การตรวจระบุและจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *Haemophilus parasuis* ที่คัดแยกจากสุกรด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

IDENTIFICATION AND GENOTYPING OF *Haemophilus parasuis* ISOLATED FROM SWINE BY MOLECULAR APPROACH

เยาวลักษณ์ คำจันทร์

YAOWALUK KUMJUN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AG-M-101-031

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตรวจระบุและจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *Haemophilus parasuis* ที่คัดแยกจากสุกรด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

IDENTIFICATION AND GENOTYPING OF *Haemophilus parasuis* ISOLATED FROM SWINE BY MOLECULAR APPROACH

T105554

เยาวลักษณ์ คำจันทร์

YAOWALUK KUMJUN

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 105554
วัน,เดือน,ปี 26 พ.ย. 2552

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พ.ศ.2552

KMITL-2009-AG-M-101-031

IDENTIFICATION AND GENOTYPING OF *Haemophilus parasuis* ISOLATED FROM SWINE BY MOLECULAR APPROACH

YAOWALUK KUMJUN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

FACULITY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MUNGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2009

KMITL-2009-AG-M-101-031

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2009

FACULITY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MUNGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อ	การตรวจระบุและจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *Haemophilus parasuis* ที่คัดแยกจากสุกรด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล
นักศึกษา	นางสาวเยาวลักษณ์ คำจันทร์
รหัสประจำตัว	50065809
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ปรีดา เลิศวัชระสารกุล

บทคัดย่อ

Haemophilus parasuis เป็นเชื้อสาเหตุของโรคแกลสเซอร์ (Glasser's disease) ซึ่งพบมากในสุกรหลังหย่านม ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิคด้านชีวโมเลกุลมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจระบุและจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* จากตัวอย่างสุกรที่แสดงวิการของโรคที่เกิดจาก *H. parasuis* อย่างชัดเจนและสุกรที่ไม่แสดงวิการของโรค โดยประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์มาเพิ่มปริมาณส่วนของยีน 16S rRNA และ hsp60 พบว่าการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน 16S rRNA มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะต่อชนิดของ *H. parasuis* จากนั้นศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่าง *H. parasuis* ด้วยการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ทางพันธุกรรมจากส่วนของยีน 16S rRNA และ hsp60 พบว่าตัวอย่าง *H. parasuis* ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับเชื้อในกลุ่ม reference strains ที่มีความสามารถในการก่อโรคสูงและอาจเป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดเฉพาะในพื้นที่ที่ทำการศึกษา สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP จากส่วนของยีน *tbp*A เพื่อให้ได้ลักษณะ RFLP groups ที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง พบว่าจำแนกลักษณะ RFLP groups ได้ทั้งหมด 14 ลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Identification and Genotyping of *Haemophilus parasuis* Isolated from Swine by Molecular Approach
Student	Miss Yaowaluk Kumjun
Student ID.	50065809
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2009
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Kanokrat Srikijkasemwat
Thesis Co-Advisor	Dr. Preeda Lertwatcharasarakul

ABTRACT

Haemophilus parasuis is an etiological agent of Glasser's disease in weaning pigs. In this study, the molecular approach was applied to improve specific identification and genotyping of *H. parasuis*. The 16S rRNA and hsp60 genes fragment were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The results show that 16S rRNA gene can be used to specifically identified. After that the PCR product were sequenced and subjected to phylogenetic analysis. Phylogenetic analysis indicated that most of the isolates were closely related to virulent reference strains. In addition, genotyping of *H. parasuis* strains from *tbp*A gene was done using PCR-RFLP assay. The results showed that *H. parasuis* can be grouped into 14 genotypes based on *tbp*A gene variation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้จากการได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร.กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และ ดร.ปรีดา เลิศวัชระสารกุล คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนจังหวัดนครปฐม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด โดยข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากอาจารย์ทั้งสองท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ คุณสกุณา พัฒนกุลอนันต์, คุณสิริลักษณ์ จาละและคุณสุขสันต์ ฉ่ำสิงห์ สำหรับคำแนะนำในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงลงได้ และขอขอบคุณนักวิจัย ผู้ช่วยนักวิจัย และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน จากหน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย ตลอดจนคำแนะนำในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ชายและญาติพี่น้องของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆเรื่องทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรทุกท่าน และน.สพ.ชนาธิป ธรรมการ ที่ให้การช่วยเหลือคำแนะนำและตำราที่ใช้ในการศึกษาและขอขอบคุณคุณสุกัญญา มั่นคง ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านที่พักตลอดเวลาในการทำวิจัย โดยประโยชน์อันพึงมีพึงได้จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

เยาวลักษณ์ คำจันทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VII

สารบัญภาพ VIII

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 สถานที่ดำเนินงาน 3

1.4 ระยะเวลาดำเนินงาน 3

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 เชื้อ *Haemophilus parasuis* 5

2.1.1 ลักษณะของเชื้อ *H. parasuis* 6

2.1.2 ปัจจัยก่อโรค (Virulence factor) 7

2.1.3 อาการของโรคแกลสเซอร์ 7

2.1.4 การวินิจฉัยภาวการณ์ติด *H. parasuis* 8

2.1.5 การรักษาและการป้องกัน 14

2.2 การจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* 14

2.2.1 การจำแนกเชื้อตามลักษณะที่ตรวจพบได้ (phenotypic identification) 14

2.2.2 การจำแนกเชื้อตามโครงสร้างพันธุกรรม (genotypic identification) 17

บทที่ 3 วิธีดำเนินการ 22

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา 22

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ 22

3.3 การตรวจระบุและการศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของ *H. parasuis* 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.1 การตรวจระบุด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 23

3.3.2 การตรวจระบุด้วยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน 16S rRNA 23

3.3.3 การตรวจระบุด้วยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน hsp60 24

3.3.4 การศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบ
ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA และ hsp60 25

3.3.4.1 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล 25

3.3.4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. parasuis* 25

3.3.4.3 การศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของ *H. parasuis* ด้วยแผนภูมิต้นไม้
พันธุกรรม (phylogenetic tree analysis) 25

3.4 การจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ด้วยการวิเคราะห์ PCR-RFLP จากส่วน
ของยีน *tbp*A 26

3.4.1 การเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *tbp*A 26

3.4.2 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 27

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 28

4.1 การตรวจระบุและการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ
H. parasuis 28

4.1.1 ผลการตรวจระบุ *H. parasuis* ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ 28

4.1.2 ผลการตรวจระบุด้วยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน 16S rRNA 28

4.1.3 ผลการศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบ
ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA 29

4.1.4 การตรวจระบุด้วยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน hsp60 32

4.1.5 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์
ในส่วนของยีน hsp60 32

4.2 ผลการจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ด้วยการวิเคราะห์ PCR-RFLP
จากส่วนของยีน *tbp*A 35

4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *tbp*A 35

4.2.2 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 35

4.2.2.1 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Taq*I 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.2.2 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Ava*I 36

4.2.2.3 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Rsa*I 37

4.2.2.4 การจัด RFLP groups 37

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 40

บรรณานุกรม 41

ภาคผนวก 46

ภาคผนวก ก 46

ภาคผนวก ข 51

ประวัติผู้เขียน 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Haemophilus* ที่พบในคนและสัตว์..... 5

2.2 แสดงความแตกต่างของผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *H. parasuis*, *A. minor*, *A. pleuropneumoniae*, *A. porcinus* และ *A. indolicus*..... 11

2.3 แสดงการจำแนก serovars จาก reference strain ของเชื้อ *H. parasuis* ที่มีรายงานการ ค้นพบในประเทศต่างๆ..... 16

4.1 สรุปผลการจำแนกชนิดย่อยของ *H. parasuis*..... 38

ตารางผนวกที่ หน้า

ก 1 แสดง RFLP pattern ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ reference strains ในส่วนของยีน *tbp*A..... 47

ก 2 แสดง *H. parasuis* แต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วนของยีน 16S rRNA..... 49

ก 3 แสดง *H. parasuis* แต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วนของยีน hsp60..... 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 แสดงลักษณะของ *H. parasuis* 6

2.2 แสดงลักษณะอาการข้อบวมของสุกรที่ป่วยเป็นโรคแกลสเซอร์ 8

2.3 แสดงวิการที่เกิดจากโรคแกลสเซอร์ 9

2.4 ลักษณะโคโลนีของ *H. parasuis* ที่เจริญบน อาหาร blood agar รอบๆ โคโลนีของ *S. aureus* 10

4.1 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วนของยีน 16s rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ .. 29

4.2 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *H. parasuis* ในส่วนของยีน 16S rRNA 31

4.3 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วนของยีน hsp60 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 32

4.4 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *H. parasuis* ในส่วนของยีน hsp60 34

4.5 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วนของยีน *tbp*A ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 35

4.6 แสดงรูปแบบการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Taq*I 36

4.7 แสดงรูปแบบการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Ava*I 36

4.8 แสดงรูปแบบการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Rsa*I 37

ภาพผนวกที่ หน้า

ก 1 แสดงรูปแบบการตัดของเอนไซม์ *Taq*I (a) *Ava*I (b) และ *Rsa*I (c) 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

Haemophilus parasuis เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) จัดอยู่ใน Family Pasteurellaceae มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นคล้ายรูปกลม (coccobacilli) เป็นเชื้อประจำถิ่น (colonize) ในบริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนบนของสุกร (ภัทรชัย กีรติสิน. 2549) มีความสำคัญเนื่องจากเป็นเชื้อสาเหตุของโรคแกลสเซอร์ (Glasser's disease) ซึ่งพบมากในสุกรหลังหย่านมช่วงอายุประมาณ 5-8 สัปดาห์ (Rúbies *et al.* 1999; Nedbalcova *et al.* 2006) ปัจจุบันจัดว่าเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากทางเศรษฐกิจ (Oliveira and Pijoan. 2004) แต่ปัจจัยที่ทำให้เชื้อสามารถก่อโรคได้ (virulence factor) ยังไม่ทราบแน่ชัด (Vanier *et al.* 2006) โดยโรคนี้มีหลายกลุ่มอาการอาทิเช่น ไม่กินอาหาร หายใจลำบาก ขากะเผลก ข้อส่วนใหญ่จะบวม เยื่อตาขาวมีสีแดง หนังตาและใบหู บวมน้ำ กล้ามเนื้อสั่นและทำงานไม่ประสานกันจนลุกขึ้นยืนไม่ได้ และแสดงวิการการอักเสบ (polyserositis) เช่น เกิดภาวะถุงหุ้มหัวใจอักเสบ (pericarditis) เยื่อบุช่องท้องอักเสบ (peritonitis) ข้อต่ออักเสบ (arthritis) และเยื่อสมองอักเสบ (meningitis) ทั้งนี้อาจพบวิการเพียงอย่างเดียวหรือหลายอย่างร่วมกัน สุกรส่วนใหญ่จะตายภายใน 2-5 วัน หลังเริ่มแสดงอาการ (กิจจา อุไรรงค์. 2530) แต่อย่างไรก็ตามอาการของโรคแกลสเซอร์คล้ายกับโรคที่เกิดจาก *Streptococcus suis* ดังนั้นในการตรวจวินิจฉัยจึงจำเป็นต้องอาศัยการเพาะเชื้อทางห้องปฏิบัติการเข้าช่วยเพื่อให้สัตว์ได้รับการรักษาที่ถูกต้องและต้องทำการรักษาในช่วงต้นของโรคจึงจะได้ผล

ในการตรวจระบุ *H. parasuis* ทำได้โดยการเพาะแยกเชื้อในอาหารคัดเลือก (enrich media) chocolate agar และ blood agar (กิจจา อุไรรงค์. 2530; นันทนา อรุณฤกษ์. 2537) แต่ *H. parasuis* เป็นเชื้อในกลุ่มเจริญยาก (fastidious bacteria) เนื่องจากต้องการปัจจัยในการเจริญ (growth factor) ที่จำเพาะเพิ่มเติมจากแบคทีเรียทั่วไป คือต้องการ nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) หรือแฟกเตอร์ V ในการเจริญและใช้เวลาในการเพาะเชื้อ 24-48 ชั่วโมง (นันทนา อรุณฤกษ์. 2537) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในสปีชีส์ *Actinobacillus pleuropneumoniae, A. minor, A. porcinus* และ *A. indolicus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นบริเวณทางเดินหายใจส่วนบนของสุกรและต้องการแฟกเตอร์ V ในการเจริญเช่นเดียวกับ *H. parasuis* สามารถแยกความแตกต่างได้โดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี (Nedbalcova *et al.* 2006) ต่อมาได้มีการพัฒนานำเอาเทคนิคด้านชีวโมเลกุลมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจระบุการติดเชื้อ *H. parasuis* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction: PCR)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ภัทรชัย กีรติสิน. 2549) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรวจระบุการติด *H. parasuis* มากกว่าการเพาะแยกเชื้อ (Oliveira *et al.* n. d.)

การวางแผนควบคุมโรคที่เกิดจาก *H. parasuis* ด้วยวิธีการใช้วัคซีนนั้นยังเป็นที่ถกเถียงกันถึงประสิทธิภาพในการ cross-protection ของเชื้อต่าง serovar ดังนั้นหากเลือกใช้วัคซีนทางการค้า (commercial vaccine) ก็ต้องมีเชื้อสายพันธุ์ที่ระบาดอยู่ในฟาร์มรวมอยู่ด้วยหรือการเลือกใช้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์เดียวกับที่ระบาดอยู่ภายในฟาร์ม (autogenous vaccine) (Oliveira. 2002) ดังนั้น Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992) ได้ทำจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* โดยใช้เทคนิค immunodiffusion ร่วมกับการเตรียมแอนติเจนด้วยวิธี heat-stable antigens extract ได้เป็น 15 serovars ซึ่งเชื้อทั้ง 15 serovars มีระดับความรุนแรงแตกต่างกันโดย serovars 1, 5, 10, 12, 13 และ 14 อาจพบเป็นสาเหตุทำให้สุกรป่วยและตายอย่างรวดเร็วส่วน serovars 2, 4 และ 15 ทำให้สุกรแสดงอาการป่วยแต่ไม่รุนแรงถึงขั้นทำให้สุกรตายได้ ขณะที่ serovars 3, 6, 7, 8, 9 และ 11 ไม่ทำให้สุกรมีการเกิดโรคจึงจัดว่าเป็นกลุ่ม serovars ที่ไม่รุนแรง

นอกจากนี้ มีรายงานการระบาดของ *H. parasuis* แต่ละพื้นที่แตกต่างออกไป อาทิเช่นในประเทศสเปนรายงานว่าพบการระบาดของ *H. parasuis* serovars 2, 4, 5 และ 13 (Rubies *et al.* 1999) ในประเทศสหราชอาณาจักร (United Kingdom) พบ *H. parasuis* serovars 1, 2, 5, 7 และ 10 ส่วนในประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศจีนและประเทศเยอรมันนีพบ *H. parasuis* serovar 4 มากที่สุด (Oliveira and Pijoan. 2004) และในประเทศเดนมาร์คพบการระบาดของ *H. parasuis* serovars 5 (Agen *et al.* 2004) นอกจากนี้ได้มีการจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* จากตัวอย่างเชื้อที่เก็บมาจากฟาร์มด้วยเทคนิคทางซีรั่มวิทยาอื่นๆ เช่นการใช้เทคนิค indirect haemagglutination (IHA) (Cai *et al.* 2005) แต่อย่างไรก็ตามก็ยังไม่เพียงพอต่อการแยกสายพันธุ์ย่อยเนื่องจากมักพบเชื้อกลุ่มที่ระบุสายพันธุ์ย่อยไม่ได้ (non-typeable) ถึง 15-41 เปอร์เซ็นต์ และการเตรียม antisera ให้มีความจำเพาะต่อแอนติเจนของ *H. parasuis* ทำได้ยากอีกทั้งยังเกิดปัญหาการ cross-reaction ด้วย (Oliveira and Pijoan. 2004)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อใช้แยกลักษณะของ *H. parasuis* ในระดับยีน (genotyping) ดังเช่นการใช้เทคนิคพีซีอาร์ร่วมกับเทคนิค restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ศึกษาส่วนของยีน *tbp*A ซึ่งเป็นยีนที่แปลรหัสเป็น transferrin binding protein A และเป็นยีนที่พบในแบคทีเรียแกรมลบทุกชนิด พบว่ามีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสำหรับจำแนกสายพันธุ์ของ *H. parasuis* และสามารถพิจารณาใช้เป็นเทคนิคทางเลือกสำหรับแยกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* โดยเฉพาะเชื้อกลุ่มที่ระบุสายพันธุ์ย่อยไม่ได้ (De la Puente Redondo *et al.* 2003) นอกจากนี้ยังมีสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) เพื่อจัดกลุ่ม (cluster) สายพันธุ์ของ *H. parasuis* และแยกระดับความรุนแรงของเชื้อในแต่ละ cluster (Olvera *et al.* 2006) โดยศึกษาในส่วนของยีน 16S rRNA เนื่องจากเป็นยีนที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ (species) แต่มีความแตกต่างกันน้อยในแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกัน (Jill. 2004) และส่วนของยีน heat

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

shock protein (hsp) ขนาด 60 กิโลดาลตัน (kDa) แทนด้วยสัญลักษณ์ hsp60 โดยโปรตีนกลุ่ม hsp เป็นโปรตีนที่พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั้งแบคทีเรียและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยจะพบได้ในเซลล์ทั้งในสภาวะปกติ และสภาวะเครียดจากสภาพสิ่งแวดล้อม (Zhang *et al.* 2004) หน้าที่หลักของ hsp คือ การคงสภาพของโปรตีนภายในเซลล์ให้ทำหน้าที่ได้ตามปกติโดยจะช่วยในการ folding ของโมเลกุลของโปรตีนรวมถึงการเคลื่อนย้ายโปรตีนไปสู่ส่วนต่างๆของเซลล์เพื่อให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Wong and Chow. 2002)

สำหรับประเทศไทยนั้นความรู้เกี่ยวกับ *H. parasuis* ยังมีอยู่อย่างจำกัดและในการตรวจระบุการติดเชื้อยังทำด้วยวิธีการชันสูตรดูวิการและการเพาะแยกเชื้อซึ่งวิธีการดังกล่าวทำให้ทราบได้เพียงว่าเกิดจาก *H. parasuis* เท่านั้นไม่สามารถระบุระดับสายพันธุ์ย่อยได้ ทั้งนี้ในการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคที่เกิดจาก *H. parasuis* ด้วยการใช้วัคซีนให้มีประสิทธิภาพนั้นมีความจำเป็นต้องทราบชนิดของสายพันธุ์ย่อย ที่มีการระบาดหรือเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค แต่สำหรับประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานการแยกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* มาก่อน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำเทคนิคด้านชีวโมเลกุลมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจระบุการติด *H. parasuis* ให้มีความถูกต้องและรวดเร็ว และทำการจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ที่มีในประเทศไทย ซึ่งคาดว่าข้อมูลที่ได้อาจนำไปใช้ในการพัฒนาวัคซีนที่มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพต่อการป้องกันและควบคุมโรคแกลสเซอร์ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาเทคนิคด้านชีวโมเลกุลที่เหมาะสมในการตรวจระบุและจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ที่คัดแยกจากสุกร

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1. หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

2. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.4 ระยะเวลาดำเนินงาน

ระยะเวลาดำเนินการทั้งสิ้น 12 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงเทคนิคที่มีความรวดเร็ว เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการตรวจระบุ *H. parasuis*
2. ทราบถึงชนิดและสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อ *Haemophilus parasuis*

เชื้อในจีนัส (Genus) *Haemophilus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมที่จัดอยู่ใน Family Pasteurellaceae สามารถแยกอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (สุรวิทย์ สิมะรักษ์อำไพ. 2545)

Domain : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : γ-proteobacteria

Oder : Pasteurelles

Family : Pasteurellaceae

Genus : *Haemophilus*

เชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Haemophilus* จำแนกเป็นสปีชีส์ (spicies) ซึ่งพบได้ทั้งในคนและสัตว์ (ตารางที่ 2.1) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีขนาดเล็ก (0.2x0.3 ถึง 2.0 ไมโครเมตร) มีลักษณะเป็นรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ดำรงชีวิตเป็นแอโรบิกหรือแฟคัลเตติฟแอนแอโรบ (facultative anaerobe) ส่วนใหญ่เจริญเติบโตยาก การแยกเชื้อต้องการอาหารพิเศษเพื่อกระตุ้นการเจริญคือแฟกเตอร์ X (X factor หรือ hematin) และ/หรือแฟกเตอร์ V (V factor หรือ nicotinamide adenine dinucleotide: NAD) (สุรวิทย์ สิมะรักษ์อำไพ. 2545)

ตารางที่ 2.1 แสดงสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Haemophilus* ที่พบในคนและสัตว์

สปีชีส์ที่พบในคน	สปีชีส์ที่พบในสัตว์
H. parainfluenzae	*H. somnus* (โค)
H. haemoliticus	*H. parasuis* (สุกร)
H. parahaemoliticus	*H. paragallinarum* (ไก่)
H. aphrophilus	*H. paracuticulus* (กระต่าย)
H. aegyptius	
H. segnis	

ที่มา : ดัดแปลงจาก Elmer *et al.* (1792)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 ลักษณะของ *H. parasuis*

ในช่วงแรกมีความเข้าใจกันว่า *H. parasuis* คือ *H. suis* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทั้งแฟกเตอร์ X และ V ในการเจริญ (Lewis and Shope. 1931) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการพิสูจน์คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อดังกล่าว พบว่าเป็นเชื้อที่ต้องการเพียงแฟกเตอร์ V ในการเจริญ ดังนั้นจึงใช้ prefix "para" นำหน้า suis สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการเพียงแฟกเตอร์ V เกิดเป็นเชื้อแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่คือ *H. parasuis* (Oliveira and Pijoan. 2004; Nedbalcova *et al.* 2006; Ferri *et al.* 2008) มีรูปร่างเป็นรูปแท่งสั้นคล้ายรูปกลม (coccobacilli) มีขนาดเล็กประมาณ 0.2X1.5 ไมครอน ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้พบเป็นเชื้อประจำถิ่นในบริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนบน (upper respiratory tract) ของสุกร (ภาพที่ 2.1) (Rúbies *et al.* 1999; Nedbalcova *et al.* 2006)

ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะของ *H. parasuis* (Ferri *et al.* 2008)

H. parasuis เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคแกลสเซอร์ซึ่งพบได้ในสุกรทุกช่วงอายุ แต่โดยปกติจะพบในสุกรเล็กช่วงอายุ 2 สัปดาห์ถึง 4 เดือน พบมากที่สุดคือช่วงหลังหย่านม (อายุ 5-8 สัปดาห์) (Rúbies *et al.* 1999; Nedbalcova *et al.* 2006) ซึ่งเป็นช่วงที่ระดับภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่ทางน้ำนมเหลืองเริ่มลดลง อีกทั้งมีสาเหตุโน้มนำเกิดจากความเครียดจากการหย่านม การย้ายคอก การจัดการและสภาพแวดล้อมที่ไม่ดี (กิจจา อุไรรงค์. 2530) ปกติแล้วเชื้อชนิดนี้จะแพร่กระจายอยู่ทั่วไป ฝูงสุกรส่วนใหญ่จึงเคยสัมผัสกับเชื้อนี้และมีภูมิคุ้มกันโรคในระดับหนึ่งทำให้อาการของโรคไม่รุนแรง แม่สุกรที่สัมผัสเชื้อแล้วจะสร้างภูมิคุ้มกันโรคและถ่ายทอดให้ลูกสุกรทางน้ำนมเหลือง ซึ่งภูมิคุ้นกันโรคนี้จะคุ้มโรคในลูกสุกรจนถึงอายุประมาณ 8-12 สัปดาห์ ในภาวะที่ฟาร์มสุกรมีแม่สุกรสาวซึ่งไม่เคยสัมผัสเชื้อมาก่อนเข้าคลอดเป็นจำนวนมาก และการจัดการให้ลูกสุกรแรกเกิดได้รับนมน้ำเหลืองล้มเหลว โอกาสที่ลูกสุกรดูดนมจะป่วยด้วยโรคนี้จะเพิ่มสูงขึ้นทันที โดยเฉลี่ยแล้วอัตราการตายจะไม่เกิน 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

เปอร์เซ็นต์ แต่หากโรคเกิดขึ้นในฝูงที่ไม่เคยสัมผัสเชื้อเลยความรุนแรงของโรคจะเพิ่มสูงขึ้นอัตราการตายอาจสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ โดยพบอาการในแม่สุกรด้วย ในฝูงที่ป่วยเป็นโรคแบบเรื้อรังจะพบลูกสุกรดูดนมป่วยอยู่เรื่อยๆ ประมาณ 10-50 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ลูกสุกรเหล่านี้จะไม่ตาย (ปรียพันธุ์ อุดมประเสริฐ. 2546)

2.1.2 ปัจจัยก่อโรค (virulence factor)

ปัจจัยก่อโรค คือปัจจัยที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างขึ้นและมีส่วนเกี่ยวข้องกับการก่อโรค ซึ่งรวมถึงสารหรือปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเกาะติดและการบุกรุกเซลล์เจ้าบ้าน เช่นส่วนประกอบของโครงสร้างเซลล์ ที่สำคัญได้แก่ แคปซูล (capsule), ฟิมเบรีย (fimbriae) และส่วนลิโพโพลิแซคคาไร (lipopolysaccharide) บริเวณผนังเซลล์ชั้นนอก (Oliveira. 2004) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ในแฟมิลี่พาสเจอร์เรลลาซีอี แต่ปัจจัยเหล่านี้เกี่ยวข้องกับความรุนแรงและความสามารถในการก่อโรคของ *H. parasuis* หรือไม่ยังไม่เป็นที่แน่ชัด (Nedbalcova *et al.* 2006) ส่วนปัจจัยอื่นๆ อาทิเช่น capsule expression หรือ whole-cell protein profile (Oliveira and Pijoan. 2004) ของสายพันธุ์ที่ก่อโรค (virulent) และไม่ก่อโรค (non-virulent) มีลักษณะไม่ต่างกัน (Sack and Baltes. 2009) แต่อย่างไรก็ตามแม้ปัจจัยการก่อโรคของ *H. parasuis* จะยังไม่แน่ชัดแต่เชื่อว่าเกิดจากการหายใจเอาเชื้อเข้าไปแล้วกลายเป็นการติดเชื้อแฝง (latent infection) ที่ทางเดินหายใจของสุกร เมื่อเกิดมีภาวะเครียดในเวลาต่อมาจะเกิดการรุกแทรกของเชื้อเป็นผลจากการนำสุกรที่ไม่มีภูมิคุ้มกันหรือไม่เคยสัมผัสกับเชื้อชนิดนี้ เข้ามารวมกลุ่มกับสุกรที่เป็นพาหะ (มีการติดเชื้อแฝง) ซึ่งพบได้ในฝูงสุกรส่วนใหญ่ การเกิดโรคในฝูงที่ไม่เคยสัมผัสเชื้อมาก่อนจะทำให้เกิดการระบาดของโรคที่ค่อนข้างรุนแรงจนกว่าฝูงสุกรนั้นจะมีภูมิคุ้มกันเกิดขึ้น (กิจจา อุไรรงค์. 2530)

2.1.3 อาการของโรคแกลสเซอร์

อาการของโรคแกลสเซอร์นั้นเมื่อเกิดภาวะโลหิตเป็นพิษจากการติดเชื้อ *H. parasuis* ร่างกายลูกสุกรมีการส่งผ่านซีรั่มเข้าสู่ช่องว่างส่วนต่างๆ ของร่างกายมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นช่องอก ถุงหุ้มหัวใจ ช่องท้อง ช่องอุ้งเชิงกราน รวมทั้งบริเวณข้อต่อต่างๆ ส่งผลให้มีการสะสมไฟบริน (fibrin) เพิ่มมากยิ่งขึ้นตามลำดับ สุกรมีอาการไข้สูง (104-105 องศาฟาเรนไฮต์) ไม่กินอาหาร ซึม อัตราการเต้นของหัวใจสูง 160 ครั้ง/นาที เยื่อตาขาวมีสีแดง การบวมน้ำของหนังตาและใบหู เดินขากะเผลก ข้อขาบวม (ภาพที่ 2.2) และแสดงอาการเจ็บปวดเมื่อคลำตรวจหรือส่งเสียงร้องเมื่อลุกขึ้นยืน สุกรป่วยจะยืนด้วยปลายกีบและเดินลากขาโดยมีช่วงก้าวสั้นๆ (กิจจา อุไรรงค์. 2530) คล้ายอาการของการติดเชื้อสเตรปโตคอคคัส อาจมีอาการหายใจลำบากในลักษณะหายใจแบบตื้นและอ้าปากหายใจ ในรายรุนแรงอาการของเยื่อหุ้มสมองและสมองอักเสบทำให้กล้ามเนื้อสั่นกระตุก กล้ามเนื้อขาหลังทั้งสองไม่ประสานกัน อัมพาตโดยล้มตัวลงนอนตะแคงและมีการดิ้นรนเพื่อจะลุกขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลินิกที่พบได้เป็นส่วนใหญ่ สุกรส่วนใหญ่ตายภายใน 2-5 วันหลังเริ่มอาการป่วย สุกรที่มีชีวิตรอดจะเกิดข้ออักเสบแบบเรื้อรัง (chronic arthritis) หรืออาจเกิดการอุดตันของลำไส้ได้ในบางราย โดยจะพบความชุกของโรคมากเมื่อมีฝนตกชุกและอากาศหนาวเย็น (ปรียพันธุ์ อุดมประเสริฐ. 2546)

ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะอาการข้อบวมของสุกรที่ป่วยเป็นโรคแกลสเซอร์ (นิรนาม. 2550)

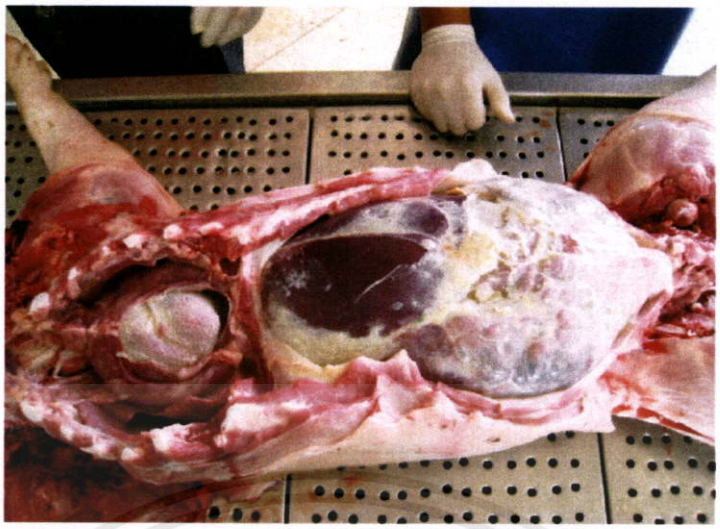
2.1.4 การตรวจระบุ *H. parasuis*

การตรวจระบุ *H. parasuis* มีความสำคัญในแง่ของการวางแผนในการรักษาการควบคุมและเฝ้าระวังการระบาดของโรค (กิจจา อุไรรงค์. 2530) โดยสามารถใช้วิธีการต่างๆ ดังนี้

2.1.4.1 การผ่าซากดูวิการของโรค

เมื่อสังเกตพบสุกรแสดงอาการป่วย เบื้องต้นจะต้องทำการตรวจวินิจฉัยด้วยการผ่าซากเพื่อดูวิการของโรค เมื่อเปิดผ่าซากจะพบลักษณะวิการของเยื่อเหนียวสีขาวเหลืองหรือขุ่นเหมือนกาวแข็งแป้งเปียก (ภาพที่ 2.3) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวสะสมของไฟบรินในช่องอก ถุงหุ้มหัวใจ ช่องท้อง ทำให้อวัยวะภายในถูกยึดตรึงติดกันทุกส่วนเป็นก้อนกลมขนาดใหญ่ ทำให้เกิดภาวะถุงหุ้มหัวใจอักเสบ เยื่อบุช่องท้องอักเสบ ข้อต่ออักเสบ และเยื่อสมองอักเสบ ซึ่งเป็นลักษณะค่อนข้างเฉพาะของโรคนี้ (ปริวรรต พูลเพิ่ม. 2547) ในการวินิจฉัยแยกโรคหรือเชื้อก่อโรคด้วยการผ่าซากดูวิการนั้นควรพิจารณาให้ดีเนื่องจากมีเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่ก่อโรคและมีอาการหรือวิการที่คล้ายกับโรคแกลสเซอร์ เช่น ในกรณีเกิดวิการของภาวะเลือดเป็นพิษที่อาจเกิดจาก *S. suis, A. suis, Escherichia coli,* และ *Salmonella enterica* ดังนั้นการตรวจระบุ *H. parasuis* จึงต้องอาศัยผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการร่วมด้วย (Olvera *et al.* 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)

(ข)

ภาพที่ 2.3 แสดงวิการที่เกิดจากโรคแกลสเซอร์ (ก) ลักษณะวิการที่มีเยื่อเหนียวหรือแผ่นหนองปกคลุมบริเวณช่องอกและช่องท้องของสุกร (ข) ลักษณะวิการที่เกิดภาวะปอกอักเสบ

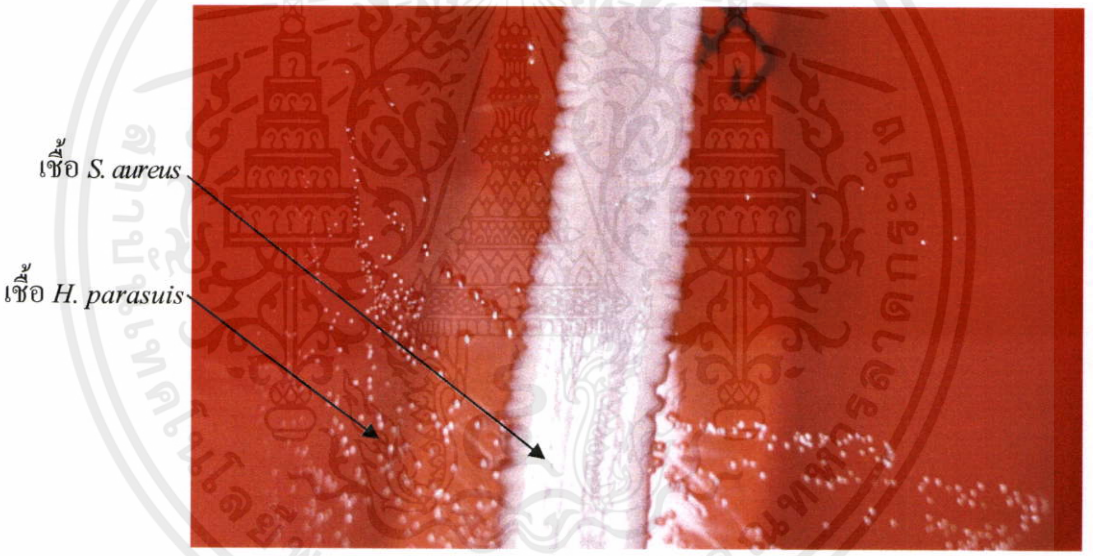
2.1.4.2 การตรวจระบุ *H. parasuis* ด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

การตรวจระบุ *H. parasuis* ด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการภายหลังจากการผ่าซากดูวิการของโรคแล้ว จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างจากส่วนจากสุกรที่แสดงอาการทางคลินิกของโรคแกลสเซอร์อย่างรุนแรงและแสดงวิการของโรคอย่างชัดเจนโดยอาจเก็บตัวอย่างด้วยวิธีการป้ายเชื้อ (swab) หรือเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อและส่งห้องปฏิบัติการอย่างรวดเร็ว (< 2 วัน) (Del Rio *et al.* 2006) แต่อย่างไรก็ตามไม่ควรเก็บตัวอย่างจากบริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนต้น เช่นโพรงจมูกและหลอดลมเพื่อใช้ในการยืนยันเชื้อที่เป็นสาเหตุทำให้สัตว์ป่วย เนื่องจากบริเวณดังกล่าวสามารถพบ *H. parasuis* ได้ทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้และไม่ก่อโรค นอกจากนี้ตัวอย่างที่เก็บจากแต่ละตำแหน่งควรแยกถุงเก็บ (Oliveira. 2004) เนื่องจากเชื้อแต่ละสายพันธุ์ก่อให้เกิดลักษณะวิการได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

แตกต่างกันแม้เป็นสุกรตัวเดียวกันและที่สำคัญต้องเป็นตัวอย่างที่ได้จากสุกรที่ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อน (Oliveira. 2002; Nedbalcova *et al*. 2006)

ในการเพาะแยกเชื้อ *H. parasuis* นั้นต้องใช้อาหารคัดเลือกคืออาหารผสมเลือดชนิด blood agar และ chocolate agar (กิจจา อุไรรงค์. 2530; นันทนา อรุณฤกษ์. 2537) ที่ประกอบด้วยปัจจัยในการเจริญที่สำคัญคือแฟกเตอร์ V หรือการขีด *Staphylococcus aureus* ลงบนอาหารเพาะเชื้อนั้น เนื่องจาก *S. aureus* สามารถสร้างแฟกเตอร์ V ปล่อยสู่ภายนอกร่วมกับการสร้างเอนไซม์สลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งช่วยเพิ่มปริมาณแฟกเตอร์ X และแฟกเตอร์ V ในอาหารเพาะเชื้อและเจริญได้ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) มากกว่าปกติ (5-10 เปอร์เซ็นต์) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 35-37 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการเพาะเชื้อประมาณ 24-48 ชั่วโมง โดยจะพบเชื้อเจริญบริเวณรอบๆ โคโลนีของ *S. aureus* ลักษณะโคโลนีของ *H. parasuis* เป็นสีน้ำตาล ไม่มีกลิ่น ขนาดของโคโลนีต่างกันไปแล้วแต่สายพันธุ์ (นันทนา อรุณฤกษ์. 2537) (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 ลักษณะโคโลนีของ *H. parasuis* ที่เจริญบนอาหาร blood agar รอบๆ โคโลนีของ *S. aureus*

นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียบางกลุ่ม เช่น เชื้อแบคทีเรียในสปีชีส์ *A. minor, A. pleuropneumoniae, A. porcinus* และ *A. indolicus* ซึ่งล้วนเป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นบริเวณทางเดินหายใจส่วนบนของสุกรและต้องการแฟกเตอร์ V ในการเจริญเช่นเดียวกับ *H. parasuis* ทำให้ต้องมีขั้นตอนการตรวจระบุชนิดของเชื้อเพิ่มขึ้น โดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งเชื้อ *H. parasuis* ให้ผลเป็นบวกเมื่อทดสอบด้วย nitrates reduction และ catalase และให้ผลเป็นลบเมื่อทดสอบด้วย urease, indole production และ haemolysis (Kielstein *et al*. 2001) แสดงผลเปรียบเทียบดังตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

ตารางที่ 2.2 แสดงความแตกต่างของผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *H. parasuis, A. minor, A. pleuropneumoniae, A. porcinus* และ *A. indolicus*

Tests	*A. pleuropneumoniae*	*A. porcinus*	*A. minor*	*A. indolicus*	*H. parasuis*
V factor dependency	+	+	+	+	+
Haemolysis	+	-	-	-	-
Camp test	+	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+
Urease	+	-	+	-	-
Catalase	-	-	-	+	+
Indole production	-	-	-	+	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kielstein *et al.* (2001)

อย่างไรก็ตามในการตรวจระบุ *H. parasuis* ด้วยการเพาะแยกเชื้อนั้นยังมีปัญหา เนื่องจากเพาะได้ยาก ใช้เวลานานและขนาดโคโลนีมีขนาดเล็กจึงต้องใช้ความชำนาญในการวินิจฉัย อีกทั้งปัญหาที่เกิดจากการขึ้นคลุม (over grown) โดยเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น จึงทำให้ต้องมีการพัฒนานำเทคนิคอื่นมาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจระบุ (Angen *et al.* 2007)

2.1.4.3 การใช้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดีหรือปฏิกิริยาซีโรโลยี (serology) ในการวินิจฉัยโรค

การนำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีไปมาใช้ในการวินิจฉัยโรค ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา หรือปรสิต โดยเฉพาะในโรคที่วิธีการตรวจหาตัวเชื้อหรือการเพาะเชื้อโดยวิธีปกติได้ผลไม่ดีหรือได้ผลช้า (นิรนาม. 2547) สำหรับการตรวจระบุ *H. parasuis* ด้วยวิธีนี้ อาทิเช่น Segalés *et al.* (1997) ใช้วิธี immunohistochemistry (IHC) ตรวจสอบหา specific protein (antigen) ซึ่งคือ *H. parasuis* ในส่วนของเนื้อเยื่อที่เตรียมโดย formalin-fixed, paraffin-embedded แล้วทำการ staining เนื้อเยื่อด้วย labeled antibodies (primary antibody และ secondary antibody) ทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี วิธี IHC มีข้อดีคือ แสดงให้เห็นการติดเชื้อบนเนื้อเยื่อโดยตรง แต่ไม่ค่อยนิยมใช้เนื่องจาก มีความไว (sensitivity) ในการตรวจพิสูจน์ *H. parasuis* น้อยมากและเกิด cross-reaction กับเชื้อ *A. pleuropneumoniae*

2.1.4.4 การตรวจระบุ *H. arasuis* โดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

การตรวจระบุ *H. parasuis* ด้วยการเพาะแยกเชื้อมีความยุ่งยากจึงมีการนำเทคนิคพีซีอาร์ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองให้ได้ปริมาณมากขึ้นหลายเท่าและใช้เวลาน้อยมาประยุกต์ใช้ในการตรวจระบุ *H. parasuis* (Oliveira *et al.* 2001) โดยนิยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

ศึกษาจากส่วนของยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนที่มีรหัสสำหรับโมเลกุลไรโบโซม และเป็นยีนที่มีอยู่ในแบคทีเรียทุกชนิด เป็นเหมือนยีนลายเซ็น (signature gene) ซึ่งมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิดแต่อย่างไรก็ตามจะมีบางช่วงในสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene ที่เหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิด ในขณะเดียวกันก็มีช่วงของสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ช่วงที่เหมือนและช่วงที่แตกต่างกันของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอจึงมีการนำยีนของ 16S rRNA มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียรวมทั้งใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Zhang *et al.* 2004) โดย Oliveira *et al.* (2001) นำเทคนิคพีซีอาร์มาใช้ในการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน 16S rRNA ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 821 คู่เบส (bp) มีความไวในการตรวจพิสูจน์เชื้อได้ตั้งแต่ 10^2 CFU/ml และใช้เป็นโพรบ (probe) ตรวจจับเชื้อบนเนื้อเยื่อได้ แต่พบว่าเทคนิคพีซีอาร์ไม่สามารถตรวจพิสูจน์เชื้อที่เก็บตัวอย่างได้จากโพรงจมูก หรือหลอดลมได้เนื่องจาก บริเวณนี้สามารถตรวจพบได้ทั้งเชื้อสายพันธุ์ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค และยังให้ผลเป็นบวกเมื่อทดสอบกับ *A. pleuropneumoniae* ดังนั้นการตรวจพบเชื้อในโพรงจมูกหรือหลอดลมจึงอาจไม่พบเชื้อสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุทำให้สุกรป่วย ต่อมา Angen *et al.* (2007) ทำการตรวจระบุ *H. parasuis* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีน16S rRNA ด้วยการพัฒนาเทคนิคของ Oliveira *et al.* (2001) ซึ่งเพิ่มความจำเพาะมากขึ้นโดยใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อทำการตรวจระบุ *H. parasuis* ที่เป็น reference strains ทั้ง 15 serovars และตัวอย่างที่ได้จากประเทศเดนมาร์คและเชื้อสปีชีส์อื่นใน Family Pasteurellaceae จำนวน 27 สปีชีส์ แล้วทำการเปรียบเทียบผลกับ Oliveira *et al.* (2001) พบว่าสามารถตรวจระบุ *H. parasuis* ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 1090 คู่เบส และให้ผลเป็นลบกับเชื้อสปีชีส์อื่นใน Family Pasteurellaceae ทั้ง 27 สปีชีส์

นอกจากนี้เนื่องจากการเรียงตัวของลำดับเบสบนยีน 16S rRNA มีการเปลี่ยนแปลงน้อยในแบคทีเรียแต่ละชนิดและพบได้ในแบคทีเรียทุกชนิดจึงสามารถใช้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างแบคทีเรียทุกชนิด และใช้จำแนกแบคทีเรียในระดับจีนัสหรือสปีชีส์ แต่สำหรับในกรณีที่ต้องการเปรียบเทียบเชื้อในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ เพื่อศึกษาระบาดวิทยาหรือตรวจหาปัจจัยที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงจนสามารถก่อโรคได้นั้น การวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA จะไม่หลากหลายมากพอที่จะนำมาใช้ได้เนื่องจากยีนส่วนนี้ไม่ใช่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (Jill. 2004)

2.1.5 การรักษาและการป้องกัน

การรักษาโรคที่เกิดจากการติด *H. parasuis* นั้นสามารถทำได้โดยการใช้ยาปฏิชีวนะซึ่งต้องรีบทำในช่วงต้นของการเป็นโรคเร็วที่สุดเท่าที่จะเร็วได้ (MacInnes and Desrosiers. 1999) การให้ยาปฏิชีวนะจำพวก ampicillin, tetracycline, neomycin และ gentamicin โดยต้องฉีดซ้ำทุกๆ 24 ชั่วโมง ติดต่อกัน 5-7 วัน ขณะเดียวกันสุกรตัวอื่นๆ ในคอกเดียวกันจะต้องได้รับการให้ยาเพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป้องกัน หรือควบคุมการระบาดของเชื้อ ยาที่ใช้จะต้องให้ในขนาดสูงเพื่อให้มีปริมาณตัวยาในกระแสเลือดสูงพอที่จะซึมเข้าไปในไขสันหลัง สารน้ำส่วนอื่นของร่างกายและแพร่เข้าไปในข้อที่อักเสบ (กิจจา อุไรรงค์. 2530) การใช้ยาต้านจุลชีพหรือยาปฏิชีวนะทั่วไปรักษาสุกรนั้น สุกรป่วยอาจจะดูดีขึ้น เนื่องจากยาไปช่วยกำจัดเชื้อหรือควบคุมโรคแทรกซ้อน แต่อาการของโรคต้องใช้เวลานานกว่าจะคืนสู่สภาพปกติ ดังนั้นแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อที่ดีที่สุด คือการจัดการฟาร์มที่ดี (วันดี ทาตระกูล. 2546)

การควบคุมโรคที่เกิดจาก *H. parasuis* นั้นสิ่งสำคัญคือการตรวจวินิจฉัยหาสาเหตุของโรคให้ถูกต้องและรวดเร็ว การเลือกตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวินิจฉัยรวมทั้งการศึกษาระบาดวิทยาหาความชุกของสายพันธุ์ของเชื้อที่ก่อปัญหาภายในฝูง สำหรับการใช้วัคซีนเพื่อควบคุมโรคที่เกิดจาก *H. parasuis* นั้นสามารถเลือกใช้ทั้ง commercial vaccine หรือ autogenous vaccine แต่เนื่องจากปัญหาการ cross-protection ต่ำระหว่างเชื้อต่าง serovar กัน (Oliviera. 2002) อาทิเช่น จากการศึกษาของ Takahashi *et al.* (2000) ในการทดสอบประสิทธิภาพการ cross-protection ของวัคซีนที่ผลิตจาก serovar 2 และ serovar 5 พบว่าสุกรในกลุ่มที่ให้วัคซีน serovar 2 นั้นจะตอบสนองเมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อที่เป็น serovar 2 แต่เมื่อกระตุ้นด้วย serovar 5 พบว่าสุกร 2 ใน 3 แสดงอาการป่วย และเมื่อนำวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อทั้งสอง serovar (bivalent vaccine) ลงทดสอบในฟาร์มผลปรากฏว่าอัตราการตายของสุกรสูงมาก และเมื่อทำการคัดแยกเชื้อพบว่าเชื้อที่ระบาดอยู่เป็น serovar 1 และกลุ่ม non-typeable จึงทำให้ bivalent vaccine ที่ใช้ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อสายพันธุ์อื่นได้

ดังนั้นในการเลือกใช้ commercial vaccine จึงต้องมีเชื้อสายพันธุ์ที่ก่อปัญหาภายในฟาร์มประกอบอยู่ในวัคซีนด้วย แต่กรณีที่พบเชื้อที่เป็น non-typeable การเลือกใช้ autogenous vaccine จึงอาจเป็นทางเลือกที่ดีกว่าซึ่งการเลือกสายพันธุ์ของเชื้อที่จะนำมาผลิตเป็น autogenous vaccine นั้นขึ้นกับปัจจัยดังนี้ ลักษณะของ serovar และ genotype (เป็นการระบุความชุกของสายพันธุ์ของเชื้อ) ตำแหน่งที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ เป็นต้น (Oliviera. 2002)

ไพบูลย์ โล่ห์สุนทร (2550) กล่าวว่า การป้องกันและควบคุมโรคต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับธรรมชาติของโรค ซึ่งหมายถึงวงจรการเกิดโรคตามธรรมชาติหรือปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้มีความไวต่อการติดเชื้อเพื่อเป็นการกำจัดหรือลดสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเช่น การฉีดวัคซีน การปรับปรุงแก้ไขสภาพแวดล้อม เป็นต้น ในการหยุดหรือลดความรุนแรงและลดระยะเวลาการติดต่อของโรค เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของโรคนั้นต้องการการวินิจฉัยที่ถูกต้อง เช่นการตรวจร่างกาย การตรวจทางห้องปฏิบัติการ และการทดสอบต่างๆ ซึ่งต้องทำโดยเร็วและมีประสิทธิภาพ เพื่อป้องกันไม่ให้มีการแพร่กระจายของโรคและจะได้ทำการรักษาได้อย่างทันท่วงที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis*

การจำแนกชนิดหรือพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ให้ความสนใจในระดับแฟมิลี่, จีนัส, และสปีชีส์ ซึ่งบางครั้งเชื้อแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกันอาจถูกแบ่งต่อออกเป็นสปีชีส์ย่อย (subspecies) หรืออาจถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มตามคุณสมบัติเฉพาะบางประการ เช่น การแบ่งกลุ่มตามโครงสร้างแอนติเจนจำเพาะที่เรียกว่า serogroup หรือ serotype และการแบ่งกลุ่มออกตามคุณสมบัติทางชีวภาพจำเพาะบางประการที่เรียกว่า biogroup หรือ biotype เป็นต้น (ภัทรชัย กีรติสิน. 2549) หลักการสำคัญในการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 2 ระบบใหญ่ ได้แก่

2.2.1 การจำแนกเชื้อตามลักษณะที่ตรวจพบได้ (phenotypic identification)

ในการจำแนกเชื้อที่ต้องการทดสอบว่าอยู่ในจีนัสหรือสปีชีส์ใด วิธีที่นิยมมากที่สุดในห้องปฏิบัติการคลินิกทั่วไปคือการทดสอบลักษณะที่ตรวจพบได้ เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของเชื้อที่มีอยู่และตัดสินว่าเชื้อดังกล่าวน่าจะมีชื่อหรืออยู่กลุ่มใด ลักษณะที่ตรวจพบได้ หรือ phenotypic characteristic หมายถึงลักษณะหรือคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเห็นหรือทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการ เช่นการย้อมติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ ส่วนประกอบหรือโครงสร้างเซลล์ ลักษณะโคโลนี ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภัทรชัย กีรติสิน. 2549) อาทิเช่นการจำแนก *S. aureus* โดยการเพาะแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการนั้น จะต้องทำการพิสูจน์เชื้อเบื้องต้นโดยการทดสอบ coagulase ร่วมกับการดูรูปร่างลักษณะของโคโลนีเพื่อแยก *S. aureus* กับ coagulase-negative staphylococci ชนิดอื่น แต่อย่างไรก็ตามนอกจาก *S. aureus* แล้วยังมี *S. hyicus* และ *S. intermedius* ที่มีลักษณะคล้ายกัน ซึ่งถ้าไม่มีความชำนาญก็อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการยืนยัน *S. aureus* (อภัสรา วรราชและวัชรชัย ณรงค์ศักดิ์. 2547)

นอกจากนั้นยังอาจใช้หลักการแอนติบอดีตรวจหาแอนติเจน หรือใช้แอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดี (ภัทรชัย กีรติสิน. 2549) โดยอาศัย (1) ปฏิกิริยาการตกตะกอน (precipitation) โดยแอนติเจนจะมีคุณสมบัติที่ละลายได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะจะเกิดเป็นตะกอน ซึ่งแบ่งชนิดออกตามตัวกลางที่เกิดปฏิกิริยาคือตกตะกอนในตัวกลางที่เป็นของเหลว (fluid precipitation) และตัวกลางที่เป็นวุ้น (gel precipitation หรือ immunodiffusion: ID) (นิรนาม. 2547) (2) ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) คือเทคนิค indirect hemagglutination (IHA) โดยแอนติเจนจะเกาะบน particle ที่เป็นเม็ดเลือดแดงเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะแล้วชักนำให้เกิดการเกาะกลุ่มและตกตะกอน แต่อย่างไรก็ตามโดยปกติแล้วแอนติบอดีย่อมทำปฏิกิริยากับแอนติเจนตัวที่กระตุ้นเท่านั้นแต่ก็สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนอื่นๆ ได้ เรียกว่า ปฏิกิริยาการข้ามกลุ่ม "cross reaction" (วิน เชยชมศรี. มปป)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992) ได้ใช้เทคนิค ID ร่วมกับการเตรียมแอนติเจนแบบ heat-stable จำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ได้เป็น 15 serovars (ตารางที่ 2.3) โดยอาศัยเชื้อจากเดิมที่เคยรายงานเป็น serovar A-D , serovar 1-7 (Morozumi and Nicolet. 1986) serovar Jena6-Jena12 และ serovar ND1-ND5 (Kielstein and Rapp-Gabrielson. 1992) โดย serovar 1-7 ให้คงไว้แต่เปลี่ยน serovar A และ B เป็น serovar 2 และ 5 ตามลำดับ ส่วน serovar C และ D เปลี่ยนเป็น serovars 8 และ 9 ตามลำดับ ขณะที่ serovar 10-15 นั้นได้จากการนำข้อมูลจากรายงานอื่นๆ ประกอบการพิจารณาโดยให้ serovar ND2 และ Jena11 เปลี่ยนเป็น serovar 11 เช่นเดียวกับ serovar ND5 และ Jena6 เปลี่ยนเป็น serovar 12 ส่วน serovar ND1, 2, 3 และ Jena10 เปลี่ยนเป็น serovar 15, 14, 13 และ 10 ตามลำดับ และเปลี่ยน serovar Jena12 เป็น serovar 9 แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า serovars Jena 7, 8 และ 9 ไม่ใช่ *H. parasuis* หลังจากนั้นทำการศึกษาระดับความรุนแรงของเชื้อทั้ง 15 serovars พบว่าแตกต่างกันคือ serovars 1, 5, 10, 12, 13 และ 14 เป็นกลุ่มที่มีความรุนแรงเนื่องจากพบเป็นสาเหตุทำให้สุกรป่วยและตายอย่างรวดเร็วภายใน 4 วัน ส่วน serovars 2, 4 และ 15 ทำให้สุกรแสดงอาการป่วยแต่ไม่รุนแรงถึงขั้นทำให้สุกรตายได้ serovar 8 ความรุนแรงไม่มากเมื่อดูจากลักษณะอาการและวิการที่ปรากฏ ขณะที่ serovars 3, 6, 7, 9 และ 11 ไม่ทำให้สุกรเกิดโรค จึงจัดว่าเป็นกลุ่ม serovars ที่ไม่รุนแรง (Kielstein and Rapp-Gabrielson. 1992)

Rúbies *et al.* (1999) ทำการจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ในประเทศสเปนระหว่างปี ค.ศ. 1993-1997 ด้วยเทคนิค agar-gel precipitation (AGP) test พบว่าจากตัวอย่างที่เก็บมาจากฟาร์ม (field strains) จำนวน 327 ตัวอย่าง สามารถตรวจระบุและจำแนกสายพันธุ์ย่อยได้ 54 เปอร์เซ็นต์ (174 ตัวอย่าง) โดยพบ serovar 2, 4, 5 และ 13 มากที่สุดและพบเชื้อที่จำแนกสายพันธุ์ย่อยไม่ได้อีก 29.3 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงการจำแนก serovars จาก reference strain ของ *H. parasuis* ที่มีรายงานการ ค้นพบในประเทศต่างๆ

serovars	reference Strains	country	diagnosis/isolation site
1.	No.4	Japan	Healthy/nose
2.	SW140	Japan	Healthy/nose
3.	SW114	Japan	Healthy/nose
4.	SW124	Japan	Healthy/nose
5.	Nagasaki	Japan	Septicemia/meninges
6.	131	Switzerland	Healthy/nose
7.	174	Switzerland	Healthy/nose
8.	C5	Sweden	Unknown
9.	D74	Sweden	Unknown
10.	H555	Germany	Healthy/nose
11.	H465	Germany	Pneumonia/trachea
12.	H425	Germany	Polyserositis/lung
13.	84-17975	United States	Unknown/lung
14.	84-22113	United States	Unknown/Joint
15.	84-15995	United States	Pneumonia/lung

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992)

Del Río *et al.* (2003) เปรียบเทียบการใช้เทคนิค IHA และ ID ในการจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ในประเทศสเปนโดยใช้ตัวอย่างที่เป็น field strains จำนวน 67 ตัวอย่าง พบว่าเมื่อใช้เทคนิค ID สามารถแยกสายพันธุ์ย่อยได้ทั้งหมด 42 ตัวอย่าง (62.7 เปอร์เซ็นต์) และที่จำแนกสายพันธุ์ย่อยไม่ได้ 25 ตัวอย่าง และเกิดการ cross-reaction ระหว่าง serovar 4 และ 15 มากที่สุด ส่วนเทคนิค IHA พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ย่อยได้ทั้งหมด 61 ตัวอย่าง (91 เปอร์เซ็นต์) และพบตัวอย่างที่จำแนกสายพันธุ์ย่อยไม่ได้ 5 ตัวอย่าง

Tadjine *et al.* (2004) ใช้เทคนิค IHA และ ID มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ย่อยและศึกษาการกระจายของ *H. parasuis* ในแถบประเทศภูมิภาคอเมริกาเหนือโดยใช้ reference strains ที่กำหนดเองทำการทดสอบเชื้อ field strain จากประเทศแคนาดา (n=250) และประเทศอเมริกา (n=50) โดยเตรียมแอนติเจนด้วยวิธี formalinized-whole-cell พบว่าการใช้เทคนิค ID กับเชื้อกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

field strains เกิดการ cross-reaction ขึ้นมากและพบสายพันธุ์ที่ระบุสายพันธุ์ย่อยไม่ได้อีกถึง 30 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเทคนิค IHA ไม่พบปัญหา cross-reaction อาจเนื่องมาจากเทคนิค ID เป็นการสรุปผลโดยดูการตะกอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่เป็น soluble กับแอนติบอดี โดยตรงดังนั้นจึงมักทำให้มีการ cross-reaction มากกว่าเทคนิค IHA ที่ใช้การ coat แอนติเจนไว้ที่ผิวของเม็ดเลือดแดงซึ่งเป็น polysaccharide ตามธรรมชาติอยู่แล้วจึงทำให้มีความจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีมากกว่าเทคนิค ID

Turni and Blackall (2005) ทำการเปรียบเทียบ 2 เทคนิคคือ IHA และเทคนิค gel diffusion (GD) ในการจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* โดยใช้ตัวอย่างที่เป็น reference strain ทั้ง 15 serovars และใช้ตัวอย่าง field strains จากประเทศออสเตรีย 72 ตัวอย่าง, ประเทศจีน 9 ตัวอย่าง พบว่าเทคนิค IHA สามารถจำแนกเชื้อที่เป็น reference strain ได้ 14 serovars ยกเว้น serovar 10 ในขณะที่เทคนิค GD สามารถจำแนกเชื้อที่เป็น reference strain ได้ 13 serovars ยกเว้น serovar 7 และ 8 ส่วนตัวอย่าง field strains พบว่า เทคนิค IHA สามารถจำแนกเชื้อได้ 45 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 81 ตัวอย่าง ในขณะที่เทคนิค GD จำแนกได้ 48 ตัวอย่าง

Cai *et al.* (2005) ใช้เทคนิค IHA และเทคนิค GD ในการจำแนก serovars ของ *H. parasuis* ในประเทศจีนทั้งหมด 281 ตัวอย่าง isolated ได้ระหว่างเดือน กันยายน ปี ค.ศ. 2002 ถึงเดือน ธันวาคม ปี ค.ศ. 2004 พบว่า serovar 4 (24.2 เปอร์เซ็นต์) เป็น serovars ที่พบมากที่สุด รองลงมาคือ serovars 5 (19.2 เปอร์เซ็นต์) serovars 13 (12.5 เปอร์เซ็นต์) serovars 14 (7.1 เปอร์เซ็นต์) และ serovars 12 (6.8 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่อีก 12.1 เปอร์เซ็นต์จำแนกสายพันธุ์ย่อยไม่ได้

Rapp-Gabrielson *et al.* (1997) กล่าวว่าความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแต่ละ serovars กับความสามารถในการก่อโรค (virulence) ยังไม่ชัดเจน อีกทั้งยังพบปัญหาที่เกิดจากการ cross-reaction ระหว่าง serovars ต่างชนิดกันและแม้เป็น serovars เดียวกันยังพบว่ามีความหลากหลายและยากต่อการทำนายผลสอดคล้องกับ Oliveira *et al.* (2003) ที่กล่าวว่า การจำแนก serovars โดยการเพาะแยกเชื้อและการใช้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีนั้น ยังไม่เพียงพอต่อการแยก serovars ของ *H. parasuis* และพบเชื้อที่จำแนกสายพันธุ์ย่อยไม่ได้ถึง 15-41 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 การจำแนกเชื้อตามโครงสร้างพันธุกรรม (Genotypic identification)

การจำแนกเชื้อตามโครงสร้างพันธุกรรมโดยเทคนิคระดับชีวโมเลกุล โดยอาศัยเครื่องหมายหรือ marker เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งนิยมใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่งๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552) อาทิเช่น การศึกษาจากส่วนของยีน 16S rRNA (Jill. 2004) หรือการศึกษาในส่วนของยีนที่แปล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

105554

รหัสเป็นโปรตีนในกลุ่ม heat shock proteins ขนาด 60 kDa (hsp60) ซึ่งพบในแบคทีเรียทุกชนิด และมีความอนุรักษ์ (conserve) ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงจึงมีการพัฒนานำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย (Goh *et al.* 1996; Wong and Chow. 2002)

การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้ เนื่องจากเกิดความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอหรือเกิดพอลิมอร์ฟีซึม (polymorphism) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของโมเลกุลดีเอ็นเอนั่นเอง (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2552) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เคยมีรายงานใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ย่อยและความหลากหลายของ *H. parasuis* ได้แก่

2.2.2.1 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ โดยจะใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับช่วงของดีเอ็นเอเป้าหมาย แล้วนำผลที่ได้ไปทำอิเล็กโตรโฟลิซิส และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ถ้ามีการเพิ่มหรือขาดหายไปของส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมาย จะพบว่าผลผลิตของดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละตัวอย่างนั้นมีขนาดไม่เท่ากัน (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2552) อาทิเช่น De la Puente Redondo *et al.* (2000) ประสบความสำเร็จในการตรวจระบุแยก *H. parasuis* ออกจากอ *A. pleuropneumoniae* โดยการใช้เทคนิคพีซีอาร์มาแยกความแตกต่างในส่วนของยีน *tbp*A (transferrin binding protein A) โดย *A. pleuropneumoniae* ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 2800 คู่เบส และ *H. parasuis* มีผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 1900 คู่เบส

2.2.2.2 REP (repetitive extragenic palindromic sequence) เป็นวิธีตรวจสอบดีเอ็นเอในแบคทีเรีย โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนของดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำ (repetitive sequence) ซึ่งพบในแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่และแกรมบวกหลายชนิด ไพรเมอร์ที่ออกแบบนี้สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียหลายชนิด มีลักษณะสุ่มหลายตำแหน่ง (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2552) ซึ่ง Smart *et al.* (1988) ได้นำเทคนิคนี้มาใช้ในการจำแนก *H. parasuis* ในสุกรจาก Southern Ontario ที่คัดแยกเชื้อจากสุกรสุขภาพดีกับสุกรที่ป่วย โดยเปรียบเทียบระหว่างสุกรที่เลี้ยงแบบปลอดโรค (specific pathogen free) และสุกรที่เลี้ยงด้วยระบบทั่วๆ ไป (conventional herds) พบว่าสุกรที่เลี้ยงด้วยระบบทั่วๆ ไป นั้นมีความหลากหลาย (heterogeneous) ของสายพันธุ์ที่คัดแยกได้มากกว่าเมื่อเทียบกับสุกร SPF และยังพบว่าในร่างกายของสุกรปกติตัวเดียวกันมีความแตกต่างของสายพันธุ์ระหว่างเชื้อที่คัดแยกจากส่วนของร่างกาย (systemic site) กับที่ได้จากระบบทางเดินหายใจส่วนบนของสุกร

Rafiee *et al.* (2000) ประยุกต์ใช้เทคนิค Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของลำดับเบสซ้ำที่เป็น non-coding ของ *H. parasuis* พบว่า ERIC-PCR เป็นเทคนิคที่เหมาะสำหรับศึกษาการระบาดของเชื้อเนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็ว ราคาไม่แพง และยืนยันแหล่งที่มาของเชื้อได้ แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ERIC-PCR มีรูปแบบการตัดที่ค่อนข้างหลากหลายมากและข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลที่มีความจำเพาะในแต่ละพื้นที่ที่ทำการศึกษาทำให้ยากต่อการนำข้อมูลมาเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ

2.2.2.3 เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP)

RFLP หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความสามารถที่จะจำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไปแต่บางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่ หรือเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม เช่นมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มเข้ามา (insertion) เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน แต่เป็นวิธีที่ทำได้ยากและใช้เวลามาก วิธีที่ทำได้ง่ายกว่าคือ นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้น มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548)

เนื่องจากการตรวจ RFLP จากดีเอ็นเอมีขั้นตอนที่ยุ่งยากต้องผ่านการทำ southern hybridization ต้องมีโพรบซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ผ่านการโคลนมาแล้วถ้าติดฉลากสารกัมมันตรังสีอาจมีอันตรายจึงต้องทำด้วยความระมัดระวังในพื้นที่ที่ควบคุม และใช้เวลานาน จึงมีการตรวจพอลิมอร์ฟีซึมด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมาก แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดก่อนแล้วนำไปแยกขนาดโดยอิเล็กโตรโฟลิซิส โดย PCR-RFLP เดิมเรียกว่า cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) ซึ่งเป็นการตรวจสอบ RFLP จากผลผลิตของพีซีอาร์ โดยไม่ต้องผ่านการไฮบริไดเซชัน จึงทำได้รวดเร็วและใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นปริมาณน้อยใช้ตรวจได้ทั้งดีเอ็นเอในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552) โดย De la Puente Redondo *et al.* (2003) ได้ใช้เทคนิค PCR-RFLP เพื่อแยกความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ในส่วนของยีน *tbp*A โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Taq*I, *Ava*I และ *Rsa*I โดยใช้ตัวอย่างเชื้อที่เป็น reference strains ทั้ง 15 serovars และตัวอย่างเชื้อที่เป็น field strains จำนวน 101 ตัวอย่าง แล้วนำผลการตัด (pattern) ที่ได้จากเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิดมาทำการจัดกลุ่ม (RFLP groups) พบว่าเชื้อกลุ่ม reference strains สามารถจัดได้ 12 RFLP groups โดย serovars 5, 12, 14 และ 15 มี RFLP groups เหมือนกันในขณะที่เชื้อในกลุ่ม field strains ทั้ง 101 ตัวอย่างนั้นสามารถจัดได้ถึง 33 RFLP groups (มี RFLP groups ตรงกับเชื้อกลุ่ม reference strains จำนวน 10 RFLP groups) แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ของเชื้อ *H. parasuis* มี heterogeneity สูงมาก แต่อย่างไรก็ตามเมื่อคัดเลือกตัวอย่าง field strains มาทำการแยกสายพันธุ์ย่อยจำนวน 66 ตัวอย่างด้วยเทคนิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

immunodiffusion เปรียบเทียบกับการจัด RFLP groups พบว่าผลการแยกสายพันธุ์ย่อยทั้งสองเทคนิคให้ผลไม่สอดคล้องกันโดยพบว่ามีเพียง 8 ตัวอย่าง (serovar 5 จำนวน 6 ตัวอย่าง, serovar 2 และ 15 อย่างละหนึ่งตัวอย่าง) ที่ให้ผลการแยกสายพันธุ์ย่อยตรงกัน

Del Río *et al.* (2006) ใช้เทคนิค PCR-RFLP เพื่อแยกความแตกต่างของ *H. parasuis* และเชื้อในสปีชีส์ *Actinobacillus* ในส่วนของยีน *aro*A ซึ่งเป็นยีนที่แปลรหัสเป็น 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate syntheses โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Sau*3*AI* กับ *Rsa*I พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตามรูปแบบการตัดได้ 7 กลุ่มคือ กลุ่ม I ได้แก่เชื้อ *H. parasuis* serovars 1, 2, 4-6 และ8-15, *A. porcinus* และ *A. ureae* กลุ่ม II ได้แก่เชื้อ *H. parasuis* serovars 3 และ 7, *A. pleuropneumoniae* serotypes 1, 4, 5, 9 และ 12 กลุ่มที่ III ได้แก่ *A.lignieresii* กลุ่มที่ IV ได้แก่ *A. pleuropneumoniae* serotype 7 กลุ่มที่ V ได้แก่ *A. pleuropneumoniae* serotypes 2, 3, 6 และ 8, *A. equuli, A. rosii, A. minor* และ *A. indolicus* กลุ่มที่ VI ได้แก่ *A. suis* และกลุ่ม VII ได้แก่ *A. pleuropneumoniae* serotype 10 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการแยกความแตกต่างในส่วนของยีน *aro*A นี้มีความจำเพาะต่อ *H. parasuis* น้อยมาก

Li *et al.* (2009) ได้ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อตั้งแต่เดือนธันวาคม ปี ค.ศ. 2003 ถึงเดือนพฤษภาคม ปี ค.ศ. 2006 พบ *H. parasuis* จำนวน 131 (28.4 เปอร์เซ็นต์) ตัวอย่าง จากทั้งหมด 462 ตัวอย่าง ซึ่งล้วนแต่เป็นตัวอย่างที่ได้จากสุกรป่วย จากนั้นเลือกเชื้อมาจำนวน 50 ตัวอย่าง รวมทั้งเชื้อกลุ่ม reference strains จำนวน 15 serovar มาทำการจำแนกสายพันธุ์ย่อยด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้ส่วนของยีน *tbp*A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 1900 คู่เบส แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Taq*I, *Ava*I และ *Rsa*I พบว่าเชื้อที่เป็น reference strains สามารถจัดรูปแบบได้ 9 รูปแบบและเชื้อที่เก็บตัวอย่างมาศึกษาจาก 50 ตัวอย่าง สามารถจัดได้ 13 รูปแบบ โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดคือ DBN (38 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งรูปแบบนี้พบว่าไม่ตรงกับรูปแบบที่รายงานโดย De la Puente Redondo *et al.* (2003) จึงแสดงให้เห็นว่าจำนวน *H. parasuis* ในประเทศจีนมีจำนวนหลากหลายมากเมื่อดูจากลักษณะ genotype ที่ได้

Oliveira *et al.* (n. d.) ใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณในส่วนของยีน 16S rRNA โดยใช้ reference strains serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 และ 14 (ขนาดประมาณ 821 คู่เบส) จากนั้นโคลนใส่ *Escherichia coli* และส่งทดสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) จากนั้นทำการศึกษาด้วยเทคนิค RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิด คือ *Hinf* I, *Sau*3A I, *Hind* III, *Alu* I, *Bam*H I และ *Mae* III จากการศึกษาด้วยเทคนิค PCR-RFLPพบว่าส่วนของเอนไซม์ Hind III และ Hinf I สามารถตัดแล้วให้รูปแบบ RFLP สูงที่สุดคือได้ทั้งหมด 4 รูปแบบ ได้แก่ Type I (serotypes 7 and 9), Type II (serotypes 5, 10 and 14), Type III (serotypes 1, 2, 3, 4, 6 and 11) และ Type IV (serotype 12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับประเทศไทยนั้นความรู้เกี่ยวกับ *H. parasuis* ยังมีอยู่อย่างจำกัดและในการตรวจระบุการติดเชื้อยังทำด้วยวิธีการชันสูตรดูวิการและการเพาะแยกเชื้อและยังไม่เคยมีรายงานถึงชนิดของสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* มาก่อน ดังนั้นหากเราสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจระบุการติด *H. parasuis* ให้มีความถูกต้องและรวดเร็ว และสามารถจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ที่มีในประเทศไทยได้ย่อมมีประโยชน์ทั้งต่อการวางแผนการรักษาและการควบคุมไม่ให้มีการระบาดของเชื้อได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยมีตัวอย่างเป็น 3 ลักษณะ คือ

1) ตัวอย่างที่ได้จากสุกรที่แสดงวิการของโรคที่เกิดจาก *H. parasuis* อย่างชัดเจน ซึ่งผ่านการชันสูตรด้วยวิธีการผ่าซากแล้วทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากส่วนของปอดที่แสดงวิการของโรคอย่างชัดเจน

2) ตัวอย่างที่ได้จากสุกรที่ไม่ได้แสดงอาการป่วยด้วยโรคที่เกิดจาก *H. parasuis* เก็บตัวอย่างจากสุกรปกติที่ไม่ได้แสดงอาการป่วยโดยจะใช้ก้านสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วป้ายเชื้อจากส่วนโพรงจมูก

3) ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้แก่ *E. coli, Salmonella* sp., *S. suis*, *S. aureus* และ *A. pleuropneumoniae* ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้จากหน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอโดย

1) ตัวอย่างจากชิ้นส่วนของปอด เตรียมโดยการใช้กรรไกรตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ลงในโกร่ง จากนั้นเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วบดจากนั้นเก็บส่วนของสารละลายที่ได้จากการบดมาใช้สกัดดีเอ็นเอปริมาตร 150 ไมโครลิตร

2) ตัวอย่างที่ได้จากการป้ายเชื้อสามารถจุ่มลงในสารละลายที่ใช้สกัดดีเอ็นเอโดยตรง

วิธีการสกัดดีเอ็นเอประยุกต์จากวิธี acid-phenol guanidinium-thiocyanate-chloroform extraction (Sambrook *et al.* 1989) โดยเติมสารละลาย D-solution ลงในตัวอย่างปริมาตร500 ไมโครลิตร จากนั้นพลิกหลอดไปมาเพื่อให้เซลล์แตกแล้วเติม phenol ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ chloroform ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำการตกตะกอนโปรตีน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเก็บเอาสารละลายส่วนใสด้านบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร มาทำซ้ำขั้นตอนการเติม phenol และ chloroform อีกครั้ง จากนั้นเก็บเอาสารละลายส่วนใสด้านบนมาปริมาตร 400 ไมโครลิตร มาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

absolute ethanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้วจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่นำมาใช้ในการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ได้แก่ *E. coli, Salmonella* sp., *S. suis, S. aureus* และ *A. pleuropneumonia* รวมทั้ง *H. parasuis* ที่เพาะแยกเชื้อได้ สกัดดีเอ็นเอ โดยการเขี่ยเชื้อที่เพาะได้ลงในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บส่วนน้ำด้านบนไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป (ดัดแปลงจาก Lin. 2003)

3.3 การตรวจระบุและการศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของ *H. parasuis*

3.3.1 การตรวจระบุด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเพาะเลี้ยง *H. parasuis* ทำได้โดยการนำตัวอย่างชิ้นเนื้อและตัวอย่างที่ป้ายเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารชนิด blood agar ด้วยเทคนิคการ streak plate และใช้ *S. aureus* ขีดบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเชื้อคือ 37 องศาเซลเซียส เพิ่มปริมาณ CO_2 ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2 การตรวจระบุด้วยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน 16S rRNA

การเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค multiplex-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ HP1F3: TAT CGR GAG ATG AAA GAC, HP2F2: GTA ATG TCT AAG GAC TAG และ HPRevx: CCT CGC GGC TTC GTC (Agen *et al.* 2007) ซึ่งส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 100 ไมโครลิตรประกอบด้วย 10 x PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 6 mM $MgCl_2$, 2 µM primer HP1F3, 2 µM primer HP2F2 และ 2 µM primer HPRevx, 2.5 U/µl Taq polymerase และดีเอ็นเอแม่พิมพ์100 นาโนกรัม ใช้น้ำปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้นเริ่มจากการผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาข้างต้นเนื่องจากต้องใช้ผลผลิต พีซีอาร์จำนวนมากจึงทำการผสมส่วนประกอบทุกอย่างยกเว้นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ลงในหลอดเดียวกันในปริมาตรที่เพียงพอกับจำนวนตัวอย่างก่อน (master mixture) แล้วจึงแบ่งใส่หลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีซีอาร์แต่ละหลอด จากนั้นเติมดีเอ็นเอแม่พิมพ์แต่ละตัวอย่างลงไป นำส่วนผสมที่ได้ไปเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมดังนี้คือ

ขั้นตอนที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นตอนที่ 2 denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
ทำซ้ำจากขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวนทั้งหมด 35 รอบ
ขั้นตอนที่ 5 final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากพีซีอาร์โดยใช้เทคนิคการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ด้วยอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์ ผ่านสารละลายตัวกลาง 1X TAE เป็นเวลา 20 นาที ที่กระแสไฟฟ้า 135 โวลต์ จากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ด้วยเครื่องเจลดอคคิวเมนเทชัน (gel documentation) และเปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (1kb DNA ladder plus; Fermentas Inc,USA)

3.3.3 การตรวจระบุด้วยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน hsp60

การเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในส่วนของยีน hsp60 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ HspF: 5′-GAATTCGAIIIIGCIGGIGAYGGIACIACIAC-3′ และ HspR: 5′CGCGGGATCCYKIY KITCICCRAAICCIGGIGIGCYTT-3′ (Olvera *et al.* 2006) ซึ่งส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรประกอบด้วย 10 x PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 2 µM primer HspF, 2 µM primer HspR และ 2.5 U/µl Taq polymerase และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 100 นาโนกรัม ใช้น้ำปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้นเริ่มจากการผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์โดยทำตามวิธีในข้อ 3.3.2 แล้วนำส่วนผสมที่ได้ไปเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ดังนี้คือ

ขั้นตอนที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นตอนที่ 2 denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที
ทำซ้ำจากขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวนทั้งหมด 35 รอบ
ขั้นตอนที่ 5 final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากพีซีอาร์โดยใช้เทคนิคการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์ ผ่านสารละลายตัวกลาง 1x

TAE เป็นเวลา 20 นาที ที่กระแสไฟฟ้า 135 โวลต์ จากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ด้วยเครื่องเจลดอคคิวเมนเทชัน และเปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (1kb DNA ladder plus; Fermentas Inc,USA)

3.3.4 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA และ hsp60

3.3.4.1 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล

เมื่อทำการตรวจสอบพบดีเอ็นเอที่มีผลผลิตตามขนาดที่ต้องการจากส่วนของยีน 16S rRNA (ขนาดประมาณ 1090 คู่เบส) และส่วนของยีน hsp60 (ขนาดประมาณ 600 คู่เบส) แล้วทำการตัดเจลเพื่อแยกแถบดีเอ็นเอที่มีความยาวตามที่ต้องการออกจากเจล จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป PCR clean-up Gel extraction (NucleoSpin® Extract II, Germany) โดยการเติมบัฟเฟอร์ NT 200 ไมโครลิตรต่อ 100 มิลลิกรัมเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีหรือจนกระทั่งเจลละลายหมด แล้วดูดของเหลวทั้งหมดใส่ลงใน NucleoSpin® Extract II column ที่สวมทับด้วยหลอดเก็บปริมาตรขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ให้ของเหลวผ่าน column ไปอยู่ในหลอด แล้วเทของเหลวในหลอดทิ้ง ล้างดีเอ็นเอที่เกาะที่ column ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที เทของเหลวทิ้งและนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย NucleoSpin® Extract II column ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม Elution buffer NE ปริมาตร 15-50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นแบ่งดีเอ็นเอที่แยกได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ในอะกาโรสเจลอีกครั้งจากนั้นเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3.4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. parasuis*

ในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. parasuis* นั้นทำได้โดยการนำผลผลิตที่ได้จากข้อ 3.3.4.1 ไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล GenBank ในอินเตอร์เน็ตที่ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อใช้ในการจัดกลุ่มหรือจำแนกตัวอย่าง

3.3.4.3 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *H. parasuis* ด้วยแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree analysis)

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่าง *H. parasuis* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยนำผลที่ได้จากข้อ 3.3.4.2 มาทำการจัดเรียงลำดับข้อมูลของสายดีเอ็นเอ

(alignment) ด้วยโปรแกรม BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) แล้วนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม MEGA 4 (http://www.megasoftware.net) โดยวิธี distance matrix ด้วย algorithms แบบ Neighbor-joining (NJ) method ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรม ด้วย bootstrap test จำนวน 5,000 รอบ ซึ่งกำหนดให้แสดง bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในต้นไม้พันธุกรรม โดยให้ชื่อตัวอย่างของ *H. parasuis* พิมพ์ด้วยอักษรตัวเข้มเป็น HP (ตัวอย่างที่แสดงวิการของโรคอย่างชัดเจน) หรือ HPN (ตัวอย่างจากสุกรที่ไม่แสดงวิการของโรค) ตามด้วยลำดับตัวอย่าง/TH/ปีที่เก็บตัวอย่าง เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลในส่วนของยีน 16S rRNA โดยใช้ *E. coli* SS1/09 เป็น outgroup (ตารางผนวกที่ ก 2) และในส่วนของยีน hsp60 นั้นใช้ *E. coli* 87-04 เป็น outgroup (ตารางผนวกที่ ก 3)

3.4 การจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ด้วยการวิเคราะห์ PCR-RFLP จากส่วนของยีน *tbp*A

3.4.1 การเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *tbp*A

การเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *tbp*A ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ forward tbpA55: [5´TTA GCC TTG CTC TTC TTA GCC3´] และ reverse tbpA33: [5´AAG CTT GAA ACT AAG GTA CTC TAA 3´] (De la Puente Redondo *et al.* 2003) ซึ่งส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรประกอบด้วย 10 x PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 2 µM primer tbpA55, 2 µM primer tbpA33 และ 2.5 U/µl Taq polymerase และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 100 นาโนกรัม ใช้น้ำปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้นเริ่มจากการผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์โดยทำตามวิธีในข้อ 3.3.2 แล้วนำส่วนผสมที่ได้ไปเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมดังนี้คือ

ขั้นตอนที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
ขั้นตอนที่ 2 denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที
ขั้นตอนที่ 4 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
ทำซ้ำจากขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวนทั้งหมด 35 รอบ
ขั้นตอนที่ 5 final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากพีซีอาร์โดยใช้เทคนิคการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์ ผ่านสารละลายตัวกลาง 1x TAE เป็นเวลา 20 นาที ที่กระแสไฟฟ้า 135 โวลต์ จากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจลดอคคิวเมนเทชันและเปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (1kb DNA ladder plus; Fermentas Inc,USA)

3.4.2 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

หลังจากตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากส่วนของยีน *tbp*A ขนาดประมาณ 1900 คู่เบส จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *Taq*I, *Ava*I และ *Rsa*I (Fermentus Inc.,USA) โดยมีส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้สำหรับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะคือ 10x buffer 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ 0.5 ไมโครลิตร และผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์ 8.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิดโดยใช้เทคนิคการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยอะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์ ผ่านสารละลายตัวกลาง 1x TAE เป็นเวลา 120 นาที ที่กระแสไฟฟ้า 35 โวลต์ จากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ด้วยเครื่องเจลดอคคิวเมนเทชัน แล้วทำการให้ลำดับอักษรแทนรูปแบบการตัด (pattern) ที่ได้จากเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบกับรูปแบบกับ *H. parasuis* ในกลุ่ม reference strains ทั้ง 15 serovars ที่รายงานโดย De la Puente Redondo *et al.* (2003) (ภาพผนวกที่ ก 1) หากมีรูปแบบการตัดที่เหมือนกันก็ให้ลำดับอักษรเหมือนกันแต่หากรูปแบบไม่เหมือนกับที่รายงานก็จะให้ลำดับอักษรต่อจากลำดับอักษรสุดท้าย และเมื่อทำการจัดรูปแบบการตัดเสร็จแล้วต่อจากนั้นทำการจัดกลุ่ม (RFLP groups) ของรูปแบบโดยเรียงรูปแบบตามชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะคือ *Taq*I, *Ava*I และ *Rsa*I แล้วนำไปใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ย่อยของตัวอย่าง *H. parasuis* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดยนำไปเปรียบเทียบกับ RFLP groups ของเชื้อในกลุ่ม reference strains ทั้ง 15 serovars (ตารางผนวกที่ ก 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจระบุ *H. parasuis* โดยการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีน 16S rRNA และ hsp60 แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางพันธุกรรมเพื่อใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *H. parasuis* จากนั้นทำการจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* โดยการใช้เทคนิค PCR-RFLP ศึกษาส่วนของยีน *tbp*A เพื่อให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ *Taq*I, *Ava*I และ *Rsa*I เมื่อได้รูปแบบการตัดแล้วทำการจัด RFLP group เพื่อนำผลไปทำการเปรียบเทียบกับรายงานของ De la Puente Redondo *et al.* (2003) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ ดังนี้

4.1 การตรวจระบุและการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *H. parasuis*

4.1.1 ผลการตรวจระบุ *H. parasuis* ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

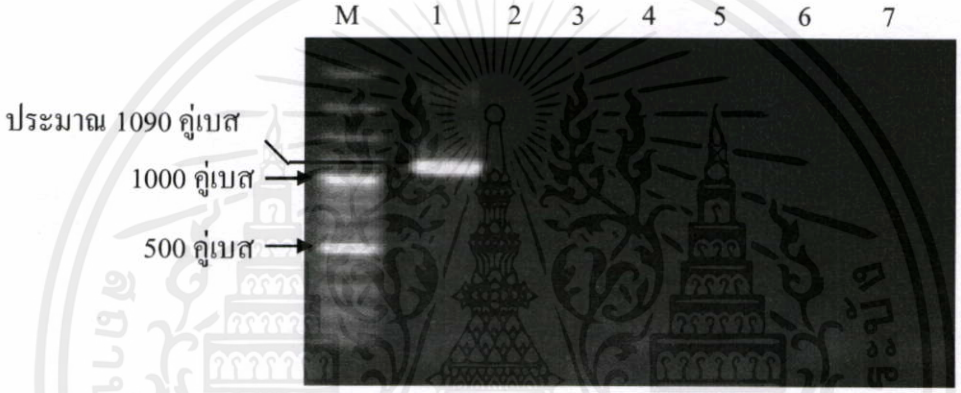
ในการตรวจระบุ *H. parasuis* ที่ได้จากตัวอย่างชิ้นส่วนของปอดที่แสดงวิการของโรคที่เกิดจาก *H. parasuis* อย่างชัดเจนและตัวอย่างที่ได้จากการป้ายเชื้อบริเวณโพรงจมูกของสุกรที่ไม่แสดงวิการของโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิด blood agar นั้นพบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้เฉพาะส่วนของตัวอย่างชิ้นส่วนของปอดเท่านั้น ในขณะที่ตัวอย่างที่ได้จากการป้ายเชื้อบริเวณโพรงจมูกของสุกรที่ไม่แสดงวิการของโรคนั้นไม่สามารถเพาะแยกเชื้อได้เพราะเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ขึ้นคลุม เนื่องจากบริเวณโพรงจมูกเป็นบริเวณที่สามารถพบเชื้อจุลินทรีย์ได้จำนวนมาก ประกอบกับ *H. parasuis* นั้นเป็นเชื้อที่เจริญช้าและมีลักษณะโคโลนีขนาดเล็กมากจึงเป็นสาเหตุทำให้เชื้อชนิดอื่นที่เจริญเร็วกว่าขึ้นคลุม สอดคล้องกับ Oliveira and Pijoan (2004) กล่าวว่าการเพาะเชื้อ *H. parasuis* จากส่วนของโพรงจมูกนั้นทำได้ยากเนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อประจำถิ่นที่อยู่บริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนบนของสุกร นอกจากนี้ Turni and Blackall (2005) กล่าวว่าบริเวณโพรงจมูกนั้นสามารถพบ *H. parasuis* ได้ทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ยืนยันได้ว่าสุกรป่วยด้วยสาเหตุจาก *H. parasuis* ดังนั้น Olvera *et al.* (2007) แนะนำว่าควรใช้ตัวอย่างที่แสดงอาการทางคลินิกและแสดงวิการของโรคอย่างชัดเจนและต้องเป็นสุกรที่ยังไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ

4.1.2 ผลการตรวจระบุด้วยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน 16S rRNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค multiplex-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ HP1F3, HP2F2 และ HPRevx (Agen *et al.* 2007) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์

ที่ได้ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1.2 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 135 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder plus (Fermentas Inc,USA) พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1090 คู่เบส (ภาพที่ 4.1) จากทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษา และเมื่อนำไพรเมอร์ชุดนี้ไปทดสอบกับ *E. coli, Salmonella* sp., *S. suis*, *S. aureus* และ *A. pleuropneumoniae* พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Angen *et al.* (2007) ที่กล่าวว่าการตรวจระบุ *H. parasuis* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้นมีความรวดเร็ว มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะต่อชนิดของ *H. parasuis* โดยไม่ต้องพบปัญหาที่เกิดจากการปนเปื้อนด้วยเชื้อชนิดอื่น



ภาพที่ 4.1 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วนของยีน 16S rRNA บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์ โดย Lane M คือเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน (1kb DNA ladder plus; Fermentas Inc,USA), Lane 1 คือผลผลิตพีซีอาร์ของ *H. parasuis*, Lane 2 คือ *A. pleuropneumoniae*, Lane 3 คือ *E. coli*, Lane 4 คือ *S. suis*, Lane 5 คือ *Salmonella* sp. และ Lane 6 คือ *S. aureus* และ Lane 7 คือ negative control

4.1.3 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA

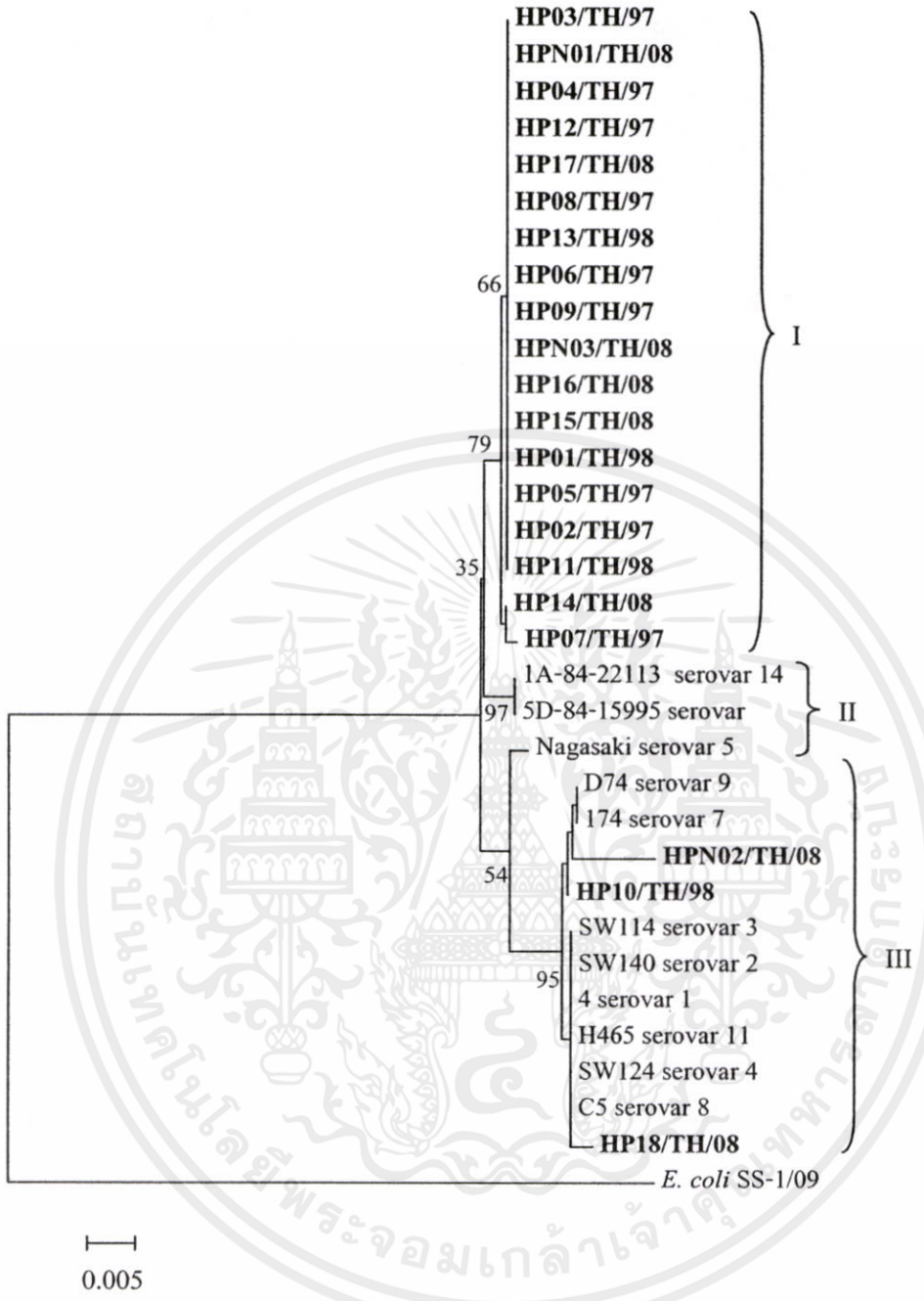
เนื่องจากการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน 16S rRNA นั้นมีความจำเพาะต่อชนิดของ *H. parasuis* ดังนั้นจึงนำผลผลิตพีซีอาร์จากส่วนของยีน 16S rRNA ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *H. parasuis* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมดมาทำการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยโปรแกรม BioEdit เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในส่วนของยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูลของ GenBank ดังตารางผนวกที่ ก 2 และสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 4 (http://www.megasoftware.net/; Tamura *et al.*

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้ามทำซ้ำ ดัดแปลง หรือเผยแพร่ในรูปแบบใดๆ ทั้งสิ้น ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น เว้นแต่ได้รับอนุญาตจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2007) โดยวิธี distance matrix และใช้ algorithm แบบ Neighbor-joining (NJ) method กำหนดพารามิเตอร์แบบจำลองการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) แบบ Kimura-2-parameter model ซึ่งเป็นแบบจำลองคู่ของ Kimura ที่ให้อัตราการเกิด transversion ที่เป็นการเปลี่ยนระหว่างหมู่ purines กับหมู่ pyrimidines และอัตราการเกิด transition ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงภายในหมู่ purines หรือภายในหมู่ pyrimidines เองนั้นเป็นอิสระต่อกัน เพื่อพิจารณาถึงความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รวมอยู่ในโปรแกรม MEGA 4 และทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม ด้วย bootstrap test จำนวน 5,000 รอบ ซึ่งกำหนดให้แสดง bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในต้นไม้พันธุกรรม โดยให้ชื่อตัวอย่างพิมพ์เป็นตัวอักษรสีเข้มและขึ้นต้นด้วย HP (ตัวอย่างที่แสดงวิการของโรคอย่างชัดเจน) หรือ HPN (ตัวอย่างจากสุกรที่ไม่แสดงวิการของโรค) ตามด้วย ลำดับตัวอย่าง/TH/ปีที่เก็บตัวอย่าง และใช้ *E. coli* SS1/09 เป็น outgroup ดังแสดงในภาพที่ 4.2 ผลการศึกษาพบว่าแผนภูมิต้นไม้ทางพันธุกรรมที่สร้างขึ้นจากส่วนของยีน 16S rRNA สามารถแบ่งตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 3 กลุ่มคือกลุ่ม I, II และกลุ่ม III โดยกลุ่ม I ประกอบด้วยตัวอย่าง *H. parasuis* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 18 ตัวอย่าง (จากทั้งหมด 21 ตัวอย่าง) โดยพบว่าใน 18 ตัวอย่างเป็นตัวอย่างที่แยกได้จากบริเวณทางเดินหายใจส่วนต้นของสุกรที่ไม่แสดงวิการของโรคจำนวน 2 ตัวอย่างซึ่งทั้ง 2 ตัวอย่างอาจเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคได้ในขณะที่กลุ่ม II ประกอบด้วย *H. parasuis* กลุ่ม reference strains 3 ตัวอย่างคือ 1A-84-22113 (serovar 14), 5D-84-15995 (serovar 15) และ Nagasaki (serovar 5) ซึ่งล้วนเป็นเชื้อกลุ่มที่มีความสามารถในการก่อโรคสูงและเป็นเชื้อที่อยู่ใน cluster A ที่รายงานโดย Olvera *et al.* (2006) ส่วนกลุ่ม III นั้นประกอบด้วย *H. parasuis* กลุ่ม reference strains ที่ไม่ก่อโรคคือ D74 (serovar 9), 174 (serovar 7) และ H465 (serovar 11) กลุ่มที่มีความสามารถในการก่อโรคในระดับปานกลางคือ C5 (serovar 8) และสุดท้ายคือกลุ่มที่มีความสามารถในการก่อโรคสูงคือ SW140 (serovar 2), SW124 (serovar 4) และ 4 (serovar 1) ซึ่งทั้งหมดเป็นเชื้อที่อยู่ใน cluster E ที่รายงานโดย Olvera *et al.* (2006) นอกจากนี้ในกลุ่ม III นั้นยังประกอบด้วยตัวอย่าง *H. parasuis* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 3 ตัวอย่างและ 1 ใน 3 เป็นตัวอย่างที่คัดแยกได้จากบริเวณทางเดินหายใจส่วนต้นของสุกรและพบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อในสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคคือ D74 (serovar 9) และ 174 (serovar 7)

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *H. parasuis* โดยใช้ส่วนของยีน 16S rRNA นั้นพบว่าตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาตั้งแต่ปี 1997 ถึงปี 2008 นั้น ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม I ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างที่ศึกษาอาจเป็นเชื้อระบาดอยู่ประจำถิ่นเนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อในกลุ่ม reference strains นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่คัดแยกได้จากโพรงจมูกของสุกร 2 ใน 3 ตัวอย่างอาจเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคได้สอดคล้องกับ Turni and Blackall (2005) กล่าวว่าบริเวณโพรงจมูกนั้นสามารถพบ *H. parasuis* ได้ทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

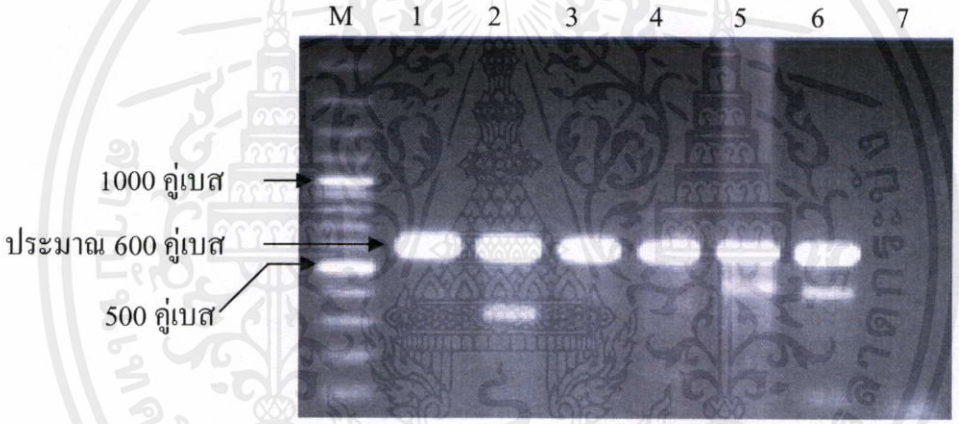


ภาพที่ 4.2 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *H. parasuis* ในส่วนของยีน 16S rRNA โดยโปรแกรม MEGA 4 ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) method และคำนวณ Nucleotide substitution แบบ Kimura-2-parameter model ตัวเลขที่จุดตัดของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย bootstrap test จำนวน 5,000 รอบ และใช้ *E. coli* SS1/09 เป็น outgroup

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ผลการตรวจระบุด้วยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน hsp60

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วนของยีน hsp60 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ HspF และ HspR (Olvera *et al.* 2006) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1.2 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 135 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder plus (Fermentas Inc,USA) พบว่าในส่วนของ *H. parasuis, A. pleuropneumoniae, S. suis, S. aureus, E. coli* และ *Salmonella* sp. ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 600 คู่เบส (ภาพที่ 4.3) ซึ่งไม่จำเพาะต่อชนิดของ *H. parasuis* สอดคล้องกับ Brousseau *et al.* (2001) ที่สามารถเพิ่มปริมาณส่วนของยีน hsp60 จากเชื้อ *S. suis* ได้เช่นเดียวกับ Wong and Chow (2002) ที่สามารถใช้ไพรเมอร์คู่นี้กับเชื้อกลุ่ม enteric bacteria คือ *E. coli, Salmonella* sp., *Yersinia* sp. และ *Campyrobacter* sp.



ภาพที่ 4.3 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วนของยีน hsp60 บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์ โดย Lane M คือเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน (1kb DNA ladder plus; Fermentas Inc,USA), Lane 1 คือผลผลิตพีซีอาร์ของ *H. parasuis*, Lane 2 คือ *A. pleuropneumoniae*, Lane 3 คือ *E. coli,* Lane 4 คือ *S. suis*, Lane 5 คือ *Salmonella* sp. และ Lane 6 คือ *S. aureus* และ Lane 7 คือ negative control

4.1.5 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน hsp60

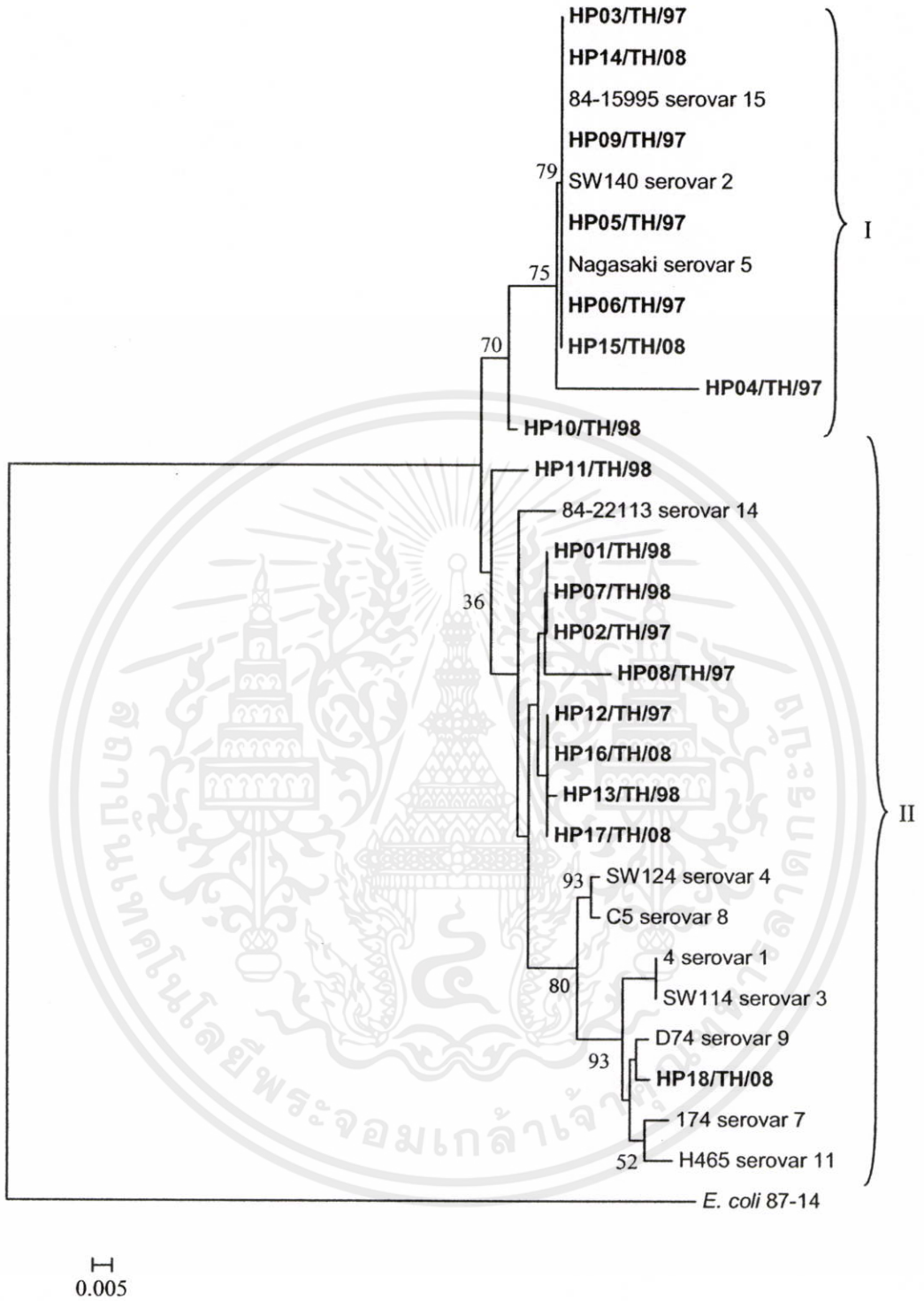
เนื่องจากการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน hsp60 ไม่จำเพาะต่อชนิดของ *H. parasuis* ดังนั้นในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจึงได้เลือกผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากตัวอย่างที่ผ่านการเพาะแยกเชื้อเท่านั้น แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมดมาทำการจัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยโปรแกรม BioEdit เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในส่วนของยีน hsp60 ในฐานข้อมูลของ GenBank ดังตารางผนวกที่ ก 3 และสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมตามข้อ 4.1.3 แต่ใช้ *E. coli* 87-14 เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมในส่วนของยีน hsp60 ดังแสดงในภาพที่ 4.4 สามารถแบ่งเป็นกลุ่มตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ 2 กลุ่มคือกลุ่ม I และกลุ่ม II โดยกลุ่ม I ประกอบด้วยตัวอย่าง *H. parasuis* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 8 ตัวอย่างคือ HP03/TH/97, HP15/TH/08, HP05/TH/97, HP06/TH/97, HP14/TH/09, HP09/TH/97, HP04/TH/97 และ HP10/TH/98 ส่วนกลุ่ม II นั้นประกอบด้วยตัวอย่าง *H. parasuis* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 10 ตัวอย่างคือ HP18/TH/08, HP02/TH/98, HP07/TH/98, HP01/TH/98, HP08/TH/97HP16/TH/08, HP17/TH/08, HP12/TH/97, HP11/TH/98 และ HP13/TH/98 จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Olvera *et al.* (2006) ซึ่งเคยรายงานการแบ่ง cluster ของ *H. parasuis* จากส่วนของยีน hsp60 ได้ 2 clusters คือ cluster I และ cluster II พบว่าในตัวอย่าง *H. parasuis* ที่ใช้ในการศึกษาในกลุ่ม I มีความสัมพันธ์กับเชื้อใน cluster I ที่ส่วนใหญ่เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการก่อโรคสูงคือ 84-15995 (serovar 15), Nagasaki (serovar 5) และSW140 (serovar 2) ในขณะที่ตัวอย่างในกลุ่ม II มีความสัมพันธ์กับเชื้อใน cluster II ซึ่งประกอบด้วยเชื้อสายพันธุ์ที่มีระดับความรุนแรงในการก่อโรคสูงคือ 84-22113 (serovar 14), SW124 (serovar 4) และ 4 (serovar 1) สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคระดับปานกลางคือ C5 (serovar 8) และสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคคือ SW114 (serovar 3), 174 (serovar 7) และ D74 (serovar 9)

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่าง *H. parasuis* จากส่วนของยีน hsp60 นั้นพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่มซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Olvera *et al.* (2006) ที่ทำการแบ่งกลุ่ม *H. parasuis* ได้เป็น 2 cluster นอกจากนี้ตัวอย่าง *H. parasuis* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ตั้งแต่ปี 1997 ถึงปี 2008 นั้นส่วนใหญ่นั้นมีความสัมพันธ์กับเชื้อกลุ่ม reference strains ที่มีความสามารถในการก่อโรคสูงแต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์อยู่ในระดับต่ำอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นอาจเป็นสายพันธุ์ที่ระบาดอยู่เฉพาะถิ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



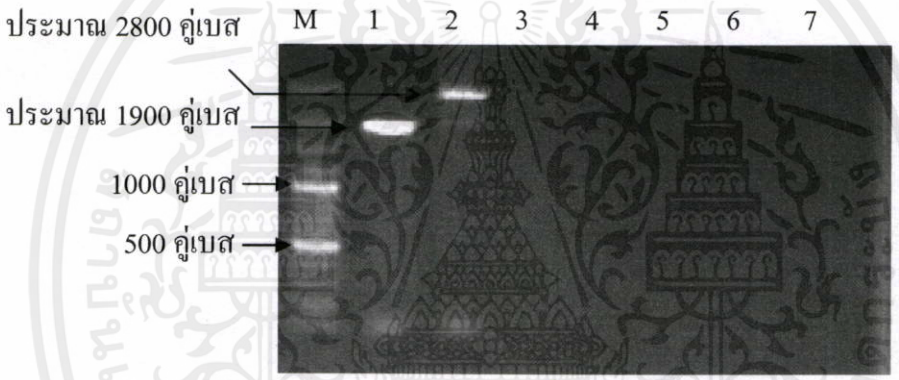
ภาพที่ 4.4 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *H. parasuis* ในส่วนของยีน hsp60 โดยโปรแกรม MEGA 4 ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) method และคำนวณ Nucleotide substitution แบบ Kimura-2-parameter model ตัวเลขที่จุดตัดของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย bootstrap test จำนวน 5,000 รอบ และใช้ *E. coli* 87-14 เป็น outgroup

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ด้วยการวิเคราะห์ PCR-RFLP จากส่วนของยีน *tbp*A

4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *tbp*A

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วนของยีน *tbp*A ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ tbpA55 และ tbpA33 (De la Puente Redondo *et al.* 2003) แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส พบว่าทุกตัวอย่างปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1900 คู่เบส ยกเว้นตัวอย่างที่ได้จากสุกรที่ปกติ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และเมื่อนำไพรเมอร์คู่นี้ไปทดสอบกับ *E. coli, Salmonella* sp., *S. suis* และ *S. aureus* พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบกับ *A. pleuropneumoniae* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่มีขนาดแตกต่างจาก *H. parasuis* คือมีขนาดประมาณ 2800 คู่เบส (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในส่วนของยีน *tbp*A บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์ โดย Lane M คือเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน (1kb DNA ladder plus; Fermentas Inc,USA), Lane 1 คือผลผลิตพีซีอาร์ของ *H. parasuis*, Lane 2 คือ *A. pleuropneumoniae*, Lane 3 คือ *E. coli*, Lane 4 คือ *S. suis*, Lane 5 คือ *S. aureus* และ Lane 6 คือ *Sallmonella* sp. และ Lane 7 คือ negative control

4.2.2 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

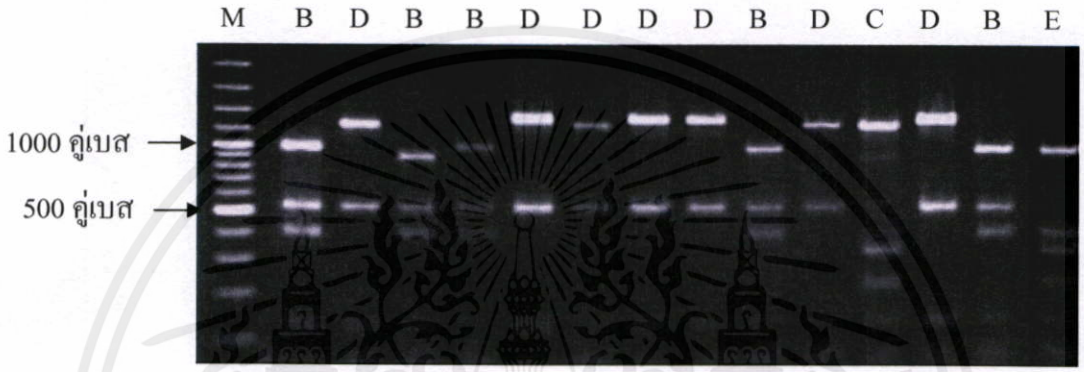
หลังจากตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากส่วนของยีน *tbp*A ขนาดประมาณ 1900 คู่เบส แล้วจากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ *Taq*I, *Ava*I และ *Rsa*I วิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส แล้วเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1kb DNA ladder plus; Fermentas Inc,USA) หลังจากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดด้วยสายตาซึ่งความแตกต่างของแต่ละรูปแบบพิจารณาจากจำนวนรูปแบบที่เกิดขึ้นโดยไม่คำนึงถึงความเข้มของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับรายงานของ De la Puente Redondo *et al.* (2003) (ภาพผนวกที่ ก 1) ซึ่งได้ผลดังต่อไปนี้

4.2.2.1 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Taq*I

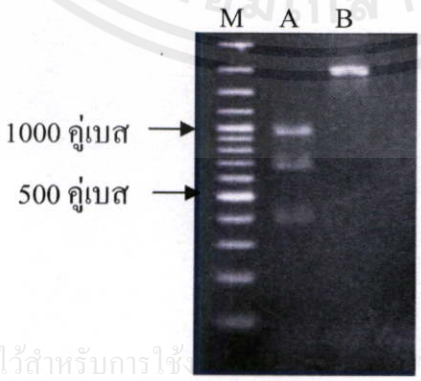
ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Taq*I พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้น 4 รูปแบบ คือ B, C, D และ E และตรงกับรูปแบบการตัดที่รายงานโดย De la Puente Redondo *et al.* (2003) ทุกรูปแบบ (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.6 แสดงรูปแบบการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Taq*I บนอะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์, Lane M คือ 1kb DNA ladder plus (Fermentas Inc,USA)

4.2.2.2 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Ava*I

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Ava*I พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้น 2 รูปแบบ คือ A และ B และตรงกับรูปแบบการตัดที่รายงานโดย De la Puente Redondo *et al.* (2003) ทุกรูปแบบ (ภาพที่ 4.7)

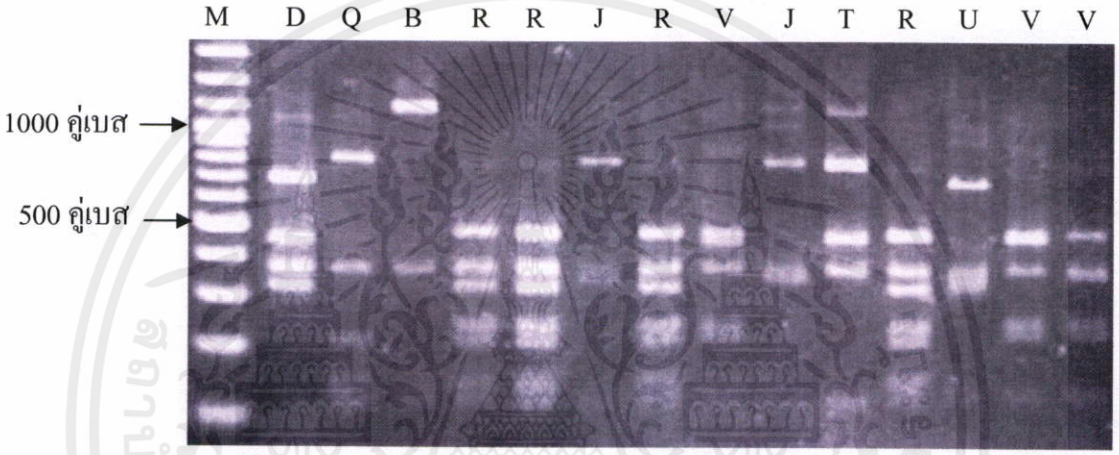


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.7 แสดงรูปแบบการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Ava*I บนอะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์, Lane M คือ 1kb DNA ladder plus (Fermentas Inc,USA)

4.2.2.3 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Rsa*I

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Rsa*I พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้น 10 รูปแบบโดยสามารถเปรียบเทียบรูปแบบกับรายงานก่อนหน้านี้ได้มีเพียง 4 รูปแบบคือ B, C, D และ J และเนื่องจาก De la Puente Redondo *et al.* (2003) ไม่ได้รายงานรูปแบบที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I ไว้ทุกรูปแบบจึงทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบรูปแบบได้ทุกรูปแบบ แต่อย่างไรก็ตามได้ทำการให้ลำดับอักษรแทนรูปแบบการตัดที่แตกต่างไปจากที่รายงานไว้คือ Q, R, S, T, U และ V (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 แสดงรูปแบบการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Rsa*I บนอะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์, Lane M คือ 1kb DNA ladder plus (Fermentas Inc,USA)

4.2.2.4 การจัด RFLP groups

เมื่อได้รูปแบบการตัดจากเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิดแล้วหลังจากนั้นทำการจัด RFLP groups โดยเรียงลำดับตามชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะคือ *Taq*I, *Ava*I และ *Rsa*I ตามลำดับ โดยผลที่ได้ (ตารางที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงรูปแบบการตัดส่วนของยีน *tbp*A จากตัวอย่าง *H. parasuis* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดคือ *Taq*I, *Ava*I และ *Rsa*I ตามลำดับ เปรียบเทียบกับรูปแบบการตัดของ reference strains ของ De la Puente Redondo *et al.* (2003)

samples	patterns			RFLP groups	serovar
	***Taq*I**	***Ava*I**	***Rsa*I**		
HP01/TH/98	B	B	B	BBB	serovar 4
HP02/TH/97	B	A	D	BAD	serovar 2
HP03/TH/97	D	A	Q	DAQ	
HP04/TH/97	D	A	Q	DAQ	
HP05/TH/97	D	A	Q	DAQ	
HP06/TH/97	B	A	V	BAV	
HP07/TH/98	B	A	V	BAV	
HP08/TH/97	D	B	U	DBU	
HP09/TH/97	B	A	U	BAU	
HP10/TH/98	E	A	V	EAV	
HP11/TH/98	C	B	T	CBT	
HP12/TH/97	D	B	N	DBN	
HP13/TH/98	D	B	J	DBJ	
HP14/TH/08	B	A	V	BAV	
HP15/TH/08	D	B	C	DBC	
HP16/TH/08	D	A	V	DAV	
HP17/TH/08	D	B	J	DBJ	
HP18/TH/08	B	B	J	BBJ	

จากตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง *H. parasuis* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 18 ตัวอย่าง สามารถจำแนก RFLP group ได้ 14 RFLP groups แต่พบว่ามีเพียง 2 RFLP groups ที่ตรงกับที่รายงานก่อนหน้านี้คือ BAD ซึ่งตรงกับ RFLP group ของเชื้อ serovar 2 และ BBB ที่ตรงกับ RFLP group ของ serovar 4

เนื่องจากปัจจุบันการจำแนก *H. parasuis* โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP นั้นมีความก้าวหน้ามากขึ้น (De la Puente Redondo *et al.* 2003; Del Rio *et al.* 2006; Li *et al.* 2009) ซึ่งจากผลการศึกษาและจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ในครั้งนี้ (ตารางที่ 4.1) พบว่าตัวอย่าง *H. parasuis* ที่ใช้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษานั้นมีลักษณะ RFLP group ที่พบมากคือลักษณะ DAQ (21.4 เปอร์เซ็นต์) และ BAV (21.4 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่จากการศึกษาของ De la Puente Redondo *et al.* (2003) นั้นพบลักษณะ DBE มากที่สุด ส่วนรายงานของ Li *et al.* (2009) นั้นพบ DBN (38 เปอร์เซ็นต์) มากที่สุดดังนั้นจะเห็นว่าผลการจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* โดยใช้ลักษณะ RFLP group นั้นสอดคล้องกับผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้แผนภูมิต้นไม้ทางพันธุกรรมที่อาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่าง *H. parasuis* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นสายพันธุ์ที่พบเฉพาะในพื้นที่ที่ทำการศึกษา เนื่องจากลักษณะ RFLP group ที่ได้นั้นแตกต่างจากรายงานก่อนหน้านี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้เพื่อทำการศึกษาตัวอย่าง *H. parasuis* ที่คัดแยกจากสุกรโดยตรวจระบุชนิดของ *H. parasuis* ที่เป็นสาเหตุของโรคแกลสเซอร์ด้วยการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณส่วนของยีน 16S rRNA และ hsp60 พบว่าจากการศึกษาในส่วนของยีน 16S rRNA นั้นมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะต่อชนิดของ *H. parasuis* เนื่องจากให้ผลเป็นลบเมื่อทำการทดสอบกับ *E. coli, Salmonella* sp., *S. suis, S. aureus* และ *A. pleuropneumonia* ในขณะที่ส่วนของยีน hsp60 นั้นสามารถเพิ่มปริมาณได้กับเชื้อทุกชนิดที่นำมาทดสอบจึงไม่มีประสิทธิภาพต่อการนำมาใช้ในการตรวจระบุชนิดของ *H. parasuis*

ในส่วนของการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *H. parasuis* นั้นทำการศึกษาจากการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ทางพันธุกรรมจากส่วนของยีน 16S rRNA และ hsp60 พบว่าตัวอย่าง *H. parasuis* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับเชื้อกลุ่ม reference strains ที่มีความสามารถในการก่อโรคสูงแต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์อยู่ในระดับต่ำจึงอาจเป็นไปได้ที่ตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นอาจเป็นเชื้อที่พบระบาดเฉพาะถิ่น สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ย่อยของ *H. parasuis* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP มาวิเคราะห์ส่วนของยีน *tbp*A พบว่าสามารถจัด RFLP groups ได้ทั้งหมด 14 RFLP groups และมีเพียง 2 RFLP groups ที่ตรงกับที่รายงานโดย De la Puente Redondo *et al.* (2003) คือตรงกับ RFLP groups ของ serovar 2 (BAD) และ serovar 4 (BBB) ในขณะที่เหลืออีก 12 RFLP groups แตกต่างจากที่รายงานก่อหน้านี้ แสดงให้เห็นว่า *H. parasuis* นั้นมีความหลากหลายของสายพันธุ์สูงและผลที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าส่วนของยีน 16S rRNA เหมาะสมที่จะนำมาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจระบุเชื้อ *H. parasuis* และผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกสายพันธ์ย่อยด้วยเทคนิค PCR-RFLP นั้นเนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษามีจำนวนน้อยและเป็นตัวอย่างที่เก็บจากเฉพาะในเขตจังหวัดนครปฐมและราชบุรี จึงทำให้ยังไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนของเชื้อทั้งประเทศได้อาจต้องมีการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมและหาเทคนิคใหม่ๆ ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างและศึกษาระดับความรุนแรงของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจนเพื่อที่จะได้นำข้อมูลนั้นมาใช้ในการคัดเลือกวัคซีนหรือผลิตวัคซีนที่สามารถป้องกันการระบาดของ *H. parasuis* ในประเทศไทยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กิจจา อุไรรงค์. 2530. **แนวทางการวินิจฉัย รักษา และควบคุมโรคสุกร.** โครงการตำราสโมสรนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: สารมวลชน.

นิรนาม. 2547. คู่มือปฏิบัติการ จุลชีววิทยาทางการแพทย์ 1 (Medical Microbiology 1). ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยนเรศวร.

นิรนาม. 2550. [Online]. Available : www.cit.kmitnb.ac.th/.../diagnosis-swine/โรคแกลสเซ่อร์. pdf. 26-03-09.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. **การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์.** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ปรียพันธุ์ อุดมประเสริฐ. 2546. **การจัดการสุขภาพและผลผลิตในฟาร์มสุกร** (swine health and production management). พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. สมุทรปราการ: อุดมสุข พริ้นติ้งแอนด์แพคเกจ.

ปริวรรต พูลเพิ่ม. 2547. **ทันโรคทันเหตุการณ์กับการเลี้ยงสุกร ปี 2547:** สเตรปโตคอคโคซิส-แกลสเซอร์: โรคเก่าที่ไม่เคยลืม. นครปฐม: คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

ไพบูลย์ โล่ห์สุนทร. 2550. **ระบาดวิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 6. ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภัทรชัย กีรติสิน. 2549. **ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์ (Text book of Medical Bacteriology).** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ: วีเจพริ้นติ้ง.

วันดี ทาตระกูล. 2546. **สุกรและการผลิตสุกร.** งานส่งเสริมการวิจัยและตำราโครงการตำรา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์.

วิน เชยชมศรี. มปป. ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. [Online]. Available : http://pirun.ku.ac.th/~fsciwcc/immune8.pdf. 01-08-09

สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2548. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรวิทย์ สิมะรักษ์อำไพ. 2545. **วิทยาแบคทีเรีย.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏสุรินทร์. กรุงเทพฯ : ธนทรัพย์การพิมพ์.

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ไม่ว่าจะเป็นการใช้งานเพื่อการศึกษา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อภัสรา วรราชและวัชรชัย ณรงค์ศักดิ์. 2547. การใช้เทคนิค multiplex PCR ตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา Methicillin. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. [Online]. Available : http://www.dld.go.th/niah/Research/Research47.htm. 30-08-09

Angen, Ø. Oliveira, S. Ahren, P. Svensmark, B. and Leser, T.D. 2007. "Development of an Improved Specific PCR Test for Detection of *Haemophilus parasuis*". **Vet. Microbiol.** 119: 266- 276.

Angen, Ø. Svensmark, B. and Mittal, K.R. 2004. "Serological Characterization of Danish *Haemophilus parasuis* Isolates". **Vet. Microbiol.** 103: 255-258.

Brousseau, R. Hill, E.J. Préfontaine, G. Goh, S.H. Harel, J. and Hemmingsen, M. 2001. "*Streptococcus suis* Serotypes Characterized by Analysis of Chaperonin 60 Gene Sequences". **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 4828-4833.

Cai, X. Chen, H. Blackall, P.J. Yin, Z. Wang, L. Liu, Z. and Jin, M. 2005. "Serological Characterization of *Haemophilus parasuis* Isolates from China". **Vet. Microbiol.** 111: 231-236.

De la Puente Redondo, V.A. Garcia del Blanco, N. Gutiérrez-Martin, C.B. Mendez, J. and Rodríquez-Ferri, E.F. 2000. "Detection and Subtyping of *Actinoacillus pleuroneumoniae* Strains by PCR-RFLP Analysis of the *tbp*A and *tbp*B Genes". **Res. Microbiol.** 151: 199-204.

De la Puente Redondo, V.A. Méndez, J.N. Del Blanco, N.G. Boronat, N.L. Martín, C.B.G. and Ferri, E.F.R. 2003. "Typing of *Haemophilus parasuis* Strain by PCR-RFLP Analysis of the *tbpA* Gene". **Vet. Microbiol.** 92: 253-262.

Del Río, M.L. Gutiérrez-Mnñiz, C.B. and Ferri, E.F.R. 2003. "Value of Indirect Hemagglutination and Coagglutination Tests for Serotyping *Haemophilus parasuis*". **J. Clin. Microbiol.** 41: 880-882.

Del Río, M.L. Gutiérrea-Martín, C.B. Navas, J. Gutiérrez-Mnñiz, B. Rodríguez-Barbosa, J.I. and Rodríguez-Ferri, E. F. 2006. "*aroA* Gene PCR-RFLP Diversity Patterns in *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus* Species". **Res. Vet. Sci.** 80: 55-61.

Elmer, W.K. Allen, D. Janda, W.M. Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C. 1792. "Haemophilus''. **Int. Diag. Microbiol**. 125-134.

Ferri, R. EF. Barceló, J.Y. and Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2008. "ENFERMEDAD DE GLÄSSER". [Online]. Available : http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/3/inf.htm. 05-08-09

Goh, S.H. Potter, S. Wood, J.O. Hemmingsen, S. M. Reynolds, R.P. and Chow, A.W. 1996. "HSP60 Gene Sequence as University Targets for Microbial Species Identification: Studies with Coagulase-negative Staphylococci". **J. Clin. Microbiol.** 34: 818-823.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jill, E. 2004. "Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Disease". **Clin. Microbiol. Rev.** 17: 840-862.

Kielstein, P. and Rapp-Gabrielson, V.J. 1992. "Designation of 15 Serovars of *Haemophilus parasuis* on the Basis of Immunodiffusion Using Heat-Stable Antigen Extract". **J. Clin. Microbiol.** 30: 862-865.

Kielstein, P., Wuthe, P. H., Angen, O., Mutters, R. And Ahrens, P. 2001. "Phenotypic and Genetic Characterization of NAD-dependent *Pasteurellaceae* from the Respiratory Tract of Pigs and their Possible Pathogenesis Importance". **Vet. Microbiol.** 81: 243-255.

Lewis, P.A. and Shope, R.E. 1931. *Swine influenza.* II. "*Haemophilic* Bacillus from the Respiratory Tract of Infected Swine". **J. Exp. Med.** 54: 361-371.

Li, J. Jiang, P. Wang, Y. Li, Y. Chen, W. Wang, X. and Li, P. 2009. "Genotyping of *H. parasuis* from Diseased Pigs in China and Prevalence of Two Coexisting Virus Pathogens". **Prev. Vet. Med.**

Lin, B. C. 2003. "Identification and Differentiation of *Haemophilus parasuis* Sero-nontypeable Strains using a Species-Specific PCR and the Digestion of PCR Products with Hind III Endonuclease". **Am. Assoc. Swine. Vet.** 299-301.

MacInnes, J.I. and Desrosiers, R. 1999. "Agents of the " Suis-ide Disease" of Swine: *Actinobacillus suis, Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis*". **Can. J. Vet. Res.** 63: 83-89.

Morozumi, T. and Nicolet, J. 1986. "Some Antigenic Properties of *Haemophilus parasuis* and Proposal for Serological Classification". **J. Clin. Microbiol.** 23: 1022-1025.

Nedbalcova, K., Satran, P., Jaglic, Z., Ondrisova, R. and Kucerova, Z. 2006. "*Haemophilus parasuis* and Glasser's Disease in Pigs: a Review". **Vet. Med.** 51: 168-179.

Oliveira, S. 2002. "*Haemophilus parasuis*". Cfactsheet : Pork Information Gateway. U.S. Pork Center of Excellence. [Online]. Available : http://www.pork.org/pig/NEWfactSheets/ 04-01-02g.pdf. 18/02/08.

Oliveira, S. 2004. "Improving rate of success in isolating *Haemophilus parasuis* from clinical samples". **J. Swine Health and Prod.** 12: 308-309.

Oliveira, S. Blackall, J. And Pijoan, C. 2003. "Characterization of the Diversity of *Haemophilus parasuis* Field Isolated by use of Serotyping and Genotyping". **Am. J. Vet. Res.** 64 : 435-442

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oliveira, S. Choi, Y.K. Joo, H.S. and Pijoan, C. No date. "Cloning, Sequencing and Typing of the 16S rRNA Gene of *Haemophilus parasuis*". Department of Clinical and Population Sciences, University of Minnesota, Saint Paul MN USA

Oliveira, S., Galina, L. and Pijoan, C. 2001. "Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections". **J. Vet. Diag. Inv.** 13: 495-501.

Oliveira, S. and Pijoan, C. 2004. "*Haemophilus parasuis*: New Trend on Diagnosis, Epidemiology and Control". **Vet. Microbiol.** 99: 1-12.

Olvera, A. Calsamiglia, M. and Aragon, V. 2006. "Genotypic Diversity of *Haemophilus parasuis* Field Strains". **Appl. Environ. Microbiol.** 72: 3984-3992.

Olvera, A. Segalés, J. and Aragón, V. 2007. "Update on the Diagnosis of *Haemophilus parasuis* Infection in Pigs and Novel Genotyping Methods". **Vet. J.** 174: 522-529.

Rafiee, M. Bara, M. Stephens, C.P. and Blackall, P.J. 2000. "Application of ERIC-PCR for the Comparison of Isolates of *Haemophilus parasuis*". **Aust. Vet. J.** 78: 846-849.

Rapp-Gabrielson, V.J. Kucur, G.J. Clark, J.T. and Stephen, K.M. 1997. "*Haemophilus parasuis*: Immunity in Swine after Vaccination". **Vet. Med.** 92: 83-90.

Rúbies, X. Kielstein, P. Costa, L. Riera, P. Artigas, C. and Espuña, E. 1999. "Prevalence of *Haemophilus parasuis* Serovars Isolated in Spain from 1993 to 1997". **Vet. Microbiol.** 66: 245-248.

Sambrook, J.E.F. and Maniants, T. 1989. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Sack, M. and Baltes, N. 2009. "Identification of novel potential virulence-associated factors in *Haemophilus parasuis*". **Vet. Microbiol.** 136: 382-386.

Segalés, J. Domingo, M. Solano, G. I. and Pijoan, C. 1997. "Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* Serovars 5 in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tssues of Experimentally Infected Swine". **J. Vet. Diagn. Ivest.** 9: 237-243.

Smart, N.L. Miniats, O.P. and Maclnnes, J.I. 1988. "Analysis of Haemophilus parasuis Isolates from Southern Ontario Swine by Restriction Endonuclease Fingerprinting". **Can. J. Vet. Res.** 52: 319-324.

Tadjine, M. Mittal, K.R. Bourdon, S. and Gottschalk, M. 2004. "Development of New Serological Test for Serotyping *Haemophilus parasuis* Isolates and Determination of their Prevalence in North America". **J. Clin. Microbiol.** 42: 839-840.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Takahashi, K. Nagai, S. Yagihashi, T. Ikehata, T. Nakano, Y. Senna, K. Maruyama, T. and Murofushi, J. 2000. "A Cross-protection Experiment in Pigs Vaccinated with *Haemophilus parasuis* Serovars and 5 Bacterins and Evaluation of a Bivalent Vaccine under Laboratory and Field Conditions". Nagai S., Thid division, Nippon Institute for Biological Science, 9-2221-1 Shimachi, Ome, Tokyo 198-0024, Japan.

Tamura, K. Dudley, J. Nei, M. and K.S. 2007. "MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis". **Mol. Bio. Evol.** 24: 1596-1599.

Turni, C. and Blackall, P.J. 2005. "Comparison of the Indirect Haemagglutination and Gel Diffusion Test for Serotyping *Haemophilus parasuis*". **Vet. Microbiol.** 106: 145-151.

Wong, R.S.Y. and Chow, A.W. 2002. "Identification of Enteric Pathogens by Heat Shock Protein 60 kDa (Hsp60) Gene Sequences". **FEMS Microbiol. Latt.** 206: 107-113.

Vanier, G. Szczotka, A. Friedl, P. Lacouture, S. Jacques, M. and Gottschalk, M. 2006. "*Haemophilus parasuis* Invades Porcine Brain Microvascular Endothelial Cells". **Microbiol.** 152: 135-142.

Zhang, L. Pelech, S. and Veli-Jukka, U. 2004. Bacteria GroEL-like Heat Shock Protein 60 Protects Epithelial Cells from Stress-Induced Death through Activation of ERK and Inhibition of Caspase 3". **Exp. Cell. Res.** 292: 231-240.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

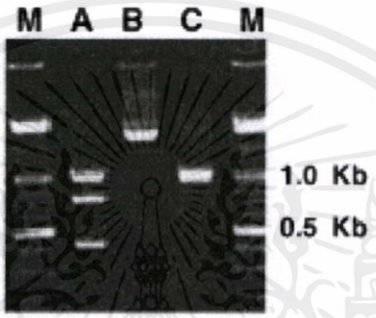
ตารางผนวกที่ ก 1 แสดง RFLP pattern ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ reference strains ในส่วนของยีน *tbp*A

strains	patterns			RFLP groups
	***Taq*I**	***Ava*I**	***Rsa*I**	
H. parasuis H409 (serovar 1 reference strain)	A	A	A	I (AAA)
H. parasuis H410 (serovar 2 reference strain)	B	B	B	II (BBB)
H. parasuis H411 (serovar 3 reference strain)	C	C	C	III (CCC)
H. parasuis H412 (serovar 4 reference strain)	B	A	D	IV (BAD)
H. parasuis H413 (serovar 5 reference strain)	D	B	E	V (DBE)
H. parasuis H780 (serovar 6 reference strain)	B	A	F	VI (BAF)
H. parasuis H643 (serovar 7 reference strain)	E	C	G	VII (ECG)
H. parasuis H494 (serovar 8 reference strain)	B	A	H	VIII (BAH)
H. parasuis H553 (serovar 9 reference strain)	B	A	I	IX (BAI)
H. parasuis H555 (serovar 10 reference strain)	B	A	A	X (BAA)
H. parasuis H465 (serovar 11 reference strain)	E	A	F	XI (EAF)
H. parasuis H425 (serovar 12 reference strain)	D	B	E	V (DBE)
H. parasuis H793 (serovar 13 reference strain)	B	B	J	XII (BBJ)
H. parasuis H792 (serovar 14 reference strain)	D	B	E	V (DBE)
H. parasuis H790 (serovar 15 reference strain)	D	B	E	V (DBE)

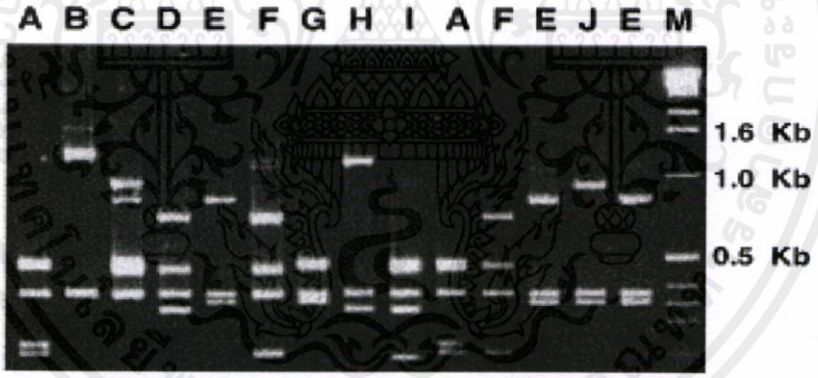
ที่มา : De la Puente Redondo *et al.* (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(a)



(b)



(c)

ภาพผนวกที่ ก 1 แสดงรูปแบบการตัดของเอนไซม์ *Taq*I (a) *Ava*I (b) และ *Rsa*I (c) (De la Puente Redondo *et al.* 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก 2 แสดง *H. parasuis* แต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ใน ส่วนของยีน 16S rRNA

Strains	Accession no.	Serovars	Isolation site	Country	Reference
H. parasuis reference strains					
4 (highly virulent)	DQ229018	1	Unknown (healthy animal)	Japan	1
SW140 (virulent)	DQ229037	2	Unknown (healthy animal)	Japan	1
SW114 (non-virulent)	DQ229032	3	Unknown (healthy animal)	Japan	1
SW124 (virulent)	DQ229031	4	Unknown (healthy animal)	Japan	1
Nagasaki (highly virulent)	DQ229036	5	Systemic	Japan	1
174 (non-virulent)	DQ229008	7	Nasal	Switzerland	1
C5 (moderately virulent)	DQ229038	8	Unknown	Sweden	1
D74 (non-virulent)	DQ229033	9	Unknown	Sweden	1
H465 (non-virulent)	DQ229030	11	Tracheae	Germany	1
84-22113 (highly virulent)	DQ229035	14	Systemic	United state	1
84-15995 (virulent)	DQ229034	15	Lung	United state	1
Out group					
E. coli SS1/09	GQ456068				2

ที่มา: 1: Olvera *et al.* (2006)

2: GenBnak

ตารางผนวกที่ ก 3 แสดง *H. parasuis* แต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน Hsp60

Strains	Accession no.	Serovars	Isolation site	Country	Reference
H. parasuis reference strains					
4 (highly virulent)	DQ198898	1	Unknown (healthy animal)	Japan	1
SW140 (virulent)	DQ198916	2	Unknown (healthy animal)	Japan	1
SW114 (non-virulent)	DQ198911	3	Unknown (healthy animal)	Japan	1
SW124 (virulent)	DQ198910	4	Unknown (healthy animal)	Japan	1
Nagasaki (highly virulent)	DQ198915	5	Systemic	Japan	1
174 (non-virulent)	DQ198889	7	Nasal	Switzerland	1
C5 (moderately virulent)	DQ198917	8	Unknown	Japan	1
D74 (non-virulent)	DQ198912	9	Unknown	Sweden	1
84-22113 (highly virulent)	DQ198914	14	Systemic	Sweden	1
84-15995 (virulent)	DQ198913	15	Lung	United state	1
Out group					
E. coli 87-14	EU890972				2

ที่มา: 1: Olvera *et al.* (2006)

2: GenBnak

ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสาร

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Sambrook *et al.* (1989)

1) D-solution (Denaturing solution)

4M Guanididium Thiocyanate	250	กรัม
25mM Sodium citrate	17.6	ไมโครลิตร
0.5% N-laurylsarcosine (Sodium salt)	26.4	ไมโครลิตร

ละลาย Guanididium Thiocyanate ในน้ำ 293 ไมโครลิตร แล้วเติม Sodium citrate และเติม N-laurylsarcosine จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าสารจะละลายแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

2) Phenol

3) Chloroform

4) Absolute Ethanol

5) 75 เปอร์เซ็นต์ Ethanol

6) สารละลาย TE buffer

1mM EDTA	0.37	กรัม
0.05M Tris	6.05	กรัม
น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	700	ไมโครลิตร
HCl		

ละลาย EDTA และ Tris ในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7.6 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

2. สารเคมีที่ใช้ในการแยกขนาดเอ็นเอในอะกาโรสเจล

1) สารละลาย TAE (Tris acetate, EDTA)

Tris base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	ไมโครลิตร
0.5 M EDTA	100	ไมโครลิตร
น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	700	ไมโครลิตร

ละลาย Tris base, Glacial acetic acid และ EDTA ในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น และห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) การเตรียม 6X loading buffer

Bromophenol blue	0.25	เปอร์เซ็นต์
Glycerol	30	เปอร์เซ็นต์

ผสมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3. สารเคมีที่ใช้ในการทำเทคนิคพีซีอาร์ของบริษัท Fermentas Inc, (USA)

1) 1X Taq high fidelity Buffer

2) 2.5 mM dNTP

3) 6 mM $MgCl_2$

4) 5 U *Taq* high fidelity DNA polymerase

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด blood agar

Tryptose blood agar (Oxoid®, England)	30	กรัม
น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	1000	ไมโครลิตร
เลือดวัว	7	ไมโครลิตร

ละลาย Tryptose blood agar ในน้ำกลั่น 1000 ไมโครลิตร แล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ จากนั้นทิ้งไว้ให้ได้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเติมเลือดลงไป

5. เอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Fermentas, Inc USA)

1) 10U/µl *Rsa*I

2) 10U/µl *Taq*I

3) 10U/µl *Ava*I

6. ชุดสกัดสำเร็จรูป PCR clean-up Gel extraction (NucleoSpin® Extract II, Germany)

บัฟเฟอร์ NT (solubilization buffer)

บัฟเฟอร์ NT3 (Wash buffer)

บัฟเฟอร์ NE (Elution buffer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การเตรียม Phosphate - buffer saline (PBS)

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	1.44	กรัม
KH_2PO_4	0.24	กรัม
น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	800	มิลลิลิตร
HCl		

ละลาย NaCl, KCl, Na_2HPO_4 และ KH_2PO_4 ในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปรับ pH ด้วย ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวเยาวลักษณ์ คำจันทร์
วัน/เดือน/ปีเกิด	30 สิงหาคม 2527
ที่อยู่	104 ม. 1 ต. บางทรายใหญ่ อ.เมือง จ.มุกดาหาร 49000
ประวัติการศึกษา	- 2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ จากภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง - 2552 สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ "การจำแยกสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ *Haemophilus parasuis* ที่คัดแยกจากสุกรในประเทศไทย (Genotyping of *Haemophilus parasuis* Isolated from Pigs in Thailand)". งานประชุมวิชาการ ครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 17-20 มีนาคม 2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้