

การพัฒนา multiplex PCR สำหรับตรวจหาซีโรไทป์และความรุนแรงของเชื้อพาสเจอร์ลลา มัลโตซิคาที่แยกได้จากสุกร

พัชรี ทองคำคูณ* อภิสรา วรราช พรเพ็ญ พัฒนาโสภณ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

*ผู้รับผิดชอบ โทร.0 2579 8908- 14 ต่อ 405, email: thongkamkoon@msn.com

บทคัดย่อ

Pasteurella multocida (*P. multocida*) เป็นสาเหตุของโรคติดต่อที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจในสัตว์หลายชนิดทั่วโลก จำแนกเป็น 5 ซีโรไทป์ตามชนิดของแคปซูล โรคปอดบวมในสุกรมักเกิดจากซีโรไทป์ A ส่วนโรคโพรงจมูกอักเสบเกิดจากซีโรไทป์ A หรือ D ที่ผลิตที่อกซิน dermonecrotic การจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *P. multocida* จากสุกรพร้อมทั้งการตรวจหาที่อกซินจึงมีความสำคัญเพื่อให้การวินิจฉัยโรคมีความถูกต้อง คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อจำแนกซีโรไทป์ทั้ง 5 ชนิดของเชื้อ *P. multocida* และตรวจหายีน *ToxA* ที่ควบคุมการผลิตที่อกซิน dermonecrotic ที่ก่อโรคโพรงจมูกอักเสบในสุกรได้พร้อมกันในหลอดทดสอบเดียว โดยมีความจำเพาะต่อซีโรไทป์ของเชื้อ 100% และมีความไวในการตรวจเชื้อได้ตั้งแต่ 10^4 CFU/ml วิธีนี้มีความถูกต้องรวดเร็วทดแทนการตรวจชนิดแคปซูลโดยวิธีทางซีรัมวิทยาได้ ผลการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *P. multocida* ที่แยกได้จากตัวอย่างสุกรระหว่างปี 2549-2554 จำนวน 154 สายพันธุ์ แบ่งเป็นซีโรไทป์ A จำนวน 119 สายพันธุ์, B1 สายพันธุ์, D 33 สายพันธุ์ และ A ที่สร้างที่อกซิน 1 สายพันธุ์ ส่วนยาด้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อ *P. multocida* ในสุกรจากการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ได้แก่ tilmicosin ตามด้วย enrofloxacin, doxycycline และ penicillin G ยาที่มีผลในการรักษาต่ำที่สุดในกลุ่มที่ทำการทดสอบได้แก่ tetracycline เพราะมีการดื้อยามากกว่า 50% ของเชื้อที่ทำการทดสอบ

คำสำคัญ: ซีโรไทป์ พาสเจอร์ลลา มัลโตซิคา โรคโพรงจมูกอักเสบ สุกร

บทนำ

Pasteurella multocida เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคติดต่อและสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจต่อปศุสัตว์หลายชนิดทั่วโลก อาทิ เช่น โรคคอบวม (haemorrhagic septicemia) ในโคและกระบือ โรคปอดบวม (pneumonic pasteurellosis) ในสุกร โค กระบือ แพะ แกะ โรคคอหอยคัสต์วีปิก (fowl cholera) ในเป็ด ไก่และนกต่างๆ รวมทั้งโรคโพรงจมูกอักเสบ (progressive atrophic rhinitis) ในสุกร (Adlam and Rutters, 1989; Dabo et al., 2007; Ross, 2007) การก่อโรคในสัตว์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะตามชนิดของเชื้อที่แตกต่างกัน ในปัจจุบันพบว่าเชื้อ *P. multocida* จำแนกได้เป็น 5 ซีโรไทป์ตามความแตกต่างของแคปซูล คือ A, B, D, E และ F ส่วนใหญ่จะพบเชื้อได้ตามปกติในทางเดินหายใจส่วนต้นของปศุสัตว์ที่มีสุขภาพแข็งแรง แต่จะสามารถก่อโรคได้ทั้งแบบปฐมภูมิและทุติยภูมิเมื่อสัตว์อ่อนแอ อยู่ในสภาวะเครียดหรือสภาพอากาศเปลี่ยนแปลง

แบคทีเรียหรือไวรัสบางชนิด เช่น *Mycoplasma hyopneumoniae*, classical swine fever หรือ porcine reproductive and respiratory syndrome เป็นเชื้อปฐมภูมิที่เหนี่ยวนำให้สุกรเป็นโรคปอดบวมแทรกซ้อนจากเชื้อ *P. multocida* ซึ่งสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อสายพันธุ์ที่มีแคปซูลชนิด A สุกรที่ติดเชื้อจะมีการหายใจลำบากเนื่องจากมีเสมหะเต็มช่องทางเดินหายใจ และหายใจกระแทก (Ross, 2007) ส่วนโรคโพรงจมูกอักเสบเกิดจากสายพันธุ์ที่มีแคปซูลชนิด A หรือ D ที่มียีน *tox A* ทำหน้าที่ผลิตท็อกซินชนิด dermonecrotic (DNT) มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์หลายชนิด รวมทั้งเซลล์ที่สร้างกระดูก (Hildebrand et al., 2011) สุกรที่ติดเชื้อจะมีการจาม น้ำมูกไหล มีคราบน้ำตาสีดำบริเวณ medial canthus ของตาและมีการพัฒนาภูมิคุ้มกันทำให้ภูมิคุ้มกันและผิดปกติ สุกรมักแสดงอาการเรื้อรัง กินอาหารไม่สะดวกและเติบโตช้า (Adlam and Rutters, 1989) การจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *P. multocida* จึงมีความสำคัญเพื่อให้การวินิจฉัยโรคที่เกิดจากซีโรไทป์หรือสายพันธุ์ต่างๆ มีความถูกต้อง ส่งผลให้มีการจำแนกระบาดวิทยาของโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แม่นยำ เพื่อให้การควบคุมและรักษาโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการที่สามารถจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *P. multocida* มีไม่มาก เนื่องจากต้องใช้วิธีการทางซีรัมวิทยา ได้แก่ indirect haemagglutination (IHA) และ agar gel precipitation (AGP) ต้องใช้ antiserum ที่จำเพาะต่อแคปซูลแต่ละชนิดที่ผลิตโดยการฉีดเชื้ออ้างอิงมาตรฐานเข้าสัตว์ทดลอง ซึ่งมีความยุ่งยากและไม่เหมาะสมกับสถานการณ์ปัจจุบัน รวมทั้งห้องปฏิบัติการยังไม่มีวิธีการเหมาะสมสำหรับตรวจหาหรือทดสอบเชื้อที่ผลิต dermonecrotic toxin อีกด้วย อย่างไรก็ตามได้มีผู้พัฒนาเทคนิค PCR และ multiplex PCR ในการตรวจหาซีโรไทป์จำเพาะต่อการสร้างแคปซูลและยีน *tox A* ขึ้น (Nagai et al., 1994; Amigot et al., 1998; Townsend et al., 2001; Davies et al., 2003) งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค multiplex PCR สำหรับตรวจหาซีโรไทป์และความรุนแรงของเชื้อจาก *tox A* ได้พร้อมกันในหลอดเดียว เพื่อให้สามารถวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. multocida* ในสุกรได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว และประหยัด พร้อมทั้งทำการทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลในการพิจารณาใช้ยาต้านจุลชีพรักษาโรคในสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *P. multocida* ซีโรไทป์ A, B, D, E, F และสายพันธุ์ที่สร้างที่อกซิน dermonecrotic (DNT) ได้รับความอนุเคราะห์จาก National Institute of Animal Health ประเทศญี่ปุ่นเชื้อสายพันธุ์ท้องถิ่นที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างสุกร ระหว่างปี 2549-2554 จำนวน 154 สายพันธุ์และเชื้ออ้างอิงมาตรฐานต่างๆ ได้แก่ *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 8 strain 405, *Campylobacter jejunii*, ATCC 33560, *Clostridium septicum* ATCC 12464, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 33864 ใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะของวิธี multiplex PCR

การทดสอบวิธี multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR)

ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจมี 7 คู่ ประกอบด้วย ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. multocida* ชนิดของแคปซูลหรือซีโรไทป์ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ A B D E F และ ยีน *tox A* ที่สร้างที่อกซิน DNT แสดงไว้ใน Table 1 วิธีการทำ multiplex PCR ดัดแปลงจากวิธีของ Townsend et al.(2001) และ Davies et al. (2003) เริ่มจากสกัด DNA จากเชื้อ *P. multocida* ทั้งหมดโดยเพาะเชื้อบน blood agar จากนั้นละลายเชื้อ 1-2 โคโลนีในน้ำกลั่น 1 ml ล้างตะกอนเชื้อ 1 ครั้งด้วยน้ำกลั่น โดยปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบ 5 นาที แล้วใส่น้ำกลั่น 100 μ l ต้มให้เดือด 10 นาที ทำให้เย็นลง หลังจากนั้นปั่นด้วยความเร็วเดิม เพื่อเก็บส่วนใสใช้เป็น DNA template

ทำ multiplex PCR โดยใช้ multiplex master mix (Qiagen, Germany) 12.5 μ l เติม 0.2 μ M ของไพรเมอร์แต่ละตัว ให้ครบทั้ง 7 คู่ จากนั้นใส่ DNA 2.5 μ l และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 25 μ l โดยมี DNA เชื้ออ้างอิงมาตรฐานและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Bio-Rad, USA) โดยใช้โปรแกรม preheating 95 °C นาน 15 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation 94 °C นาน 1 นาที annealing 60 °C นาน 1.30 นาที และ extension 72 °C นาน 2 นาที แล้วทำ final extension 72 นาน 10 นาที นำ PCR product ที่ได้ไปแยกแถบ DNA ใน 2% agarose gel ด้วยเครื่อง electrophoresis (Cosmo BioCo.Ltd., Korea) ซึ่งมี 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Germany) เป็นแถบ DNA มาตรฐาน ย้อมด้วย 1.5% ethidium bromide ดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง GelDoc.It (UVP, USA.)

การทดสอบความจำเพาะของวิธี multiplex PCR

นำ DNA ของเชื้อ *P. multocida* อ้างอิงมาตรฐานซีโรไทป์ A, B, D, E, F สายพันธุ์ที่สร้าง DNT และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ข้างต้น มาทำ multiplex PCR เพื่อหาความจำเพาะของวิธี

การทดสอบความไวของวิธี multiplex PCR

เชื้อ *P. multocida* อ้างอิงมาตรฐานทั้งหมด มาเพาะใน tryptic soy broth บ่มที่ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนเชื้อและปรับให้มีความเข้มข้น 10^7 CFU/ml หลังจากนั้นทำ ten-fold dilution เพื่อเจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^1 - 10^7 CFU/ml สกัด DNA จากเชื้อทุกระดับความเข้มข้นดังกล่าวนำมาทำ multiplex PCR ตามวิธีข้างต้น เพื่อหาปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ multiplex PCR สามารถตรวจได้

Table 1 Oligonucleotide primers and sizes of PCR products in this study

Primer	Sequence	Size (bp)
KMT1T7	ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG	460
KMT1SP6	GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC	
CAPA -F	TGC CAA AAT CGC AGT CAG	1,044
CAPA-R	TTG CCA TCA TTG TCA GTC	
CAPB -F	CAT TTA TCC AAG CTC CAC C	760
CAPB -R	GCC CGA GAG TTT CAA TCC	
CAPD -F	TTA CAA AAG AAA GAC TAG GAG CCC	657
CAPD -R	CAT CTA CCC ACT CAA CCA TAT CAG	
CAPE -F	TCC GCA GAA AAT TAT TGA CTC	511
CAPE -R	GCT TGC TGC TTG ATT TTG TC	
CAPF -F	AAT CGG AGA ACG CAG AAA TCA G	851
CAPF-R	TTC CGC CGT CAA TTA CTC TG	
toxA -F	CGT GAA CTG CGT ACT CAA	1854
toxA-R	AAG AGG AGG CAT GAA GAG	

การจำแนกชนิดโรไทป์ของเชื้อ *P. multocida* เปรียบเทียบระหว่าง multiplex PCR และวิธีทางซีรัมวิทยา

นำเชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้จากสุกรทั้ง 154 สายพันธุ์ตรวจหาชนิดแคปซูล A, B, D, E และ F ของเชื้อโดยวิธี IHA (Sawada et al., 1982) และชนิดของ lipopolysaccharide หรือโสมาคิก 1-16 โดยวิธี AGP (Heddleston et al., 1972) และทำ multiplex PCR เปรียบเทียบผลกับวิธีทางซีรัมวิทยา

การทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี minimal inhibitory concentration (MIC)

ทำการทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพ 5 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. multocida* จำนวน 154 สายพันธุ์ โดยวิธี broth microdilution method (CLSI, 2013a) ยาที่ทดสอบ ได้แก่ doxycycline enrofloxacin penicillin G tetracycline และ tilmicosin วิธีการโดยย่อคือ เตรียมสารละลายตั้งต้นของยาทั้ง 5 ชนิดใน cations adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) และทำ two-fold serial dilution ให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ แจกลงใน microtiter plate หลุม 1-10 เรียงความเข้มข้นจากน้อยไปมาก (0.125-64 µg/ml) หลุมละ 50 µl แล้วเติมเชื้อที่ทดสอบซึ่งปรับให้มีความเข้มข้น 10^6 CFU/ml หลุมละ 50 µl สายพันธุ์ละ 2 แถว ปิดฝาให้สนิท บ่มที่ 35 °C นาน 18-24 ชั่วโมง จึงอ่านผลโดยหลุมที่มีความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ได้จะถูกบันทึกเป็นค่า MIC ของยาต่อเชื้อสายพันธุ์นั้น

ผล

ความจำเพาะและความไวของวิธี multiplex PCR

ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี multiplex PCR พบว่า DNA ของเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *P. multocida* ซีโรไทป์ A, B, D, E และ F รวมทั้งเชื้อ *P. multocida* ที่ผลิต DNT ให้ผลบวกทั้งหมด โดยเชื้อทุกซีโรไทป์จะเกิดแถบ PCR product กับไพรเมอร์ KMT1T7 กับ KMT1SP6 ที่ขนาด 460 bp เนื่องจากไพรเมอร์เป็นชนิด species-specific ส่วนไพรเมอร์คู่อื่นจะเกิดแถบ PCR product ที่จำเพาะต่อซีโรไทป์นั้นๆ เท่านั้น โดยแถบ PCR product ของซีโรไทป์ A, B, D, E และ F มีขนาด 1044, 760, 657, 511 และ 851 bp ตามลำดับ ส่วนเชื้อ toxigenic *P. multocida* จะพบแถบ PCR product ของ *toxA* ขนาด 1854 bp เพิ่มอีกแถบหนึ่งด้วย ส่วน DNA ของเชื้ออื่นๆ ที่ไม่ใช่เชื้อ *P. multocida* รวม 7 สเตรน ให้ผลลบทั้งหมด (Fig 1)

การทดสอบความไวของวิธี multiplex PCR พบว่า DNA ของเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *P. multocida* ทุกสายพันธุ์ ให้แถบของ PCR product ที่จำนวนเชื้อตั้งแต่ 10^4 CFU/ml

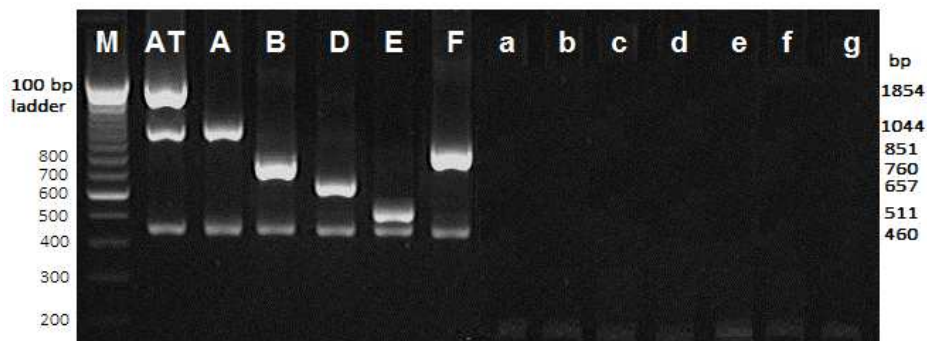


Fig 1 Multiplex PCR specific to capsular types and *toxA* gene of *P. multocida*. Lane M, 100 bp DNA ladder; lane AT, toxigenic *P. multocida* serotype A; lane A, B, D, E, F, *P. multocida* reference strains serotype A, B, D, E and F, respectively; lane a, *Actinobacillus pleuropneumoniae*; lane b, *Campylobacter jejuni*; lane c, *Clostridium septicum*; lane d, *Enterococcus faecalis*; lane e, *E. coli*; lane f, *Salmonella* Typhimurium; lane g, *Staphylococcus aureus*.

การจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *P. multocida* ทางซีรัมวิทยาเทียบกับ multiplex PCR

ผลการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ *P. multocida* ที่แยกได้จากตัวอย่างสุกรจำนวน 154 สายพันธุ์ ให้ผลตรงกัน 148 สายพันธุ์ แบ่งเป็นซีโรไทป์ A จำนวน 118 สายพันธุ์ ซีโรไทป์ B จำนวน 1 สายพันธุ์ และซีโรไทป์ D จำนวน 29 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้มี 1 สายพันธุ์ที่เป็นซีโรไทป์ A ที่พบ *toxA* ยีน โดยวิธี multiplex PCR

อย่างไรก็ตามมีเชื้อจำนวน 6 สายพันธุ์ที่ให้ผลระหว่างสองวิธีไม่ตรงกันดังนี้ เชื้อ 2 สายพันธุ์ไม่ทำปฏิกิริยากับการทดสอบทางซีรัมวิทยา แต่ตรวจหา ยีน ที่ควบคุมการสร้างแคปซูลได้เป็นซีโรไทป์ A นอกจากนี้มีเชื้อจำนวน 3 สายพันธุ์และอีก 1 สายพันธุ์ให้ผลทางซีรัมวิทยาเป็นซีโรไทป์ A และ B ตามลำดับ ในขณะที่ทั้ง 4 สายพันธุ์ให้ผลเป็นซีโรไทป์ D โดยวิธี multiplex PCR

ความไวของเชื้อ *P. multocida* จำนวน 154 สายพันธุ์ต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี MIC

การศึกษาความไวของเชื้อ *P. Multocida* ที่แยกได้จากสุกร ตั้งแต่ปี 2549-2554 จำนวน 154 สายพันธุ์ ต่อยาต้านจุลชีพ 5 ชนิด โดยวิธี broth microdilution method พบว่า MIC range MIC₅₀ และ MIC₉₀ ของยา doxycycline มีค่า <0.125 - ≥64, 1 และ 2 µg/ml ตามลำดับ; ยา enrofloxacin มีค่า <0.125 - 8, <0.125 และ <0.125 µg/ml ตามลำดับ; ยา penicillin G มีค่า <0.125 - ≥64, <0.125 และ ≥64 µg/ml ตามลำดับ; ยา tetracycline มีค่า 0.25 - 32, 4 และ 16 µg/ml ตามลำดับ และยา tilmicosin มีค่า <0.125 - 8, 2 และ 4 µg/ml ตามลำดับ (Table2)

Table2 The MIC values and break point of antimicrobials against *P. multocida* 154 strains during 2006-2011

Antimicrobial	MIC range(µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	break point (µg/ml)*
Doxycycline	<0.125 - ≥64	1	2	ND
Enrofloxacin	<0.125 - 8	<0.125	<0.125	≥1
Penicilin G	<0.125 - ≥64	<0.125	≥64	ND
Tetracycline	0.25 - 32	4	16	≥2
Tilmicosin	<0.125 - 8	2	4	≥32

*Data obtained from CLSI (2013b) ND = not determined

วิจารณ์

Multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ ผู้วิจัยเพิ่มเติมและดัดแปลงจากการศึกษาของ Townsend et al. (2001) ที่ได้ทำการทดสอบแล้วว่า วิธี PCR มีความจำเพาะและถูกต้องในการจำแนกชนิดของแคปซูลของเชื้อ *P. multocida* จากการนำเชื้อที่ผลการตรวจชนิดของแคปซูลของวิธี PCR ไม่สอดคล้องกับผลทางซีรัมวิทยาไปหาลำดับเบสตรงบริเวณของยีนที่ผลิตแคปซูล (*cap* locus) พบว่าผลที่ถูกต้องนั้นเป็นไปตามวิธี PCR ส่วนการศึกษานี้พบการตรวจเชื้อ *P. multocida* ที่ให้ผลระหว่างสองวิธีไม่สอดคล้องเช่นกัน จำนวน 6 สายพันธุ์ จึงเชื่อมั่นได้ว่าผลของ multiplex PCR เป็นผลที่ถูกต้อง โดยที่เชื้อ 2 สายพันธุ์ที่ไม่ตอบสนองกับการตรวจด้วยวิธี IHA และ AGP น่าจะเกิดจากการสูญเสียแคปซูลทางกายภาพ แต่ยีนที่ควบคุมการสร้างแคปซูลนั้นยังคงปกติ ทำให้สามารถตรวจพบเป็นซีโรไทป์ A โดย multiplex PCR ทั้งนี้คุณสมบัติทางกายภาพจะกลับคืนมาเมื่อมีการฉีดเชื้อกลับเข้าหนูไมซ์ (Watt et al., 2003) ส่วนเชื้ออีก 4 สายพันธุ์น่าจะเป็นเพราะความคลาดเคลื่อนของวิธีซีรัมวิทยาซึ่งมีโอกาสเกิดขึ้นได้ (Townsend et al., 2001) การเพิ่มไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *toxA* ในปฏิกิริยาของ multiplex PCR เป็นประโยชน์ถึงสามประการ คือสามารถยืนยันผลได้ทั้งระดับ specie-specific ของ *P. multocida* ชนิดของแคปซูล และการตรวจหาที่อกขึ้นไปพร้อมกัน ทำให้ในการพิสูจน์เชื้อสามารถเลือกโคโลนีที่มีลักษณะทางกายภาพคล้าย *P. multocida* มาทำ multiplex PCR ทันทีโดยลดขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีได้ (Townsend et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อ *P. multocida* ที่แยกได้จากสุกรเป็นชนิด untypeable อีกด้วย (Davies et al., 2003; Tang et al., 2009) ดังนั้นการทดสอบที่ให้ผลยืนยันที่เชื่อถือได้ในทุกระดับพร้อมกันในหนึ่งปฏิกิริยานับเป็นข้อดี ที่จะทำให้การวิเคราะห์ผลของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ครอบคลุมในครั้งเดียว ส่งผลให้มีความผิดพลาดในการตรวจและตอบผลน้อยที่สุด

เชื้อ *P. multocida* สายพันธุ์ท้องถิ่นที่ศึกษาครั้งนี้แยกได้จากสุกรระหว่างปี พ.ศ. 2549-2554 จำแนกเป็น ซีโรไทป์ A จำนวน 119 สายพันธุ์ (72.27%), B จำนวน 1 สายพันธุ์ (0.65%), D จำนวน 33 สายพันธุ์ (21.43%) และ A ที่สร้าง DNT เพียง 1 สายพันธุ์ (0.65%) แตกต่างจาก Pathanasophon et al. (2001) ที่รายงานว่าเชื้อ *P. multocida* ที่แยกได้จากสุกรระหว่างปี 2532-2541 จำนวน 87 สายพันธุ์จำแนกเป็นซีโรไทป์ A,D และ non-capsulated 50 (57.5%), 36 (41.4%) และ 1 (1.1%) สายพันธุ์ ตามลำดับ ในจำนวนนี้เป็นสายพันธุ์ A/DNT และ D/DNT จำนวน 2 และ 3 สายพันธุ์ ตามลำดับ หรือคิดเป็น 5.7% แสดงให้เห็นว่าในปัจจุบันการพบซีโรไทป์ A มีสัดส่วนที่สูงขึ้น ในขณะที่ซีโรไทป์ D และสายพันธุ์ที่สร้าง DNT มีสัดส่วนที่ลดลงและลดลงค่อนข้างมากตามลำดับ การพบ toxigenic *P. multocida* ลดลง น่าจะเป็นเพราะฟาร์มสุกรมีความเข้มงวดในการคัดเลือกสุกรพ่อแม่พันธุ์ให้ปราศจากโรคโพรงจมูกอักเสบมากขึ้น รายงานซีโรไทป์ของเชื้อจากสุกรในประเทศอังกฤษช่วงปี 1989-2000 พบเป็นซีโรไทป์ A 71.52%, D 15.19%, F 1.26%, untype 1.26%, A/DNT 3.18% และ D/DNT 7.59% (Davies et al., 2003) ซึ่งมีอัตราการพบซีโรไทป์ A และ D ใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ แต่มีการพบ toxigenic *P. multocida* สูงกว่าในประเทศไทย ส่วนซีโรไทป์ F และ B มีโอกาสพบน้อยในสุกรเพราะเป็นชนิดที่มักพบในสัตว์ปีกและโค-กระบือตามลำดับ อย่างไรก็ตามซีโรไทป์ F ที่พบในสัตว์ปีกของไทยก็มีสัดส่วนต่ำเช่นกัน (ข้อมูลส่วนตัว) ส่วนการพบซีโรไทป์ B ในสุกรของไทยนั้นอาจเป็นเพราะยังคงพบการระบาดของโรคเฮโมราจิกเซพติกซีเมียในโคและกระบือ ซึ่งเกิดจากซีโรไทป์ B:2 ในประเทศไทยสม่ำเสมอทุกปี ในขณะที่พบว่าเชื้อที่ก่อโรคในโคที่ประเทศอังกฤษจะเป็นซีโรไทป์ A เป็นส่วนใหญ่ (Davies et al., 2004)

ยาด้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อ *P. multocida* ในสุกรจากการศึกษาค่า MIC และเปรียบเทียบกับค่า breakpoint (CLSI, 2013b) พบว่า tilmicosin มีประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากยังไม่พบเชื้อที่ดื้อยานี้ ยาที่มีผลในการรักษาได้ถึงปานกลาง ได้แก่ enrofloxacin และ doxycycline เนื่องจากพบเชื้อบางสายพันธุ์มีการดื้อยาเหล่านี้ ตามมาด้วย penicillin G ที่พบว่าประมาณ 10% ของเชื้อที่ทำการทดสอบมีการดื้อยา ส่วนยาที่มีผลในการรักษาต่ำที่สุดในกลุ่มที่ทำการทดสอบได้แก่ tetracycline ซึ่งพบว่าเชื้อที่ทำการทดสอบมีการดื้อยามากกว่า 50% ต่างจากการศึกษาในสเปนในปี 2003-2004 ที่ไม่พบเชื้อที่ดื้อต่อยา enrofloxacin และพบมีการดื้อยา tetracycline น้อยกว่า 10% แต่พบการดื้อยา tylosin และ tiamulin ค่อนข้างมาก (Lizarazo et al., 2006) ส่วนในประเทศอินเดียไม่พบการดื้อยา chlortetracycline, doxycycline และ enrofloxacin แต่ดื้อยา penicillin G ทุกสายพันธุ์ (Rajkhwa et al., 2012) ขณะที่เชื้อในประเทศจีนระหว่างปี 2003-2007 พบมีการดื้อยา tetracycline และ tilmicosin สูงถึง 94% และ 28% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังดื้อยา amoxicillin ประมาณ 80% อีกด้วย (Tang et al., 2009) การดื้อยาที่แตกต่างกันในแต่ละประเทศน่าจะเกิดจากมีกลุ่มหรือชนิดของยาที่ใช้แต่ละประเทศแตกต่างกัน ทำให้มีหลักเกณฑ์และอัตราการใช้ยาที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการพบเชื้อดื้อยาบางชนิดในอัตราที่สูงเป็นการสะท้อนให้เห็นถึงแนวโน้มประสิทธิภาพของยาด้านจุลชีพในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่ลดลง ซึ่งอาจก่อปัญหาต่อสัตวแพทย์และการทำฟาร์มปศุสัตว์ในอนาคตได้ ดังนั้นสัตวแพทย์และเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ควรตระหนักถึงการเลือกใช้อย่างเหมาะสมตามความจำเป็นและสมเหตุสมผล

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ น.สพ.วัชรชัย ณรงค์ศักดิ์ ให้ความช่วยเหลือด้านข้อมูลการศึกษาประสิทธิภาพยาต้านจุลชีพต่อเชื้อ ขอขอบคุณ คุณนัยนา หัสสรังสี คุณชยภัค สีบุญ คุณอุบลรัตน์ แทนกลาง ซึ่งทำหน้าที่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เพิ่มจำนวนเชื้อ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคต่างๆ รวมทั้งเจ้าหน้าที่กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการทำวิจัยจนประสบความสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Adlam, C. and Rutters, J.M. 1989. *Pasteurella* and *Pasteurellosis*. Acedemic Press Limited. London, UK. 341 p.
- Amigot, J.A., Torremorell, M. and Pijoan, C. 1998. Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* strains from pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 10: 169-173.
- CLSI. 2013a. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Second information supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute. VET01-A4, Vol. 33 No.7, PA, USA. 73 p.
- CLSI. 2013b. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard-Fourth edition. Clinical and Laboratory Standard Institute. VET01-S2, Vol. 33 No.8, PA, USA. 63 p.
- Dabo, S.M., Taylor, J.D. and Confer, A.W. 2007. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. Animal Health Res. Rev. 8: 129-150.
- Davies, R.L., MacCorquodale, R., Baillie, S. and Caffrey, B. 2003. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atropic rhinitis. J. Med. Microbiol. 52: 59-67.
- Davies, R.L., MacCorquodale, R. and Reilly, S. 2004. Characterization of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. Vet. Microbiol. 99: 145-158.
- Heddeleston, K.L., Gallagher, J.E. and Robers, P.A. 1972. Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis. 16: 925-936.
- Hildebrand, D., Heeg, K. and Kutbatsky, K.F. 2011. *Pasteurella multocida* toxin-stimulated osteoclast differentiation is B cell dependent. Infect. Immun. 79: 220-228.
- Lizarozo, Y.A., Ferri, E.F., de la Fuente, A.J. and Martin, C.B. 2006. Evaluation of changes in antimicrobial susceptibility pattern of *Pasteurella multocida* subsp *multocida* isolates from pig in Spain 1987-1998 and 2003-2004. Am. J. Vet. Res. 67(4): 663-668.

- Nagai, S., Someno, S. and Yagihashi, T. 1994. Differentiation of toxigenic and nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. J. Clin. Microbiol. 32(4): 385-393.
- Pathanasophon, P., Worarach, A and Mulika, L. 2001. Serotypes of *Pasteurella multocida* isolates from swine and demonecrotic toxin gene detection by PCR. J. Thai Vet. Med. Assoc. 52(3): 33-41.
- Rajkhowa, S., Shakuntala, I., Pegu, S.R., Das, R.K. and Das, A. 2012. Detection of *Pasteurella multocida* isolates from local pigs of India by polymerase chain reaction and their antibiogram. Trop. Anim. Health Prod. 44(7): 1497-1503.
- Ross, R.F. 2007. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. Anim. Health Res. Rev. 7: 13-29.
- Sawada, T., Rimler, R.B. and Rhoades, K.R. 1982. Indirect haemagglutination tests that use glutaraldehyde fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of *Pasteurella* antibody. J. Clin. Microbiol. 15: 752-756.
- Tang, X., Zhao, Z., Hu, J., Wu, B., Cai, X., He, Q. and Chen, H. 2009. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. J. Clin. Microbiol. 47(4): 951-958.
- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A.J. and Adler, B. 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. J. Clin. Microbiol. 39: 924-929.
- Watt, J.M., Swiatlo, E., Wade, M.M. and Champlin, F.R. 2003. Regulation of capsule biosynthesis in serotype A strains of *Pasteurella multocida*. FEMS Microbiol. Lett. 225(1): 9-14.

Development of multiplex PCR for detection of serotype and virulence of *Pasteurella multocida* strains isolated from pig

Pacharee Thongkamkoon* Apasara Worarach

Pornpen Pathanasophon

National Institute of Animal Health, KasetKlang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900.

*Corresponding author: Tel. 02579809 ext. 405, email: thongkamkoon@msn.com

Abstract

Pasteurella multocida (*P. multocida*) causes many infectious diseases in various animals and is responsible for economic losses worldwide. *P. multocida* strains are classified into 5 capsular types. Bronchopneumonia in pigs is mostly caused by *P. multocida* serotype A, whereas progressive atrophic rhinitis is caused by serotype A and D strains containing dermonecrotic toxin. Therefore, capsular typing as well as toxin detection of the *P. multocida* strain is essential for the accurate diagnosis. We could develop the multiplex PCR for detection of 5 capsular types of *P. multocida* as well as *tox A* gene which encodes dermonecrotic toxin production of *P. multocida* within one reaction. The technique had 100% specificity and the sensitivity of the technique was 10^4 CFU/ml of the bacteria. Therefore this technique, which is an easy and accurate tool for capsule typing of *P. multocida*, can replace a conventional serology test. By this technique, a total of 154 *P. multocida* isolates from pigs during 2006-2011 was identified as serotype A, 119 isolates; B, 1 isolate; D, 33 isolates and toxin-producing A, 1 isolate. Antimicrobial susceptibility of *P. multocida* by determination of minimal inhibitory concentration (MIC) revealed that tilmicosin was the most effective drug followed by enrofloxacin, doxycycline and penicillin G. Whereas tetracycline had the lowest activity among the test drugs because more than 50% of the tested strains were resistant to tetracycline.

Keywords: dermonecrotic toxin, multiplex PCR, *Pasteurella multocida*, pig, serotype