



วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.

KKU Veterinary Journal

ISSN 0858-2297



RESEARCH ARTICLE

Monitoring of *Burkholderia pseudomallei* in animals from slaughterhouses
in Nakhon Pathom and Ratchaburi provinces

Petcharat Sakdinun^{1*}, Trakarnsak Paethaisong¹, Rattiya Nakswan¹, Niramol Sriwongsa²

¹Veterinary Research and Development Center (western region), Ratchaburi province.

²Veterinary Research and Development Center (lower northeastern region), Surin province.

*Corresponding author E-mail: ped_charat@hotmail.com

Received 4 September 2018, Accepted 4 October 2018, Published 31 October 2018

Abstract

Objective: To study of *Burkholderia pseudomallei* from animals slaughtered in slaughterhouses, these data would benefit to stakeholders in biosafety managements.

Materials and Methods: A total of 400 samples were collected by purposive sampling from organs and tissues containing gross lesion, during a period from November 2016 to April 2017. Then, proceed with bacterial cultivation and identification, antimicrobial susceptibility testing by broth microdilution and genetic pattern analysis using pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

Results: Overall, bacterial cultivation was identified to *B. pseudomallei* 23.3% (93/400). The specimens which collected from carcasses of pigs slaughtered in Nakhon Pathom province detected 26.0% (52/200), while in Ratchaburi province was isolated from carcasses of pigs 20.8% (40/192) and goat 100% (1/1), but not detected *B. pseudomallei* from beef cattles (0/7). Gross lesion which observed *B. pseudomallei* infection was abscesses 40.7% (81/199), inflammation of capsule 7.4% (9/121), congestion 4.2% (1/24), white foci 2.7% (1/37) and pyometra 100% (1/1). In specimens containing abscesses, *B. pseudomallei* was detected from liver 40.4% (36/89), lung 23.8% (10/42), spleen 53.2% (33/62) and lymph node 66.7% (2/3). Antimicrobial susceptibility testing was found highly susceptible 100% (89/89) to ceftazidime and imipenem followed by amoxicillin-clavulanic acid 98.9% (88/89), doxycycline 92.1% (82/89) and tetracycline 91.0% (81/89) but the effectiveness of trimethoprim-sulfamethoxazole was 34.8% (31/89). While, the genetic pattern analysis showed the DNA fingerprinting 46 different patterns. The strains isolated from specimens that collected from slaughterhouses in Nakhon Pathom province were presented 31 patterns and Ratchaburi province 17 patterns.

Conclusion: The findings showed that it has *B. pseudomallei* infected animals included in healthy animals slaughtered in slaughterhouses. The isolated strains were common detected from spleen liver and lung which contained abscesses, these presented highly genetic diversity. Therefore, best practices in biosafety are essential for stakeholders.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, animals, slaughterhouses, Nakhon Pathom, Ratchaburi

การเฝ้าระวังเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในสัตว์จากโรงฆ่าสัตว์ ในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี

เพชรรัตน์ ศักดินันท์¹, ตระการศักดิ์ แพไธสง¹, รัตติยา นาคสุวรรณ¹, นิรมล ศรีวงษา²

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก จังหวัดราชบุรี ประเทศไทย

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง จังหวัดสุรินทร์ ประเทศไทย

* ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ อีเมลล์: ped_charat@hotmail.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* จากสัตว์ที่เข้ามาในโรงฆ่าสัตว์ ข้อมูลนี้เป็นประโยชน์ให้ผู้เกี่ยวข้องใช้สำหรับการจัดการด้านความปลอดภัยทางชีวภาพในโรงฆ่าสัตว์

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ เก็บตัวอย่างอวัยวะและเนื้อเยื่อแบบเจาะจงเฉพาะที่มีรอยโรคจากสัตว์ที่เข้ามาในโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2559 ถึงเมษายน 2560 จำนวน 400 ตัวอย่าง เพาะเชื้อและจำแนกชนิดเชื้อ ทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี broth microdilution และตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมของเชื้อโดยวิธี pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

ผลการศึกษา ผลการเพาะเชื้อโดยรวมพบ *B. pseudomallei* 23.3% (93/400) ตัวอย่างอวัยวะและเนื้อเยื่อที่เก็บจากซากสุกรในโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐมพบเชื้อ 26.0% (52/200) ส่วนตัวอย่างที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดราชบุรีพบเชื้อจากอวัยวะและเนื้อเยื่อจากซากสุกร 20.8% (40/192) และซากแพะ 100% (1/1) แต่ไม่พบ *B. pseudomallei* จากซากโคเนื้อ (0/7) ลักษณะรอยโรคที่พบเชื้อจำแนกเป็นแบบฝีหนอง 40.7% (81/199) เยื่อหุ้มอวัยวะอักเสบ 7.4% (9/121) มีเลือดคั่ง 4.2% (1/24) เป็นหย่อมสีขาว 2/7% (1/37) และมดลูกอักเสบแบบมีหนอง 100% (1/1) ผลเพาะเชื้อจากตัวอย่างที่มีรอยโรคแบบฝีหนองพบ *B. pseudomallei* จากตับ 40.4% (36/89) ปอด 23.8% (10/42) ม้าม 53.2% (33/62) และต่อมน้ำเหลือง 66.7% (2/3) การทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพพบว่าเชื้อมีความไวสูงสุด 100% (89/89) ต่อยา ceftazidime และ imipenem รองลงมาคือ amoxicillin-clavulanic acid 98.9% (88/89), doxycycline 92.1% (82/89) และ tetracycline 91.0% (81/89) ส่วนยา trimethoprim-sulfamethoxazole มีประสิทธิภาพต่อเชื้อเพียง 34.8% (31/89) ผลการตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมพบเชื้อมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน 46 รูปแบบ เชื้อซึ่งแยกได้จากตัวอย่างที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐมพบ 31 รูปแบบ และจากจังหวัดราชบุรีพบ 17 รูปแบบ

ข้อสรุป ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ามีสัตว์ติดเชื้อ *B. pseudomallei* รวมอยู่ในกลุ่มสัตว์สุขภาพดีที่เข้ามาในโรงฆ่าสัตว์ อวัยวะที่พบการติดเชื้อได้บ่อยคือม้าม ตับ และปอด ซึ่งส่วนใหญ่พบเชื้อจากรอยโรคแบบฝีหนอง โดยเชื้อที่พบมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นผู้เกี่ยวข้องต้องมีแนวทางปฏิบัติที่ดีเพื่อให้เกิดความปลอดภัยทางชีวภาพ

คำสำคัญ: *Burkholderia pseudomallei* สัตว์ โรงฆ่าสัตว์ นครปฐม ราชบุรี

บทนำ

Burkholderia pseudomallei เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง สาเหตุของโรคmelioidosis โรคติดเชื้อที่พบได้ทั้งในคนและสัตว์หลายชนิด ได้แก่ โค กระบือ แพะ แกะ สุกร อูฐ ม้า ชะนี ลิง จระเข้ สุนัข ไก่ นก และปลา (Godoy et al., 2003; Kongkaew et al., 2017) โรคmelioidosis เป็นโรคที่พบบ่อยทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลียและหลายประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น มาเลเซีย เวียดนาม ลาว ชองกง สิงคโปร์ และไทย (Godoy et al., 2003) ในภูมิภาคที่มีโรคmelioidosis เป็นโรคประจำถิ่นมักพบเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ดิน และน้ำ ในดินพบเชื้อได้ตั้งแต่บริเวณผิวดินหน้าดินและลึกลงไปใต้ผิวดินถึงระดับ 90 เซนติเมตร (Manivanh et al., 2017; Rolim et al., 2009) ส่วนในน้ำพบเชื้อได้จากแหล่งน้ำต่างๆ ทั้งจากแม่น้ำ นาข้าว ทะเลสาบ บ่อน้ำ รวมถึงน้ำที่ใช้ดื่มก็พบเชื้อนี้เช่นกัน (Vongphayloth et al., 2012; Limmathurosakul et al., 2014) เชื้อ *B. pseudomallei* ผ่านเข้าสู่ร่างกายได้โดยการกิน การสูดดม หรือทางบาดแผลและรอยถลอกของผิวหนัง ลักษณะการก่อโรคมักไม่มีอาการที่จำเพาะแต่อาจแสดงอาการคล้ายกับโรคติดเชื้ออื่นๆ ขึ้นอยู่กับภาวะหรือตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ เช่น เป็นไข้ ไอ มีเสมหะ ทางเดินปัสสาวะอักเสบ หรือมีข้อบวม หรืออาจจะไม่แสดงอาการทางคลินิกแต่พบรอยโรคจากการติดเชื้อเรื้อรังซึ่งส่วนใหญ่เป็นลักษณะฝีหนองที่ตับ ม้าม ปอด ไต ต่อม้ำเหลือง ผิวหนัง หรือตามอวัยวะอื่นๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะการเกิดโรคในสัตว์มักไม่แสดงอาการป่วยแต่จะปรากฏรอยโรคแบบฝีหนองตามอวัยวะต่างๆ และพบเชื้อ *B. pseudomallei* ได้จากการเพาะเชื้อ (Julagiwansujarit et al., 2014)

อย่างไรก็ตามการเฝ้าระวังโรคmelioidosis ในสัตว์ทางห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันใช้วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี indirect haemagglutination (IHA) โดยในปีพ.ศ. 2560 พบตัวอย่างซีรัมสัตว์จากจังหวัดราชบุรีให้ผลบวกต่อการทดสอบโรคmelioidosis เพียง 2.02% (DLD, 2017) ทั้งนี้ การทดสอบโรคด้วยวิธี IHA มีความจำเพาะค่อนข้างต่ำและการพบแอนติบอดีจากการทดสอบแสดงว่าเคยมีการสัมผัสเชื้อมาก่อน ซึ่งการพบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อในระดับสูงมีโอกาสตรวจพบได้ในแหล่งที่มีโรคmelioidosis เป็นโรคประจำถิ่น (Harris et al., 2009) ส่วนการเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจจากสัตว์ที่ยังมีชีวิต เช่น การป้ายเชื้อจากระบบทางเดินหายใจหรือระบบทางเดินอาหาร ปัสสาวะ และอุจจาระ มักพบเชื้อชนิดอื่นปนเปื้อนเป็นจำนวนมากทำให้ไม่พบหรือไม่สามารถสังเกตเห็นเชื้อ *B. pseudomallei* ที่อาจจะมีปริมาณน้อยและเจริญเติบโตช้ากว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ดังนั้นการเฝ้าระวังเชื้อ *B. pseudomallei* ในสัตว์จากโรงฆ่า

สัตว์โดยการเพาะเชื้อจากอวัยวะและเนื้อเยื่อที่มีรอยโรคเป็นอีกหนึ่งวิธีในการเฝ้าระวังโรคเชิงรุกที่จะทำให้ทราบถึงการติดเชื้อในกลุ่มสัตว์ที่ไม่แสดงอาการทางคลินิก ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้เกี่ยวข้องสามารถนำไปประกอบการกำหนดแนวทางในการจัดการที่ดีด้านความปลอดภัยทางชีวภาพในโรงฆ่าสัตว์

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ตัวอย่างอวัยวะและเนื้อเยื่อ

เก็บตัวอย่างอวัยวะและเนื้อเยื่อจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2559 ถึง เมษายน 2560 จำแนกเป็นโรงฆ่าสุกร โคเนื้อ และแพะ จำนวน 6, 1 และ 1 แห่ง ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 400 ตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างอวัยวะและเนื้อเยื่อใช้วิธีแบบเฉพาะเจาะจง (purposive sampling) โดยในขั้นตอนการตรวจซากของโรงฆ่าสัตว์ (post-mortem examination) เมื่อพนักงานตรวจโรคสัตว์ในโรงฆ่าหรือผู้ประกอบการโรงฆ่าพบอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่มีรอยโรค ได้แก่ ฝี (abscesses) เยื่อหุ้มอวัยวะอักเสบ (inflammation of capsule) เลือดคั่ง (congestion) จุดเลือดออก (petechial haemorrhage) มีจุดหรือหย่อมสีขาว (white spot or foci) รวมถึงลักษณะที่ผิดปกติอื่นๆ เช่น มีถุงน้ำ (cyst) หรือมดลูกอักเสบแบบมีหนอง (pyometra) ให้ทำการเก็บตัวอย่างทุกอวัยวะที่พบรอยโรคโดยเก็บทั้งชิ้นใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ 1 ตัวอย่างต่อ 1 ถุง ระบุชนิดตัวอย่างและจังหวัดที่ตั้งโรงฆ่าสัตว์ จากนั้นนำถุงตัวอย่างแช่ในถังน้ำแข็งส่งศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตกภายใน 24 ชั่วโมง เจ้าหน้าที่ด้านพยาธิวิทยาทำการตรวจสอบลักษณะรอยโรคด้วยตาเปล่าอย่างละเอียดพร้อมทั้งบันทึกและจัดเก็บข้อมูล

การเพาะแยกเชื้อและการจำแนกชนิดเชื้อ

ขั้นตอนการเพาะเชื้อ *B. pseudomallei* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Ashdown broth และ MacConkey agar ที่มีส่วนผสมของยา gentamicin 8 mg/L จากนั้นจำแนกเชื้อโดยการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเขียวขุ่น ผิวขรุขระ สีชมพู เป็นประกายวาว มีกลิ่นคล้ายไอระเหยของดินหลังฝนตก นำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นและยืนยันชนิดเชื้อด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ก่อนทำการเก็บรวบรวมเชื้อทั้งหมดใน skim milk ที่อุณหภูมิ -80 °C ในช่วงเวลาเดียวกันได้ทำการเพาะเชื้อจากตัวอย่างอวัยวะและเนื้อเยื่อทั้งหมดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% sheep Blood agar และ MacConkey agar เพื่อหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นโดยดำเนินการตามคู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคแบคทีเรียและเชื้อราทางด้านสัตวแพทย์ (Carter and Cole, 1990)

การทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

ทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution โดยทดสอบกับยาทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ amoxicillin-clavulanic acid, ceftazidime, doxycycline, imipenem, tetracycline และ trimethoprim-sulfamethoxazole ควบคุมคุณภาพผลการทดสอบด้วยเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และใช้ค่า breakpoints ตามมาตรฐาน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016)

การตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรม

ตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี pulsed field gel electrophoresis (PFGE) โดยใช้เอนไซม์ Spe I ในการตัดย่อย genomic DNA จากนั้นเตรียม DNA และ agarose block โดยตัดแปลงจากวิธีการของ Thong et al. (1994) และแยกแถบ DNA ใน PFGE agarose โดยใช้เครื่อง CHEF-DR[®] III pulsed field electrophoresis systems (Biorad, USA) ก่อนย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 10 mg/ml อ่านผลภายใต้แสง UV และบันทึกภาพด้วยเครื่อง GelDoc-It imaging system (UVP, USA) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Bio1D⁺⁺ (Vilber Lourmat, Germany)

ผลการศึกษา

การศึกษาค้นคว้านี้เก็บตัวอย่างอวัยวะและเนื้อเยื่อที่มีรอยโรคจากซากสัตว์รวมทั้งสิ้น 391 ตัว จำแนกเป็นซากสุกรที่เข้าฆ่าในโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐม 200 ตัว และจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดราชบุรีเก็บตัวอย่างจากซากสุกร 188 ตัว โคเนื้อ 2 ตัว และแพะ 1 ตัว ผลการเพาะเชื้อพบ *B. pseudomallei* จากซากสุกรทั้งหมด 88 ตัว และซากแพะ 1 ตัว

ผลการเพาะเชื้อจากตัวอย่างอวัยวะและเนื้อเยื่อที่มีรอยโรคโดยรวมพบ *B. pseudomallei* 23.3% (93/400) ตัวอย่างที่เก็บจากซากสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐมพบเชื้อ 26.0% (52/200) ในขณะที่ตัวอย่างซึ่งเก็บจากซากสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดราชบุรีพบเชื้อ 20.8% (40/192) ซากแพะ 100% (1/1) ส่วนตัวอย่างอวัยวะจากซากโคเนื้อ จำนวน 7 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* (0/7) ตัวอย่างที่พบเชื้อมีลักษณะรอยโรคแบบฝีหนอง 40.7% (81/199) เยื่อหุ้มอวัยวะอักเสบ 7.4% (9/121) มีเลือดคั่ง 4.2% (1/24) เป็นหย่อมสีขาว 2.7% (1/37) และมดลูกอักเสบแบบมีหนอง 100% (1/1) (Table 1)

ผลการเพาะเชื้อ *B. pseudomallei* แยกตามชนิดตัวอย่างอวัยวะและเนื้อเยื่อต่อจำนวนตัวอย่างที่ปรากฏรอยโรค

โดยรวมพบเชื้อที่หัวใจ 5.4% (2/37) ตับ 24.5% (38/155) ปอด 13.3% (14/105) ม้าม 40.0% (36/90) ต่อมท่อน้ำเหลือง 66.7% (2/3) และมดลูก 100% (1/1) อวัยวะที่พบการติดเชื้อจากรอยโรคแบบฝีหนองบ่อยที่สุดคือม้าม 53.2% (33/62) รองลงมาคือตับ 40.4% (36/89) และปอด 23.8% (10/42) (Table 2)

การทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพพบเชื้อมีความไวสูงสุดต่อยา ceftazidime และ imipenem 100% (89/89) รองลงมาคือ amoxicillin-clavulanic acid 98.9% (88/89), doxycycline 92.1% (82/89) และ tetracycline 91.0% (81/89) ส่วนยา trimethoprim-sulfamethoxazole พบเชื้อมีความไวต่อยาที่ทดสอบ 34.8% (31/89) โดยพบเชื้อดี้อย่า 65.2% (58/89) ค่า MIC range อยู่ระหว่าง 2/38-8/152 µg/ml ส่วนค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ เท่ากันที่ 4/76 µg/ml (Table 3)

การตรวจสอบพันธุกรรมของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี PFGE จากเชื้อจำนวน 93 ตัวอย่าง (เชื้อ 4 ใน 93 ตัวอย่าง ไม่สามารถจำแนกรูปแบบทางพันธุกรรมได้) เชื้อซึ่งแยกได้จากซากสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐมพบ 31 รูปแบบ ได้แก่ P3, P5, P8, P9, P10, P11, P12, P14, P15, P16, P17, P20, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P33, P35, P36, P38, P39, P40, P41, P42, P43, P45 และ P46 รูปแบบที่มีเชื้อตั้งแต่ 2 ตัวอย่างขึ้นไปแสดงแถบดีเอ็นเอแบบเดียวกัน 100% คือ P9, P15, P24, P28, P33, P41, P43 และ P45 ส่วนเชื้อจากซากสุกรและซากแพะที่แยกได้จากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดราชบุรี พบลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมด 17 รูปแบบ ได้แก่ P1, P2, P4, P6, P7, P13, P18, P19, P21, P22, P31, P32, P34, P37, P41, P44 และ P45 รูปแบบที่มีเชื้อตั้งแต่ 2 ตัวอย่างขึ้นไปแสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน 100% คือ P1, P6, P7, P13, P21, P22, P34, P37 และ P44 อย่างไรก็ตามพบเชื้อที่แยกได้จากมดลูกของแพะที่เข้าโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดราชบุรีและเชื้อที่แยกได้จากตับและม้ามจากซากสุกรที่เข้าโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐมในรูปแบบ P41 ในขณะเดียวกันพบเชื้อที่แยกได้จากตับของซากสุกรที่เข้าโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดราชบุรีและจากตัวอย่างตับ ม้าม และปอด จากซากสุกรที่เข้าโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐมในรูปแบบ P45 (Figure 1)

วิจารณ์

การเฝ้าระวังเชื้อ *B. pseudomallei* ในสัตว์จากการศึกษาค้นคว้านี้ดำเนินการในจังหวัดราชบุรีและนครปฐม เนื่องจากประเมินว่าจังหวัดราชบุรีเป็นถิ่นของโรคเมลิออยด์ในสัตว์โดยประมาณการจากข้อมูลการตรวจวินิจฉัยโรคสัตว์ทางห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก ร่วมกับ

Table 1. Presence of *B. pseudomallei* cultured from gross lesion specimens of animals slaughtered in Nakhon Pathom and Ratchaburi provinces

Gross lesions	Number of positive/number of gross lesion appearance specimens (%)				Total
	Nakhon Pathom	Ratchaburi			
	Pigs	Pigs	Beef cattles	Goats	
Abscesses (n=199)	44/118 (37.3)	37/80 (46.3)	0/1 (0)	NA	81/199 (40.7)
Inflammation of capsule (n=121)	6/58 (10.3)	3/62 (4.8)	0/1 (0)	NA	9/121 (7.4)
Congestion (n=24)	1/18 (5.6)	0/5 (0)	0/1 (0)	NA	1/24 (4.2)
Petechial haemorrhage (n=17)	NA	0/15 (0)	0/2 (0)	NA	0/17 (0)
White spot/foci (n=37)	1/6 (16.7)	0/29 (0)	0/2 (0)	NA	1/37 (2.7)
Cyst (n=1)	NA	0/1 (0)	NA	NA	0/1 (0)
Pyometra (n=1)	NA	NA	NA	1/1 (100)	1/1 (100)
Total (n=400)	52/200 (26.0)	40/192 (20.8)	0/7 (0)	1/1 (100)	93/400 (23.3)

n: number of gross lesion specimens; NA: not available.

Table 2. Positive of *B. pseudomallei* cultured from organs and tissues contained gross lesion

Specimens	Number of positive/number of gross lesion appearance specimens (%)						Total
	Abscesses	Inflammation of capsule	Congestion	Petechial haemorrhage	White spot/foci	Other	
Heart (n=37)	NA	2/34 (5.9)	NA	0/2 (0)	0/1 (0)	NA	2/37 (5.4)
Liver (n=155)	36/89 (40.4)	2/34 (5.9)	0/2 (0)	NA	0/30 (0)	NA	38/155 (24.5)
Lung (n=105)	10/42 (23.8)	4/40 (10.0)	0/12 (0)	0/11 (0)	NA	NA	14/105 (13.3)
Spleen (n=90)	33/62 (53.2)	1/13 (7.7)	1/10 (10.0)	0/4 (0)	1/1 (100)	NA	36/90 (40.0)
Kidney (n=6)	NA	NA	NA	NA	0/5 (0)	0/1 (0)*	0/6 (0)
Lymph node (n=3)	2/3 (66.7)	NA	NA	NA	NA	NA	2/3 (66.7)
Muscle (n=2)	0/2 (0)	NA	NA	NA	NA	NA	0/2 (0)
Tonsil (n=1)	0/1 (0)	NA	NA	NA	NA	NA	0/1 (0)
Uterus (n=1)	NA	NA	NA	NA	NA	1/1 (100)**	1/1 (100)

*: cyst; **: pyometra; NA: not available.

ผลการศึกษาของ Julagiwansujarit et al. (2014) และการพบความเชื่อมโยงทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์เชื้อจากตัวอย่างดินบริเวณที่พบการเกิดโรคเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับที่พบก่อโรคในสัตว์ในพื้นที่จังหวัดราชบุรีจากผลการศึกษาของ Sakdinun et

al. (2012) ส่วนจังหวัดนครปฐมเป็นพื้นที่ใกล้เคียงกับจังหวัดราชบุรีและมีข้อมูลสุกรเข้าโรงฆ่าจำนวนมาก จึงมีความเป็นไปได้ที่อาจพบเชื้อ *B. pseudomallei* จากสัตว์ที่เข้าฆ่า การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเฉพาะอวัยวะและเนื้อเยื่อที่มีรอยโรค

Table 3. Results of antimicrobial susceptibility testing of *B. pseudomallei* (N=89)

Antimicrobial agents	Antimicrobial susceptibility testing			MICs (µg/ml)		
	n/% S	n/% I	n/% R	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Amoxicillin-clavulanic acid	88/98.9	1/1.1	0	4/2-16/8	4/2	8/4
Ceftazidime	89/100	0	0	1-8	2	4
Doxycycline	82/92.1	7/7.9	0	0.25-8	2	4
Imipenem	89/100	0	0	1-4	2	4
Tetracycline	81/91.0	6/6.7	2/2.3	0.5-16	4	4
Trimethoprim-sulfamethoxazole	31/34.8	0	58/65.2	2/38-8/152	4/76	4/76

N: number of isolates tested; n/%: number of isolates detected/percentage of isolates detected; S: susceptible; I: intermediate; R: resistant; MIC: minimal inhibitory concentration; MIC₅₀ and MIC₉₀: the MIC which inhibits at 50% and 90% of isolates tested

ซึ่งส่วนใหญ่เก็บจากซากสุกรเนื่องจากมีจำนวนสัตว์เข้าโรงฆ่าต่อวันมากที่สุด ส่วนโคนเนื้อมีจำนวนเข้าฆ่าต่อวันไม่มากและไม่ค่อยพบรอยโรคแบบจำเพาะทำให้เก็บตัวอย่างได้ในจำนวนจำกัด และตัวอย่างจากซากแพะเก็บได้เพียงตัวอย่างเดียวอาจเป็นเพราะเกษตรกรในพื้นที่นิยมเลี้ยงแพะเพื่อเพาะพันธุ์ขายมากกว่าการเลี้ยงเพื่อจำหน่ายเนื้อทำให้มีสัตว์เข้าโรงฆ่าต่อวันจำนวนน้อย อีกทั้งการศึกษาค้างนี้ในช่วงระยะเวลาเก็บตัวอย่างค่อนข้างสั้นเพียง 6 เดือน ผลการเพาะเชื้อจากตัวอย่างที่มีรอยโรคโดยรวมพบเชื้อ *B. pseudomallei* 23.3% โดยอวัยวะที่มีรอยโรคแบบฝีมหนองพบเชื้อสูง 40.7% สอดคล้องกับผลการตรวจชันสูตรซากสัตว์ที่วินิจฉัยว่ามีสาเหตุการตายจากโรคเมลิออยด์จากการศึกษาของ Julagiwansujarit et al. (2014) พบเชื้อจากอวัยวะที่เป็นฝีมหนอง 75.8% ความสัมพันธ์ระหว่างรอยโรคที่พบเชื้อจากการศึกษาค้างนี้และรายงานจากการศึกษาของ Julagiwansujarit et al. (2014) แสดงให้เห็นว่าอวัยวะที่มีลักษณะรอยโรคแบบฝีมหนองมีโอกาสสูงที่จะพบเชื้อ *B. pseudomallei* แต่อย่างไรก็ตามผลการเพาะเชื้อจากตัวอย่างทั้งหมดที่ปรากฏรอยโรคในลักษณะดังกล่าวพบการติดเชื้อแบคทีเรียอื่นอีกหลายชนิด เช่น *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Arcanobacterium* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Aeromonas* spp. และ *Pseudomonas* spp. (ไม่ได้แสดงข้อมูลในผลการศึกษา) ซึ่งการก่อโรคจากเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ทำให้เกิดรอยโรคในลักษณะฝีมหนองได้เช่นเดียวกัน (Aljameel et al., 2014) การศึกษาค้างนี้ส่วนใหญ่พบการติดเชื้อที่ม้าม ตับ และปอด อวัยวะเหล่านี้มีขนาดใหญ่ง่ายต่อการสังเกตเห็นรอยโรคได้ชัดเจน แต่อวัยวะอื่นๆ เช่น มดลูก ต่อมม้ามและหัวใจ มีโอกาสพบเชื้อ *B. pseudomallei* ได้เช่นกัน

ผลการทดสอบความไวเชื้อต่อยาต้านจุลชีพจากการศึกษาค้างนี้พบว่ายาที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 5 จาก 6 ชนิด ยังคงมีความไวสูงต่อเชื้อที่ทดสอบทั้งหมด (91.0-100%) มีเพียงยา trimethoprim-sulfamethoxazole เท่านั้นที่มีประสิทธิภาพต่อเชื้อค่อนข้างต่ำ (34.8%) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Hassan et al. (2014) พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศมาเลเซียมีความไวต่อยา ceftazidime และ imipenem มากกว่า 90%, tetracycline และ amoxicillin-clavulanic acid 82% ส่วนยา trimethoprim-sulfamethoxazole พบเชื้อมีความไวต่อยาที่ทดสอบ 47%

จากการตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี PFGE พบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อมากถึง 46 รูปแบบ เชื้อที่แยกได้จากซากสุกรจำนวน 2 ตัว ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าติดเชื้อหลายอวัยวะพบรูปแบบพันธุกรรมเหมือนกัน 100% ได้แก่ P22 (ต่อมน้ำเหลือง, ตับ, หัวใจ) และ P44 (ตับ, ม้าม, ต่อมม้ามและต่อม) เป็นข้อสังเกตว่ายังไม่พบการติดเชื้อหลายสายพันธุ์ในซากสัตว์ตัวเดียวกัน การพบเชื้อที่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน 100% เช่น P1, P7, P13 หรือ P45 มีความเป็นไปได้สูงว่าเป็นเชื้อในกลุ่มสัตว์ซึ่งมีที่มาจากแหล่งเดียวกัน แต่สัตว์ต่างชนิดจากแหล่งที่มาต่างกันก็พบการติดเชื้อสายพันธุ์เดียวกันได้ (Sakdinun et al., 2012) ซึ่งจากการศึกษาค้างนี้พบเชื้อที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอรูปแบบ P41 ทั้งจากซากแพะที่เข้าโรงฆ่าในจังหวัดราชบุรีและจากซากสุกรที่เข้าโรงฆ่าในจังหวัดนครปฐม และรูปแบบ P45 ในเชื้อที่แยกได้จากซากสุกรที่เข้าโรงฆ่าสัตว์ทั้งสองจังหวัด อาจเป็นไปได้ว่าสัตว์ทั้งสองกลุ่มดังกล่าวมีแหล่งที่มาจากฟาร์มในพื้นที่ใกล้เคียงกัน หรืออาจอธิบายได้เป็นอีกอย่างหนึ่งแต่ข้อจำกัดของการศึกษาค้างนี้คือไม่มีข้อมูลที่สามารถ

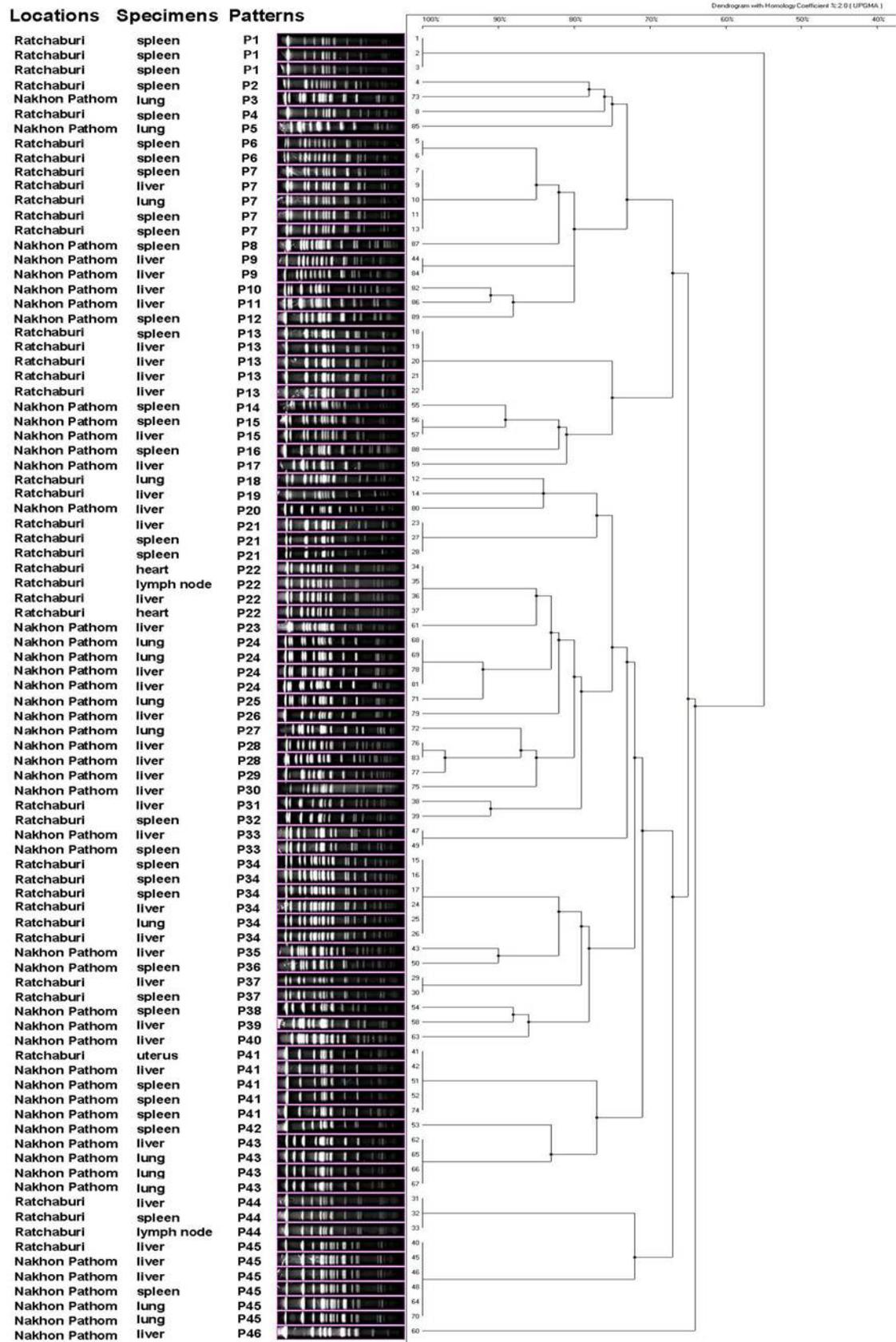


Figure 1. DNA fingerprinting of *Burkholderia pseudomallei* isolated from organs and tissues of animals slaughtered in slaughterhouses of Nakhon Pathom and Ratchaburi provinces

ตรวจสอบย้อนกลับแหล่งที่มาของสัตว์ได้ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าพบกลุ่มเชื้อที่มีรูปแบบพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากกว่า 70% ขึ้นไป เช่น P2-P12, P13-P17, P18-P32, P34-P40 และ P41-P43 สันนิษฐานว่าเชื้อแต่ละกลุ่มดังกล่าวอาจเป็นสายพันธุ์เดียวกันแต่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบางตำแหน่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์หรืออาจเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์แต่มีพันธุกรรมคล้ายกันก็เป็นได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าซากสัตว์ที่พบรอยโรคแบบฝีหนองมีโอกาสสูงที่จะพบเชื้อ *B. pseudomallei* โดยวิธีการเพาะเชื้อ ผู้ปฏิบัติงานในโรงฆ่าสัตว์ต้องปฏิบัติตามหลักการผลิตที่ดี (good manufacturing practice: GMP) และประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การกำหนดโรคหรือลักษณะของสัตว์หรือเนื้อสัตว์ที่ไม่เหมาะสมที่จะใช้เนื้อสัตว์นั้นเป็นอาหารตามพระราชบัญญัติควบคุมการฆ่าสัตว์เพื่อการจำหน่ายเนื้อสัตว์ พ.ศ. 2559 อย่างเคร่งครัดเพื่อความปลอดภัยและความมั่นคงทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามเชื้อที่แยกได้จากซากสัตว์ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ายังคงมีความไวสูงต่อยา ceftazidime, imipenem, amoxicillin-clavulanic acid, doxycycline และ Tetracycline ในขณะที่ผลการตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมพบว่าเชื้อมีความหลากหลายของสายพันธุ์แต่ส่วนใหญ่มีรูปแบบทางพันธุกรรมค่อนข้างคล้ายกัน ในอนาคตควรมีการศึกษาระบาดวิทยาทางโมเลกุลด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม เช่น multilocus sequence typing (MLST) เพื่อตรวจสอบหาความสัมพันธ์หรือความเชื่อมโยงกับเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ก่อโรคในคนหรือที่พบการระบาดในต่างถิ่น ในขณะเดียวกันหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทางด้านสัตวแพทย์ควรให้ความรู้เรื่องการเกิดโรคและการติดต่อของโรค นอกจากนี้ควรมีการฝึกอบรมพนักงานตรวจโรคสัตว์และเจ้าหน้าที่ในโรงฆ่าสัตว์เกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่มีรอยโรคส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่พิจารณาสนับสนุนงบประมาณการวิจัยประจำปี 2560 น.สพ.กัษฐพร ภูเพ็ชร ผู้อำนวยการส่วนมาตรฐานการปศุสัตว์ สำนักงานปศุสัตว์เขต 7 ที่ให้ข้อสังเกตเกี่ยวกับรอยโรคที่พบในซากสัตว์ที่โรงฆ่าสัตว์ทำให้เกิดแนวคิดและกลายมาเป็นโจทย์วิจัยในการศึกษาครั้งนี้ น.สพ.อนุสรณ์ สังข์ผาด นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำนักงานปศุสัตว์เขต 7 ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐม

สพ.ญ.สุชาดา สุสุทธิ นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดราชบุรี ที่ให้ความช่วยเหลือในการประสานงานเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดราชบุรี นายกำธร พรหมโต กลุ่มงานแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ช่วยเหลือด้านการตรวจวิเคราะห์ PFGE และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียและเชื้อราวิทยา ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา และกลุ่มระบาดวิทยาและสารสนเทศ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก ที่ให้ความร่วมมือด้านการเก็บตัวอย่างและทดสอบทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

Aljameel, M.A., Halima, M.O., ElTigani-Asil, A.E., Abdalla, A.S., Abdellatif, M.M., 2014. Liver abscesses in dromedary camels: Pathological characteristics and aerobic bacterial aetiology. *Open Veterinary Journal* 4(2), 118-123.

Carter, G.R., Cole, J.R.Jr., 1990. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 4th edition, Academic Press, Inc. San Diego, California.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2016. Method for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. 3rd edition, CLSI guideline M45. CLSI, Wayne, Pennsylvania.

Department of Livestock Development (DLD). 2017. Annual report 2017. Veterinary Research and Development Center (western region), p 30.

Godoy, D., Randle, G., Simpson, A.J., Aanensen, D.M., Pitt, T.L., Kinoshita, R., Spratt, B.G., 2003. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (5), 2068-2079.

Harris, P.N.A., Ketheesan, N., Owens, L., Norton, R.E., 2009. Clinical features that affect indirect-hemagglutination-assay responses to *Burkholderia pseudomallei*. *Clinical and Vaccine Immunology* 16 (6), 924-930.

Hassan, M.R.A., Vijayalakshmi, N., Pani, S.P., Peng, N.P., Mehenderkar, R., Voralu, K., Michael, E., 2014. Antimicrobial susceptibility pattern of *Burkholderia pseudomallei* among melioidosis case in Kedah, Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health* 45 (3), 680-688.

Julagiwansujarit, J., Naksuwan, R., Sakdinun, P., 2014. Epidemiology and genetic diversity of *Burkholderia pseudomallei* strains isolated from goats deer pigs and soil in Ratchaburi province by Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Thai-NIAH eJournal*, <http://niah.dld.go.th/niah> 8 (3), 113-129.

- Kongkaew, W., Thiptara, A., Kaewkalong, S., Hinjoy, S., 2017. Situation of melioidosis in Thailand, 2006-2015. Thai-NIAH eJournal, <http://niah.dld.go.th/niah> 12 (1), 80-102.
- Limmathurotsakul, D., Wongsuvan, G., Ngamwilai, S., Saiprom, N., Rongkard, P., Thaipadungpanit, J., Chantratits, N., Day, N.P.J., Peacock, S.J., 2014. Melioidosis caused by *Burkholderia pseudomallei* in drinking water, Thailand, 2012. *Emerging Infectious Diseases* 20 (2), 265-268.
- Manivanh, L., Pierret, A., Rattanavong, S., Kounnavongsa, O., Buisson, Y., Elliott, I., Maeght, J.L., Xayyathip, K., Silisouk, J., Vongsouvath, M., Phetsouvanh, R., Newton, P.N., Lacombe, G., Ribolzi, O., Rochelle-Newall, E., Dance, D.A.B., 2017. *Burkholderia pseudomallei* in a lowland rice paddy: seasonal changes and influence of soil depth and physico-chemical properties. *Scientific Report* 7, 3031. doi: 10.1038/s41598-017-02946-z.
- Rolim, D.B., Rocha, M.F.G., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Leitao-Junior, N.P., Inglis, T.J.J., Sidrim, J.J.C., 2009. Environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* in Ceara state, northeastern Brazil. *Applied Environment Microbiology* 75 (4), 1215-1218.
- Sakdinun, P., Paethaisong, T., Antarasena, C., 2012. Epidemiological study of *Burkholderia pseudomallei* isolates from animals and soil in an endemic area of Ratchaburi province by pulsed-field gel electrophoresis. *Proceedings of Thailand-Japan joint conference on animal health 2012. The 25th year anniversary of National Institute of Animal Health; May 30-31, 2012. Rama Gardens hotel, Bangkok, Thailand*, 117-123.
- Thong, K.L., Cheong, Y.M., Puthucheary, S., Koh, C.L., Pang, T., 1994. Epidemiologic analysis of sporadic *Salmonella* Typhi isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (5), 1135-1141.
- Vongphayloth, K., Rattanavong, S., Moore, C.E., Phetsouvanh, R., Wuthiekanun, A., Phouminh, V., Sengdouangphachanh, P., Newton, P.N., Buisson, Y., 2012. *Burkholderia pseudomallei* detection in surface water in southern Laos using Moore's swabs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86 (5), 872-877.