01/0090/36

นิพนธ์ต้นฉบับ

ซีโรไทป์ของเชื้อ พาสเจอเรลล่า มัลโตซิด้า ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอหิวาต์ในสัตว์ปีก

Certain serotypes of *Pasteurella multocida in poultry*

ทิพา ตันติเจริญยศ พรเพ็ญ พัฒนโสภณ**

*ทาคูโอะ ซาวาดะ***

Abstract: **Tipa Tanticharoenyos, Pornpen Pathanasophon, and Takuo Sawada. 1993. Certain serotypes of *Pasteurella multocida* in poultry : Thai J Hlth Resch 7(1): 21-26**

*One hundred twenty-four isolates of **Pasteurella multocida** from fowl cholera were serogrouped and serotyped by indirect hemagglutination test and gel diffusion precipitin test. The isolates represented 98, 23 and 3 flocks of ducks, chickens and other birds respectively. One hundred and one isolates (81.45%) had antigenic characteristic of capsular group A and 23 isolates (18.54%) were nonencapsulated. The somatic serotyping revealed serotype 1 as the most prevalent (92.74%); the other 7.26% were serotypes 3,4; 1,14; 2,5,10,14; 12; 14 and nontypable (2, 1, 1, 1, 1 and 3 isolates respectively). Eleven isolates contained more than one antigenic factors.*

Key words: ***Pasteurella multocida,*** *serogroup, serotype, poultry.*

บทคัดย่อ: **ทิพา ตันติเจริญยศ, พรเพ็ญ พัฒนโสภณ, และทาคูโอะ ซาวาดะ. 2536. ซีโรไทป์ของเชื้อพาสเจอเรลล่า มัลโตซิดา ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอหิวาต์ในสัตว์ปีก. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 7(1): 21-26**

*ศึกษาแค็ปซูล่าซีโรกรุ๊ป (capsular serogroup) และโซมาติกซีโรไทป์ (somatic serotype) ของเชื้อ **Pasteurella multocida** ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอหิตวาต์ในสัตว์ปีก จำนวน 124 สเตรน โดยวิธี indirect hemagglutination test และ gel diffusion precipitin test เชื้อแต่ละสเตรนเป็นตัวแทนของฝูงเป็ด ไก่ และนกอื่นๆ จำนวน 98, 23 และ 3 ฝูงตามลำดับ พบว่า 101 สเตรน (81.45%) มีแค็ปซูล่ากรุ๊ป A และอีก 23 สเตรน (18.54%) ไม่มีแค็ปซูล่าแอนติเจน โซมาติกซีโรไทป์ที่พบมากที่สุดคือ ซีโรไทป์ 1 จำนวน 115 สเตรน (92.74%) ที่เหลือ 7.26% เป็นซีโรไทป์ 3,4 จำนวน 2 สเตรน และซีโรไทป์ 1,14; 2,5,10,14; 12 และ 14 ซีโรไทป์ละ 1 สเตรน มี 3 สเตรน ไม่สามารถตรวจหาโซมาติกซีโรไทป์ได้จากซีรั่มมาตรฐาน และ 11 สเตรน มีปฏิกิริยากับซีรั่มมาตรฐานมากกว่า 1 ซีโรไทป์*

คำสำคัญ: *พาสเจอเรลล่า มัลโตซิดา, ซีโรกรุ๊ป, ซีโรไทป์, สัตว์ปีก*

* *กลุ่มงานแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ บางเขน กรุงเทพฯ 10900*

Bacteriology Section, National Animal Health and Production Institute, Bangkhen, Bangkok 10900.

** *มหาวิทยาลัยนิปปอนสัตวแพทย์และสัตวศาสตร์ โตเกียว 180 ประเทศญี่ปุ่น*

Nippon Veterinary and Animal Science University, Tokyo, 180, Japan.

01/0093/36

บทนำ

โรคอหิวาต์เป็นโรคระบาดที่ร้ายแรงโรคหนึ่งในสัตว์ปีก โดยมีเชื้อ *Pasteurella multocida* เป็นสาเหตุ และยังคงเป็นปัญหาในเกือบทุกประเทศทั่วโลก เป็นที่ทราบกันว่า แค็ปซูลเป็นส่วนที่ก่อโรค เนื่องจากเชื้อสเตรนที่เคยมีความรุนแรงเมื่อสูญเสียแค็ปซูลไปกลับลดความรุนแรงลง แต่ก็ยังคงมีความรุนแรงแตกต่างกันในสเตรนที่มีแค็ปซูล่าซีโรกรุ๊ปเดียวกัน แต่โซมาติกซีโรไทป์ (somatic serotype) แตกต่างกัน เชื่อกันว่าภายในซีโรกรุ๊ปเดียวกัน ซีโรโทป์มีส่วนสัมพันธ์กับความคุ้มโรค เช่น วัคซีนที่เตรียมจากซีโรไทป์หนึ่ง อาจให้ความคุ้มโรคข้ามซีโรไทป์ได้น้อยหรือไม่ให้ความคุ้มครองเลย โรคอหิวาต์สัตว์ปีกที่ระบาดในอเมริกาเป็นแค็ปซูล่าซีโรกรุ๊ป A ถึง 88.3% ที่เหลือเป็นแค็ปซูล่าซีโรกรุ๊ป B, D และ F (Rhoades and Rimler, 1987) โดยพบโซมาติกซีโรไทป์ 3, 4 มากที่สุด (Hofacre and Glissen, 1986) ส่วนในแคนาดาพบซีโรไทป์ 3 ถึง 50% ในไก่ (Bhasin, 1982) ประเทศไทย พรเพ็ญและคณะ (2528) รายงานซีโรกรุ๊ป A เป็นสาเหตุของโรคอหิวาต์ในสัตว์ปีกทั้งหมด สำหรับโซมาติกซีโรไทป์ยังไม่เคยมี รายงาน

รายงานนี้ได้ทำการศึกษาแค็ปซูล่าซีโรกรุ๊ปและโซมาติกซีโรไทป์ เพื่อให้ทราบถึงสาเหตุที่แท้จริงของเชื้อโรคอหิวาต์ที่ระบาดในสัตว์ปีกในประเทศไทย อันจะเป็นแนวทางในการควบคุม ป้องกัน และการเลือกใช้วัคซีนสำหรับเกษตรกร และการปรับปรุงวัคซีนของกรมปศุสัตว์ ให้มีประสิทธิภาพและตรงกับซีโรกรุ๊ปและซีโรไทป์ที่ระบาดในท้องที่ ทั้งยังเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางระบาดวิทยาอีกด้วย

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อ *Pasteurella multocida* จำนวนทั้งสิ้น 124 สเตรน 39 สเตรน แยกได้จากซากสัตว์ปีกที่มีอาการและรอยโรคของโรคอหิวาต์ ซึ่งส่งไปชันสูตรที่สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ อีก 31 สเตรนเป็นเชื้อที่เก็บจากศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ประจำภาคใต้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือจำนวน 23, 4 และ 4 สเตรนตามลำดับ พิสูจน์เชื้อโดยทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาตามวิธีของ Kenneth and Heddleston (1976) และทดสอบหาแค็ปซูลโดยเพาะเชื้อบน dextrose starch agar (Difco) ตรวจดูด้วยกล้อง stereomicroscope ให้แสงที่กระทบจานเลี้ยงเชื้อเป็นรังสีหักเห จะเห็นโคโลนีบนวุ้นเลี้ยงเชื้อเป็นสีรุ้ง (Rhoades and Rimler, 1984) จากนั้นจึงเก็บเชื้อไว้ในสภาพดูดแห้ง (lyophilized) ที่อุณหภูมิ 4°C

แค็ปซูล่าแอนตี้ซีรัม เตรียมจากสเตรนมาตรฐานซึ่งเป็นตัวแทนของซีโรกรุ๊ป A, B, D, E และ F (ตารางที่ 1) โดยเตรียมสเตรนมาตรฐานในสารละลาย 0.3% formalinized saline ฉีดเข้ากระต่ายนิวซีแลนด์ไวท์ สเตรนมาตรฐาน 1 สเตรน ใช้กระต่าย 4 ตัว การเตรียมแอนติเจน และตารางการฉีดเข้ากระต่ายตามวิธีของ Sawada *et al.* (1982)

ตารางที่ 1 *Pasteurella multocida* สเตรนมาตรฐานที่ใช้เตรียม capsular antiserum ในกระต่าย

แค็ปซูล่าซีโรกรุ๊ป	เลขที่สเตรน	แหล่งที่มา	ประเทศ
A	P – 3827	โค	สหรัฐอเมริกา
B	M – 1404	โคไบซัน	สหรัฐอเมริกา
D	Kobe 6	สุกร	ญี่ปุ่น
E	Bunia II	กระบือปลัก	แซร์ (Zaire)
F	P – 2481	ไก่งวง	สหรัฐอเมริกา

โซมาติกแอนติ้ซีรัมเตรียมจากสเตรนมาตรฐาน ซึ่งเป็นตัวแทนของซีโรไทป์ 1-16 (ตารางที่ 2) ใช้ไก่ไวท์เล็กฮอร์น อายุ 12-14 สัปดาห์ คละเพศ 4 ตัวต่อ 1 สเตรนมาตรฐาน แอนติเจนที่ใช้ฉีดทำเป็นวัคซีนชนิดน้ำมัน ตามรายงานของ Brogden *et al.* (1977) ฉีดเข้าใต้หนังคอไก่ 1 มล. หลังจากนั้นอีก 3 สัปดาห์จึงเก็บซีรัมจากไก่ และเติม 0.01% thimerosal และ 0.06% phenol เก็บรักษาไว้ที่ 4° C ในระหว่างใช้งาน

ตารางที่ 2 *Pasteurella multocida* สเตรนมาตรฐานที่ใช้เตรียม somatic antiserum ในไก่

โซมาติกซีโรไทป์	สเตรน	แหล่งที่มา
1	X–73	ไก่
2	M–1404	โคไบซัน
3	P–1059	ไก่งวง
4	P–1662	ไก่งวง
5	P–1702	ไก่งวง
6	P–2129	ไก่
7	P–1997	Herring gull
8	P–1581	Pine siskin
9	P–2095	ไก่งวง
10	P–2100	ไก่งวง
11	P–903	สุกร
12	P–1573	คน
13	P–1591	คน
14	P–2225	โค
15	P–2237	ไก่งวง
16	P–2723	ไก่งวง

การตรวจหาแคปซูล่าซีโรกรุ๊ปใช้วิธี indirect hemagglutination test โดยใช้เม็ดเลือดแดงแกะ ดูดซับ (adsorb) ด้วยแอนติเจนที่สกัดจากเชื้อ *Pasteurella multocida* ด้วยความร้อน 121°C 1 ชม. (autoclaving) ตามวิธีของ Sawada *et al.* (1982)

การตรวจหาโซมาติกซีโรไทป์ ใช้วิธี gel diffusion precipitin test (GDPT) การเตรียมแอนติเจนสำหรับ GDPT ตามวิธี ของ Brogden *et al.* (1977) โดยเพาะเชื้ออย่างหนาแน่นลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ dextrose starch agar (Difco) บ่มที่ 37° C 18 ชม. จึงเก็บเชื้อลงในสารละลาย 0.02 M PBS (phosphate buffer saline ซึ่งมี 8.5% NaCl) 1 มล. ต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ จึงนำเชื้อไปสกัดด้วยความร้อน 121° C 1 ชม. ปั่น 3500 rpm 30 นาที เพื่อแยกน้ำใสที่สกัดได้ออกมาเป็นแอนติเจน

GDPT ใช้ 0.9% noble agar (Difco) หลอมละลายใน 0.02 M PBS โดยต้มใน water bath เทวุ้นที่หลอมแล้ว 6 มล. ลงบนแผ่นแก้วมาตรฐาน เมื่อวุ้นแข็งตัวแล้วจึงเจาะรู ขนาดหลุม 2.5 มม. จุดศูนย์กลางแต่ละหลุมห่างกัน 6 มม. หลุมนอกมี 6 หลุม เรียงกันเป็นรูปหกเหลี่ยมใช้หยอดแอนตี้ซีรัมที่ทราบซีโรไทป์แล้ว ส่วนหลุมกลางใช้หยอดแอนติเจนที่ต้องการทราบซีโรไทป์ บ่มในกล่องชื้นที่ 37C 24 ชม. จึงอ่านผลโดยดู precipitin line ซึ่งเห็นเป็นเส้นโค้งสีขาวจากแสงที่ส่องผ่านจาก immunoviewer ตรงบริเวณระหว่างหลุมของแอนติเจนกับหลุมของแอนตี้ซีรัม ถ้าปฏิกิริยาไม่ชัด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 1-2 วันจึงอ่านผลซ้ำอีก

ผลและวิจารณ์

เชื้อ *Pasteurella multocida* 124 สเตรนที่แยกได้จากอหิวาต์ในสัตว์ปีก มีเพียงซีโรกรุ๊ป A เท่านั้นที่พบในประเทศไทย (81.45%) ซึ่งตรงกับรายงานของพรเพ็ญและคณะ (2528) ส่วนที่เหลือเป็นสเตรนที่ไม่มีแค็ปซูล่าแอนติเจน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 Capsular serogroup และ somatic serotype ของเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่แยกได้จากสัตว์ปีกที่ป่วยเป็นโรคอหิวาต์ จำนวนทั้งสิ้น 124 สเตรน

แค็ปซูล่าซีโรกรุ๊ป	โซมาติกซีโรไทป์	จำนวน	เปอร์เซ็นต์
A	1	89	71.8
A	1, 10	5	4
A	1, 10, 14	1	0.8
A	1, 12	1	0.8
A	2, 5, 10, 14	1	0.8
A	3, 4	2	1.6
A	12	1	0.8
A	14	1	0.8
–	1	18	15
–	1, 14	1	0.8
–	–	3	3.2
รวมซีโรกรุ๊ป A		101	81.45
รวมซีโรไทป์ 1		115	92.74

ในอเมริกา Rhoades and Rimler (1987) รายงานแค็ปซูล่ากรุ๊ป A, B, D และ E รวมทั้งสเตรนที่ไม่มีแค็ปซูล่าแอนติเจนในสัตว์ปีก อย่างไรก็ดีซีโรกรุ๊ป A ก็ยังคงเป็นปัญหาอันดับหนึ่ง การทดลองทำให้เชื้อ *Pasteurella multocida* สร้างแค็ปซูลขึ้นมาใหม่ โดยนำสเตรนที่ไม่มีแค็ปซูลจำนวน 31 สเตรน ฉีดผ่านหนู mice แล้วนำเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่เพาะแยกได้จากเลือดของหัวใจหนูที่ตายหลังฉีดเชื้อภายใน 24 ชม. มาตรวจหาแค็ปซูล่ากรุ๊ปอีกครั้งหนึ่ง ปรากฏว่ามี 8 สเตรน สามารถสร้างแค็ปซูลขึ้นมาใหม่ ซึ่งก็ตรวจพบกรุ๊ป A เช่นกัน ส่วนอีก 23 สเตรน สูญเสียแค็ปซูลไปแล้วอย่างถาวร แต่ยังคงทำให้หนูตายได้ภายใน 24 ชม. แสดงว่าไม่เฉพาะแต่ส่วนแค็ปซูลของเชื้อเท่านั้นที่ทำให้เกิดโรค (pathogenesis) การตรวจหาโซมาติกซีโรกรุ๊ปพบว่า 92.74% ของเชื้ออหิวาต์ที่ระบาดในประเทศไทยเป็นซีโรไทป์ 1 และไม่มีความแตกต่างในระหว่างชนิดของสัตว์ปีก เช่นเดียวกับประเทศอิสราเอล Mushin (1979) พบซีโรไทป์ 1 มากที่สุดเช่นกัน แต่อัตราการพบแตกต่างกันในไก่

ห่าน และไก่งวง (58.6%, 47.8% และ 33.1% ตามลำดับ) ในสหรัฐอเมริกา Hofacre and Glisson (1986) รายงานในไก่งวงพบ ซีโรไทป์ 3, 4 มากที่สุด รองลงมาคือซีโรไทป์ 3 ซีโรไทป์ 1 พบเพียง 19% ในขณะที่ Curtis (1976), Bhasin (1982) และ Rhoades and Rimler (1987) พบซีโรไทป์ 3 มากที่สุด ตามด้วยซีโรไทป์ 1 ในสัตว์ปีกในอังกฤษ แคนาดา และ สหรัฐอเมริกา ตามลำดับ

เชื้อ *Pasteurella multocida* ที่ศึกษาครั้งนี้ ส่วนใหญ่มีปฏิกิริยากับแอนตี้ซีรัมมาตรฐานเพียงซีโรไทป์เดียว มีเพียง 11 สเตรนที่มีปฏิกิริยากับแอนตี้ซีรัมมาตรฐานมากกว่า 1 ซีโรไทป์ คือตั้งแต่ 2, 3 ซีโรไทป์ สูงสุด 4 ซีโรไทป์ ส่วนใหญ่มีซีโรไทป์ 1 ร่วมด้วย Blackburn *et al.* (1975) และ Mushin (1979) ก็พบปรากฏการณ์นี้เช่นเดียวกันและตั้งข้อสังเกตว่า สเตรนเหล่านี้มีแอนติเจนเป็นองค์ประกอบมากกว่าหนึ่งแอนติเจน และมักพบในสเตรนที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน มากกว่าสเตรนที่แยกได้จากสัตว์ใหม่ๆ

วัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ในสัตว์ปีกที่กรมปศุสัตว์ผลิต ใช้เชื้อ *Pasteurella multocida* ที่แยกได้จากสัตว์ป่วยในท้องที่และเป็นซีโรไทป์ A:1 ซึ่งเป็นซีโรไทป์ส่วนใหญ่ที่ระบาดในประเทศไทย ปัญหาเรื่องความแตกต่างของซีโรไทป์ของสเตรนที่ผลิตวัคซีน กับสเตรนที่ระบาดในท้องที่จึงหมดไป ปัญหาเรื่องความคุ้มของวัคซีน จึงต้องคำนึงประสิทธิภาพของวัคซีนและระยะเวลาที่วัคซีนให้ความคุ้ม ซึ่งโดยทั่วไปแล้วมักให้ความคุ้มดีในระยะ 3 เดือนแรกหลังฉีด การพิจารณาใช้วัคซีนชนิดน้ำมันในเป็ดและไก่ ที่จำเป็นต้องเลี้ยงระยะยาวเช่นเลี้ยงไว้เก็บไข่ หรือพ่อแม่พันธุ์ อาจเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการป้องกันโรคอหิวาต์ในสัตว์ปีก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.วาสนา แสงสุวรรณ์ ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ น.สพ.นิมิตร ลีสิริกุล ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สพ.ญ.จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคเหนือ และสถานผลิตชีวภัณฑ์ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสเตรนของเชื้อ *Pasteurella multocida* สพ.นพพร โต๊ะมี และเจ้าหน้าที่งานสัตว์ทดลองทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง

เอกสารอ้างอิง

พรเพ็ญ พัฒนโสภณ, ทิพา ตันติเจริญยศ, สมาน พิพิธกุลและนิดารัตน์ ไพรคณะฮก. 2528. การศึกษาซีโรไทป์ของเชื้อพาสเจอเรลล่า มัลโตไซด้า. สัตวแพทยสาร 36(4): 385-393.

Bhasin JL. 1982. Serological types of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and chickens in Canada. Can J Microbiol 28: 1078-1080.

Blackburn BO, Heddleston KL, and Pfow CJ. 1975. *Pasteurella multocida* serotyping results (1971-1973). Avian Dis 19: 353-356.

Brogden KA, Rhoades KR, and Heddleston KL. 1977. A new serotype of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. Avian dis 22(1): 185-190.

Curtis PE. 1976. Serotyping British isolates of *P. multocida* from avian species. Vet Rec 99: 256-257.

Hofacre CL, and Glisson JR. 1986. A serotyping survey of *Pasteurella multocida* isolated from poultry. Avian dis 30(3): 632-633.

Kenneth L, and Heddleston BS. 1976. Physiological characteristics of 1268 cultures of *Pasteurella multocida*. Am J Vet Res 37(6): 745-747.

Mushin R. 1979. Serotyping of *Pasteurella multocida* isolants from poultry. Avian Dis 23(3): 608-615.

Rhoades KR, and Rimler RB. 1984. Avian pasteurellosis. In: Diseases of poultry 8th ed. Hofstad M S, Barnes H J, Calnek B W, Reid W M, and Yoder H W Jr, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp: 141-164.

Rhoades KR, and Rimler RB. 1987. Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. Avian Dis 31: 895-898.

Sawada T, Rimler RB, and Rhoades KR. 1982. Indirect hemagglutination test that uses glutaraldehyde-fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of *Pasteurella* antibody. J Clin Microbiol 15(5): 752-756.