

Application of Polymerase Chain Reaction to detect serogroups, serotypes and virulence genes in *Pasteurella multocida* isolated from cattle and buffalo with hemorrhagic septicemia in Thailand

Thammarath Sujit* Apasara Worarach

Abstract

Background: Hemorrhagic septicemia (HS) is a fatal infection in cattle and buffalo caused by *Pasteurella multocida* (*P. multocida*). Traditional diagnostic methods, such as indirect haemagglutination (IHA) and agar-gel immunodiffusion (AGID), are complex, time-consuming, and involve experimental animals for antiserum production. Currently, laboratories have applied the PCR method, which is more accurate and reliable, to replace the traditional method. This study aimed to use PCR to identify the capsular serogroups, LPS serotypes, and virulence genes of *P. multocida* and to analyze the distribution of virulence-associated genes in HS.

Methods: A total of 102 strains of *P. multocida*, isolated from samples related to hemorrhagic septicemia in cattle and buffaloes in Thailand from 1989 to 2024, were cultured and confirmed using biochemical tests. The serogroups (A, B, D, E, and F) and serotypes (L1-8) were identified using multiplex PCR. Additionally, the analysis of 23 virulence-associated genes (*ptfA*, *fimA*, *hsf-1*, *hsf-2*, *pfhA*, *tadD*, *toxA*, *exbB*, *exbD*, *tonB*, *hgbA*, *hgbB*, *fur*, *nanB*, *nanH*, *pmHAS*, *sodA*, *sodC*, *tbpA*, *ompA*, *ompH*, *oma87* and *plpB*) was performed using PCR, followed by statistical analysis for correlation and comparison.

Results: A total of 102 *P. multocida* strains were isolated from 83 buffaloes and 19 cattle, all of which were classified into serogroup B and serotype L2. Virulence gene distribution revealed four distinct patterns among the 23 genes examined. Pattern A, (17 genes, 95.09%), was the most frequent, followed by Pattern B (16 genes, 2.94%), Pattern C (18 genes, 0.98%), and Pattern D (21 genes, 0.98%). Significant differences were found in *hsf-1*, *tadD*, *tbpA*, *hgbB*, and *pmHAS* genes ($p < 0.05$).

Conclusion: The PCR technique can effectively detect *Pasteurella multocida* in Thai cattle and buffalo. All strains identified belonged to serogroup B and serotype L2. Furthermore, each strain preserved 16 virulence factor genes, with five genes (*hsf-1*, *tadD*, *tbpA*, *hgbB*, and *pmHAS*) exhibiting differential distribution patterns. Additionally, the virulence factor gene distribution in the vaccine strains closely resembled that of the prevalent local strains, suggesting that these vaccine strains may possess potential for disease prevention.

Keywords: *Pasteurella multocida*, serogroups, serotypes, virulence-associated genes, PCR, cattle and buffalo

¹National Institute of Animal Health, Kasetklang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

*Corresponding author: Tel. 0 2561 2730 e-mail: thammarathh@hotmail.com

Received: 7 October 2025

Revised: 17 October 2025

Accepted: 20 October 2025

การประยุกต์ใช้ Polymerase chain reaction เพื่อตรวจหาซีโรกรุ๊ป ซีโรไทป์ และยีนควบคุม ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่เพาะแยกได้จากโคและกระบือ ที่เป็นโรคเฮโมรายิกเซปติซีเมียในประเทศไทย

ธรรมรัฐ สุจิต* อภัสรา วรราช

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคเฮโมรายิกเซปติซีเมีย (Hemorrhagic septicemia; HS) หรือโรคคอบวม เป็นโรคติดต่อในกระแสดเลือดเฉียบพลันที่ร้ายแรงถึงชีวิตในโคและกระบือ เกิดจากเชื้อ *Pasteurella multocida* (*P. multocida*). การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคดั้งเดิม ในการจำแนกซีโรกรุ๊ป ใช้วิธี indirect haemagglutination (IHA) และตรวจแยก lipopolysaccharide (LPS) serotype โดยวิธี agar-gel immunodiffusion (AGID) ที่มีขั้นตอนยุ่งยาก ซับซ้อน ใช้เวลานานและมีการใช้สัตว์ทดลองในการผลิตแอนติซีรัม ปัจจุบันห้องปฏิบัติการมีการประยุกต์ใช้ วิธี PCR ที่มีความถูกต้องแม่นยำ มาทดแทนวิธีการดั้งเดิม ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าวิจัยวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหา capsular serogroup, LPS serotype และ virulence-associated genes ของเชื้อ *P. multocida* ด้วยวิธี PCR และเพื่อวิเคราะห์รูปแบบการกระจายของยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยความรุนแรงของโรค HS

วิธีการ: นำเชื้อ *P. multocida* ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างส่งตรวจโรค HS ในโคและกระบือในประเทศไทย ระหว่างปี 2532-2567 จำนวน 102 สายพันธุ์ มาเพาะเชื้อและตรวจยืนยันเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี ทำการตรวจหาซีโรกรุ๊ป (A, B, D, E, และ F) และตรวจหาซีโรไทป์ของเชื้อ (L 1-8) ด้วยวิธี multiplex PCR และตรวจหายีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ 23 ยีน (*ptfA*, *fimA*, *hsf-1*, *hsf-2*, *pfhA*, *tadD*, *toxA*, *exbB*, *exbD*, *tonB*, *hgbA*, *hgbB*, *Fur*, *nanB*, *nanH*, *pmHAS*, *sodA*, *sodC*, *tbpA*, *ompA*, *ompH*, *oma87* และ *plpB*) ด้วยวิธี PCR แล้ววิเคราะห์และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ด้วยวิธีทางสถิติ

ผล: เชื้อ *P. multocida* จำนวน 102 สายพันธุ์ จากกระบือ 83 สายพันธุ์ และโค 19 สายพันธุ์ ทุกสายพันธุ์จัดอยู่ในซีโรกรุ๊ป B และซีโรไทป์ L2 และพบการกระจายตัวของยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ 4 รูปแบบจาก 23 ยีน ยีนรูปแบบ A พบมากที่สุดคือ 17 ยีน (95.09%) รูปแบบ B ตรวจพบ 16 ยีน (2.94%) รูปแบบ C ตรวจพบ 18 ยีน (0.98%) และรูปแบบ D ตรวจพบ 21 ยีน (0.98%) โดยพบว่าสายพันธุ์ของเชื้อวัคซีนมียีนรูปแบบ A ซึ่งการกระจายตัวของยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงในแต่ละรูปแบบพบความแตกต่างกันของยีน *hsf-1*, *tadD*, *tbpA*, *hgbB* และ *pmHAS* อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

สรุป: สามารถใช้วิธี PCR มาตรวจเชื้อ *P. multocida* ในโคและกระบือไทยพบเป็นซีโรกรุ๊ป B ซีโรไทป์ L2 ทั้งหมด โดยเชื้อทั้งหมดมีการอนุรักษ์ยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ 16 ยีน และมีการกระจายแปรผัน 5 ยีน (*hsf-1*, *tadD*, *tbpA*, *hgbB* และ *pmHAS*) และพบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตวัคซีน มีรูปแบบการกระจายตัวของยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อใกล้เคียงกับเชื้อที่ระบาดในพื้นที่ ซึ่งอาจแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการป้องกันโรค

คำสำคัญ: *Pasteurella multocida*, ซีโรกรุ๊ป, ซีโรไทป์, ยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรง, PCR, โคและกระบือ

*สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

*ผู้รับผิดชอบบทความ โทร: 0 2561 2730 e-mail: thammrathh@hotmail.com

บทนำ

โรคเฮโมราจิกเซปติซีเมีย (Hemorrhagic septicemia; HS) หรือโรคคอบวม เป็นโรคติดเชื้อในกระแสเลือดเฉียบพลันที่ร้ายแรงถึงชีวิตในโคและกระบือ เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) เป็นโรคสัตว์ที่อยู่ในรายชื่อขององค์การสุขภาพสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organisation for Animal Health: WOAH) และเป็นโรคในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 เมื่อสัตว์ติดเชื้อจะส่งผลให้สัตว์ตายภายใน 8-24 ชั่วโมงหรืออาจนานถึง 3-5 วัน กระบือมีความไวต่อเชื้อมากกว่าในโค และแสดงอาการป่วยที่รุนแรงกว่าโดยพบอาการบวม น้ำใต้ผิวหนังบริเวณขากรรไกร คอ และหน้าอก ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของโรคในกรณีติดเชื้อเฉียบพลันสัตว์อาจเสียชีวิตกะทันหันโดยไม่มีอาการทางคลินิก จากข้อมูลขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization) โรคนี้มีอัตราการตายที่ค่อนข้างสูงประมาณ 60% และในประเทศไทยพบรายงานอัตราการป่วยตายจากกรณีการระบาดของโรคในกระบือพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดอุดรธานี กาฬสินธุ์ และมหาสารคาม ปี 2535 เท่ากับ 60.62% (สมใจ และคณะ, 2535) จังหวัดนครพนม ปี 2558 เท่ากับ 57.1% (หฤทัย และชนินทร์, 2561) และจากข้อมูลรายงานการระบาดของโรคในจังหวัดนครพนมและมหาสารคามพบอัตราการตายสูงในสัตว์อายุน้อย (หฤทัย และชนินทร์, 2561; อัญชลี และอรพรรณ, 2565) ซึ่งสร้างความเสียหายร้ายแรงต่อเกษตรกรและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก นอกจากนี้เชื้อ *P. multocida* ยังก่อให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ แม้จะไม่มีรายงานยืนยันเกี่ยวกับการติดเชื้อในมนุษย์ด้วย *P. multocida* ซีโรไทป์ B:2 และ E:2 แต่ซีโรไทป์อื่น ๆ ก็สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ได้ ดังนั้นจึงควรระมัดระวังเพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสเชื้อและมีมาตรการป้องกันที่เหมาะสมเพื่อรับมือกับกรณีที่สงสัยว่าเป็นโรค HS (WOAH, 2024)

เชื้อ *P. multocida* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่เคลื่อนที่ สามารถก่อให้เกิดโรคได้หลากหลายในสัตว์และมนุษย์ (Peng et al., 2019; Calderón Bernal et al., 2023; WOAH, 2024) โดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 5 ซีโรกรุ๊ปตามแอนติเจนแคปซูล ได้แก่ A, B, D, E และ F แต่ละสายพันธุ์จะเกี่ยวข้องกับโฮสต์เฉพาะ แม้ว่าจะไม่ได้จำกัดอยู่เพียงโฮสต์เหล่านั้นเท่านั้น (Ewers et al., 2006; Harper et al., 2006) โดยซีโรกรุ๊ป A สัมพันธ์กับสัตว์ปีก ซีโรกรุ๊ป B สัมพันธ์ในโคกระบือ ซีโรกรุ๊ป D สัมพันธ์กับสุกร และแบ่งออกเป็น 1-16 ซีโรไทป์ (Townsend et al., 2001; Khamesipour et al., 2014; Harper et al., 2015) เชื้อ *P. multocida* ที่เป็นสาเหตุการเกิดโรค HS เกิดจากสายพันธุ์ B:2 (สายพันธุ์เอเชีย) หรือ E:2 (สายพันธุ์แอฟริกา) มีอาการทางคลินิกที่สำคัญคือ มีไข้ หายใจลำบาก มีน้ำมูกไหล น้ำลายเป็นฟองซึ่งอาจนำไปสู่การล้มนอนของสัตว์ และเสียชีวิตในที่สุด ซึ่งในประเทศไทยพบเฉพาะสายพันธุ์ B: 2 และ B:2, 5 ส่วนการติดเชื้อซีโรไทป์ A:1 และ A:3 มักเกี่ยวข้องกับปอดบวมและทำให้เสียชีวิต ซึ่งมีการศึกษาในสเปนพบการตรวจพบเชื้อ *P. multocida* ในโคสุขภาพดีและโคที่ป่วยด้วย Bovine Respiratory Disease (BRD) ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ A: L3 (Calderón Bernal et al., 2023)

เชื้อ *P. multocida* มีปัจจัยความรุนแรง (virulence factors: VFs) ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ adherence proteins, toxin, iron-intake related proteins, sialic acid kinase, hyaluronic acid, superoxide dismutase และ outer membrane proteins ซึ่งการแสดงออกของปัจจัยความรุนแรงนี้จะถูกควบคุมด้วยยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ (virulence-associated genes) ซึ่งจะส่งผลต่อการบุกรุกและตั้งรกรากของเชื้อ *P. multocida* ในเซลล์โฮสต์ โดยขัดขวางการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ การทำลายเนื้อเยื่อของโฮสต์ รวมถึงการกระตุ้นการตอบสนองต่อการอักเสบของโฮสต์ที่เป็นพิษ และยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนอื่น ๆ และส่งเสริมการพัฒนาของโรค (Khamesipour et al., 2014; Aski-Shirzad and Tabatabaei, 2016)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *P. multocida* ในปัจจุบันมีเทคนิคและวิธีในการตรวจยืนยันเชื้อโดยการจำแนกซีโรกรุ๊ป และซีโรไทป์ ทั้งจากเทคนิคดั้งเดิม โดยใช้วิธี indirect haemagglutination (IHA) และตรวจแยก lipopolysaccharide (LPS) serotype โดยวิธี agar-gel immunodiffusion (AGID) (WOAH, 2024) และเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลที่ถูกพัฒนาขึ้นมาทดแทนเทคนิคดั้งเดิมในการจำแนกซีโรกรุ๊ป ส่วนเทคนิคอณูชีวโมเลกุลมีผู้พัฒนาเทคนิค PCR มาใช้ในการยืนยันเชื้อ *P. multocida* ทั้งในส่วนการยืนยันเชื้อ และการยืนยันซีโรกรุ๊ป (Townsend et al., 1998; Townsend et al., 2001) และการพัฒนา multiplex PCR ในการตรวจยืนยันซีโรไทป์ (Harper et al., 2015) เพื่อใช้ทดแทนวิธี IHA และ AGID ที่ต้องใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อซีโรกรุ๊ปหรือซีโรไทป์ของเชื้อในการทดสอบ โดยต้องใช้สัตว์ทดลองในการผลิตแอนติซีรัม มีขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยาก และแอนติซีรัมของเชื้อที่เตรียมได้อาจเกิดการบวกข้ามกลุ่ม (cross reaction) ได้ รวมทั้งการประยุกต์ใช้ PCR ตรวจหาปัจจัยความรุนแรงของโรคทดแทนวิธีการฉีดเชื้อที่แยกได้จากสัตว์ป่วยในสัตว์ทดลอง ซึ่งวิธีการตรวจวินิจฉัยแบบดั้งเดิมล้วนมีขั้นตอนที่ซับซ้อน ใช้เวลาในการทดสอบหลายวัน และผู้ปฏิบัติการทดสอบต้องมีประสบการณ์ในการอ่านและแปลผลการทดสอบ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้รวบรวมเชื้อ *P. multocida* ที่แยกได้จากตัวอย่างโคกระปือที่ส่งตรวจวินิจฉัยที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2532-2567 มาเพาะแยก และตรวจยืนยันเชื้อ จำแนกซีโรกรุ๊ป ซีโรไทป์ และตรวจหาปัจจัยความรุนแรงของเชื้อโดยใช้วิธี PCR ที่ให้ผลตรวจรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ เพื่อลดข้อจำกัดของวิธีดั้งเดิมและพัฒนาศักยภาพของห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *P. multocida* ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างอวัยวะภายในโคกระปือที่เป็นโรค HS ในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2532-2567 จำนวน 102 สายพันธุ์ จากโค 19

สายพันธุ์ และกระปือ 83 สายพันธุ์ เก็บรักษาไว้ที่ -80°C ในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ นำเชื้อมาเพาะบน blood agar (Oxoid, Germany) บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง ตรวจยืนยันเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (Markey et al., 2013) (catalase test, oxidase test และ oxidation-fermentation; O-F test) โดยมีเชื้ออ้างอิง *P. multocida* ซีโรกรุ๊ป A, B, D, E และ F ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก National Institute of Animal Health, Japan สำหรับเป็นตัวควบคุมบวก

วิธี Polymerase chain reaction (PCR)

การเตรียม DNA template ดัดแปลงจากวิธีของ Queipo-Ortuño et al. (2008) โดยนำเชื้อ *P. multocida* เพาะบน blood agar (Oxoid, Germany) บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง ละลายเชื้อ 3-5 โคโลนี ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที ที่ส่วนน้ำใส แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นทันที จากนั้นปั่นที่ 12,000 rpm 5 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น DNA template ไว้ที่ -20°C เพื่อรอการทดสอบต่อไป

การตรวจหา capsular serogroup ของเชื้อ

P. multocida ด้วยวิธี multiplex PCR

ตรวจยืนยันเชื้อ *P. multocida* และตรวจหา *cps* genes ที่จำแนกซีโรกรุ๊ปออกเป็น A, B, D, E และ F ดัดแปลงจากวิธีของ Townsend et al. (2001) โดยใช้ primer 6 คู่สำหรับตรวจหา serogroup-specific โดยใช้ capsular typing (ตารางที่ 1) มีขั้นตอนดังนี้ ใส่ DNA 2 ไมโครลิตร ลงในหลอด multiplex PCR master mix (QIAGEN, Germany) 10 ไมโครลิตร ที่มี 0.2 μM primer mix 6 คู่รวมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ 20 ไมโครลิตร โดยมี DNA ของเชื้ออ้างอิงตัวควบคุมบวกและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (BIO-RAD, USA) ตั้งค่าโปรแกรมดังนี้ initial activation 95°C 15 นาที ต่อด้วย denaturation 94°C 30 วินาที annealing 55°C 30 วินาที และ extension 72°C 30 วินาที ทั้งหมด

35 รอบ final extension 72 °C 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ PCR product ใน 2 % agarose gel ด้วย electrophoresis (MyRun, Japan) วิเคราะห์ผลจาก แถบของ PCR product

การตรวจหา LPS serotype ของเชื้อ *P. multocida* ด้วยวิธี multiplex PCR

ตรวจหา LPS serotype: L 1-8 ดัดแปลงจากวิธีของ Harper et al. (2015) ขั้นตอนเช่นเดียวกับการตรวจหา capsular serogroup โดยใช้ primer mix 8 คู่สำหรับ LPS serotype (ตารางที่1) ตั้งโปรแกรมเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (BIO-RAD, USA) ดังนี้ initial activation 95 °C 15 นาที ต่อด้วย denature 94 °C 30 วินาที annealing 52 °C 30 วินาที และ extension 72 °C 2.30 นาที ทั้งหมด 35 รอบ final extension 72 °C 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ PCR product ใน 2 % agarose gel ด้วย electrophoresis (MyRun, Japan) วิเคราะห์ผลจากแถบของ PCR product

การตรวจหา virulence-associated genes ด้วยวิธี PCR

ดัดแปลงจากวิธีของ Khamesipour et al. (2014) โดยใช้ primer สำหรับ virulence genes 23 คู่แยกกัน มีขั้นตอนดังนี้ ใส่ DNA template 2.0 ไมโครลิตร ลงใน PCR tube 0.2 มิลลิลิตร ที่มี PCR master mix (QIAGEN, Germany) 18.0 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR

buffer, 1.5 mM MgCl₂ pH 8.7, HotStar Taq DNA polymerase, 0.25 mM deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), น้ำกลั่น และ Primers mix (F และ R) 0.4 μmol (ตารางที่1) โดยมี DNA ของเชื้ออ้างอิงตัวควบคุมบวกและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (BIO-RAD, USA) โดยเริ่ม Initial activation ที่ 95 °C 15 นาที แล้วตั้งโปรแกรม denaturation ที่ 94 °C 1 นาที annealing temperature ของ primer แต่ละคู่ดังตารางที่ 1 extension ที่ 72 °C 1 นาที ทั้งหมดรวม 35 รอบ ต่อด้วย final extension ที่ 72 °C 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ PCR product ใน 1.5% agarose gel ด้วย electrophoresis (MyRun, Japan) วิเคราะห์ผลจาก แถบของ PCR product

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูล capsular serogroup, LPS serotype และ virulence-associated genes ด้วยสถิติเชิงพรรณนา และสถิติเชิงอนุมาน ทดสอบความแตกต่างของยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์และใช้สถิติ Fisher's Exact Test ในการทดสอบความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม R version 4.4.2 สำหรับ Windows (R Core Team, 2024)

ตารางที่ 1 Primer sequences, annealing temperature และขนาดของ PCR products

Putative function	Target gene	Primer sequence (5'→3')	Annealing temp. (°C)	Product length (bp)
Capsular Typing				
All	KMT1	F: ATCCGCTATTTACCCAGTGG R: GCTGTAACGAACTCGCCAC	55	460
A	<i>hyaD-hyaC</i>	F: TGCCAAAATCGCAGTCAG R: TTGCCATCATTGTCAGTG	55	1,044
B	<i>bcbD</i>	F: CATTATCCAAGCTCCACC R: GCCCGAGAGTTTCAATCC	55	760
D	<i>dcbF</i>	F: TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC R: CATCTACCCACTCAACCATATCAG	55	657
E	<i>ecbJ</i>	F: TCCGCAGAAAATTATTGACTC R: GCTTGCTGCTTGATTTTGTG	55	511
F	<i>fc bD</i>	F: AATCGGAGAACGCAGAAATCAG R: TTCCGCCGTCAATTAATCTCTG	55	851

ตารางที่ 1 Primer sequences, annealing temperature และขนาดของ PCR products (ต่อ)

Putative function	Target gene	Primer sequence (5'→3')	Annealing temp. (°C)	Product length (bp)
LPS typing				
L1	<i>pcgD</i> <i>pcgB</i>	F: ACATTCCAGATAATACACCCG R: ATTGGAGCACCTAGTAACCC	52	1,307
L2	<i>nctA</i>	F: CTTAAAGTAACACTCGCTATTGC R: TTTGATTTCCCTTGGGATAGC	52	810
L3	<i>gatF</i>	F: TGCAGGCGAGAGTTGATAAACCATC R: CAAAGATTGGTTCCAAATCTGAATGGA	52	474
L4	<i>latB</i>	F: TTTCCATAGATTAGCAATGCCG R: CTTTATTTGGCTTTATATATACC	52	550
L5	<i>rmlA</i> <i>rmlC</i>	F: AGATTGCATGGCGAAATGGC R: CAATCCTCGTAAGACCCCC	52	1,175
L6	<i>nctB</i>	F: TCTTTATAATTATACTCTCCCAAGG R: AATGAAGGTTTAAAAGAGATAGCTGGAG	52	668
L7	<i>ppgB</i>	F: CCTATATTTATATCTCCTCCCC R: CTAATATATAAACCATCCAACGC	52	931
L8	<i>natG</i>	F: GAGAGTTACAAAATGATCGGC R: TCCTGGTTCATATATAGGTAGG	52	255
virulence-associated genes				
Adhesins	<i>ptfA</i>	F: TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC R: TCATGAATCTTATGCGCAAAATCCT GCTGG	55	488
	<i>fimA</i>	F: CCATCGGATCTAACGACCTA R: AGTATTAGTTCTGCGGGTG	55	866
	<i>hsf-1</i>	F: TTGAGTCGGCTGTAGAGTTCG R: ACTCTTTAGCAGTGGGACAACTC	54	654
	<i>hsf-2</i>	F: ACCGCAACCATGCTCTTAC R: TGA CTGACATCGGCGGTAC	54	433
	<i>pfhA</i>	F: TTCAGAGGGATCAATCTTCG R: AACTCCAGT TGGTTTGTGCG	55	286
	<i>tadD</i>	F: TCTACCATTCTCAGCAAGGC R: ATCATTTCGGGCATTCAAC	55	416
Toxins	<i>toxA</i>	F: CTTAGATGAGCGACAAGG R: GAATGCCACACCTCTATAG	55	864
Iron Acquisition	<i>exbB</i>	F: TTGGCTTGTGATTGAACGC R: TGCAGGAATGGCGACTAA A	55	283
	<i>exbD</i>	F: CGTTCTGATTACAGCCTCTT R: AACGAAATCTTGGAACTGG	55	247
	<i>tonB</i>	F: CGACGGTGAACCTGAGCCA R: CCGAGCGATAAGCATTGACT	55	261
	<i>hgbA</i>	F: TCAACGGCAGATAATCAGGG R: GCGGGAATGCTGAAGATAAG	55	267
	<i>hgbB</i>	F: ACCGCGTTGGAATTATGATTG R: CATTGAGTACGGCTTGACAT	55	788
	<i>Fur</i>	F: GTTTACCGTGATTAGACCA R: CATTACTACATTTGCCATAC	55	244
Sialidases nanB	<i>nanB</i>	F: CATTGCACCTAACACCTCT R: GGACACTGATTGCCCTGAA	55	555
	<i>nanH</i>	F: GTGGGAACGGGAATTGTGA R: ACATGCCAAGTTTGCCTA	55	287
Hyaluronidase	<i>pmHAS</i>	F: TCAATGTTTGCATAGTCCGTTAG R: TGGCGAATGATCGGTGATAGA	54	430

ตารางที่ 1 Primer sequences, annealing temperature และขนาดของ PCR products (ต่อ)

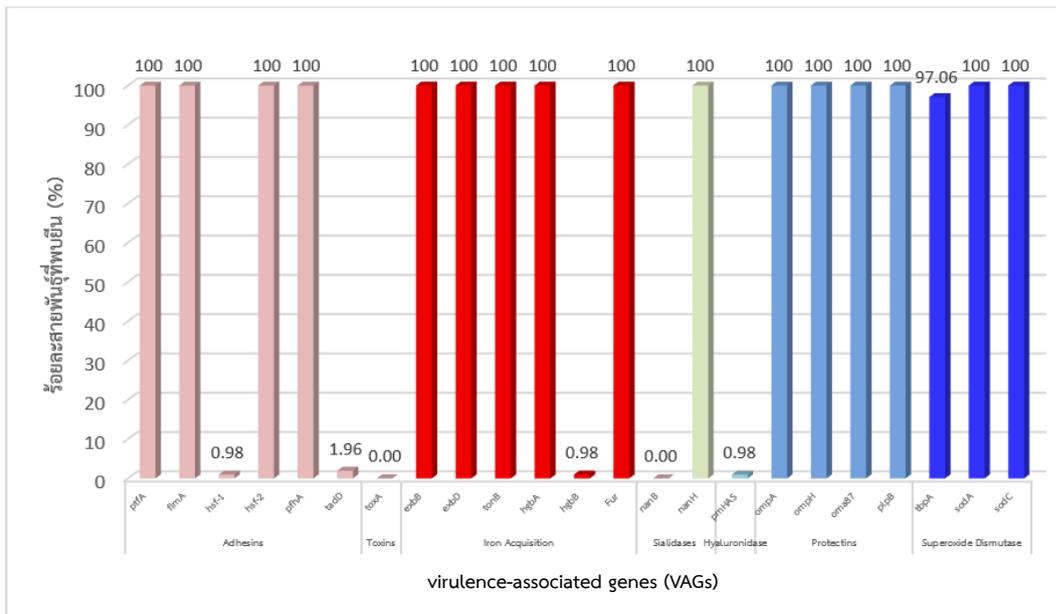
Putative function	Target gene	Primer sequence (5'→3')	Annealing temp. (°C)	Product length (bp)
Protectins	<i>ompA</i>	F: CGCATAGCACTCAAGTTTCTCC R: CATAAACAGATTGACCGAAAACG	55	201
	<i>ompH</i>	F: CGCGTATGAAGTTTAGGT R: TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC	55	438
	<i>oma87</i>	F: GGCAGCGAGCAACAGATAACG R: TGTTTCGTCAAATGTCGGGTGA	55	838
	<i>plpB</i>	F: TTTGGTGGTGCATGTCTTCT R: AGTCACTTTAGATTGTGCGTAG	55	282
Superoxide Dismutase	<i>tbpA</i>	F: TTGGTTGGAACGGTAAAGC R: TAACGTGTACGGAAAAGCCC	54	728
	<i>sodA</i>	F: TACCAGAATTAGGCTACGC R: GAAACGGGTTGCTGCCGCT	55	361
	<i>sodC</i>	F: AGTTAGTAGCGGGTTGGCA R: TGGTGCTGGGTGATCATCATG	55	235

ผลและวิจารณ์

เชื้อ *P. multocida* จำนวน 102 สายพันธุ์ ทุกสายพันธุ์ยืนยันลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar พบเชื้อโคโลนีขนาดเล็ก กลม ขอบผิวเรียบ มันวาว ไม่เกิดการสลายเม็ดเลือดแดง และยืนยันด้วยวิธีทางชีวเคมีเป็นเชื้อ *P. multocida* จากนั้นยืนยันเชื้อด้วยวิธี PCR และ multiplex-PCR เชื้อทั้ง 102 สายพันธุ์ จัดอยู่ในซีโรกรุ๊ป B และซีโรไทป์ L2 (B:L2) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิด HS ในโคและกระบือในประเทศไทย สอดคล้องกับการศึกษาของ Worarach et al. (2014) ที่ทดสอบหา capsular typing (A, B และ D) ด้วย IHA และ somatic serotyping (1-16) ด้วย AGID จากเชื้อ *P. multocida* 87 สายพันธุ์ ซึ่งนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเป็น B: 2 จำนวน 77 สายพันธุ์ เป็น B: 2,5 จำนวน 10 สายพันธุ์ซึ่ง L2 จากวิธี multiplex-PCR บ่งชี้ว่าเป็น 2 หรือ 2,5 ด้วยวิธี AGID (Harper et al., 2015) จากการศึกษาที่สอดคล้องกันนี้แสดงว่าสามารถใช้วิธี PCR เป็นทางเลือกในการทดสอบเพื่อตรวจหาซีโรกรุ๊ป และซีโรไทป์แทนวิธีการดั้งเดิมเช่น IHA และ AGID ได้ ส่วนเชื้ออีก 15 สายพันธุ์เป็นเชื้อที่เพิ่งจะพบการระบาดในเขตภาคกลางหลังจากปี 2554 ที่ Worarach et al. (2014) ได้ศึกษาไว้ ซึ่งการระบาดของ HS ที่พบในแถบเอเชีย หรือเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มักพบเป็นเชื้อสายพันธุ์ ซีโรไทป์ B (Almoheer et al., 2022) เช่น บังคลาเทศพบ

การยืนยันเชื้อ HS type B ในปี 2559 (Ara et al., 2016) มาเลเซียรายงานการระบาดของ HS ซีโรไทป์ B ในปี 2560 (Khuo et al., 2020) อย่างไรก็ตามจากรายงานการระบาดของโรคในโคกระบือของประเทศแถบยุโรป เช่น การระบาดของโรคทางเดินหายใจในโคเนื้อของสเปนช่วงปี 2020-2022 เกิดจากเชื้อ *P. multocida* ชนิด capsular type A:L3 (Calderón Bernal et al., 2023)

การตรวจหาและวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อทั้งหมด 23 ยีน จากเชื้อ 102 สายพันธุ์ เนื่องจากโรค HS เป็นโรคระบาด ความรุนแรงของโรคจะขึ้นกับเชื้อ *P. multocida* ที่มีปัจจัยความรุนแรงซึ่งจะแสดงออกโดยการควบคุมของยีนจากการศึกษา พบความชุกของยีน 21 ยีน (รูปที่ 1) โดยพบความชุกที่มากที่สุด 100% ในยีน *ptfA*, *fimA*, *hsf-2*, *pfhA*, *exbB*, *exbD*, *tonB*, *hgbA*, *Fur*, *nanH*, *ompA*, *ompH*, *oma87*, *plpB*, *sodA* และ *sodC* ความชุก 97.06% ในยีน *tbpA* ความชุก 1.96% ในยีน *tadD* และ ความชุกน้อยที่สุด 0.98% ในยีน *hsf-1*, *hgbB* และ *pmHAS* จากข้อมูลดังกล่าว พบความแตกต่างของยีน *hsf-1*, *tadD*, *tbpA*, *hgbB* และ *pmHAS* อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สามารถจัดกลุ่มรูปแบบการกระจายยีนออกเป็น 4 รูปแบบ (ตารางที่ 2) ยีนรูปแบบ A ตรวจพบ 17 ยีน ซึ่งพบมากที่สุด (95.09%) รูปแบบ B ตรวจพบ 16 ยีน (2.94%) รูปแบบ C ตรวจพบ 18 ยีน (0.98%) และรูปแบบ D ตรวจพบ 21 ยีน (0.98%)



รูปที่ 1 แสดงร้อยละของ virulence-associated genes ของเชื้อ *P. multocida* 102 สายพันธุ์

จากการศึกษาครั้งนี้เชื้อส่วนใหญ่พบการกระจายเป็นรูปแบบ A มากที่สุด แสดงว่าเชื้อ *P. multocida* ที่รวบรวมไว้ตั้งแต่ปี 2532 จนถึงปัจจุบัน มีการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบยีนที่ควบคุมปัจจัยความรุนแรงน้อยมาก ถึงแม้จะเป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากแหล่งที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรูปแบบที่ไม่แตกต่างจากเชื้อที่เพาะแยกได้จากประเทศลาว (2 สายพันธุ์) และปากีสถาน (3 สายพันธุ์) ที่ห่างไกลจากไทยพบว่า มีรูปแบบ A เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 2) จากข้อมูลผลการศึกษายังพบว่า มีเชื้อ 1 สายพันธุ์ที่มีการกระจายยีนในรูปแบบ D ที่พบการอนุรักษ์ยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยความรุนแรงของเชื้อสูงถึง 21 ยีน ซึ่งเชื้อสายพันธุ์นี้ตรวจพบเมื่อปี 2548 อย่างไรก็ตามควรมีการเฝ้าระวังไม่ให้เชื้อมีการแพร่กระจายเนื่องจากอาจเป็นสาเหตุทำให้การเกิดโรครุนแรงมากกว่าเดิมและวัคซีนอาจไม่สามารถป้องกันได้

จากการศึกษานี้พบยีนในกลุ่ม Adhesins ได้แก่ *ptfA*, *fimA*, *hsf-2* และ *pfhA* ในทุกสายพันธุ์ (100%) การพบปัจจัย adhesins บนพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรียมักเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค เนื่องจากโปรตีนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการช่วยให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์โฮสต์ สอดคล้องกับการศึกษาเชื้อ *P. multocida* ซีโรกรุ๊ป B ที่ก่อโรค HS ในมาเลเซียที่ตรวจพบยีนเหล่านี้ในทุกสายพันธุ์เช่นกัน (Khoo et al., 2020)

และมีรายงานว่าพบการติดเชื้อ *P. multocida* ในโคมกพบยีน *fimA*, *hsf-2* และ *ptfA* (Ewers et al., 2006; Kline et al., 2009) ในส่วนของ toxins ที่ตรวจวิเคราะห์ไม่พบยีน *toxA* สอดคล้องกับการศึกษาเชื้อ *P. multocida* ในโคอินเดียนและเอเชียใต้ที่ทำให้เกิด HS ไม่พบยีน *toxA* แต่มียีน *tbpA* (Verma et al., 2013; E-Kobon et al., 2017) ยีนที่ทำหน้าที่ในการดูดซึมธาตุเหล็ก (Iron Acquisition) พบยีน *exxB*, *exxD*, *tonB*, *hgbA* และ *Fur* มากถึง 99.02% โดยมีเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นที่ตรวจพบทุกยีนรวมถึง *hgbB* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการกระจายตัวของยีนในรูปแบบ D อาจเกิดจากเชื้อมีการกลายพันธุ์หรือเป็นเชื้อที่มาจากแหล่งอื่น สอดคล้องกับการศึกษาของ Gharibi et al. (2017) ได้ระบุว่ายีน *hgbB* มักพบได้น้อยกว่ายีนอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกัน

กลุ่มเอนไซม์ sialidase ตรวจพบยีน *nanH* ในทุกสายพันธุ์ (100%) และไม่พบยีน *nanB* ในทุกสายพันธุ์ ในส่วนของ hyaluronidase ซึ่งมีความสำคัญต่อการก่อโรคของเชื้อและความรุนแรงของโรค จากการที่ hyaluronidase ทำหน้าที่เป็นตัวช่วยอำนวยความสะดวกในการแพร่กระจายของพิษผ่านการย่อยสลายส่วนประกอบนอกเซลล์ ทำให้โรคมียุทธศาสตร์รุนแรงยิ่งขึ้นและแม้จะมีข้อสรุปจากการศึกษาโรค HS ในโคที่พบว่าการทำงานของ hyaluronidase จะจำกัดอยู่เฉพาะในเชื้อซีโรกรุ๊ป B

ตารางที่ 2 รูปแบบการกระจายตัวของยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรง 23 ยีนของสายพันธุ์ *P. multocida* ที่ก่อโรคเฮโมราจิกเซปติซีเมียในโคกระบือ ปี พ.ศ. 2532-2567 จัดกลุ่มเป็น 4 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบ A, B, C และ D สัญลักษณ์ “+” บ่งชี้ว่ามียีนอยู่ในสายพันธุ์ และ “-” บ่งชี้ว่าไม่มียีนอยู่ในสายพันธุ์นั้น

Virulence gene profile	Number (%)	capsular serogroup	LPS sero-type	Adhesins						Toxins	Iron Acquisition					Sialidases	Hyaluro nidase	Protectins				Superoxide Dismutase		
				<i>ptfA</i>	<i>fimA</i>	<i>hsf-1</i>	<i>hsf-2</i>	<i>pfhA</i>	<i>tadD</i>	<i>toxA</i>	<i>exbB</i>	<i>exbD</i>	<i>tonB</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>Fur</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>pmHAS</i>	<i>ompA</i>	<i>ompH</i>	<i>oma87</i>	<i>plpB</i>	<i>tbpA</i>
A	97 (95.09%)	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
B	3 (2.94%)	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
C	1 (0.98%)	B	L2	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D	1 (0.98%)	B	L2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A	Seed สทช.*	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A	Laos*	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A	Laos*	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A	Pakistan*	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A	Pakistan*	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A	Pakistan*	B	L2	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+

* ตัวอย่างเชื้อที่มีการส่งตรวจยืนยันซีโรกรุ๊ป และซีโรไทป์ ณ ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

(Harper et al., 2006) แต่จากผลการศึกษานี้กลับพบยีน *pmHAS* ในสายพันธุ์ที่มีการกระจายยีนในรูปแบบ D เพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น ส่วนยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนเยื่อหุ้มชั้นนอก (protectins หรือ outer membrane protein) พบยีน *ompA*, *ompH*, *oma87* และ *plpB* ในทุกสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา (100%) ซึ่งมีความแตกต่างจากการศึกษาในมาเลเซีย โดยเชื้อ *P. multocida* ซีโรกรุ๊ป B ที่ทำให้เกิดโรค HS ตรวจไม่พบยีน *ompH* (Khoo et al., 2020)

กลุ่ม superoxide dismutase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ในเซลล์ และช่วยป้องกันเซลล์จากอันตรายที่เกิดจากการมีเชื้อโรคอาศัยอยู่ในเซลล์นั้น พบยีน *sodA* และ *sodC* ในทุกสายพันธุ์ของการศึกษา (100%) ซึ่งยีนนี้มีส่วนช่วยให้แบคทีเรียอยู่รอดในระหว่างการเดินทาง และช่วยให้เชื้อก่อโรคต่อต้านปฏิกิริยาการตอบสนองจากเซลล์ภูมิคุ้มกันของโฮสต์ เช่น แมคโครฟาจและเซลล์เพลิมอร์โฟนิวเคลียร์ (Lynch and Kuramitsu, 2000) สอดคล้องกับที่มีการตรวจพบยีนกลุ่มนี้ในการติดเชื้อ *P. multocida* ในโคป่วย (Verma et al., 2013) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Gharibi et al. (2017) ที่ทำการศึกษาในโคกระบือปกติ ที่ไม่มีการแสดง

อาการของโรค ยีนในกลุ่ม Superoxide Dismutase มีการตรวจพบยีน *sodC* ทุกตัว แต่พบยีน *sodA* เพียง 22.7% ซึ่งเป็นเหตุผลสนับสนุนการตรวจพบยีน Superoxide Dismutase ในอัตราที่สูงในสัตว์ที่ติดเชื้อ *P. multocida* อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบยีน *tbpA* 97.06% โดยไม่พบในการกระจายตัวของยีนในรูปแบบ B ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เพาะแยกได้จากกระบือสอดคล้องกับ Dabo et al.(2007) ที่พบว่าจะพบ *tbpA* ในกระบือได้น้อยกว่าในแพะและแกะ ซึ่งในการศึกษานี้การกระจายตัวของยีนในรูปแบบ B เป็นเชื้อที่แยกได้จากกระบือ

นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิตวัคซินโรค HS (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์; สทช.) ที่เคยส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติร่วมกับการศึกษานี้ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตวัคซิน มีความใกล้เคียงกับเชื้อที่ระบาดในพื้นที่ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่มีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ HS ที่มีการระบาดและเชื้อที่ใช้ผลิตวัคซินของ สทช. ด้วย pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) พบว่ารูปแบบเชื้อที่ใช้ในการผลิตวัคซินอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่ระบาดส่วนใหญ่ในปี 2532-2554 (Worarach et al.,

2014) และในเชื้อที่มีการระบาดในปี 2557 (พัชรี และคณะ, 2558) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษารูปแบบยีนควบคุมปัจจัยความรุนแรงของเชื้อในการศึกษานี้ที่ครอบคลุมเชื้อที่มีการระบาดในการศึกษาก่อนหน้า โดยพบเชื้อที่ผลิตวัคซีนที่มีรูปแบบยีนความรุนแรงของโรคเป็นรูปแบบเดียวกับเชื้อ HS ส่วนใหญ่ที่มีระบาดในพื้นที่แสดงให้เห็นว่าวัคซีน HS ที่ใช้ในการป้องกันโรคในประเทศ น่าจะยังมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคเนื่องจากเชื้อส่วนใหญ่ที่มีการระบาดจนถึงปัจจุบันยังคงมีลักษณะทางพันธุกรรมและยีนที่เป็นปัจจัยก่อโรคใกล้เคียงกับเชื้อที่ใช้ในการผลิตวัคซีน อย่างไรก็ตามในการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อและในส่วนของการพัฒนาวัคซีนยังคงต้องมีการดำเนินการอย่างต่อเนื่อง ซึ่งในปัจจุบันมีการวิจัยเพื่อพัฒนาวัคซีนอย่างหลากหลาย โดยเน้นการใช้โปรตีนโดยการระบุแอนติเจนที่สัมผัสกับพื้นผิวของเชื้อ *P. multocida* ที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียหรือการเกิดโรคในโฮสต์เป้าหมาย (Islam et al., 2023) ซึ่งพบความเชื่อมโยงระหว่างชนิดแคปซูลและไลโปโปรตีนพื้นผิวของโฮสต์เป้าหมาย

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

เชื้อ *P. multocida* ที่แยกได้จากในโคและกระบือในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2532-2567 เป็นเชื้อซีโรกรุป B ซีโรไทป์ L2 ทั้งหมด การกระจายของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง 23 ยีนจากเชื้อสายพันธุ์โคและกระบือ 102 สายพันธุ์ของ *P. multocida* ในประเทศไทย ยีนที่ก่อความรุนแรงได้รับการอนุรักษ์ไว้ 16 ยีน ได้แก่ *ptfA*, *fimA*, *hsf-2*, *pfhA*, *exbB*, *exbD*, *tonB*, *hgbA*, *Fur*, *nanH*, *ompA*, *ompH*, *oma87*, *plpB*, *sodA* และ *sodC* จากการบ่งชี้โดยการตรวจวิเคราะห์ยีนเฉพาะด้วย PCR ส่วนอีก 5 ยีน (*hsf-1*, *tadD*, *tbpA*, *hgbB* และ *pmHAS*) แสดงรูปแบบการกระจายยีนที่แปรผัน และจัดรูปแบบการกระจายยีนของสายพันธุ์โคและกระบือในการศึกษาออกเป็น 4 รูปแบบ และรูปแบบ

การกระจายยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *P. multocida* ส่วนใหญ่ของประเทศในการศึกษานี้มีรูปแบบเดียวกับรูปแบบของสายพันธุ์ของเชื้อ *P. multocida* ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์กรมปศุสัตว์ การระบุปัจจัยก่อโรคโดยเฉพาะยีนที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคมียุทธศาสตร์ในการทราบถึงกลไกการก่อโรคและการพัฒนามาตรการควบคุม เช่น การผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ และการพัฒนารูปแบบของวัคซีน subunit เพื่อใช้ในการป้องกันควบคุมโรคคอบวม ยังเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาต่อไป เนื่องจากวัคซีน subunit จะช่วยให้สามารถพัฒนาการป้องกันโรคที่จำเพาะกับสายพันธุ์หรือจำเพาะต่อแคปซูลซีโรกรุปได้ ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันโรคให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ควรมีการศึกษาเพื่อพัฒนาระบบวิธีในการบริหารวัคซีนเพื่อช่วยให้สัตว์ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เหมาะสม รวมถึงการลดผลกระทบจากภาวะการแพ้ในสัตว์ที่ได้รับวัคซีน เพื่อสัตว์สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานโรคได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ National Institute of Animal Health, Japan ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อควบคุมบวกสำหรับการศึกษา สพ.ญ.อรพรรณ อาจคำภา สำนักงานปศุสัตว์เขต 4 ที่ช่วยให้คำปรึกษาการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการศึกษาวิจัย และเจ้าหน้าที่กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราที่ช่วยในการดำเนินการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- พัชรี ทองคำคุณ เนตรชนก จิวกานนท์ เสกสิทธิ์ สิงห์แจ่ม และวัฒนศักดิ์ จำละคร. 2558. ลักษณะทางพันธุกรรมและความไวต่อต้านจุลชีพของเชื้อก่อโรคเฮโมราจิกเซฟติซีเมียที่ระบาดในปี พ.ศ. 2557. *วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ*. 10(1): 11-25.
- สมใจ สีหาคิม นิยมศักดิ์ อุปทุม นพดล มีมาก และ นิमित สิริกุล. 2535. โรคเฮโมราจิกเซฟติซีเมียในโคและกระบือในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. *วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.* 2(1): 33-46.

- หฤทัย รุ่งเรือง และชนินทร์ น้าชม. 2561. การศึกษาปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมีย (โรคคอบวม) ในกระบือ และโคเนื้อ ตำบลก้านเหลือง อำเภอนาแก จังหวัดนครพนม. แหล่งที่มา: <https://pvlo-kop.dld.go.th/Manu/Academic%20works/01.pdf>. [17 พฤศจิกายน 2567].
- อัญชลี คำไสย์ และ อรพรรณ อาจคำภา. 2565. การระบาดของโรคเฮโมรายิกเซพติซีเมียในกระบือ และความรู้ ทักษะและวิธีปฏิบัติในการป้องกันและควบคุมโรคของเกษตรกรในพื้นที่เกิดโรคในจังหวัดมหาสารคาม ปี 2563. [Online]. Available: <https://pvlo-msk.dld.go.th/webnew/index.php/th/news-menu/paper-menu/608-paper003>. [17 พฤศจิกายน 2567].
- Almoheer, R., Abd Wahid, M. E., Zakaria, H. A., Jonet, M. A. B., Al-Shaibani, M. M., Al-Gheethi, A. and Addis, S. N. K. 2022. Spatial, Temporal, and Demographic Patterns in the Prevalence of Hemorrhagic Septicemia in 41 Countries in 2005-2019: A Systematic Analysis with Special Focus on the Potential Development of a New-Generation Vaccine. *Vaccines*. 10(2): 315. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020315>.
- Ara, M.S., Rahman, M.T., Akhtar, M., Rahman, M., Nazir, K.H.M.N.H., Ahmed, S., Hossen, M.L., Khan, M.F.R. and Rahman, M.B. 2016. Molecular detection of *Pasteurella multocida* Type B causing hemorrhagic septicemia in cattle and buffaloes of Bangladesh. *Progressive Agriculture*. 27 (2): 175-179.
- Aski-Shirzad, H. and Tabatabaei, M. 2016. Occurrence of Virulence-associated Genes in *Pasteurella multocida* Isolates Obtained from Different Hosts. *Microbial Pathogenesis*. 96: 52-57.
- Calderón Bernal, J.M., Serna, C.; García Muñoz, Á., Díez Guerrier, A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., Vela, A.I. and Cid, D. 2023. Genotypic Comparison of *Pasteurella multocida* from Healthy Animals at Entry to the Feedlots with That and from Bovine Respiratory Disease-Affected Animals during the Fattening Period. *Animals*. 13: 2687.
- Dabo, S.M., Taylor, J.D., and Confer, A.W. 2007. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*. 8(2): 129-150.
- Dabo, S.M., Taylor, J.D., and Confer, A.W. 2007. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*. 8(2): 129-150.
- E-Kobon, T., Leenan, R., Pannoi, S., Anuntasomboon, P., Thongkamkoon, P. and Thamchaipenet, A. 2017. OmpA protein sequence-based typing and virulence-associated gene profiles of *Pasteurella multocida* isolates associated with bovine haemorrhagic septicaemia and porcine pneumonic pasteurellosis in Thailand. *BMC. Vet. Res.* 13 (1): 243.
- Ewers, C., Lubke-Becker, A., Bethe, A., Kiebling, S., Filter, M. and Wieler, L.H. 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet Microbiol.* 114: 304-317.
- Gharibi, D., Haji Hajikolaei, M.R., Ghorbanpour, M. and Barzegar, S.K. 2017. Virulence gene profiles of *Pasteurella multocida* strains isolated from cattle and buffalo. *Veterinary Archives*. 87(6): 677-690.
- Harper, M., Boyce, J. D. and Adler, B. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS microbiology letters*. 265 (1): 1-10.
- Harper, M., John, M., Turni, C., Edmunds, M., Michael, F.S., Adler, B., Blackall, P. J., Cox, A.D. and Boyce J.D. 2015. Development of a rapid multiplex PCR assay to genotype *Pasteurella multocida* strains by use of the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. *J. Clin. Microbio.* 53: 477-485.
- Islam, E.A., Fegan, J.E., Tefera, T.A., Curran, D.M., Waeckerlin, R.C., Ng, D., Ahn, S.K., Lai, C.H.R., Nguyen, Q.H., Shah, M., Tesfaw, L., Adamu, K., Medhin, W.W., Legesse, A., Deresse, G., Getachew, B., Rawlyk, N., Evans, B., Potter, A., Schryvers, A.B. and Moraes, T.F. 2023. Reverse vaccinology-based identification of a novel surface lipoprotein that is an effective vaccine antigen against bovine infections caused by *Pasteurella multocida*. *PLoS pathogens*. 19(3): e1011249. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011249>.
- Khamesipour, F., Momtaz, H. and Azhdary, M.A. 2014. Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran. *Front. Microbiol.* 5: 536.
- Khoo, E., Siti Nor Hanani, R., N00rmah, M.A., Nafizak, M., Saifu Nazri, R., Norazariyah, M.N., Mohammad Fhitri, S. and Roseiliza, R. 2020. Virulence genes profile of haemorrhagic septicemia (HS) – causing *Pasteurella multocida* serogroup B in Malaysia. *Malaysian Journal of Veterinary Research*. 11(2): 32-38.

- Kline, K.A., Falker, S., Dahlberg, S., Normark, S. and Henriques-Normark, B. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe*. 5(6): 580-592.
- Lynch, M. and Kuramitsu, H. 2000. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*. 2(10): 1245-1255.
- Markey, B. K., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A. and Maguire, D. 2013. Chapter 21: *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Bibersteinia* and *Avibacterium* species. In: Clinical veterinary microbiology (2nd ed.). Mosby Elsevier.
- Peng, Z., Wang, X., Zhou, R., Chen, H., Wilson, B. A. and Wu, B. 2019. *Pasteurella multocida*: Genotypes and Genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 83 (4): e00014-19.
- Queipo-Ortuño, M. I., De Dios Colmenero, J., Macias, M., Bravo, M. J. and Morata, P. 2008. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clinical and vaccine immunology*. 15(2): 293–296.
- R Core Team. 2024. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A. J. and Adler, B. 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.* 39: 924-929.
- Townsend, K.M., Frost A.J., Lee C.W., Papadimitriou J.M. and Dawkins H.J.S. 1998. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1096–1100.
- Verma, S., Sharma, M., Katoch, S., Verma, L., Kumar, S., Dogra, V., Chahota, R., Dhar, P. and Singh G. 2013. Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. *Vet. Res. Commun.* 37(1): 83–89.
- Worarach, A., Promto, G. and Pathanasophon, P. 2014. Molecular Characterization of *Pasteurella multocida* Isolates that Cause Haemorrhagic Septicaemia in Thailand using Pulsed-field Gel Electrophoresis. *Thai J Vet Med.* 44(1): 23-29.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2024. “Chapter 3.4.10. Haemorrhagic septicemia (*Pasteurella multocida* serotype 6:B and 6:E), version adopted in May 2021.” In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2024. [Online]. Available: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.10_HAEMORRHAGIC_SEPTICAEMIA.pdf. Accessed: August 17, 2024.