RESEARCH ARTICLE

Serovar Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by Combination of Multiplex PCR and Single PCR Based on *apx* and *cps* Genes

Walaiporn Tonpitak[1]

Abstract

Objective — *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a causative agent of porcine pleuropneumonia, can be categorized into 15 serovars which vary in geographic distribution and have specific immune responses. This study aimed to improve serovar identification of *A. Pleuropneumoniae* by using combination of multiplex PCR and single PCR.

Materials and Methods — *A. pleurpneumoniae* used in this study comprised 15 serovars of reference strains and 33 strains isolated from pig tissues (6 from the lungs and 27 from the tonsils) which were randomly collected from slaughter houses and from Mahanakorn University of Technology Veterinary Diagnostic Center. To identify serovars of *A. Pleurpneumoniae*, multiplex PCR based on *apx*I, *apx*II, *apx*III and *cps* genes were used in combination with single PCR based on *apx*IV gene. In addition, the result of the serova identification from the above method was compared with that from the slide agglutination test.

Results — Combination of the multiplex PCR and the single PCR based on *apx* and *cps* genes enabled all reference serovars 1-15 to be distinguished except 3 groups of 6 serovars: serovar 5A versus 5B, serovar 9 versus 11 and serovar 12 versus 13. Of 33 isolates studied, 20 isolates (61%) of *A. pleuropneumoniae* were serotyped by this method. Serovars 1, 2, 5 and 6 were found and serovar 1 was the most prevalence. All identified serovars were in accordance to those of the slide agglutination test.

Conclusion — Combination of the multiplex PCR and the single PCR based on *apx* and *cps* genes could be a supporting tool for *A. pleuropneumoniae* typing. However, to improve efficiency of the method, further studies are needed to find genes that are specific to serovars or less variation between strains.

KKU Vet J. 2009;19(2):150-161 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Serovar; PCR

[1]Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, 140 Cheum Sampan Rd., Nong Chok, Bangkok, Thailand 10530

Phone: 029883655 ext. 5200, 5221 Fax: 029883655 ext. 5201 E-mail: wtonpitak@hotmail.com

การระบุซีโรวาร์ *Actinobacillus pleuropneumoniae* โดยใช้ multiplex PCR ร่วมกับ single PCR ตรวจหายีน *apx* และ *cps*

วลัยพร ตนพิทักษ์[1]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ *Actinobacillus pleuropneumoniae* เป็นสาเหตุของโรคปอดและเยื่อหุ้มปอดอักเสบในสุกร จำแนกออกเป็น 15 ซีโรวาร์ ซึ่งพบการระบาดในแต่ละภูมิภาคแตกต่างกันไป และภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะต่อซีโรวาร์ การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อปรับปรุงการระบุซีโรวาร์ของ *A. pleuropneumoniae* ทั้ง 15 ซีโรวาร์ ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ *A. Pleuropneumoniae* ที่ทดสอบ ได้แก่ สายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 15 ซีโรวาร์ และ *A. pleuropneumoniae* จำนวน 33 ตัวอย่างที่แยกได้จากสุกร (จำนวน 6 ตัวอย่างจากปอด และจำนวน 27 ตัวอย่างจากทอนซิล) ตัวอย่างดังกล่าวเก็บโดยการสุ่มจากโรงฆ่าสัตว์ และตัวอย่างที่ถูกส่งมายังศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ระบุซีโรวาร์โดยการตรวจด้วยวิธี multiplex PCR เพื่อตรวจหายีน *apx*I, *apx*II, *apx*III และ *cps* ร่วมกับ single PCR เพื่อตรวจหายีน apxIV นอกจากนี้ ยังเปรียบเทียบผลการตรวจดังกล่าวกับวิธี slide agglutination test

ผลการศึกษา วิธีที่ปรับปรุงขึ้นใหม่นี้ สามารถจำแนก *A. pleuropneumoniae* สายพันธุ์มาตรฐานซีโรวาร์ 1-15 ได้ ยกเว้น 3 กลุ่มไม่สามารถจำแนกได้ คือ ซีโรวาร์ 5A และ 5B, ซีโรวาร์ 9 และ 11, ซีโรวาร์ 12 และ 13 สำหรับทดสอบกับสายพันธุ์ที่แยกได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างปอดและทอนซิลสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ และสุกรป่วยจำนวน 33 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกซีโรวาร์ได้ 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 61 ซีโรวาร์ที่พบ คือ 1, 2, 5 และ 6 โดยพบซีโรวาร์ 1 มากที่สุด ซึ่งซีโรวาร์ที่จำแนกได้ทั้งหมดให้ผลสอดคล้องกับการจำแนกซีโรวาร์ด้วยวิธี slide agglutination test

ข้อสรุป วิธีนี้เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้สนับสนุนการจำแนกซีโรวาร์ *A. pleuropneumoniae* ได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาเพื่อคัดเลือกยีนที่มีความจำเพาะต่อซีโรวาร์หรือมีความแปรผันน้อยยังคงต้องพัฒนาต่อไปเพื่อให้วิธีการมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2552;19(2):150-161 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

คำสำคัญ: *Actinobacillus pleuropneumoniae* ซีโรวาร์ พีซีอาร์

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร 140 ถนนเชื่อมสัมพันธ์ แขวงกระทุ่มราย เขตหนองจอก กรุงเทพฯ 10530

โทรศัพท์ 029883655 ต่อ 5200, 5221 แฟกซ์: 029883655 ต่อ 5201 E-mail: wtonpitak@hotmail.com

บทนำ

Actinobacillus pleuropneumoniae เป็นสาเหตุของปอดและเยื่อหุ้มปอดอักเสบในสุกร ซึ่งพบได้ในสุกรทุกอายุ แต่สุกรช่วงอายุประมาณ 3 เดือนพบว่ามีความไวต่อการติดเชื้อมากที่สุด [1] การติดเชื้อนี้พบในทุกภูมิภาคของโลกซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรอย่างมาก *A. pleuropneumoniae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น แบ่งออกเป็น 2 ไบโอวาร์ โดยอาศัยความแตกต่างของความต้องการ nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) ในการเจริญเติบโต และ 15 ซีโรวาร์ ซึ่งแตกต่างกันที่โครงสร้างของโพลิแซคคาไรด์ในแคปซูล (capsular polysaccharides) [2,3] ในแต่ละภูมิภาคจะพบการกระจายตัวของซีโรวาร์แตกต่างกันไป ซีโรวาร์ 2 และ 9 พบในหลายประเทศในแถบยุโรป ในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือส่วนใหญ่พบซีโรวาร์ 1 และ 5 ในประเทศแคนาดาส่วนใหญ่พบซีโรวาร์ 1, 3 และ 5 [1,4] ในประเทศไทยพบซีโรวาร์ 1, 2, 3, 5 และ 11 [5,6] ยีน *apx* เป็นปัจจัยหนึ่งที่สร้างความรุนแรง (virulence factor) ที่สำคัญของ *A. pleuropneumoniae* ซึ่ง *apx* operon ประกอบด้วยยีน 4 ชนิด คือ *apx*I, *apx*II, *apx*III และ *apx*IV *apx*ICABD operon พบในซีโรวาร์ 1, 5A, 5B, 9, 10, 11 และ 14 *apx*IICA operon พบในทุกซีโรวาร์ยกเว้นซีโรวาร์ 10 และ 14 *apx*IIICABD พบในซีโรวาร์ 2, 3, 4, 6, 8 และ 15 สำหรับยีน *apx*IV พบในทุกซีโรวาร์แต่มีขนาดแตกต่างกันในแต่ละซีโรวาร์ [7-9] การจำแนกซีโรวาร์ที่มีการพัฒนาขึ้นมีอยู่หลายวิธี ได้แก่ การตรวจหาแอนติเจนบนผิวเซลล์ด้วยวิธี slide agglutination test หรือ immunodiffusion test การตรวจหายีนที่จำเพาะกับบางซีโรวาร์ [10-13] การตรวจหายีนชนิดต่างๆ [14-16] การตรวจดูแบบการตัดด้วยเอนไซม์ของยีนที่ได้จากการทำ PCR (PCR-Restriction analysis) [17,18] อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถจำแนกได้ทุกซีโรวาร์ ปัจจุบันวัคซีนที่มีจำหน่ายทางการค้าเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจาก *A. pleuropneumoniae* มีทั้งแบบวัคซีนเชื้อตายและ subunit vaccine แต่มีรายงานพบว่าวัคซีนดังกล่าวป้องกันโรคได้จำเพาะกับบางซีโรวาร์เท่านั้น [19-21] ซึ่งการทราบถึงซีโรวาร์จะสามารถช่วยในการเลือกใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคให้มีประสิทธิภาพดี อีกทั้งยังเป็นข้อมูลสำคัญในการควบคุมโรค เนื่องจากการระบาดของ *A. pleuropneumoniae* ซีโรวาร์ต่างๆ ในแต่ละภูมิภาคแตกต่างกันไป ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงได้ปรับปรุงวิธีการจำแนกซีโรวาร์ของ *A. pleuropneumoniae* ทั้ง 15 ซีโรวาร์ให้สามารถจำแนกซีโรวาร์ได้มากยิ่งขึ้นด้วยวิธี multiplex PCR ร่วมกับ single PCR โดยตรวจหายีน *apx* และยีน *cps* ซึ่งผลของการทดสอบได้นำไปเปรียบเทียบกับการจำแนกซีโรวาร์ด้วยวิธี slide agglutination test

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

สายพันธุ์แบคทีเรีย

A. pleuropneumoniae สายพันธุ์มาตรฐาน ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ดังแสดงใน **Table 1** สำหรับ *A. pleuropneumoniae* สายพันธุ์อื่นเพาะแยกได้จากปอดสุกร 6 ตัวอย่าง และทอนซิลสุกรจำนวน

27 ตัวอย่าง โดยได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ รวมทั้งตัวอย่างที่ส่งมาตรวจวินิจฉัยที่ศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

Table 1. *A. pleuropneumoniae* Reference Strains Used in This Study

***A. pleuropneumoniae* Reference Serovar**	**Strain**	**Source and reference**
1	ATCC 27088	American Type Culture Collection
2	ATCC 27089	
3	ATCC 27090	
4	ATCC 33378	
5A	ATCC 33377	
5B	L20	Sakpuaram T. (Kasetsart University,
6	Fem ϕ	Kampangsaen Campus, Nakohn Pathom, Thailand)
7	WF83	Rosendal S. (University of Guelph, Ontario, Canada)
8	405	Nielsen R. (State Veterinary Serum Laboratory,
9	CVJ13261	Copenhagen, Denmark)
10	D13039	
11	56153	
12	8329	
13	N273	Angen ϕ. (Institute of Food and Veterinary Research,
14	3906	Copenhagen, Denmark)
15	HS143	

การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

ตัวอย่างถูกนำมาเพาะแยกเชื้อและทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโคโลนีแบคทีเรียที่สงสัยว่าเป็น *A. pleuropneumoniae* แล้วยืนยันด้วยวิธี PCR ได้ทำตามวิธีที่อธิบายรายละเอียดไว้ใน Tonpitak และคณะ [22]

วิธีการ PCR

การเตรียม DNA template จากเซลล์แบคทีเรีย

DNA template สำหรับปฏิกิริยา PCR เตรียมด้วยวิธี directed lysis method จากเซลล์แบคทีเรียที่เพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PPLO agar ที่เติม 0.001 % nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) ตามที่อธิบายไว้ใน Jessing และคณะ [10]

PCR test เพื่อจำแนกซีโรวาร์ A. pleuropneumoniae

ปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดทำในเครื่อง Thermocycler (Thermohybaid, MA, USA) โดยใช้น้ำกลั่นเป็น template ในปฏิกิริยาควบคุมลบ และหลังจากทำ gel electrophoresis แล้ว นำไปตรวจดูผลและถ่ายภาพด้วย Gel Doc 2000® system (Bio Rad, CA, USA)

*Multiplex PCR เพื่อตรวจหายีน apx*I, *apx*II, *apx*III และยีน *cps*

ปฏิกิริยา multiplex PCR ปริมาตร 50 μl ประกอบด้วย DNA Template 2 μl, 2 mM Tris-HCl (pH8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen, CA, USA), 0.2 mM ของ dNTP แต่ละชนิด (Promega, MA, USA) Primer (Invitrogen) ได้แก่ XIBD-L, XIBD-R, XIIIBD-L, XIIIBD-R, AIF, AIR, AIIF, AIIR, AIIIF และ AIIIR ตามที่อธิบายไว้ใน Sthitmatee และคณะ [21] และ AP2F และ AP2R Jessing และคณะ [12] ที่ความเข้มข้น 0.5 μM และ Taq DNAPolymerase 2 Units (Invitrogen) โดยมีขั้นตอนปฏิกิริยา คือ initial denaturation step ที่ 94˚C 5 นาที amplification จำนวน 30 รอบ ที่ 94˚C 30 วินาที, 58˚C 30 วินาที, 72˚C 2 นาที และ final extension ที่ 72˚C 10 นาที แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ PCR product ใน 2% agarose gel (Promega, MA, USA) ใน 1xTAE buffer ย้อมด้วย 0.5 μg/ml ethidium bromide

Single PCR เพื่อตรวจหายีน apxIV

สำหรับปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจหายีน apxIV ปริมาตร 25 μl ประกอบด้วย DNA Template 2 μl, 2 mM Tris-HCl (pH8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen, CA, USA), 0.2 mM ของ dNTP แต่ละชนิด (Promega), Primer APXIVA-IR และ APXIVDWN-L ตามที่อธิบายไว้ใน Sthitmatee และคณะ [21] และ Taq DNAPolymerase 1 U (Invitrogen) โดยมีขั้นตอนปฏิกิริยา คือ initial denaturation step ที่ 94˚C 5 นาที amplification จำนวน 30 รอบ ที่ 94˚C 30 วินาที, 60˚C 30 วินาที, 72˚C 2 นาที และ final extension ที่ 72˚C 10 นาที แล้วนำไป ตรวจวิเคราะห์ PCR product ใน 1% agarose gel (Promega) ใน 1xTAE buffer ย้อมด้วย 0.5 μg/ml ethidium bromide

ผลการศึกษา

Multiplex PCR เพื่อตรวจหายีน *apx*I *apx*II *apx*III และ *cps*

จากการทำ multiplex PCR เพื่อตรวจหายีน *apx*IBD, *apx*IICA, *apx*IIIBD, *apx*ICA, *apx*IIICA และ *cps* ได้ PCR product ขนาด 1447 1069 968 826 635 และ 500 bp ตามลำดับ ซึ่งผลการ

จำแนกซีโรวาร์ *A. pleuropneumoniae* โดยตรวจหายีน *apx*I, *apx*II, *apx*III และ *cps* สายพันธุ์มาตรฐานซีโรวาร์ 1-15 ทั้ง 16 สายพันธุ์พบว่า สามารถจำแนกออกได้เป็น 6 กลุ่ม ดังแสดงใน **Table 2** และ **Figure 1**

Table 2. PCR Products of *apx* and *cps* Genes of Reference Strains of *A. pleuropneumoniae* Serovar 1-15

PCR Products in Multiplex PCR	PCR Product of *apx*IV Gene (bp)	Reference Seovar
*apx*IBD, *apx*IICA	2800	7
	2400	12, 13
*apx*IBD, *apx*ICA	2800	10
	2400	14
*apx*ICA, *apx*IBD, *apx*IICA	2400	1
	1600	9, 11
	2800	5A, 5B
*apx*IICA, *apx*IIIBD, *apx*IIICA	2400	3
*apx*IBD, *apx*IICA, *apx*IIIBD, *apx*IIICA	1600	4
	2000	6
	2800	8
	3200	15
*apx*IBD, *apx*IICA, *apx*IIIBD, *apx*IIICA, *cps*	2800	2

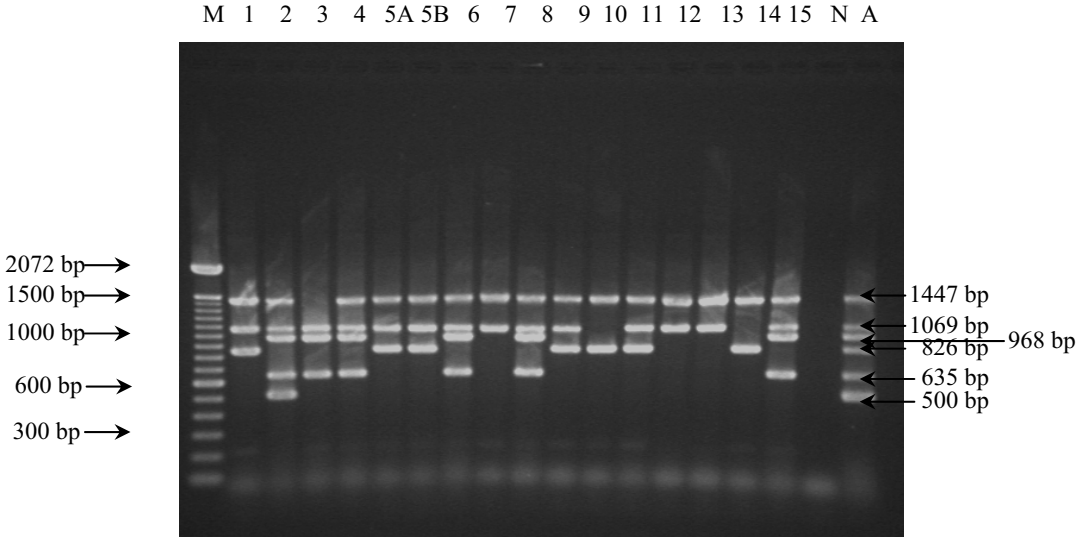
Single PCR เพื่อตรวจหายีน *apx*IV

ผลการระบุซีโรวาร์ *A. pleuropneumoniae* โดยตรวจหายีน apxIV สายพันธุ์มาตรฐานซีโรวาร์ 1-15 ทั้ง 16 สายพันธุ์พบว่า ให้ขนาดของ PCR product ที่แตกต่างกันสามารถจำแนกออกได้เป็น 5 กลุ่ม ดังแสดงใน **Table 2** และ **Figure 2**

การระบุซีโรวาร์โดยใช้ผลของ multiplex PCR เพื่อตรวจหายีน *apx*I, *apx*II, *apx*III และ *cps* ร่วมกับ single PCR เพื่อตรวจหายีน *apx*IV

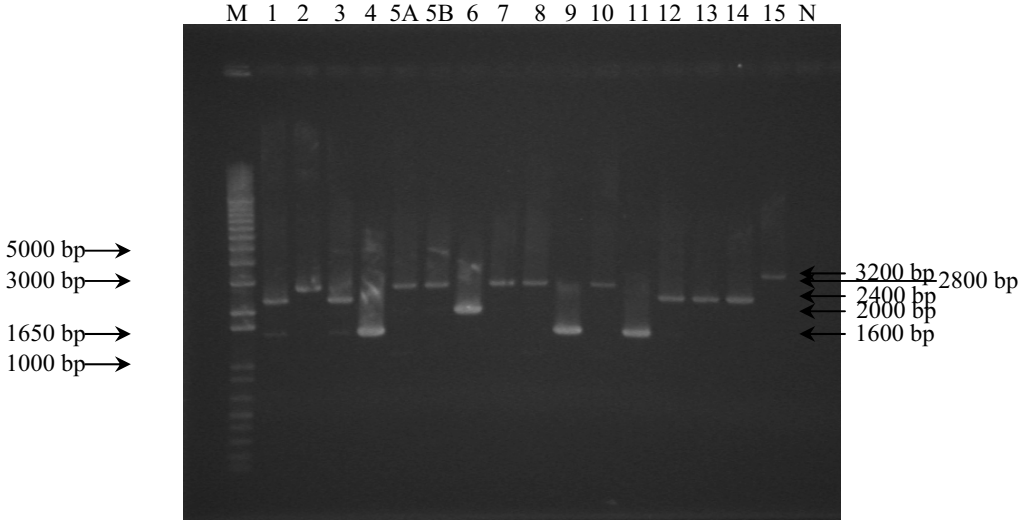
การระบุซีโรวาร์ของ *A. pleuropneumoniae* 15 ซีโรวาร์ทั้ง 16 สายพันธุ์มาตรฐาน โดยใช้ผลของการตรวจพบยีน *apx*I, *apx*II, *apx*III, *cps* และยีน *apx*IV ร่วมกันพบว่า สามารถระบุซีโรวาร์ได้ดี มีเพียง 5 ซีโรวาร์ที่ไม่สามารถระบุได้เนื่องจากให้ผลของ PCR ที่เหมือนกัน 3 แบบ คือ ซีโรวาร์ 5A และ 5B ซีโรวาร์ 9 และ 11 ซีโรวาร์ 12 และ 13 ดังแสดงใน **Table 2** และ **Figure 2**

Figure 1. Multiplex PCR Based On *apx*I, *apx*II, *apx*III, and *cps* Genes



Abbreviations: M, standard molecular weight; 1-15, reference strains of *A. pleuropneumoniae* serovar 1-15; N, negative control; A, reference strains of *A. pleuropneumoniae* serovar 1, 2 and 6 as template

Figure 2. Single PCR Based On *apx*IV Gene



Abbreviations: M, standard molecular weight; 1-15, reference strains of *A. pleuropneumoniae* serovar 1-15; N, negative control

สำหรับการระบุซีโรวาร์ของตัวอย่างที่เพาะแยกเชื้อได้จำนวน 33 ตัวอย่างพบว่าสามารถจำแนกซีโรวาร์โดยวิธีนี้ได้ 20 ตัวอย่าง คิดเป็น 61% ดังแสดงใน **Table 3** อีก 13 ตัวอย่างไม่สามารถระบุได้ โดยมี 3 ตัวอย่างที่พบยีน *cps* ซึ่งจำเพาะกับซีโรวาร์ 2 แต่รูปแบบยีน *apx* ไม่สอดคล้องกันกับซีโรวาร์มาตรฐาน สำหรับ 10 ตัวอย่างที่เหลือนั้นรูปแบบยีน *apx* ไม่สอดคล้องกับซีโรวาร์ใด โดยตัวอย่างต่างๆ ให้ผล PCR ดังแสดงใน **Table 4**

ผลการเปรียบเทียบการจำแนกซีโรวาร์ *A. pleuropneumoniae* ด้วยวิธี PCR ที่พัฒนาขึ้น กับวิธี slide agglutination test

หลังจากที่ได้จำแนกซีโรวาร์ด้วยวิธี PCR ที่พัฒนาขึ้น ตัวอย่างทั้งหมดได้นำไปตรวจซีโรวาร์ยืนยันด้วยวิธี slide agglutination test พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน

Table 3. Comparison Between the Results of *A. pleuropneumoniae* Field Isolates Serotyped by Slide Agglutination test and by Combination of Mutiplex and Single PCR

Serovar	Number of Field Isolates Serotyped	
	By Slide Agglutination Test	By Combination of Mutiplex and Simple PCR
1	17	14
2	4	1
4	1	0
5	9	4
6	1	1
17	1	0
Total	**33**	**20**

Table 4. The Gene Profiles of Field Isolates Unserotyped by Multiplex PCR and Single PCR

Serovar	No. of Field Isolates	Gene Profile in Multiplex PCR	PCR Product of *apx*IV Gene (bp)	No. of Field Isolates
1	3	*apx*IBD, *apx*IICA	2000	3
2	3	*apx*IBD, *apx*IICA, cps	1600	3
4	1	*apx*IBD, *apx*IICA	1600	1
5	5	*apx*IBD, *apx*ICA, apxIICA	2000	4
		*apx*IBD, *apx*IICA	2000	1
7	1	*apx*IBD, *apx*IICA	2000	1
Total	**13**			**13**

วิจารณ์

การระบุซีโรวาร์ *A. pleuropneumoniae* โดยใช้วิธี multiplex PCR ตรวจหายีน *apx*I, *apx*II, *apx*III และยีน *cps* ร่วมกับ single PCR ตรวจหายีน *apx*IV ในการศึกษานี้สามารถระบุซีโรวาร์ของ *A. pleuropneumoniae* ได้ถึง 20 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 33 ตัวอย่าง คิดเป็น 61%

วิธีการจำแนกซีโรวาร์ของ *A. pleuropneumoniae* มีการศึกษาและพัฒนาขึ้นมาหลายวิธี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจหายีนชนิดต่างๆ ด้วยวิธี PCR ซึ่งให้ผลรวดเร็วและแม่นยำ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถจำแนกได้ทุกซีโรวาร์ วิธีที่ได้มีการศึกษาไว้แล้ว ได้แก่ การตรวจหายีน *apx*I *apx*II *apx*III ชนิดต่างๆ ในซีโรวาร์ 1-12 ซึ่งสามารถจำแนกซีโรวาร์ออกเป็น 5 กลุ่ม มีเพียงซีโรวาร์ 3 และ 10 เท่านั้นที่จำแนกได้ชัดเจน [7] การตรวจหายีน *cps* ร่วมกับยีน *oml*A ในซีโรวาร์ 1-15 ซึ่งสามารถจำแนกซีโรวาร์ 2, 5 และ 6 ออกจากซีโรวาร์อื่นได้ [10] การตรวจหายีน *apx*I, *apx*II, *apx*III และ *apx*IV ในซีโรวาร์ 1-15 ซึ่งไม่สามารถจำแนกซีโรวาร์ 12 และ 13 ซีโรวาร์ 2, 8 และ 15 ได้ [8] การตรวจหา capsular polysaccharide ในซีโรวาร์ 1-12 ซึ่งจำแนกได้เพียงซีโรวาร์ 1, 2 และ 8 [12] การตรวจหายีน *apx*I, *apx*II, *apx*III และ *apx*IV ในซีโรวาร์ 1-12 ซึ่งไม่สามารถจำแนกซีโรวาร์ 5A และ 5B, ซีโรวาร์ 9 และ 11, ซีโรวาร์ 2 และ 8 ได้ [6] การตรวจหายีน capsular polysaccharides ในซีโรวาร์ 1-15 ซึ่งสามารถจำแนกซีโรวาร์ได้เพียงซีโรวาร์ 3, 6 และ 8 เท่านั้น [13] วิธีการตัด PCR product ของยีน *tbp*B และ *tbp*A ด้วยเอนไซม์ restriction endonuclease typeII ซึ่งศึกษาในซีโรวาร์ 1-12 ไม่สามารถจำแนกซีโรวาร์ 4 และ 11, ซีโรวาร์ 7 และ 9 [16] วิธีการตัด PCR product ของยีน *apx*IV ด้วยเอนไซม์ restriction endonuclease typeII ชนิดต่างๆ ซึ่ง Jaglic และคณะ [11] ศึกษาในซีโรวาร์ 1-12 พบว่าไม่สามารถจำแนกซีโรวาร์ 9 และ 11 ได้ ต่อมา Turni และ Blackall [23] ได้ทำการศึกษาในซีโรวาร์ 13-15 พบว่าไม่สามารถจำแนกซีโรวาร์ 13 และ 14 ได้ สำหรับวิธีทางซีรั่มวิทยานั้นมีรายงานการให้ผลบวกข้ามกันในซีโรวาร์ 1 และ 9 ซีโรวาร์ 3, 6 และ 8 ซีโรวาร์ 4 และ 7 [11] ซึ่งเป็นผลมาจากความคล้ายคลึงกันของแอนติเจนใน lipopolysaccharide หรือโปรตีนในผนังเซลล์ [3]

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการจำแนกซีโรวาร์โดยใช้ผลการตรวจหายีน *apx* และยีน *cps* ด้วยวิธี multiplex PCR ร่วมกันกับ single PCR โดยทดสอบกับ *A. pleuropneumoniae* สายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 15 ซีโรวาร์ และ *A. pleuropneumoniae* ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างปอดและต่อมทอนซิลสุกร 33 ตัวอย่าง หลังจากนั้นได้นำไปเปรียบเทียบกับวิธี slide agglutination test โดยใช้ซีรั่มที่จำเพาะกับสายพันธ์มาตรฐานซีโรวาร์ 1-12 พบว่า ตัวอย่างที่จำแนกซีโรวาร์ได้โดยวิธี multiplex PCR ร่วมกับ single PCR จำนวน 20 ตัวอย่าง และทุกตัวอย่างให้ผลสอดคล้องกันกับวิธี slide agglutination test สำหรับตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกได้โดยวิธี PCR นี้ เนื่องจากให้รูปแบบการพบยีนไม่สอดคล้องกับซีโรวาร์มาตรฐาน มีจำนวนทั้งสิ้น 13 ตัวอย่าง ซึ่งต่อมาได้นำไประบุซีโรวาร์ด้วยวิธี slide gglutination test แล้วพบว่าเป็นซีโรวาร์ 1, 2, 4, 5 และ 7 จำนวน 3, 3, 1, 5 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดการพบยีนชนิดต่างๆ ในการทดสอบ ดังแสดงใน **Table 4** รูปแบบของ

ยีน *apx* ไม่ตรงตามซีโรวาร์มาตรฐานนี้ พบได้ในการศึกษาซีโรวาร์และจีโนไทป์ของ *A. pleuropneumoniae* ในการทดลองอื่นเช่นกัน [23,24] ซึ่งการขาดหายไปของยีน *apx* บางชนิด อาจจะเป็นผลมาจากการผสมกันของดีเอ็นเอบนยีนบริเวณนั้น (DNA recombination) หรือ จาก insertion sequence-like element [23] สำหรับซีโรวาร์ 15 สายพันธุ์มาตรฐานให้ผล PCR product ของยีน *apx*IV ขนาด 3200 bp ซึ่งต่างจากผลการทดลองของ Rayamajhi และคณะ [17] ที่มีขนาดของยีน *apx*IV เพียง 2800 bp การจำแนกซีโรวาร์ *A. pleuropneumoniae* ด้วยวิธีนี้สามารถจำแนกซีโรวาร์ได้ดี มีเพียง 5 ซีโรวาร์ที่ไม่สามารถจำแนกได้เนื่องจากให้ผลของ PCR ที่เหมือนกัน 3 แบบ คือ ซีโรวาร์ 5A และ 5B, ซีโรวาร์ 9 และ 11, ซีโรวาร์ 12 และ 13 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการจำแนกซีโรวาร์ด้วยวิธี PCR โดยอาศัยยีน *apx* ในการศึกษาของ Sthitmatee และคณะ [21] ซึ่งทำการศึกษาในซีโรวาร์ที่ 1-12 เท่านั้น และไม่สามารถจำแนกซีโรวาร์ 2 และ 8, ซีโรวาร์ 5A และ 5B, ซีโรวาร์ 9 และ 11 สำหรับในการศึกษาของ Rayamajhi และคณะ [17] ซึ่งได้ทดลองใน *A. pleuropneumoniae* ซีโรวาร์ 1-15 นั้น ไม่สามารถจำแนกซีโรวาร์ได้จำนวน 4 กลุ่ม คือ ซีโรวาร์ 2, 8 และ 15, ซีโรวาร์ 5A และ 5B, ซีโรวาร์ 9 และ 11, ซีโรวาร์ 12 และ 13 แม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ primer สำหรับการตรวจหายีน *apx*IV ซึ่งมีลำดับนิวคลิโอไทด์เช่นเดียวกันกับในการศึกษาของ Rayamajhi และคณะ [17] และใช้ซีโรวาร์สายพันธุ์มาตรฐานเดียวกัน แต่ให้ผลของ PCR product ของยีน *apx*IV สำหรับซีโรวาร์ 15 มีขนาด 3200 bp ที่มีขนาดแตกต่างจากซีโรวาร์อื่นๆ ทำให้สามารถจำแนกซีโรวาร์ 15 ได้จากซีโรวาร์ 2 และ 8 ซึ่งต่างจากในการศึกษาของ Rayamajhi และคณะ [17] ที่รายงานว่าซีโรวาร์ 15 ให้ผล PCR product ของ ยีน *apx*IV เพียง 2800 bp เช่นเดียวกันกับ ซีโรวาร์ 2 และ 8 ทำให้ไม่สามารถแยกซีโรวาร์ 15 ได้จากซีโรวาร์ 2 และ 8 นั้น น่าจะเป็นผลมาจากในการศึกษาครั้งนี้ใช้ความเข้มข้น agarose gel เพียง 1 % ซึ่งทำให้แยกความแตกต่างระหว่าง PCR product ขนาด 2800 และ 3200 bp ได้ดีกว่าการใช้ความเข้มข้น agarose gel 1.5 %

การระบุซีโรวาร์ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้สนับสนุนการระบุซีโรวาร์ *A. pleuropneumoniae* ในกรณีที่ไม่สามารถจำแนกด้วยวิธีอื่น เช่น slide agglutination test ได้ซึ่งอาจเนื่องมาจากการให้ผลบวกข้ามซีโรวาร์ เป็นต้น เพื่อช่วยในการวินิจฉัย ศึกษาการระบาด และพิจารณาเลือกใช้วัคซีนในการป้องกันโรคให้มีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุซีโรวาร์ได้คิดเป็น 39% ดังนั้นการศึกษาเพื่อพิจารณาเลือกใช้ยีนอื่นที่มีความจำเพาะต่อซีโรวาร์หรือมีความแปรผันน้อยร่วมในการตรวจเพื่อให้มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้นจึงควรมีการศึกษาพัฒนาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผ.ศ.น.สพ.ดร.ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อร่าม คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้อนุเคราะห์ antiserum เพื่อใช้ในการตรวจซีโรวาร์ 1-12 ด้วยวิธี slide agglutination test และ *A. peluropneumoniae* สายพันธุ์มาตรฐานซีโรวาร์ 5B และ 6 Prof. Gerald-F. Gerlach

ที่ได้อนุเคราะห์ *A. pleuropneumoniae* สายพันธุ์มาตรฐานซีโรวาร์ต่างๆ และ อ.จุฬาภา สอนกลิ่น ที่ช่วยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

เอกสารอ้างอิง

1. วันทนีย์ เนรมิตมานสุข, ไพโรจน์ มินเด็น, จิรา วายุโชติ และ รัชนี ศิลปะสิทธิ์. ซีโรไทป์ของเชื้อฮีโมฟีลัสพลูโรนิวโมนิอี้ที่แยกได้ในประเทศไทย. *เวชชสารสัตวแพทย์* 2533;20(2):367-372.
2. Anderson CA, Potter AA, Gerlach GF. Isolation and molecular characterization of spontaneously occuring cytolysin-negative mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Infect Immun.* 1991;59: 4110-4116.
3. Blackall PJ, Klaasen HLBM, Van den Bosch H, Kuhnert P, Frey J. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Micobiol.* 2002;84:47-52.
4. Chiers K, Van O, de Lanender IP, Ducatelle R, Carel S, Haesebrouck F. Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the Apx toxins. *Vet Q.* 1998;220:65-69.
5. Cho WS, Chae C. Differentiation of twelve *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes by outer membrane lipoprotein gene-based restriction fragment length polymorphism. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003;50:90-94.
6. Fenwick B, Henry S. Porcine pleuropneumonia. *J Am Vet Med Assoc.* 1994;204:334-340.
7. Frey J, Beck M, van den Bosch JF, Segers RPAM, Nicolet J. Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae strains. Mol Cell Probes.* 1995;9:277-282.
8. Gram T, Ahrens P, Andreasen M, Nielsen JP. *An Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes-evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Vet Microbiol.* 2000;75:43-57.
9. Haesebrouck F, Chiers K, Van O, Ducatelle R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet Microbiol.* 1997;58:239-249.
10. Hennessy KJ, Iandolo JJ, Fenwick BW. Serotype identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrary primed polymerase chain reactions. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1155-1159.
11. Jaglic Z, Svastova P, Rychlik I, Nedbalcova K, Kucerova Z, Pavlik I, et al. Differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR-REA based on sequence variability of the *apx*IVA gene and by ribotyping. *Vet Microbiol.* 2004;103:63-69.
12. Jessing SG, Angen O, Inzana T. Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5, and 6. *J Clin Microbiol.* 2003;41: 4095-4100.
13. Lo TM, Ward CK, Inzana T. Detection an identification of *Actinobacillus pleuroneumoniae* serotype 5 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1704-1710.

14. Min K, Chae C. Serotype and apx genotype profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates in Korea. *Vet Rec.* 1999;145:251-254.
15. de la Puente-Redondo VA, del Blanco NG, Gutierrez-M CB, Mendez JN, Rodriguez Ferri EF. Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* and *tbpB* genes. *Res Microbiol.* 2000;151:669-681.
16. Perry MB, Altman E, Brisson JR, Beynon LM, Richards JC. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus pleuropneumoniae. Serodiagn Immun Infect Dis.* 1990;4:299-308.
17. Rayamajhi N, Sung JH, Kang SG, Lee DY, Ahn JM, Yoo HS. Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae isolates. J Vet Diagn Invest.* 2005;17:359-362.
18. Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, Nicolet J, Anderson TJ, MacInnes JI, et al. Characterization of apxIVA, a new determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae. Microbiol.* 1999;145:2105-2116.
19. Schuchert J, Inzana TJ, Angen ϕ, Jessing S. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4344-4348.
20. Sebunya TN, Saunders JR. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. *J Am Vet Assoc.* 1983;182:1333-1337.
21. Sthitmatee N, Sirinarumitr T, Makonkewkeyoon L, Sakpuaram T, Tesaprateep T. Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based-apx genes. *Mol Cell Probes.* 2003;17: 301-305.
22. Tonpitak W, Rohde J, Gerlach GF. Prevalence of *"Actinobacillus porcitonsillarum"* in porcine tonsils and development of a diagnosis duplex PCR differentiating between *"Actinobacillus porcitonsillarum"* and *Actinobacillus pleuropneumoniae. Vet Microbiol.* 2007;122:157-165.
23. Turni C, Blackall PJ. An Evaluation of the apxIVA based PCR-REA method for differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae. Vet Microbiol.* 2007;31:163-169.
24. Zhou L, Jones SCP, Angen ϕ, Bosse JT, Nash JHE, Frey J, et al. Multiplex PCR that can distinguish cross-reactive serovar 3, 6 and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *J Clin Micobiol.* 2008;46: 800-803.