, P8, P10) from deer and 3 patterns (P5, P6, P7) from pig isolates. The P8 pattern was the highest prevalent in isolates from animals (48.8%, 15/32) followed by equal number of P7 and P5 (12.5%, 4/32), whereas only one pattern (P8) was found in 14 isolates from soil surrounding the goat pen which was similar to a pattern found in goats and deer. The results from this study showed that there was genetic diversity of *B. pseudomallei* isolates from animals. The similarity of the pattern from animals and soil provided the evidence of route of transmission. Thus, precaution and preventive measure should be implemented to prevent the spread of *B. pseudomallei* among animals, human and soil.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, pulsed field gel electrophoresis, goats, deer, pigs, soil