คุณลักษณะการดื้อต่อยาต้านจุลชีพทางยีนและการแสดงออกของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในไก่ของเชื้อ AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM ที่แยกได้ในประเทศไทย

นางสาวทิพยาพร โนนคู่เขตโขง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

CHARACTERIZAATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES AND EXPRESSION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN CHICKENS OF AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM ISOLATED IN THAILAND

Miss Tippayaporn Nonkookhetkhong

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine
Department of Veterinary Medicine
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	คุณลักษณะการดื้อต่อยาต้านจุลชีพทางยีนและการแสดงออกของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในไก่ของเชื้อ AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM ที่แยกได้ในประเทศไทย
โดย	นางสาวทิพยาพร โนนคู่เขตโขง
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มงคล เตชะกำพุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สมศักดิ์ ภัคภิญโญ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง อินทิรา กระหม่อมทอง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ทิพยาพร โนนคู่เขตโขง : คุณลักษณะการดื้อต่อยาต้านจุลชีพทางยีนและการแสดงออกของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในไก่ของเชื้อ AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM ที่แยกได้ในประเทศไทย. (CHARACTERIZAATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES AND EXPRESSION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN CHICKENS OF AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM ISOLATED IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. น.สพ. ดร. นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. น.สพ. ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์, 37 หน้า.

Avibacterium paragallinarum เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคหวัดหน้าบวม หรือ infectious coryza (IC) ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันในไก่ วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อตรวจหาความไวรับต่อยาต้านจุลชีพและยีนดื้อยาของเชื้อ A. paragallinarum และการแสดงออกของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในไก่ เชื้อ A. paragallinarum 18 isolate ที่แยกได้ในประเทศไทยได้ถูกนำมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration ; MIC) โดยทดสอบกับยาต้านจุลชีพจำนวน 14 ชนิด เชื้อส่วนมากดื้อต่อยา oxytetracycline doxycycline streptomycin ciprofloxacin erythromycin และ sulfamethoxazole-trimethoprim เชื้อ 12 isolate (ร้อยละ 66.7) ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายตัว ยีนดื้อยาที่พบคือ tet(A) tet(B) tet(M) erm(A) erm(B) blaROB-1 และ sul2 และพบยีน tet(A) tet(B) tet(M) มากที่สุด (ร้อยละ 66.7) ไก่ที่ได้รับเชื้อที่ไวรับและไม่มียีนดื้อต่อยา amoxicillin และ doxycycline เมื่อรักษาด้วย amoxicillin และ doxycycline สามารถลดอาการทางคลินิกได้ แสดงว่าการแสดงออกของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในตัวไก่สัมพันธ์กับความไวรับของยาปฏิชีวนะและยีนดื้อยาที่ปรากฏ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาควิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตวแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5275581231 : MAJOR VETERINARY MEDICINE
KEYWORDS: ANTIMICROBIAL RESISTANCE / AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM / RESISTANCE GENES

TIPPAYAPORN NONKOOKHETKHONG: CHARACTERIZAATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES AND EXPRESSION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN CHICKENS OF AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM ISOLATED IN THAILAND. ADVISOR: ASSOC. PROF. NIWAT CHANSIRIPORNCHAI, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. JIROJ SASIPREEYAJAN, Ph.D., 37 pp.

Avibacterium paragallinarum is a causative agent of avian infectious coryza (IC) that is an acute upper respiratory disease in chickens. The aims of this study were to characterise the antimicrobial susceptibility and resistance genes of A. paragallinarum and the expression of antimicrobial resistance characters in chickens. Eighteen isolates of A. paragallinarum in Thailand were tested antimicrobial susceptibility by the minimal inhibitory concentration (MIC) method with 14 antimicrobial drugs. There was a high prevalence of resistance to oxytetracycline, doxycycline, streptomycin, ciprofloxacin, erythromycin and sulfamethoxazole-trimethoprim. Twelve isolates (66.7%) were multiple antimicrobial drugs resistance. The resistance genes, tet(A), tet(B), tet(M), erm(A), erm(B), blaROB-1 and sul2 were found and the highest number of resistance genes were tet(A), tet(B) and tet(M) (66.7%). The chickens were challenged with A. paragallinarum isolates which sensitive to amoxicillin and doxycycline and no resistance genes of penicillin and tetracycline and then treated with amoxicillin and doxycycline, the clinical signs in all groups were reduced. So the antimicrobial susceptibility and resistance genes were relate with the expression of antimicrobial resistance in chickens.

Chulalongkorn University

Department:	Veterinary Medicine	Student's Signature .....
Field of Study:	Veterinary Medicine	Advisor's Signature .....
Academic Year:	2013	Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ

รศ.น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ.น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ

มาโดยตลอด และขอขอบคุณ รศ.อัจฉรา ธวัชสิน รศ.น.สพ.ดร.สมศักดิ์ ภัคภิญโญ และ

รศ.สพ.ญ.อินทิรา กระหม่อมทอง สำหรับคำแนะนำต่องานวิจัย

ขอขอบคุณรุ่นพี่นิสิตปริญญาเอก และนักวิทยาศาสตร์ที่ภาควิชาอายุรศาสตร์ ที่ให้ความรู้เทคนิค และคำแนะนำในการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ ครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจ ในการเรียนและทำงานวิจัยอยู่เสมอ ทำให้งานวิจัยสำเร็จได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
รายการอ้างอิง 33
ส่วนประกอบ 39
Biosate Peptone (BBL, USA) 39
Supplement 39
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 41

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1

บทนำ

Avibacterium paragallinarum เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ รูปแท่งสั้น ขนาดของเซลล์กว้าง 0.4-0.8 ไมครอน ยาว 1-3 ไมครอน เจริญได้ดีในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และต้องการ V-factor (nicotinamide adenine dinucleotide) ในการเจริญเติบโต อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้ออยู่ระหว่าง 34-42 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37-38 องศาเซลเซียส (Blackall and Soriano, 2008) โดยเชื้อ *A. paragallinarum* ก่อให้เกิดโรคหวัดหน้าบวม (infectious coryza) ซึ่งเป็นโรคของระบบทางเดินหายใจส่วนต้นในไก่ ไก่อายุมากมีความไวต่อโรคมากกว่าไก่อายุน้อย โรคนี้พบทั่วโลกและก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเนื่องจากการคัดทิ้งไก่ป่วย ในไก่ไข่พบอัตราการไข่ลดลงร้อยละ 10-40 อาการของโรคที่พบคือ มีน้ำมูก น้ำตาไหล หน้าบวม และเยื่อตาอักเสบ (Blackall, 1999) และพบว่าไก่ที่ฟื้นตัวจากการเป็นโรค มักเป็นพาหะของโรค เป็นระยะเวลามากกว่า 4 เดือน แต่ในบางฝูงอาจยาวนานถึง 2 ปี (เกรียงศักดิ์, 2536)

ในประเทศโมร็อคโคพบการระบาดของโรคในฟาร์มไก่ไข่จำนวน 10 ฟาร์ม พบว่าทำให้ผลผลิตลดลงร้อยละ 17-41 และมีการตายร้อยละ 0.7-1.0 (Mouahid et al., 1992) และในประเทศจีนพบการระบาดของโรคซึ่งทำให้เกิดการป่วยร้อยละ 20-50 และพบการตายร้อยละ 5-20 (Chen et al., 1993) ส่วนในประเทศไทยในปี 2549 พบรายงานการระบาดของโรคหวัดหน้าบวมจากเชื้อ *A. paragallinarum* ทั้ง 3 ซีโรวาร์ และมีการระบาดในฟาร์มไก่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการให้วัคซีนตามโปรแกรม และพบการดื้อยาในเชื้อที่แยกจากไก่ป่วย เช่น amoxicillin erythromycin sulfamethoxazole–trimethoprim และ doxycycline เป็นต้น (กฤดาและนิวัตร, 2550) *A. paragallinarum* เป็นเชื้อที่พบปัญหาการดื้อยาหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาโรค Reece และ Coloe (1985) พบว่าในประเทศออสเตรเลีย เชื้อ *A. paragallinarum* บางตัวอย่างดื้อต่อยา sulfonamides streptomycin และ sulfamethoxazole–trimethoprim ต่อมาในปี 1988 ที่ประเทศออสเตรเลีย Blackall พบว่า เชื้อ *A. paragallinarum* 20 ตัวอย่าง (จาก 75 ตัวอย่าง) ดื้อต่อยา streptomycin (Blackall, 1988) การศึกษาการดื้อยาของ Poernomo และคณะ (2000) พบว่าเชื้อ *A. paragallinarum* ใน

ประเทศอินโดนีเซียมีการดื้อต่อยา erythromycin neomycin และ streptomycin ค่อนข้างมาก นอกจากนี้ยังพบการดื้อต่อยากลุ่ม tetracycline เช่น oxytetracycline และ doxycycline ในระดับปานกลาง และในปี 2007 พบว่า เชื้อ *A. paragallinarum* ที่มาจากไต้หวันมากกว่าร้อยละ 75 ดื้อต่อยา neomycin streptomycin และ erythromycin โดยพบว่าเชื้อมากกว่าร้อยละ 88.9 ดื้อยามากกว่า 2 ชนิดขึ้นไป และร้อยละ 72 ของเชื้อพบ Plasmid pYMH5 ซึ่งมียีนดื้อยาต่อ streptomycin sulfonamide kanamycin และ neomycin (Hsu et al., 2007) ปัจจุบันยาที่ให้ผลดีในการควบคุมโรค ได้แก่ sulfonamide oxytetracycline quinolone gentamicin amoxicillin และ erythromycin เป็นต้น การรักษาโรคหวัดหน้าบวมยังสามารถใช้ยา erythromycin และ oxytetracycline หรือยา กลุ่ม sulfonamide ในการลดความรุนแรงของโรคได้ แต่การรักษาที่ไม่ต่อเนื่องหรือยังมีตัวแพร่เชื้ออยู่ มักทำให้การควบคุมการระบาดของโรคไม่ได้ผล (Blackall and Soriano, 2008) ดังนั้นการศึกษาคุณลักษณะของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ จึงมีประโยชน์ต่อการเลือกใช้ยาที่ใช้ในการรักษาโรคหวัดหน้าบวมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาโรคหวัดหน้าบวมที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Avibacterium paragallinarum* ที่แยกได้จากไก่ในประเทศไทย
2. เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในไก่กับการปรากฏของยีนดื้อยาในเชื้อ *Avibacterium paragallinarum*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำสำคัญ : การดื้อต่อยาต้านจุลชีพ, เอวิแบคทีเรียม พารากัลลินารุม, ยีนดื้อยา

Keywords : Antimicrobial resistance, *Avibacterium paragallinarum*, Resistance genes

คำถามสำหรับการวิจัย / สมมติฐานการวิจัย

1. เชื้อที่แยกได้จากไก่ในประเทศไทยมียีนดื้อต่อยาชนิดใดบ้าง
2. การแสดงออกของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในสัตว์ทดลองสัมพันธ์การปรากฏของยีนดื้อยาหรือไม่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบความไวรับและการปรากฏของยีนดื้อต่อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *Avibacterium paragallinarum* ที่แยกได้จากไก่ในประเทศไทย
2. ทราบผลการแสดงออกของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในไก่กับยีนดื้อยาที่ปรากฏในเชื้อ *Avibacterium paragallinarum*
3. สามารถนำผลที่ได้ไปประกอบในการเลือกใช้ยาในการรักษาไก่ที่เป็นโรคหวัดหน้าบวมได้อย่างเหมาะสม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

1. เชื้อ *Avibacterium paragallinarum*

โรคหวัดหน้าบวม หรือ infectious coryza (IC) เกิดจากเชื้อ *Haemophilus paragallinarum* จากการศึกษาในช่วงปี 1930 สาเหตุที่เชื้อถูกจัดให้เป็น *Haemophilus gallinarum* เพราะเชื้อต้องการทั้ง X-factor (haemin) และ V-factor (nicotinamide adenine dinucleotide ; NAD) ในการเจริญเติบโต (Blackall and Soriano, 2008) หลังจากนั้น Page (1962) ได้รายงานว่าเชื้อที่แยกได้จากการติดเชื้อหวัดหน้าบวมต้องการเพียง V-factor ในการเจริญเติบโต และตั้งชื่อใหม่ว่า *Haemophilus paragallinarum* สเตรนที่ต้องการ V-factor ในการเจริญเติบโตเรียกว่า NAD-dependent ส่วนสเตรนที่ไม่ต้องการ V-factor ในการเจริญเติบโตเรียกว่า NAD-independent ซึ่งพบในแอฟริกาใต้และเม็กซิโก ในปี 2005 มีการศึกษาการจัดหมวดหมู่ด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์วิวัฒนาการ (Phylogenic analysis) และใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าสายพันธุ์ *Haemophilus paragallinarum* ไม่ได้อยู่ในจีนัส Haemophilus และหลังจากนั้นถูกเปลี่ยนให้เป็นจีนัส Avibacterium เช่นเดียวกับแบคทีเรียตัวอื่นๆ ในแฟมิลี่ Pasteurellaceae (Blackall et al., 2005) ได้แก่ *Avibacterium avium*, *Avibacterium gallinarum* และ *Avibacterium volantium* และปัจจุบัน *Haemophilus paragallinarum* ได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Avibacterium paragallinarum*

โดยเชื้อนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ รูปแท่งสั้น มีแคปซูล ขนาดของเซลล์กว้าง 0.4-0.8 ไมครอน ยาว 1-3 ไมครอน เจริญได้ดีในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 แต่ก็สามารถโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (Rimler, 1979) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้ออยู่ระหว่าง 34-42 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37-38 องศาเซลเซียส การเจริญเติบโตในหลอดทดลองสเตรนที่ต้องการ V-factor หรือ NAD-dependent ต้องอาศัย V-factor จากเชื้อ *Staphylococcus* spp. เช่น *S. aureus* (Bragg et al., 1997), *S. epidermidis* (Page, 1962) หรือ *S. hyicus* (Blackall and Reid, 1982) ซึ่งใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นเลือด (blood agar) ส่วนใน

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นจะใช้ NAD เป็นรูปแบบที่ถูกออกซิไดซ์หรือ NADH ซึ่งเป็นรูปแบบที่ถูกรีดิวซ์ (Page, 1962)

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ

ลักษณะโคโลนี

โคโลนีของเชื้อ *A. paragallinarum* เป็นแบบ typically tiny ขนาด 0.3 มิลลิเมตร หลังจากเพาะ 24 ชั่วโมง มีลักษณะคล้ายหยดน้ำค้าง และไม่เกิด hemolytic บนอาหารวุ้นเลือด (blood agar) สำหรับสเตรนที่ต้องการ V-factor เมื่อคาดทับด้วย *Staphylococcus* spp. โคโลนีจะค่อยๆ เล็กลงเมื่อห่างจากแบคทีเรียที่คาดทับเรียกรูปแบบนี้ว่า satellitic growth สำหรับสเตรนที่ไม่ต้องการ V-factor การเลี้ยงบนอาหารวุ้นเลือดไม่ต้องคาดทับด้วย *Staphylococcus* spp. และสร้างโคโลนีขนาดเล็ก 1-2 มิลลิเมตร แต่ไม่เป็นรูปแบบ satellitic growth และโคโลนีมีลักษณะคล้ายกับโคโลนีของเชื้อ *Ornithobacterium rhinotracheale* (Blackall and Soriano, 2008) *A. paragallinarum* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนต่อสภาพแวดล้อม แบคทีเรียมีชีวิตอยู่ได้บนอาหารวุ้นเลือดแกะ โดยการเขี่ยเชื้ออย่างต่อเนื่องทุกสัปดาห์ เชื้อที่มีลำดับ passage น้อยสามารถเก็บไว้ในโถเทียน แล้วจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถมีอายุได้นาน 2 สัปดาห์ (Blackall and Soriano, 2008)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเชื้อ *A. paragallinarum* มีหลายชนิด หากเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (solid media, agar) ต้องบ่มภายใต้สภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 หรือบ่มในโถที่จุดเทียนไข (candle jar) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบน้ำ (broth) บ่มในสภาวะปกติได้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้สำหรับการแยกเชื้อคือ อาหารวุ้นเลือด (blood agar) ซึ่งจะสังเกตการเกิด satellitic growth โดยจะถูกเตรียมจาก blood agar base และเติมด้วย 5% erythrocyte จากเลือดแกะ (Blackall and Soriano, 2008)

การให้เชื้อในไก่

ไก่อายุ 4 สัปดาห์ขึ้นไป มีความไวต่อเชื้อ *A. paragallinarum* การให้เชื้อแบคทีเรียในไก่สามารถให้เชื้อผ่านทางจมูก (intranasal inoculation) หรือการให้เข้าไปใน infraorbital sinus หลังจากให้เชื้อจะพบอาการทางคลินิกภายใน 24-48 ชั่วโมง โดยเชื้อที่จะให้ไก่สามารถเตรียมและ

เพิ่มความรุนแรงของเชื้อได้โดยการฉีดเชื้อเข้าไข่แดงของไข่ฟักอายุ 7 วัน โดยจำนวนเชื้อในไข่แดงหลังการบ่มข้ามคืนประมาณ 0.5-5x10^8 cfu/ml (Jacobs et al., 1992)

การจำแนกชนิดซีโรวาร์

A. paragallinarum สามารถจำแนกได้ 3 ซีโรกรุ๊ป ตาม Page Scheme โดยใช้ปฏิกิริยาการจับกลุ่ม (slide agglutination test) คือ ซีโรกรุ๊ป A, B และ C (Page, 1962) ส่วน Kume scheme ใช้วิธีการยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (hemagglutination inhibition test; HI) จำแนกได้เป็น 9 ซีโรวาร์ อยู่ใน 3 ซีโรกรุ๊ป คือ I, II และ III (Kume et al., 1983) ต่อมา Blackall และคณะ (1990) ได้เปลี่ยนชื่อ Kume scheme ที่เป็น Kume ซีโรกรุ๊ป I, II และ III ให้สอดคล้องกับ Page ซีโรกรุ๊ป A, B และ C แล้วเรียกซีโรวาร์ที่อยู่ภายใน Kume ซีโรกรุ๊ป A เป็นซีโรวาร์ A-1, A-2, A-3 และ A-4 Kume ซีโรกรุ๊ป B เป็นซีโรวาร์ B-1 และ Kume ซีโรกรุ๊ป C เป็นซีโรวาร์ C-1, C-2, C-3 และ C-4 ในปัจจุบันพบ variant type B จากการระบาดของเชื้อหวัดหน้าบวมในฟาร์มที่ทำวัคซีนหวัดหน้าบวมที่มีเชื้อซีโรวาร์ A, B และ C ซึ่งเชื้อเป็นซีโรวาร์ B แต่ผลการป้องกันจากวัคซีนซีโรวาร์ B ต่ำ (Jacobs et al., 2003) วิธีที่ดีที่สุดในการจำแนกซีโรวาร์ คือการทดสอบการยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (HI) ด้วยแอนติซีรั่มจากซีโรวาร์จำเพาะ ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีทางโมเลกุลที่สามารถใช้จำแนกชนิดซีโรวาร์ของเชื้อ *A. paragallinarum* ได้ ถึงแม้จะมีการศึกษาที่ใช้วิธี enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) ในการจำแนกซีโรวาร์ ซึ่งวิธีนี้สามารถแยกเชื้อ Kume ซีโรวาร์ทั้ง 9 กลุ่มได้ แต่ก็ไม่สามารถจำแนก field isolate ตาม Kume ซีโรวาร์ได้ (Soriano et al., 2004c)

การป้องกันโรคข้ามสายพันธุ์

ความสามารถในการป้องกันโรคข้ามสายพันธุ์ พบว่าภายในซีโรกรุ๊ป A จะมีความสามารถในการป้องกันโรคข้ามซีโรวาร์ได้มากกว่า ซีโรกรุ๊ป C ซึ่งภายในซีโรกรุ๊ป C มีความสามารถในการป้องกันข้าม ซีโรวาร์ได้น้อยมาก (Soriano et al., 2004a) และไม่พบแอนติบอดีไตเตอร์ในไก่ที่ได้รับวัคซีนซีโรวาร์ที่ไม่ตรงกับเชื้อที่ได้รับ (Jacobs et al., 1992; Soriano et al., 2004a) การทำวัคซีนหวัดหน้าบวมในบางพื้นที่ไม่ได้ผลอาจเกิดจากไม่มีการป้องกันข้ามสายพันธุ์ระหว่าง vaccine strain และ field strain (Soriano et al., 2004a)

ความสามารถในการก่อโรค

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ความสามารถในการก่อพยาธิสภาพของเชื้อขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตของเชื้อ ลำดับ passage ของเชื้อ และสภาพตัวสัตว์ ในปี 1990 Yamaguchi และคณะ ศึกษาเชื้อ *A. paragallinarum* ซีโรกรุ๊ป B จำนวน 4 สเตรน พบว่า 3 ใน 4 สเตรนทำให้เกิดอาการทางคลินิกในไก่ (Yamaguchi et al., 1990) และพบว่า Hemagglutinin (HA) antigen มีบทบาทสำคัญต่อความรุนแรงของเชื้อ Page ซีโรกรุ๊ป C เพราะเมื่อให้เชื้อไก่ด้วยซีโรวาร์ C และ ซีโรวาร์ C ที่กลายพันธุ์ซึ่งไม่มี HA antigen พบว่าไก่ที่ได้รับเชื้อซีโรวาร์ C ปกติ ร้อยละ 45 แสดงอาการทางคลินิก ส่วนไก่ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อซีโรวาร์ C ที่กลายพันธุ์ไม่มีตัวใดแสดงอาการทางคลินิก (Yamaguchi et al., 1993) และจากการศึกษาความรุนแรงของ Kume ซีโรวาร์ทั้ง 9 ซีโรวาร์ โดยให้เชื้อในไก่ที่ไม่ได้ทำวัคซีนและสังเกตอาการทางคลินิก พบว่าซีโรวาร์ C-1 มีคะแนนอาการทางคลินิกสูงสุด ส่วน C-4 มีคะแนนอาการทางคลินิกต่ำสุด โดยซีโรวาร์ A-1, A-4, C-1, C-2 และ C-3 มีความรุนแรงมากกว่าซีโรวาร์ A-2, A-3, B-1 และ C-4 (Soriano et al., 2004b) ส่วนการศึกษาในแอฟริกาใต้ พบว่าซีโรวาร์ C-2 และ C-3 รุนแรงกว่า A1 และ B-1 (Bragg, 2005)

2. โรคหวัดหน้าบวม (infectious coryza)

<u>ข้อมูลทั่วไปของโรค</u>

โรคหวัดหน้าบวมเป็นโรคติดเชื้อทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันในไก่ พบการติดเชื้อได้ทั้งในไก่เนื้อและไก่ไข่ซึ่งเป็นโฮสต์ตามธรรมชาติของเชื้อ *A. paragallinarum* ไก่ทุกอายุมีความไวต่อโรคหวัดหน้าบวม แต่โรคมักก่อให้เกิดความรุนแรงได้น้อยในไก่อายุน้อย ส่วนในไก่โตเต็มวัยจะพบระยะฟักตัวของโรคสั้นและช่วงเวลาในการเกิดโรคค่อนข้างยาวนาน โดยเฉพาะแม่ไก่ที่กำลังให้ผลผลิต โรคหวัดหน้าบวมมีอัตราการป่วยสูงแต่มีอัตราการตายต่ำ (Blackall and Soriano, 2008) การติดต่อของโรคมีได้หลายทาง เช่น การสัมผัสกับสัตว์ป่วย การปนเปื้อนของเชื้อจากเสมหะที่ขับออกมาปะปนกับน้ำและอาหาร นอกจากนี้เชื้ออาจแพร่มากับวัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ภายในฟาร์ม สิ่งรองนอน และยานพาหนะ แต่ไม่แพร่เชื้อผ่านไข่ (เกรียงศักดิ์, 2536) โรคหวัดหน้าบวมมีระยะการฟักตัวสั้น โดยการพัฒนาอาการของโรคเกิดขึ้นภายใน 24-48 ชั่วโมง หลังการได้รับเชื้อจากการเพาะเชื้อหรือจากสารคัดหลั่ง ไก่ที่ไวรับต่อเชื้อจะพบอาการภายใน 24-72 ชั่วโมง และในกรณีที่ไม่รุนแรงอาการจะหายภายใน 10 วัน ส่วนกรณีที่รุนแรงอาการจะหายภายใน 2-3 สัปดาห์ ซึ่งความรุนแรงของโรคเกิดได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ การจัดการที่ไม่ดี ปรสิต หรือติดเชื้อทางเดินหายใจอื่น

ร่วมด้วย เช่น infectious bronchitis virus *Mycoplasma gallisepticum Escherichia coli* และ *Pasteurella* spp. (Blackall and Hinz, 2008)

พยาธิกำเนิด

เชื้อ *A. paragallinarum* เมื่อเข้ามาในรูจมูก ผ่านเข้าไปในทางเดินหายใจไปเกาะที่ ciliated mucosa ของทางเดินหายใจส่วนบน และทำให้เกิดรอยโรคในเยื่อเมือกจากการหลั่งสารพิษของแบคทีเรีย แคปซูลของแบคทีเรียจะช่วยป้องกันการทำลายจากคอมพลีเม้นท์ของร่างกายโฮสต์ได้ หากเกิดการติดเชื้ออื่นร่วมด้วยหรือร่างกายมีภาวะกดภูมิคุ้มกัน เชื้อจะเคลื่อนที่ไปยังทางเดินหายใจส่วนล่าง เช่น ปอด หรือ ถุงลมได้ (Blackall and Hinz, 2008)

อาการทางคลินิก

เมื่อมีการติดเชื้อหวัดหน้าบวมจะเกิดการอักเสบเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนต้น ก่อให้เกิดอาการมีน้ำมูก น้ำตาไหล หน้าบวม เยื่อตาอักเสบ และเหนียงบวม (Blackall, 1999) แต่การติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนล่างอาจเกิดขึ้นได้หากมีการติดเชื้ออื่นร่วมด้วยหรือร่างกายมีภาวะกดภูมิคุ้มกัน ไก่ที่ติดเชื้ออาจมีอาการท้องเสีย กินน้ำ และอาหารลดลง ส่งผลให้เกิดการคัดไก่ทิ้งในไก่ไข่ที่กำลังเจริญเติบโต ส่วนในฝูงไก่ไข่ พบว่าการให้ไข่ลดลงร้อยละ 10-40 (Blackall and Hinz, 2008)

พยาธิสภาพ

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพจะพบประมาณ 20 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อและรุนแรงสูงสุดที่ 7-10 วันหลังติดเชื้อ พยาธิสภาพที่พบอาจมี การอักเสบในช่องจมูก infraorbital sinus และเยื่อตาแบบ catarrhal fibrinopurulent inflammation และมักพบอาการ catarrhal conjunctivitis และการบวมน้ำของชั้นใต้ผิวหนัง บริเวณหน้าและหงอน (Blackall and Soriano, 2008) การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิสภาพอาจพบการสูญเสียซีเลียและไมโครวิลไล เซลล์บวมน้ำ มีการเสื่อมของเยื่อเมือก หลังจากนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาว leukocyte และ mast cell จะเข้ามาในชั้น lamina propia ของผนังเยื่อเมือก (Blackall and Hinz, 2008)

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยโรคหวัดหน้าบวมสามารถวินิจฉัยได้จากประวัติที่มีการกระจายโรคอย่างรวดเร็ว ไก่แสดงอาการหวัด โดยการเก็บเชื้อจาก infraorbital sinus จากการเปิดผิวหนังที่ปลอดเชื้อ

ด้วยการใช้ spatula เผาร้อนทาบบนผิวหนังแล้วเปิดด้วยใบมีด หรือเก็บตัวอย่างด้วยการตัดจะงอยปากบริเวณหลังโพรงจมูก และทำการป้ายเชื้อจากไซนัส เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ให้ผลลบกับการทดสอบแคทตาเลส และมีการเจริญแบบ satellite colonies บนอาหารวุ้นเลือด ที่ขีดคาดทับด้วย *Staphylococcus* spp. ในกรณีที่มีเชื้อปริมาณน้อยสามารถใช้วิธี PCR โดยใช้ HP-2 PCR ซึ่งสามารถใช้ได้กับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเมือกที่ได้จากโพรงจมูกของไก่ (Chen et al., 1996) ที่จำเพาะทั้งสเตรนที่ต้องการและไม่ต้องการ v-factor ซึ่งปัจจุบันเป็นวิธีที่ใช้เป็นประจำในการระบุเชื้อ *A. paragallinarum* จากการป้ายเชื้อและใช้ในการยืนยันเชื้อในห้องปฏิบัติการ (Miflin et al., 1999)

การวินิจฉัยแยกโรค

การวินิจฉัยโรคหวัดหน้าบวมแยกออกจากโรคอื่นๆ ที่มีอาการทางคลินิกคล้ายกัน เช่น chronic respiratory disease chronic fowl cholera fowlpox ornithobacteriosis swollen head syndrome และ การขาดวิตามินเอ โดยทำการวินิจฉัยจากประวัติและอาการ ซึ่งจะพบการกระจายของโรคอย่างรวดเร็ว ไก่แสดงอาการหวัด มีน้ำมูก หน้าบวม เมื่อพบว่ามีอาการที่รุนแรงขึ้น มีอัตราการตายสูง ระยะการเกิดโรคนาน อาจเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสอื่นแทรกซ้อน นอกจากนั้นสามารถใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการ เช่น การเพาะเชื้อจาก infraorbital sinus บนอาหารวุ้นเลือด และคาดทับด้วย *Staphylococcus* spp. แล้วสังเกต satellite colonies หรือทำการยืนยันเชื้อด้วยวิธี PCR (Blackall and Soriano, 2008)

การทดสอบทางซีรั่มวิทยา

ปัจจุบันวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหาระดับแอนติบอดีของโรคหวัดหน้าบวมคือวิธีการยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (HI test) เพราะสามารถตรวจหาระดับแอนติบอดีได้ทั้งซีโรวาร์ A, B และ C (Blackall and Hinz, 2008) ส่วนวิธีการอื่นที่มีการศึกษาคือ monoclonal Ab-base blocking enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งมีไวและความจำเพาะในการตรวจสูง แต่ monoclonal antibody ที่ใช้ในการตรวจมีเฉพาะ Page ซีโรวาร์ A และ C ดังนั้นจึงตรวจแอนติบอดีได้เฉพาะ Page ซีโรวาร์ A และ C อีกทั้ง monoclonal antibody นี้ก็ไม่ได้ผลิตมาขายในทางการค้า (Sun et al., 2007)

การรักษาและการดื้อยา

การรักษาสามารถใช้ยา erythromycin และ oxytetracycline หรือยากลุ่ม sulfonamide ในการลดความรุนแรงของโรคได้ (Blackall and Soriano, 2008) ปัจจุบันยาที่ใช้ในการควบคุมโรคหวัดหน้าบวม ได้แก่ sulfonamide oxytetracycline quinolone gentamicin amoxicillin และ erythromycin เป็นต้น อย่างไรก็ตาม มีรายงานการดื้อของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ Reece และ Coloe (1985) พบว่าในปี 1985 ที่ประเทศออสเตรเลียเชื้อ *A. paragallinarum* บางตัวอย่างดื้อต่อยา sulfonamides streptomycin และ sulfamethoxazole–trimethoprim ต่อมาในปี 1988 Blackall พบว่าเชื้อ *A. paragallinarum* ในประเทศออสเตรเลีย 20 ตัวอย่าง (จาก 75 ตัวอย่าง) ดื้อต่อยา streptomycin (Blackall, 1988) การศึกษาการดื้อยาของ Poernomo และคณะ (2000) พบว่าเชื้อ *A. paragallinarum* ในประเทศอินโดนีเซียมีการดื้อต่อยา erythromycin neomycin และ streptomycin ค่อนข้างมาก นอกจากนี้ยังพบการดื้อต่อยากลุ่ม tetracycline เช่น oxytetracycline และ doxycycline ในระดับปานกลาง และในปี 2007 พบว่าเชื้อจากไต้หวันมากกว่าร้อยละ 75 ดื้อต่อยา neomycin streptomycin และ erythromycin โดยพบว่าเชื้อมากกว่าร้อยละ 88.9 ดื้อยามากกว่า 2 ชนิดขึ้นไป และร้อยละ 72 ของเชื้อพบ Plasmid pYMH5 ซึ่งมียีนดื้อยาต่อ streptomycin sulfonamide kanamycin และ neomycin (Hsu et al., 2007) ส่วนในประเทศไทยในปี 2549 พบการดื้อยาในเชื้อที่แยกจากไก่ป่วยจากรายงานการระบาดของโรคหวัดหน้าบวมในฟาร์มไก่แห่งหนึ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งดื้อต่อยา amoxicillin ampicillin erythromycin gentamicin neomycin sulfamethoxazole–trimethoprim doxycycline และ penicillin (กฤดาและนิวัตร, 2550)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>การควบคุมและป้องกันโรค</u>

การลดการระบาดของโรคหวัดหน้าบวมทำได้โดยมีการจัดการที่ดี มีระบบป้องกันทางชีวภาพที่ดี หลีกเลี่ยงการเลี้ยงไก่หลายรุ่นรวมกัน ทำการกำจัดไก่ที่ติดเชื้อหรือฝูงที่หายจากโรคซึ่งไก่เหล่านี้เป็นแหล่งของเชื้อหวัดหน้าบวม ทำความสะอาด ฆ่าเชื้อ และพักโรงเรือนอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนนำไก่ใหม่เข้า (Blackall and Hinz, 2008 ; Blackall and Soriano, 2008) การป้องกันโรคหวัดหน้าบวม สามารถป้องกันโดยการให้วัคซีนฉีดเข้าใต้ผิวหนังหรือเข้ากล้ามเนื้อในช่วงอายุ 10-20 สัปดาห์ แต่เนื่องจากข้อจำกัดในการป้องกันข้ามซีโรวาร์ วัคซีนที่ผลิตสำหรับการป้องกันโรคจึงประกอบด้วยหลายซีโรกรุ๊ป เช่น bivalent vaccine (ซีโรกรุ๊ป A+C) trivalent vaccine (ซีโรกรุ๊ป

A+B+C) หรือ tetravalent (ซีโรกรุ๊ป A+B+C+variant-B) และจากการศึกษาของ Chukiatsiri และคณะ (2009) พบว่า autogenous vaccines ของเชื้อ *A. paragallinarum* มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคหวัดหน้าบวมในไก่ทุกตัวที่ทดลอง ส่วนวัคซีนทางการค้า (commercial vaccines) สามารถป้องกันการเกิดโรคหวัดหน้าบวมในไก่ที่ทดลองได้บางตัว

3. กลไกที่ทำให้เกิดการดื้อยา (มาลินี, 2525)

กลไกที่ทำให้เกิดการดื้อยาอธิบายได้เป็น 2 หัวข้อ คือ หลักทางสรีระเคมีและหลักของยีน

<u>หลักทางสรีระเคมี</u>

1) การเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ในเซลล์แบคทีเรีย

เอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงไปจนทำให้ยาไม่สามารถไปรวมตัวกับเอนไซม์ได้ตามปกติทำให้ยาไม่มีผลต่อแบคทีเรีย ตัวอย่างคือการดื้อยาซัลฟา โดยมีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ซินทิเทสทำให้ยาซัลฟาไม่สามารถไปรวมตัวได้

2) การซึมผ่านเข้า-ออกเซลล์ของยา

ผิวเซลล์ของแบคทีเรียที่ดื้อยาจะมีโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ยาบางส่วนซึมกลับออกมานอกเซลล์และไม่สามารถสะสมยาให้อยู่ในเซลล์ในปริมาณที่สูงพอที่จะออกฤทธิ์ต่อกระบวนการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียได้

3) การสร้างเอนไซม์มาทำลายยา

แบคทีเรียหลายชนิดที่เกิดการดื้อยาโดยการสร้างเอนไซม์มาทำลายยาต้านจุลชีพทำให้ยานั้นๆ ไม่ได้ผล เอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมาในขณะที่ได้รับยาแบ่งได้เป็น 2 พวก คือ เอนไซม์ที่ทำลายยาโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยา ตัวอย่างคือ เอนไซม์เบต้าแลคตาเมส สามารถทำลายยาในกลุ่ม penicillin และ cephalosporin และเอนไซม์ที่สามารถเข้าไปแทนที่ในสูตรโครงสร้างของยาทำให้ยาเสื่อมฤทธิ์ไป ตัวอย่างคือ เอนไซม์อะดรีนิลทรานสเฟอเรส ทำให้ดื้อต่อยา streptomycin และ spectinomycin

<u>หลักของยีน</u>

1) การเปลี่ยนแปลงของยีน

การเปลี่ยนแปลงส่วนของยีนตามธรรมชาติที่เรียกว่า mutation หรือการกลายพันธุ์ แต่ปัญหา

การดื้อยาเกิดจากแบคทีเรียในกลุ่มนั้นๆ ได้รับยาต้านจุลชีพอยู่ประจำ และยาต้านจุลชีพนี้ทำให้เกิดสภาพ selective pressure ซึ่งเปิดโอกาสให้เซลล์ที่กลายพันธุ์เพิ่มจำนวนขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียปกติถูกยาทำลายไปจนเหลือแต่กลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงหรือเชื้อดื้อยา เรียกการดื้อยาแบบ Chromosomal resistance

2) ยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยา

ยีนนี้อาจเป็นส่วนหนึ่งในโครโมโซม หรืออยู่นอกโครโมโซมที่เรียกว่า พลาสมิด (plasmid) ตัวอย่างแบคทีเรียแกรมลบที่พบพลาสมิด เช่น *E. coli* Salmonella Enterobacter Haemophilus เป็นต้น

<u>การถ่ายทอดการดื้อยา</u>

ยีนที่ควบคุมการดื้อยาบนพลาสมิด ยีนดื้อยาในพลาสมิดมีความสำคัญในการถ่ายทอดการดื้อยาในกลุ่มแบคทีเรีย ส่วน r-determinant บนพลาสมิดเป็นส่วนของยีนที่ควบคุมการดื้อยา ซึ่งสามารถพบ r-determinant ได้มากกว่าหนึ่งชนิด

วิธีการถ่ายทอดการดื้อยาระหว่างแบคทีเรียจะเกิดโดยวิธี transduction และ conjugation เป็นส่วนใหญ่ และเกิดโดยวิธี transformation เป็นส่วนน้อย วิธี transduction เกิดโดยการถ่ายทอดดีเอ็นเอจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งโดยแบคเทอริโอฟาจเป็นตัวกลางในการถ่ายทอด ส่วน conjugation เกิดโดยเซลล์สองเซลล์เชื่อมติดกันแล้วมีการถ่ายทอดดีเอ็นเอ และ transformation เกิดโดยการถ่ายทอดดีเอ็นเอจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งผ่านทางอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งพบในการศึกษาในห้องทดลองเท่านั้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมเชื้อ *Avibacterium paragallinarum*

1.1 <u>การเพาะเชื้อแบคทีเรีย</u>

1.1.1 ในการทดลองจะใช้เชื้อ *A. paragallinarum* 18 isolate ซึ่งครอบคลุมทั้งซีโรไทป์ A, B และ C เชื้อ 6 isolate มาจากภาคอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากการระบาดในช่วงปี พ.ศ. 2549-2552 จากฝูงที่ทำวัคซีนป้องกันโรคหวัดหน้าบวมที่แตกต่างกัน และเชื้อ 12 isolate มาจากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (NIAH) เก็บตัวอย่างมาจากการระบาดที่ต่างสถานที่และเวลา แต่ไม่ได้ทำการบันทึกไว้ ซึ่ง Chukiatsiri และคณะ (2012) ได้ทำการจำแนกซีโรวาร์ด้วยวิธี HI ดังแสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 แหล่งที่มาและชนิดซีโรกรุ๊ปของเชื้อ *A. paragallinarum* ทั้ง 18 isolate

สเตรน	แหล่งที่มาของเชื้อ	ซีโรกรุ๊ป A	ซีโรกรุ๊ป B	ซีโรกรุ๊ป C
B1E1	NIAH	Apg A-2		
423	NIAH	Apg A-2		
111492	NIAH	Apg A		
746	NIAH	Apg A		
112179	NIAH	Apg A		
102090	NIAH	Apg A		
IR1	ชัยภูมิ	Apg A-2		
CHS0809	ฉะเชิงเทรา	Apg A		
CMU1009	เชียงใหม่	Apg A		
1687	NIAH		Apg B	
102984	NIAH		Apg B	
211108	ชลบุรี		Apg B	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สเตรน	แหล่งที่มาของเชื้อ	ซีโรกรุ๊ป A	ซีโรกรุ๊ป B	ซีโรกรุ๊ป C
CMA0509	เชียงใหม่		Apg B	
F1CM0809	เชียงใหม่		Apg B	
102947	NIAH			Apg C-2
115757	NIAH			Apg C-2
102943	NIAH			Apg C

1.1.2 นำเชื้อ *A. paragallinarum* มาขีดลงบนอาหารวุ้นเลือด จนเต็ม plate ขีดคาดทับด้วย *Staphylococcus aureus* เป็นรูปสามเหลี่ยม เพื่อเป็นแหล่ง V-factor ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

1.1.3 บ่มเชื้อในโถเทียนซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 จากนั้นนำโถไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.1.4 เลือกโคโลนีของเชื้อ *A. paragallinarum* โดยจะมีลักษณะใส นูน ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร และมีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ เมื่ออยู่ไกลจาก *Staphylococcus aureus* จนไม่พบเชื้อเลย ซึ่งเรียกลักษณะนี้ว่า satellite colonies นำโคโลนีเดี่ยวมาขีดลงบนอาหารวุ้นเลือดและขีดคาดทับด้วย *Staphylococcus aureus* บ่มเชื้อในโถเทียน จากนั้นนำโถไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.2 <u>การเก็บเชื้อแบคทีเรีย</u>

1.2.1 นำเชื้อ *Avibacterium paragallinarum* ที่ผ่านการลงอาหารวุ้นเลือดแกะเป็นครั้งที่ 2 ที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว มาขีดลงบนอาหารวุ้น GC media ที่มีส่วนผสม (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร) GC agar base (Lab M) 18 กรัม soluble haemoglobin (Oxoid) 5 กรัม และ BBL™ IsoVitaleX™ 10 มิลลิลิตร

1.2.2 นำอาหารวุ้น GC media ใส่ในโถเทียนบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นป้ายเชื้อลงบนอาหารเหลวสำหรับเก็บเชื้อ Mist Desicans และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

2. การตรวจหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration ; MIC)

การทดสอบ MIC จะทำการทดลองในเชื้อ *A. paragallinarum* 18 isolate ที่แยกได้ในประเทศไทย ควบคุมคุณภาพโดยใช้ reference strain ของเชื้อ *Escherichia coli* (ATCC 25922) และวิธีการทดสอบ MIC ดัดแปลงมาจากการศึกษาของ Blackall (Blackall, 1988)

2.1 ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิด supplemented test medium broth (TMB) ข้ามคืน และนำเชื้อไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm และเปรียบเทียบค่าที่ได้กับปริมาณเชื้อใน ตารางที่ 3-2 ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย TMB ให้มีความเข้มข้นเป็น $5x10^5$ CFU/ml

ตารางที่ 3-2 McFarland Nephelometer Standards (McFarland, 1907)

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density ($1X10^8$ CFU/ml)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Transmittance*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance*	0.08 - 0.1	0.257	0.451	0.582	0.669

*วัดที่ความยาวคลื่น 600 nm

2.2 เตรียมยาต้านจุลชีพ โดยยาที่ใช้ในการหาค่า MIC มีทั้งหมด 14 ชนิด โดยเลือกจากยาที่ใช้ในการรักษาโรคในไก่และใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *A. paragallinarum* ในการศึกษาก่อนหน้านี้ (Chukiatsiri et al., 2012) โดยยาต้านจุลชีพที่ทำการศึกษา ได้แก่ ampicillin amoxicillin doxycycline streptomycin nalidixic acid gentamicin enrofloxacin ciprofloxacin erythromycin sulfamethoxazole–trimethoprim ceftiofur cephalexin oxytetracycline และ spectinomycin แล้วทำการเตรียม stock solution ของยาต้านจุลชีพ ซึ่งคำนวณปริมาณยาที่ใช้ด้วยสูตร $\text{Volume (ml)} = \frac{\text{Weight (mg) X Potency (µg/mg)}}{\text{Concentration (µg/ml)}}$

หลังจากนั้นนำยาตามปริมาณที่คำนวณมาผสมกับสารทำละลาย ดังแสดงในตารางที่ 3-3 แล้วนำสารละลายมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

ตารางที่ 3-3 สารทำละลายยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ minimal inhibitory concentration (MIC) (CLSI, 2011)

ยาต้านจุลชีพ	สารทำละลาย
amoxicillin ampicillin gentamicin	0.1 M phosphate buffer
sulfonamides	distilled water ½ ของปริมาตรที่ใช้ เติม 2.5 M NaOH จนยาละลายหมด แล้วเติม distilled water ให้ครบปริมาตรที่ต้องการ
tetracycline hydrochloride	distilled water
trimethoprim	0.05 M HCl
Ceftiofur	distilled water
erythromycin spectinomycin	95% ethanol
Quinolone	distilled water ½ ของปริมาตรที่ใช้ เติม 1 M NaOH จนยาละลายหมด แล้วเติม distilled water ให้ครบปริมาตรที่ต้องการ
cephalexin	phosphate buffer, 0.1 M

2.3 นำ stock solution ของยาต้านจุลชีพ นำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิด TMB/CM ซึ่งเป็น TMB ที่เติม 0.125 M $CaCl_2$ และ 0.1 M $MgCl_2$ โดยทำการเจือจางแบบ doubling dilutions จากความเข้มข้น 256-0.25 µg/ml ใน 96 well plate ให้ได้ปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 2.1 ปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยทำการทดลองครั้งละ 3 replications ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง การอ่านผล อ่านค่าของความเข้มข้นของยาหลุมแรกที่ใส ซึ่งก็คือค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ยับยั้งการโตของเชื้อแบคทีเรีย

3. การตรวจหายีนดื้อยา โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction ; PCR)

3.1 สกัดดีเอ็นเอโดยป้ายเชื้อ *A. paragallinarum* จากอาหารวุ้น GC ที่บ่มข้ามคืน ใส่ลงใน

eppendorf tube เติม sterile PBS ปริมาตร 200 µl เขย่าให้เข้ากัน นำไปใส่ในเครื่อง AccuBlock ™ Digital Dry Bath (Labnet international, Inc., USA) ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 13,000 x g เป็นเวลา 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

3.2 ใช้ oligonucleotide primers ทั้งหมด 7 ตัว ในการตรวจยีนที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม tetracycline sulfonamides erythromycin และ penicillins ยีนดื้อยาเหล่านี้พบได้ในเชื้อแบคทีเรียในแฟมิลี่ Pasteurellaceae ซึ่งได้แก่ จีนัส Avibacterium Haemophilus และ Aggregatibacter (Kehrenberg et al., 2006) (ดังที่แสดงในตารางที่ 3-4)

ตารางที่ 3-4 oligonucleotide primers ที่ใช้ในการตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *A. paragallinarum*

Gene	Primer	5' -----> 3' sequence	Fragment size (bp)	Primer design
Tetracycline				
***tet*(A)**	tetA-L	GGCGGTCTTCTTCATCATGC	502	Lanz et al. (2003)
	tetA-R	CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA		
***tet*(B)**	tetB-L	CATTAATAGGCGCATCGCTG	930	Lanz et al. (2003)
	tetB-R	TGAAGGTCATCGATAGCAGG		
***tet*(M)**	tet1	GCTCAYGTTGAYGCAGGAA	variable	Barbosa et al. (1999)
	tet 2	AGGATTTGGCGGSACTTCKA		
Sulfonamides				
sul2	sulII-a	CGGCATCGTCAACATAACCT	721	Lanz et al. (2003)
	sulII-b	TGTGCGGATGAAGTCAGCTC		
Erythromycin				
***erm*(A)**	erm(A)-F	ATGAACCAGAAAAACCCTAAAG	732	Matter et al. (2007)
	erm(A)-R	TTAGTGAAACAATTTGTAACTATTG		
***erm*(B)**	erm(B)-F	GAAAAGGTACTCAACCAAATA	639	Chung et al. (1999)
	erm(B)-R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC		
Penicillin				
bla_{ROB-1}	bla_{ROB}-1-F	CATTAACGGCTTGTTCGC	852	Matter et al. (2007)
	bla_{ROB}-1-R	CTTGCTTTGCTGCATCTTC		

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 PCR 1 reaction มีปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR Master mix 12.5 ไมโครลิตร (Eppendorf®, USA) primer F 2 ไมโครลิตร primer R 2 ไมโครลิตร DNA ตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร และ H_2O 3.5 ไมโครลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น negative control ใช้เชื้อ *Escherichia coli* และ Lactobacillus ที่มียีนดื้อยาเหล่านี้เป็น Positive control

3.4 นำเข้าเครื่อง PCR (BIOER) เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

3.5 นำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์โดยวิธี electrophoresis ใน 0.7% agarose gel (Invitrogen™) ใช้ TBE เป็นบัฟเฟอร์ ทำการผสม PCR product 10 ไมโครลิตร กับ loading buffer 2 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงหลุม และใช้ 100 base pair ladder (Fermentas, Germany) 3.5 ไมโครลิตร หยอดหลุมแรก จากนั้นนำเข้าเครื่อง electrophoresis โดยใช้ TBE เป็นบัฟเฟอร์ ที่กระแสไฟฟ้า 80 โวล์ท เป็นเวลา 30 นาที ทำการย้อมด้วย Ethidium bromide เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่น ส่องดูแถบ (band) ที่เกิดขึ้นด้วยแสงอัลตร้าไวโอเล็ต

4 การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพในไก่

4.3 <u>ชนิดแบคทีเรีย</u>

4.3.1 เลือกเชื้อ *A. paragallinarum* ที่ไม่พบการดื้อต่อยากลุ่ม penicillin และ tetracycline จากผล MIC และการตรวจหายีนดื้อยามา 3 isolate ได้แก่ 98 111492 และ B1E1

4.3.2 เตรียมเชื้อโดยการเลี้ยงเชื้อใน TMB ข้ามคืน และนำเชื้อไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm และเปรียบเทียบค่าที่ได้กับปริมาณเชื้อในตารางที่ 3-2 เชื้อมีความเข้มข้นประมาณ $5x10^8$ CFU/ml ทำการให้เชื้อในไก่ที่อายุ 5 สัปดาห์ โดยวิธีการหยอดจมูกตัวละ 0.2 มิลลิลิตร

4.4 <u>ยาต้านจุลชีพ</u>

ให้ยา amoxicillin (Virbac Animal Health, Thailand) และ doxycycline (Better Pharma Co. Ltd, Thailand) 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยวิธีป้อนปาก ติดต่อกัน 5 วัน วันละ 1 ครั้ง โดยทำการให้ยาหลังการให้เชื้อ 72 ชั่วโมง

4.5 <u>การออกแบบการทดลอง</u>

4.5.1 ใช้ไก่ไข่ เพศเมีย พันธุ์ Isa Babcock จากฟาร์มไก่เกิดเจริญ อายุ 5 สัปดาห์ โดยก่อนทำการทดลองที่อายุ 5 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือดไก่ทุกตัว เพื่อนำมาตรวจหา

แอนติบอดีต่อ *A. paragallinarum* ด้วยวิธี hemagglutination inhibition test (HI test) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Garcia และคณะ (2008) ตามขั้นตอนดังนี้

4.5.1.1 ปั่นแยกซีรั่มที่ความเร็วรอบ 3,000 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นผสมซีรั่มกับ 10% glutaraldehyde (GA) fixed chicken erythrocyte ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง เขย่าให้เข้ากัน เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำออกมาเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้ทำเพื่อไม่ให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์กับเม็ดเลือดแดง

4.5.1.2 นำซีรั่มจากข้อ 4.5.1.1 มาปั่นที่ความเร็วรอบ 3,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสและเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตรวจ HI test โดยซีรั่มจะมีความเข้มข้น 1 ต่อ 5

4.5.1.3 นำซีรั่มจากข้อ 4.5.1.2 มาทำ two-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้น 1/5-1/160 โดยเจือจางด้วย PBS + 0.1% BSA ให้ได้ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร

4.5.1.4 นำ antigen reference ของทุกซีโรไทป์ (The Kitasato institute) มาเจือจางด้วย PBS + 0.1% BSA ให้ได้ 4 hemaglutination (HA) unit

4.5.1.5 หลังจากนั้นเติม antigen ความเข้มข้น 4 HA unit หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30-45 นาที ทำ antigen control และ serum control เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม 1% GA-fixed chicken erythrocyte ทุกหลุม เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จึงอ่านผล โดยความเข้มข้นสูงสุดของซีรั่มที่ยับยั้งการตกตะกอนเท่ากับ HI titer

4.5.2 แบ่งไก่ออกเป็น 10 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ซึ่งแต่ละกลุ่มจะทำการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่	แบคทีเรีย	ยาต้านจุลชีพ
1	98	amoxicillin
2	111492	amoxicillin
3	B1E1	amoxicillin
4	98	doxycycline
5	111492	doxycycline
6	B1E1	doxycycline

7	98	-	Positive control
8	111492	-	
9	B1E1	-	
10	-	-	Negative control

4.6 สังเกตอาการโรคหวัดหน้าบวม (clinical sign score) ในไก่ทดลองทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน หลังการให้ยา โดยให้คะแนนดังนี้ 0 = ไม่แสดงอาการ 1 = มีน้ำมูกและหน้าบวมเล็กน้อย 2 = มีน้ำมูกและหน้าบวมปานกลาง 3 = มีน้ำมูกมากและหน้าบวมมาก และ 4 = มีน้ำมูกมาก หน้าบวม มาก และหงอน เหนียงบวม (Soriano et al., 2004b)

4.7 หลังจากการให้เชื้อ 8 วันจะทำการเมตตาฆาตและเก็บตัวอย่างจากการป้ายเชื้อจากไซนัสใต้ตา (infraorbital sinus) แล้วนำมา streak ลงบนอาหารวุ้นเลือดแกะ ขีดคาดทับด้วย *Staphylococcus aureus* บ่มเชื้อในโถเทียน จากนั้นนำโถไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.8 ตรวจยืนยันเชื้อ *A. paragallinarum* ด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างจากการป้ายเชื้อจากไซนัสใต้ตา โดยนำตัวอย่างมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีข้อ 3.1 และใช้ oligonucleotide primers สำหรับ HPG-2 PCR (Chen et al., 1996) ดังนี้ N1 5’ TGA GGG TAG TCT TGC ACG CGA AT 3’ , R1 5’ CAA GGT ATC GAT CGT CTC TCT ACT 3’ โดยใช้น้ำกลั่นเป็น negative control และ *A. paragallinarum* strain 221 เป็น positive control นำเข้าเครื่อง PCR (BIOER) โดยใช้ cycle ดังนี้ 1) Initial denaturation ที่ 98 องศาเซลเซียส 2 นาที 30 วินาที 2) Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 3) Annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส 1 นาที 4) Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 5) ทำซ้ำในขั้นตอน 2-4 เป็นจำนวน 25 รอบ 6) Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบต่อไป แล้วนำ PCR product มาวิเคราะห์โดยวิธี electrophoresis ใน 0.7% agarose gel (Invitrogen™)

4.9 ตรวจหายีนดื้อยากลุ่ม penicillin และ tetracycline จากตัวอย่างจากการป้ายเชื้อจากไซนัสใต้ตา ตามวิธีข้อ 3

5 การวิเคราะห์ผล

ผลของค่า MIC, HI test และ การตรวจหายีนดื้อต่อยาต้านจุลชีพนำมาวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา (Descriptive Statistics)

Clinical sign score ในแต่ละวันและแต่ละกลุ่มการทดลอง จะคำนวณเป็นค่าเฉลี่ย คือ

$$\text{mean daily clinical sign score} = \frac{\text{ผลรวม clinical sign score แต่ละวันของไก่ทั้งหมดในกลุ่ม}}{\text{จำนวนไก่ทั้งหมดในกลุ่ม}}$$

ใช้ Kruskal-wallis test เปรียบเทียบความแตกต่างของ mean daily clinical sign score ของไก่แต่ละกลุ่ม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ

เชื้อ *A. paragallinarum* ที่ทดสอบส่วนมากจะดื้อต่อยา oxytetracycline (13 isolate, ร้อยละ 72.2) รองลงมาคือ doxycycline streptomycin ciprofloxacin erythromycin sulfamethoxazole-trimethopri (12 isolate ร้อยละ 66.7) gentamicin (10 isolate ร้อยละ 55.6) enrofloxacin, spectinomycin (9 isolate ร้อยละ 50) ampicillin และ ceftiofur (1 isolate ร้อยละ 5.6) ดังแสดงในตารางที่ 4-1 ทั้ง 18 isolate ที่ทำการทดลองมีความไวต่อยา amoxicillin และพบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากกว่า 3 ชนิดขึ้นไป 12 isolate (ร้อยละ 66.7) สเตรน 98 และ 111492 ไม่พบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพทุกชนิดในการทดลองนี้ เมื่อสังเกตการดื้อต่อยาต้านจุลชีพแยกตามซีโรวาร์จะพบว่าซีโรวาร์ A มีการดื้อยาน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับซีโรวาร์ B และ C ยกเว้นสเตรน CHS0809 และ CMU1009 ซึ่งแสดงในตารางที่ 4-2 และซีโรวาร์ A มีช่วงของค่า MIC กว้าง เพราะเชื้อสเตรนอื่นๆ ในซีโรกรุ๊ป A มีค่า MIC ต่ำ แต่ค่า MIC ของสเตรน CHS0809 และ CMU1009 สูง ส่วนช่วงของค่า MIC ในซีโรกรุ๊ป B แล C นั้นจะแคบเพราะเชื้อต่างๆ ในซีโรกรุ๊ปทั้งสองนี้มีค่าที่สูงและใกล้เคียงกัน (ดังแสดงในตารางที่ 4-3)

ตารางที่ 4-1 ผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC)

ยาต้านจุลชีพ	Breakpoints	จำนวนสเตรนในแต่ละค่า MIC (µg/ml)											ดื้อยา
		≤0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256	(%)
ampicillin[a]	≥8	8	6	1	1	1	1	-	-	-	-	-	5.6
amoxicillin[b]	≥8	14	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0
ceftiofur[b]	≥4	11	4	2	-	1	-	-	-	-	-	-	5.6
Cephalexin	ND[c]	3	-	2	5	3	5	-	-	-	-	-	ND[c]
doxycycline[b]	≥8	3	3	-	-	-	-	2	-	5	5	-	66.7
oxytetracycline[b]	≥8	1	-	-	1	3	-	-	1	-	-	12	72.2

ciprofloxacin[b]	≥2	2	3	1	1	1	-	1	-	2	3	4	66.7
enrofloxacin[b]	≥1	9	-	-	-	2	0	5	-	1	-	1	50
sulfamethoxazole–trimethoprim[a]	≥2	4	-	2	-	-	-	-	-	-	2	10	66.7
erythromycin[a]	≥4	2	1	2	1	-	1	1	1	3	4	1	66.7
gentamicin[b]	≥8	3	2	1	-	2	2	5	2	1	-	-	55.6
spectinomycin[b]	≥64	2	-	-	-	-	1	3	3	4	3	2	50
streptomycin[a]	≥8	3	-	2	1	-	-	1	-	-	-	11	66.7
nalidixic acid	ND[c]	2	2	2	1	1	1	-	1	3	2	3	ND[c]

[a] breakpoints ของค่า MIC จากการศึกษาของ Blackall (1988).

[b] breakpoints ของค่า MIC จากรายงานของ CLSI (2011).

[c] Not defined.

ตารางที่ 4-2 ความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *A. paragallinarum*

สเตรน	ซีโรวาร์	ที่มาของเชื้อ	Antimicrobial resistant profile
98	A	NIAH	
423	A-2	NIAH	ERT
746	A	NIAH	OXT
102090	A	NIAH	DOX/OXT/SXT/STR
111492	A	NIAH	
112179	A	NIAH	DOX/OXT/CIP/SXT/ERT/GEN/SPC/STR
B1E1	A-2	NIAH	STR
IR1	A-2	ชัยภูมิ	CIP/ENR
CHS0809	A	ฉะเชิงเทรา	DOX/OXT/CIP/SXT/ERT/GEN/SPC/STR
CMU1009	A	เชียงใหม่	AMP/CEF/DOX/OXT/CIP/SXT/ERT/ENR/STR
1687	B	NIAH	DOX/OXT/CIP/SXT/ERT/GEN/SPC/STR
102984	B	NIAH	DOX/OXT/CIP/ENR/SXT/ERT/GEN/SPC/STR
211108	B	ชลบุรี	DOX/OXT/CIP/ENR/SXT/ERT/GEN/SPC/STR

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

CMA0509	B	เชียงใหม่	DOX/OXT/CIP/ENR/SXT/ERT/GEN/SPC/STR
F1CM0809	B	เชียงใหม่	DOX/OXT/CIP/ENR/SXT/ERT/GEN/STR
102943	C	NIAH	DOX/OXT/CIP/ENR/SXT/ERT/GEN/SPC/STR
102947	C-2	NIAH	DOX/OXT/CIP/ENR/SXT/ERT/GEN/SPC/STR
115757	C	NIAH	DOX/OXT/CIP/ENR/SXT/ERT/GEN/SPC/STR

AMP: ampicillin; DOX: doxycycline; OXT: oxytetracycline; CEF: ceftiofur; CIP: ciprofloxacin; ENR: enrofloxacin; SXT: sulfamethoxazole–trimethoprim ; ERT: erythromycin; GEN: gentamicin: SPC: spectinomycin; STR: streptomycin

ตารางที่ 4-3 ช่วงของค่า MIC ในเชื้อแต่ละซีโรกรุ๊ป

ยาต้านจุลชีพ	**ช่วงของค่า MIC ในเชื้อแต่ละซีโรกรุ๊ป**		
	ซีโรกรุ๊ป A	**ซีโรกรุ๊ป B**	**ซีโรกรุ๊ป C**
ampicillin	≤0.25-8	≤0.25-2	0.5-1
amoxicillin	≤0.25	≤0.25-1	≤0.25-1
ceftiofur	≤0.25-≥256	≥256	≥256
cephalexin	≤0.25-8	2-4	4-8
doxycycline	≤0.25-128	64-128	64-128
oxytetracycline	≤0.25-≥256	≥256	≥256
ciprofloxacin	≤0.25-≥256	16-≥256	64-≥256
enrofloxacin	≤0.25-≥256	≤0.25-64	4-16
sulfamethoxazole–trimethoprim	≤0.25-≥256	≥256	≥256
erythromycin	≤0.25-64	64-128	128-≥256
gentamicin	≤0.25-32	8-16	8-64
spectinomycin	≤0.25-128	32-≥256	64-≥256
streptomycin	≤0.25-≥256	≥256	≥256
nalidixic acid	≤0.25-≥256	4-≥256	64-≥256

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. การตรวจหายีนดื้อยา

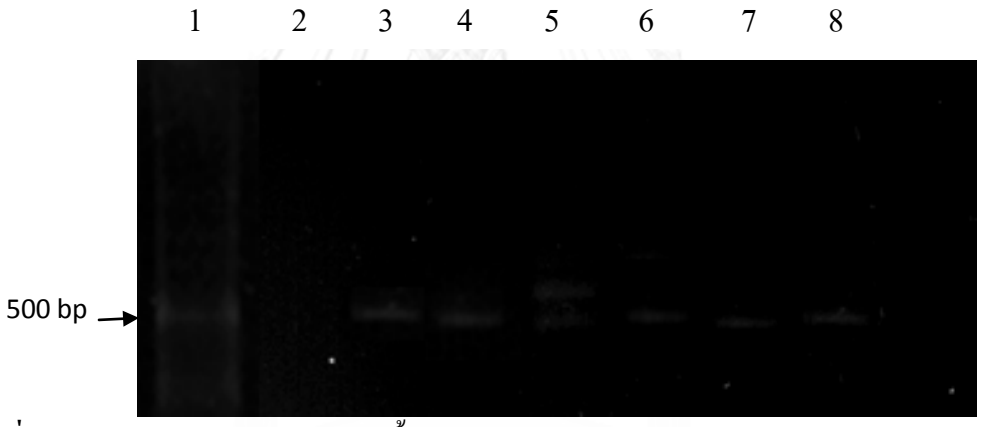
ผลการตรวจหายีนดื้อยาพบยีน *tet(A)* (ภาพที่ 4-1) *tet(B) tet(M)* และ *erm(A)* มากที่สุด (13 isolate, ร้อยละ 72.2) รองลงมาคือยีน *erm(B)* (12 isolate, ร้อยละ 66.7) *sul2* (ภาพที่ 4-2) (3 isolate, ร้อยละ 16.7) และ bla_{ROB-1} (1 isolate, ร้อยละ 5.6) พบยีนดื้อยาอย่างน้อย 1 ยีนจาก 13 isolate (ร้อยละ 72.2) และ มียีนดื้อยาตั้งแต่ 3 ยีนขึ้นไป 12 isolate (ร้อยละ 66.7) (ตารางที่ 4-4)

เมื่อมาดูที่ความสัมพันธ์ระหว่างแสดงความไวรับต่อยาต้านจุลชีพและยีนดื้อยาที่พบ ดังแสดงในตารางที่ 4-2 และ 4-4 พบว่า เชื้อ 12 isolate (ร้อยละ 66.7) ที่ดื้อต่อยากลุ่ม tetracycline (doxycycline และ oxytetracycline) จากการทดสอบ MIC จะมียีน *tet(A) tet(B)* และ *tet(M)* แต่จะมี 1 isolate ที่ดื้อต่อยา oxytetracycline แต่ไม่พบยีน *tet(A) tet(B)* และ *tet(M)* พบการดื้อต่อยา erythromycin 12 isolate (ร้อยละ 66.7) ซึ่งในจำนวนนี้มี 11 isolate ที่พบยีน *erm(A)* และ *erm(B)* และ 1 isolate ที่พบเพียงยีน *erm(A)* เชื้อ 11 isolate (ร้อยละ 61.1) ดื้อต่อยา sulfamethoxazole-trimethoprim แต่มีเพียง 3 isolate (ร้อยละ 16.7) ที่พบยีน *sul2* และเชื้อ 1 isolate (ร้อยละ 5.6) ที่ดื้อต่อยา ampicillin และพบยีนดื้อยา bla_{ROB-1} และเมื่อสังเกตการพบยีนดื้อยาแยกตามซีโรกรุ๊ปพบว่า ซีโรกรุ๊ป A มียีนดื้อยาน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับซีโรกรุ๊ป B และ C ยกเว้น สเตรน CHS0809 และ CMU1009 เช่นเดียวกันกับผลการดื้อยาจากวิธี MIC

ตารางที่ 4-4 ผลการตรวจพบยีนดื้อยาของเชื้อ *A. paragallinarum*

สเตรน	ซีโรวาร์	ที่มาของเชื้อ	ยีนดื้อยาที่พบ
98	A	NIAH	
423	A-2	NIAH	*erm(A)*
746	A	NIAH	
102090	A	NIAH	*tet(A) /tet(B)/tet(M)*
111492	A	NIAH	
112179	A	NIAH	*tet(A) /tet(B)/tet(M)/erm(A)/erm(B)*
B1E1	A-2	NIAH	
IR1	A-2	ชัยภูมิ	
CHS0809	A	ฉะเชิงเทรา	*tet(A) /tet(B)/tet(M)/erm(A)/erm(B)*

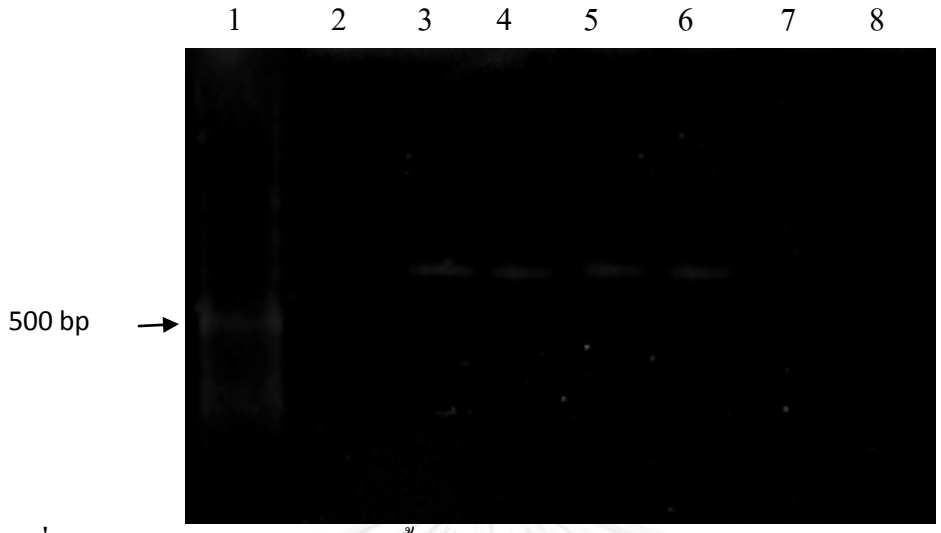
CMU1009	A	เชียงใหม่	*tet(A)/tet(B)/tet(M)/erm(A)/erm(B)/bla*$_{ROB-1}$
1687	B	NIAH	*tet(A) /tet(B)/tet(M)/erm(A)/erm(B)*
102984	B	NIAH	*tet(A) /tet(B)/tet(M)/erm(A)/erm(B)*
211108	B	ชลบุรี	*tet(A) /tet(B)/tet(M)/erm(A)/erm(B)*
CMA0509	B	เชียงใหม่	*tet(A) /tet(B)/tet(M)/erm(A)/erm(B)*
F1CM0809	B	เชียงใหม่	*tet(A) /tet(B)/tet(M)/erm(A)/erm(B)*
102943	C	NIAH	*tet(A) /tet(B)/tet(M)/erm(A)/erm(B)/sul2*
102947	C-2	NIAH	*tet(A) /tet(B)/tet(M)/erm(A)/erm(B)/sul2*
115757	C	NIAH	*tet(A) /tet(B)/tet(M)/erm(A)/erm(B)/sul2*



ภาพที่ 4-1 การตรวจพบยีน *tet(A)* ของเชื้อ *A. paragallinarum*

แถว 1 : 100 bp marker แถว 2 : negative control แถว 3 : positive control แถว 4 : สเตรน 102090 แถว 5 : สเตรน CHS0809 แถว 6 : สเตรน 211108 แถว 7 : สเตรน 102943 แถว 8 : สเตรน 102947

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 4-2 การตรวจพบยีน *sul2* ของเชื้อ *A. paragallinarum*

แถว 1 : 100 bp marker แถว 2 : negative control แถว 3 : positive control แถว 4 : สเตรน 102943 แถว 5 : สเตรน 102947 แถว 6 : สเตรน 115757 แถว 7 : สเตรน CMA0509 แถว 8 : สเตรน 1687

3. การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพในไก่

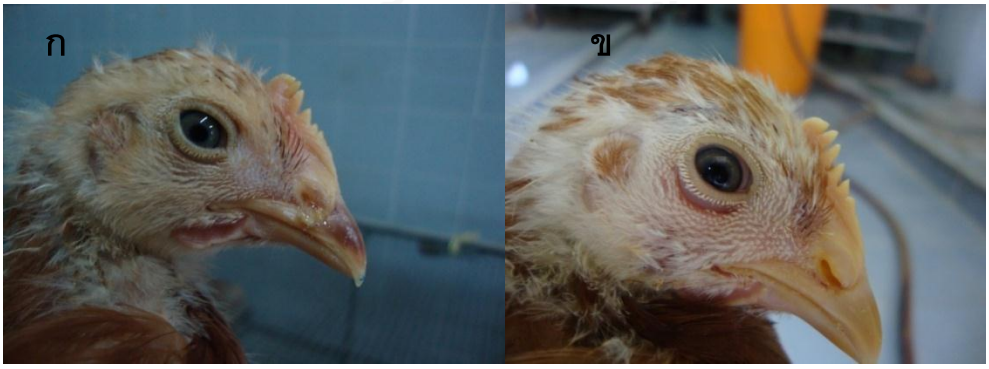
เชื้อ *A. paragallinarum* ที่ไก่ได้รับทำการเลือกจากเชื้อที่ไวรับต่อยา amoxicillin และ doxycycline และต้องไม่พบยีนดื้อยาในกลุ่ม penicillin (bla_{ROB-1}) และกลุ่ม tetracycline (*tet(A) tet(B)* and *tet(M)*) ซึ่งเชื้อที่เลือกมา 3 สเตรน คือ 98 111492 และ B1E1

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อ *A. paragallinarum* ด้วยวิธี HI test จากซีรั่มไก่ก่อนที่จะทำการทดลอง พบว่าไม่พบแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ *A. paragallinarum*

อาการทางคลินิกทำการให้คะแนนตามภาพที่ 4-3 หลังจากไก่ได้รับเชื้อไป 24 ชั่วโมง ตรวจพบอาการหวัดหน้าบวมในไก่ โดยมีอาการมีน้ำมูก หน้าบวม เยื่อตาอักเสบ ดังภาพที่ 4-4 โดยค่าเฉลี่ยคะแนนอาการทางคลินิกของไก่ที่ได้รับยา amoxicillin และ doxycycline ของเชื้อทุกสเตรนที่ไก่ได้รับมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมบวก (positive control) ตั้งแต่หลังได้รับยา (4 วันหลังรับเชื้อ) (ตารางที่ 4-5) ไปจนจบการทดลอง ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อสเตรน 98 และรักษาด้วยยา amoxicillin และ doxycycline มีค่าเฉลี่ยคะแนนอาการทางคลินิกต่ำกว่ากลุ่มควบคุมบวกอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 4 หลังได้รับเชื้อ ($p<0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับเชื้อสเตรน 111492 และรักษาด้วยยา amoxicillin และ doxycycline มีค่าเฉลี่ยคะแนนอาการทางคลินิกต่ำกว่ากลุ่มควบคุมบวกอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 5

และ 6 หลังได้รับเชื้อ (p<0.05) และกลุ่มที่ได้รับเชื้อสเตรน B1E1 และรักษาด้วยยา amoxicillin มีค่าเฉลี่ยคะแนนอาการทางคลินิกต่ำกว่ากลุ่มควบคุมบวกอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 4 หลังได้รับเชื้อ (p<0.05) แต่กลุ่มที่ได้รับยา doxycycline ค่าเฉลี่ยคะแนนอาการทางคลินิกต่ำกว่ากลุ่มควบคุมบวก แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ภาพที่ 4-3 คะแนนอาการทางคลินิกที่ใช้ในการบันทึก 0 = ไม่แสดงอาการ (ก) 1 = มีน้ำมูกและหน้าบวมเล็กน้อย (ข) 2 = มีน้ำมูกและหน้าบวมปานกลาง (ค) 3 = มีน้ำมูกมากและหน้าบวมมาก (ง)



ภาพที่ 4-4 อาการทางคลินิกที่พบ มีน้ำมูก (ก) หน้าบวมและเยื่อตาอักเสบ (ข)

ผลการเพาะเชื้อจากสิ่งคัดหลั่งจาก infraorbital sinus ในไก่ที่ถูกเมตตาฆาตในวันที่ 8 หลังได้รับเชื้อพบว่าในกลุ่มที่ได้รับยา amoxicillin และ doxycycline พบเชื้อ *A. paragallinarum* จำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมบวก แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อนำเชื้อที่เพาะได้นี้มาตรวจหายีนดื้อยากลุ่ม penicillin และ tetracycline ก็ไม่พบยีนดื้อยาทั้งสองกลุ่ม โดยค่าเฉลี่ยคะแนนอาการทางคลินิกและผลการแยกเชื้อจาก infraorbital sinus แสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 คะแนนอาการทางคลินิกและผลการแยกเชื้อจาก infraorbital sinus

		Mean clinical sign scores[A]							การแยกเชื้อจาก infraorbital sinus[B]
		จำนวนวันหลังได้รับเชื้อ							
สเตรน	ยาต้านจุลชีพ	1	2	3	4	5	6	7	
98	amoxicillin	0.8[a]	1.1[a]	1.1[a]	0.7[b]	0.5[a]	0.5[a]	0[a]	6/10[a]
98	doxycycline	0.8[a]	1.1[a]	1.4[a]	0.9[b]	0.8[a]	0.3[a]	0.2[a]	8/10[a]
98	-	0.8	0.8	1.2	1.6	1	0.9	0.3	9/10[a]
111492	amoxicillin	0.8[a]	1.4[a]	1.2[a]	0.6[a]	0.2[b]	0.2[b]	0.2[a]	4/10[a]
111492	doxycycline	0.8[a]	1.4[a]	1.2[a]	0.6[a]	0.2[b]	0.2[b]	0.2[a]	7/10[a]
111492	-	0.7	0.8	1	1.1	1.2	0.9	0.6	8/10[a]
B1E1	amoxicillin	1.1[a]	1.2[a]	1.6[a]	0.8[b]	0.7[b]	0.4[a]	0.3[a]	4/10[a]
B1E1	doxycycline	0.8	1.2	1.8	1.2	0.8	0.5	0.4	6/10[a]
B1E1	-	0.9	1.2	1.6	1.6	1.2	0.9	0.7	9/10[a]
-	-	0[b]	0[b]	0[b]	0[b]	0[b]	0[b]	0[b]	0/10[b]

[A]Mean clinical sign scores ในแถวเดียวกันที่มีตัวยกที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และ[B]การแยกเชื้อจาก infraorbital sinus ในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวยกที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผล

จากการศึกษานี้ ความไวรับต่อยาต้านจุลชีพจากการทดสอบ MIC ที่พบเชื้อ *A. paragallinarum* จำนวนมากดื้อต่อยา oxytetracycline doxycycline streptomycin ciprofloxacin erythromycin และ sulfamethoxazole-trimethoprim ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้านี้ (Reece and Coloe, 1985; Blackall, 1988; Poernomo et al., 2000; Hsu et al., 2007; Chukiatsiri et al., 2012) และ เชื้อ *A. paragallinarum* จำนวนมาก (66.7%) ดื้อต่อยาต้านจุลชีพตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไป ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Hsu และคณะ (2007) แสดงว่าเชื้อ *A. paragallinarum* ที่พบในประเทศไทยเกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด โดยผลความไวรับต่อยาต้านจุลชีพในซีโรกรุ๊ป C มีค่าสูงกว่า ซีโรกรุ๊ป A และ B หากจะอ้างอิงถึงความรุนแรงของซีโรกรุ๊ปนั้นจะตรงกับการศึกษาของ Bragg ที่พบว่าซีโรกรุ๊ป C มีความรุนแรงมากกว่า ซีโรกรุ๊ป A (Bragg, 2005) และบทบาทสำคัญของ Hemagglutinin (HA) antigen ต่อความรุนแรงของเชื้อ Page ซีโรกรุ๊ป C (Yamaguchi et al., 1993) ส่วนการที่ซีโรกรุ๊ป A มีช่วงของค่า MIC กว้าง เนื่องจากค่า MIC ของสเตรน CHS0809 และ CMU1009 สูงต่างจากเชื้อซีโรกรุ๊ป A สเตรนอื่นๆ อาจเกิดจากเชื้อทั้งสองสเตรนนี้มีแหล่งที่มาต่างจากสเตรนอื่น ทำให้มีความแตกต่างของการได้รับยาต้านจุลชีพของไก่ที่เป็นที่มาของเชื้อตัวอย่างเหล่านี้

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Chukiatsiri และคณะ (2012) ซึ่งเป็นการศึกษาความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *A. paragallinarum* สเตรนเดียวกันแต่ใช้วิธี disk diffusion พบว่ามีผลที่สอดคล้องกันในยาหลายชนิดคือ ampicillin amoxicillin doxycycline streptomycin nalidixic acid enrofloxacin erythromycin sulfamethoxazole–trimethoprim ceftiofur cephalexin และ oxytetracycline และผลที่แตกต่างในยา ciprofloxacin gentamicin และ spectinomycin ดังนั้นวิธีการในการตรวจความไวรับต่อยาต้านจุลชีพที่แตกต่างทำให้ผลที่ได้มาแตกต่างกัน ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Watson และคณะในปี 1991 ที่พบความแตกต่างของผลการทดสอบความไวรับของ

ยาต้านจุลชีพระหว่างวิธี MIC และ วิธี disk diffusion พบว่ามีผลการทดสอบแตกต่างกันร้อยละ 31 ซึ่งอาจเกิดจากการอ่านผลของวิธี MIC จะใช้ breakpoint ซึ่งผลที่ได้จะมีเพียง sensitive และ resistant ส่วนการอ่านผลของวิธี disk diffusion ด้วย zone diameter ซึ่งแบ่งผลออกเป็น sensitive intermediate และ resistant โดยความแตกต่างก็อาจเกิดจากค่า intermediate (Watson et al., 1991)

ในการตรวจหายีนดื้อยาพบว่ายีนดื้อยาที่พบส่วนมากสอดคล้องกับผลความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ แต่มีเชื้อบางตัวที่มีการดื้อยาแต่ไม่พบยีนที่ดื้อต่อยาในกลุ่มนั้น ในกรณีของเชื้อสเตรน 746 ที่ดื้อต่อยา oxytetracycline แต่ไม่มี *tet(A) tet(B)* และ *tet(M)* อาจจะมียีนตัวอื่นที่ไม่ได้นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็นยีนที่ควบคุมการดื้อต่อยากลุ่ม tetracycline หรืออาจเกิดจากการใช้ breakpoint ในการอ่านผล MIC ที่อ้างอิงมาจากเชื้อ *Haemophilus influenza* ซึ่งไม่ได้มาจากเชื้อ *A. paragallinarum* โดยตรง ทำให้ค่าที่ได้อาจเกิดการคลาดเคลื่อนได้ ส่วนเชื้อดื้อต่อยา sulfamethoxazole-trimethoprim แต่มีเพียง 3 isolate ที่พบยีน *sul2* นั้นเกิดจากยา sulfamethoxazole-trimethoprim เป็นการผสมระหว่าง sulfamethoxazole กับ trimethoprim ดังนั้นเชื้อที่ไม่พบยีน *sul2* อาจจะดื้อต่อยา trimethoprim เพียงอย่างเดียว แต่การพบยีน *sul2* นี้ตรงกับการค้นพบ Plasmid pYMH5 ในเชื้อ *A. paragallinarum* ซึ่งควบคุมการดื้อยา sulfonamide และยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ ได้แก่ streptomycin, kanamycin และ neomycin (Hsu et al., 2007)

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า MIC กับจำนวนยีนดื้อยาที่พบในแต่ละซีโรกรุ๊ป พบว่ามีความสัมพันธ์กัน โดยซีโรกรุ๊ป A มีค่า MIC ต่ำ จะตรวจพบปริมาณยีนดื้อยาน้อย ส่วนซีโรกรุ๊ป B และ C ที่มีค่า MIC สูง จะตรวจพบยีนดื้อยาจำนวนมากกว่า แสดงว่าค่า MIC จะบ่งบอกได้ว่าเชื้อน่าจะมียีนดื้อยามากหรือน้อย

การทดลองในไก่พบว่ายาต้านจุลชีพซึ่งได้แก่ amoxicillin และ doxycycline ช่วยลดอาการทางคลินิกของไก่ที่ได้รับเชื้อ *A. paragallinarum* ที่ไม่มียีนดื้อยาและไม่ดื้อต่อยาทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งตรงกับการรายงานก่อนหน้านี้ว่า หลังจากไก่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมและต่อเนื่องเป็นเวลา 5-7 วัน อาการทางคลินิกควรจะหายไป (Blackall and Hinz, 2008) และจากรายงานสัตว์ป่วยของไก่ไข่ที่ติดเชื้อหวัดหน้าบวม เมื่อรักษาด้วยยาที่เชื้อไม่ดื้อต่อเนื่อง 7 วัน (กฤดาและนิวัตร, 2550) พบว่าอาการมีน้ำมูกและหน้าบวมลดลง แต่อาการทางคลินิกที่ลดลงนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมบวกเพียง 1-2 วัน ของการทดลองที่เป็นเช่นนี้อาจเป็น

เพราะในวันที่ 7 หลังรับเชื้อไก่ก็เริ่มไม่แสดงอาการทางคลินิกแล้ว ซึ่งตรงกับคำอธิบายว่าในกรณีที่ไม่รุนแรงอาการทางคลินิกจะหายไปภายใน 10 วัน (Blackall and Hinz, 2008) และตรงกับการศึกษาของ Zhoa และคณะ (2009) ที่ศึกษารูปแบบการติดเชื้อของโรคหวัดหน้าบวมในไก่ พบว่าอาการทางคลินิกจะลดลงที่ 6 วันหลังได้รับเชื้อและหมดไปที่ 8 วันหลังรับเชื้อ และเมื่อดูข้อมูลไก่รายตัวในกลุ่มควบคุมบวกของเชื้อสเตรน 111492 จะพบว่ามีไก่หนึ่งตัวที่ไม่แสดงอาการทางคลินิกตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง และไม่พบเชื้อใน infraorbital sinus แสดงว่าความสามารถในการแพร่กระจายของเชื้อสเตรน 111492 ต่ำ

ในส่วนของผลการเพาะเชื้อจากสิ่งคัดหลั่งจาก infraorbital sinus ที่ไม่ค่อยแตกต่างจากกลุ่มควบคุมบวก สามารถพบเชื้อจากสิ่งคัดหลั่งจาก infraorbital sinus ถึงแม้ไก่นั้นจะไม่แสดงอาการทางคลินิก อาจเป็นเพราะตัว infraorbital sinus อยู่ลึกและมีหลอดเลือดไปเลี้ยงน้อยทำให้ยาเข้าไปถึงได้ยากทำให้ปริมาณยาที่ไก่ได้รับเข้าไปถึงไซนัสได้น้อย ซึ่งจากรายงานข้างต้นของ Blackall และ Hinz และ กฤดาและนิวัตร รายงานว่ายาช่วยให้อาการทางคลินิกหายไปได้แต่ไม่ได้กล่าวว่าจะทำลายเชื้อในไซนัสให้หมดไปได้ ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นว่าไก่ที่ติดเชื้อ *A. paragallinarum* ที่ไม่ดื้อยา และไม่มียีนดื้อยา และเมื่อได้รับยาอย่างต่อเนื่อง จะช่วยรักษาอาการทางคลินิกได้ (Blackall and Hinz, 2008; กฤดาและนิวัตร, 2550) แสดงว่าการแสดงออกของการดื้อต่อยาในตัวไก่สัมพันธ์กับความไวรับของยาต้านจุลชีพและยีนดื้อยาที่ปรากฏ และจากผลการทดลองข้างต้นยาต้านจุลชีพช่วยทำให้อาการทางคลินิกลดลง แต่เชื้อใน infraorbital sinus ยังมีอยู่ เพราะฉะนั้นในการกำจัดเชื้อไม่อาจอาศัยการใช้ยาต้านจุลชีพเพียงอย่างเดียว ต้องทำควบคู่ไปกับการจัดการที่ดี ทำการกำจัดไก่ที่ติดเชื้อหรือที่หายจากโรคซึ่งเป็นแหล่งของเชื้อหวัดหน้าบวมออกจากฝูง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

กฤดา ชูเกียรติศิริ และนิวัตร จันทร์ศิริพรชัย. 2550. รายงานสัตว์ป่วย: การระบาดโรคหวัดหน้าบวมในฟาร์มไก่ไข่. สัตวแพทยสาร. 58(3): 98-107.

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2536. โรคอินเฟคเชียส คอไรซ่า. ใน: โรคติดเชื้อในไก่. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ หน้า 74-86.

มาลินี ลิ้มโภคา. 2525. เชื้อดื้อยาและองค์ประกอบที่ทำให้เกิดการดื้อยา. ใน: การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ (ยาปฏิชีวนะ ยาซัลฟา และสารปฏิชีวนะ). โรงพิมพ์จรัลสนิทวงศ์ กรุงเทพฯ หน้า 63-73.

Barbosa TM, Scott KP and Flint HJ 1999. Evidence for recent intergeneric transfer of a new tetracycline resistance gene, tet(W), isolated from Butyrivibrio fibrisolvens, and the occurrence of tet(O) in ruminal bacterial. Environ Microbiol. 1(1): 53–64.

Blackall PJ 1988. Antimicrobial drug Resistance and the Occurrence of Plasmids in Haemophilus paragallinarum. Avian Dis. 32(4): 742-747.

Blackall PJ 1999. Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic Options. Clin Micro Rev. 12(4): 627-632.

Blackall PJ and HinZ KH 2008. Infectious coryza and related diseases. In: Poultry diseases. 6th ed. M Pattison, P McMullin, JM Bradbury and Alexander (eds). UK: WB saunders Company Ltd. 155-159.

Blackall PJ and Reid GG 1982. Further characterization of Haemophilus paragallinarum and Haemophilus avium. Vet Microbiol. 7:359-367.

Blackall PJ and Soriano EV 2008. Infectious Coryza and related bacterial infections. In: Disease of poultry. 12th ed. YM Saif (ed). USA: Blackwell Publishing. 789-798.

Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, Blackall LL and Bisgaard M 2005. Reclassification of Pasteurella gallinarum, [Haemophilus] paragallinarum, Pasteurella avium and Pasteurella volantium as Avibacterium gallinarum gen. nov., comb. nov., Avibacterium paragallinarum comb. nov., Avibacterium avium comb. nov. and Avibacterium volantium comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 55(Pt 1): 353-362.

Blackall PJ, Eves LE and Rogers DG 1990. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for Haemophilus paragallinarum in the Kume hemagglutinin Scheme. J Clin Microbiol. 28(6): 1185-1187.

Bragg RR 2005. Effect of differences in virulence of different serovars of

Haemophilus paragallinarum on perceived vaccine efficacy. Onderstepoort J Vet Res. 72(1): 1-6.

Bragg RR, Gunter NJ, Coetzee L and Verschoor JA 1997. Monoclonal antibody characterization of reference isolates of different serogroups of Haemophilus paragallinarum. Avian Pathol. 26 (4): 749-764.

Chen X, Miflin JK, Zhang P and Blackall PJ 1996. Development and application of DNA probes and PCR tests for Haemophilus paragallinarum. Avian Dis. 40(2): 398-407.

Chen X, Zhang P, Blackall PJ and Feng W 1993. Characterization of Haemophilus paragallinarum isolates from China. Avian Dis. 37(2): 574-576.

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 PJ, Yuwatanichsampan S and Chansiripornchai N 2012. Serovar identification, antimicrobial sensitivity, and virulence of Avibacterium paragallinarum isolated from chickens in Thailand. Avian Dis. 56(2): 359-364.

Chukiatsiri K, Sasipreeyajan J, Neramitmansuk W and Chansiripornchai N 2009. Efficacy of autogenous killed vaccine of Avibacterium paragallinarum. Avian Dis. 53(3): 382-386.

Chung WO, Werckenthin C, Schwarz S and Roberts MC 1999. Host range of the ermF rRNA methylase gene in bacteria of human and animal origin. J Antimicrob Chemother. 43(1): 5–14.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. Performance standards for antimicrobial suseptibility testing; Twenty-First Informational Supplement. 31(1): 88-134.

Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Buckridge S and Felmingham D 2005. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 b-lactamases in Haemophilus influenzae. J Antimicrob Chemother. 56(1): 773–776.

García A, Romo F, Orti AM and Blackall PJ 2008. The vaccination-challenge trial: the gold standard test to evaluate the protective efficacy of infectious coryza vaccines. Avian Pathol. 37(2):183-186.

Hsu YM, Shieh HK, Chen WH, Sun TY and Shiang JH 2007. Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles and haemocin activities of Avibacterium paragallinarum strains. Vet Microbiol. 124(3-4): 209-218.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Jacobs AAC, Berg KVD and Malo A 2003. Efficacy of a new tetravalent coryza vaccine against emerging variant type B strains. Avian Pathol. 32(3): 265-269.

Jacobs AAC, Cuenen W and Storm PK 1992. Efficacy of a trivalent Haemophilus paragallinarum vaccine compared to bivalent vaccines. Vet Microbiol. 32(1): 43-49.

Kehrenberg C, Walker RD, Wu CC and Schwarz S 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Pasteurellaceae. In: Antimicrobial Resistant in bacteria of animal origin. Frank M Aarestrup (ed.). USA: ASM Press. 167-181.

Kume K, Sawata A, Nakai T and Matsumoto M 1983. Serological classification of Haemophilus paragallinarum with a haemagglutinin system. Clin Microbiol. 17(6): 958-964.

Lanz R, Kuhnert P and Boerlin P 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical Escherichia coli from different animal species in Switzerland. Vet Microbiol. 91(1): 73–84.

Matter D, Rossano A, Limat S, Vorlet-Fawer L, Brodard I and Perreten V 2007. Antimicrobial resistance profile of Actinobacillus pleuropneumoniae and Actinobacillus porcitonsillarum. Vet Microbiol. 122(1-2): 146-156.

McFarland J 1907. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. Journal of the American Medical Association. 14: 1176-1178.

Miflin JK, Chen X, Bragg BR, Welgemoed JM Greyling JM, Horner RF and Blackall PJ 1999. Confirmation that PCR can be used to identify both NAD-dependent and NAD-independent Haemophilus paragallinarum. Onderstepoort J Vet Res. 66(1): 55-57.

Mouahid M, Bisgaard M, Morley AJ, Mutters R and Mannheim W 1992. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of Haemophilus paragallinarum. Vet Microbiol. 31(4): 363-368.

Page LA 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. 78(11): 759-762.

Reece RL and Coloe PJ 1985. The resistance to anti-microbial agents of bacteria isolates

CHULALONGKORN UNIVERSITY

from pathological conditions of birds in Victoria, 1978 to 1983. Aus Vet Journal. 62(11): 379-381.

Rimler RB 1979. Studies of the Pathogenic Avian Haemophili. Avian Dis. 23(4): 1006-1018.

Soriano VE, Garduno ML, TelleZ G, Rosa, PF, Suarez-Guemes F and Blackall PJ 2004a. Cross-protection study of the nine serovars of Haemophilus paragallinarum in the Kume haemagglutinin scheme. Avian Pathol. 33(5): 506-511.

Soriano VE, Longinos GM, Fernandez RP, Velasquez QE, Ciprian CA, Salazar-Garcia F and Blackall PJ 2004b. Virulence of the nine serovar reference strains of Haemophilus paragallinarum. Avian Dis. 48(4): 886-9.

Soriano VE, Téllez G, Hargis BM, Newberry L, Salgado-Miranda C and Vázquez JC 2004c. Typing of Haemophilus paragallinarum Strains by Using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Based Polymerase Chain Reaction. Avian Dis. 48(4): 890-895.

Sun H, Miao D, Zhang P, Gong Y and Blackall PJ 2007. A comparison of a blocking ELISA and a haemagglutination inhibition assay for the detection of antibodies to Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum in sera from artificially infected chickens. Biologicals. 35 (4): 317-320.

Watson CK, Cole JR Jr and Purse11 AR 1991. Comparison of a veterinary breakpoint minimal inhibitory concentration system and a standardized disk agar diffusion procedure for antimicrobic susceptibility testing. J Vet Diagn Invest 3:66-71.

Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y and Hayashi Y 1990. Pathogenicity and serovar-specific hemagglutinating antigens of Haemophilus paragallinarum serovar B strains. Avian Dis. 34(4): 964-968.

Yamaguchi T, Kobayashi M, Masaki S and Iritani Y 1993. Isolation and characterization of a Haemophilus paragallinarum mutant that lacks a hemagglutinating antigen. Avian Dis. 37(4): 970-976.

Zhao Q, Sun YN, Zhang XX, Kong YB, Xie ZJ, Zhu YL, Zhou EM and Jiang SJ 2009. Evaluation of two experimental infection models for Avibacterium paragallinarum. Vet Microbiol. 141(1-2): 68-72.

Chulalongkorn University

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

<u>อาหารวุ้นเลือด</u>

ส่วนประกอบ	500 มิลลิลิตร
Blood agar base	40 กรัม
น้ำกลั่น เติมให้ครบปริมาตร	500 มิลลิลิตร
เลือด	25 มิลลิลิตร

ละลาย Blood agar base ที่เติมน้ำกลั่นให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิลดลงอยู่ที่ 45-50 องศาเซลเซียส ทำการเติมเลือดแกะ ผสมให้เข้ากัน

<u>GC agar base</u>

ส่วนประกอบ	500 มิลลิลิตร
GC agar base (Lab M)	18 กรัม
Soluble haemoglobin (Oxoid)	5 กรัม
BBL™ IsovitaleX™	10 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น เติมให้ครบปริมาตร	

ละลาย GC agar base ในน้ำกลั่น 240 มิลลิลิตร และเตรียม 2% Soluble haemoglobin โดยละลาย Soluble haemoglobin 5 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร แล้วนำทั้งสองขวดไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิลดลงอยู่ที่ 45-50 องศาเซลเซียส ทำการผสมสารละลายทั้งสองขวดเข้าด้วยกันแล้วใส่ BBL™ IsovitaleX™

TMB

ส่วนประกอบ	500 มิลลิลิตร
Biosate Peptone (BBL, USA)	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Starch (Merk, Germany)	0.5 กรัม
Glucose (Merk, Germany)	0.25 กรัม
Yeast extract	0.05 กรัม
Distilled Water	100 มิลลิลิตร

ทำการชั่งสารที่เป็นของแห้งทั้งหมด แล้วเติมน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.5 นำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำการเติม supplement ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางด้านล่าง

Supplement	500 มิลลิลิตร
1% NADH (Sigma, USA)	1.25 มิลลิลิตร
0.05% Thiamine HCl	5 มิลลิลิตร
Heat Inactivated Chicken Serum (56°C/30 นาที)	5 มิลลิลิตร
O-A Complex[A]	25 มิลลิลิตร

[A]Oleic acid-Albumin (O-A) complex

สำหรับปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทำการเตรียม Sodium oleate solution โดยผสม Oleic acid0.3 มิลลิลิตร กับ 0.05 N NaOH 25 มิลลิลิตร (0.2 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร) และ Albumin solution โดยผสม Bovine serum albumin 23.75 กรัม กับ Normal saline 475 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน ปรับความเป็นกรด ด่างให้ได้ 6.8 แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

TMB/CM

เตรียมโดยการผสม TMB 100 มิลลิลิตร กับ 0.125 M $CaCl_2$ และ 0.01 M $MgCl_2$ อย่างละ 1 มิลลิลิตร

Mist Desicans

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้
ส่วนที่ 1	
Horse serum	300 มิลลิลิตร
ส่วนที่ 2	
Glucose	30 กรัม
Soy peptone	1.3 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

นำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนใช้นำส่วนที่ 1 และ 2 ผสมในอัตราส่วน 30 : 10

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทิพยาพร โนนคู่เขตโขง

วัน/เดือน/ปี เกิด

23 มกราคม พ.ศ. 2526

ประวัติการศึกษา

- จบการศึกษาระดับปริญญาตรีจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- จบการศึกษามหาบัณฑิตจากภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University