Thesis Title	Identification and Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by Using PCR Typing System
Author	Mr. Nattawooti Sthitmatee
M.S.	Health Sciences
Examining Committee	Assoc.Prof.Dr.Luksana Makonkewkeyoon Chairman Asst.Prof.Dr.Theerapol Sirinarumitr Member Lect.Dr.Pawin Padungtod Member

ABSTRACT

Actinobacillus pleuropneumoniae is an important swine respiratory disease pathogen that can be categorized into at least 15 serotypes. There are several techniques for the detection and serotyping of *A. pleuropneumoniae*. However, these techniques are time consuming. In this study, a PCR technique was developed for the serotype identification and detection of *A. pleuropneumoniae* directly from the fresh swine pleuropneumonic lung samples using a specific set of primers designated for *apxI*, *apxII*, *apxIII* and *apxIVA* gene. This PCR typing system is consisted of the nested PCR for the detection and the multiplex PCR for the serotype identification of *A. pleuropneumoniae*. For the detection of *A. pleuropneumoniae* using pure culture, all 13 reference strains of *A. pleuropneumoniae* including subtype 5a and 5b of serotype 5 gave the same results for both the first and second reaction of nested PCR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

products (442 and 377 bp in size). This PCR assay could detect *A. pleuropneumoniae* from as few as 22 pg of DNA content and showed negative result for others swine bacterial pathogens. Moreover, this assay could detect *A. pleuropneumoniae*-infected lung samples and in lung samples co-infected with other swine respiratory bacterial organism. For the detection assay using *A. pleuropneumoniae* naturally infected lungs, the results were similar to the results from the pure culture experiment. The multiplex PCR could successfully differentiate 13 reference strains pure culture of *A. pleuropneumoniae* into 10 groups. Each serotype showed own PCR products patterns, with the exception of serotype 2 and 8, serotype 5a and 5b, and serotype 9 and 11, respectively. Furthermore, this PCR typing system was applied for serotyping 47 field isolates of *A. pleuropneumoniae* and compared with the rapid slide agglutination test (SAT). The multiplex PCR assay of the field isolates showed the same PCR patterns as serotype 1 and 2 or 8 of reference strains. Furthermore, this multiplex PCR assay can be directly used to identify serotype of *A. pleuropneumoniae* from 10 naturally infected swine' lungs. These results were in accordance with SAT for the serotyping of *A. pleuropneumoniae*. According to these results, this PCR typing system may provide a rapid and useful tool for the detection and serotype identification of *A. pleuropneumoniae* in the routine laboratory work.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพิสูจน์และการตรวจชนิดเชื้อ *Actinobacillus pleuropneumoniae* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส
ชื่อผู้เขียน	นายณัฐวุฒิ สถิตเมธี
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.ลักษณา มกรแก้วเกยูร	ประธานกรรมการ
	ผศ.ดร.ธีระพล ศิรินฤมิตร	กรรมการ
	อ.ดร.ภาวิน ผดุงทศ	กรรมการ

บทคัดย่อ

เชื้อ *A. pleuropneumoniae* เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินหายใจที่สำคัญในสุกร ซึ่งในปัจจุบันมีทั้งสิ้น 15 ชนิด มีรายงานถึงวิธีการตรวจและจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียนี้หลายวิธีการด้วยกันแต่จะใช้เวลาในการตรวจหรือทดสอบนาน การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในการพิสูจน์และการตรวจชนิดเชื้อ *A. pleuropneumoniae* โดยตรงจากตัวอย่างปอดสุกรที่มีวิการปอดและเยื่อหุ้มปอดอักเสบ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับยีน *apxI, apxII, apxIII* และ *apxIVA* ของเชื้อแบคทีเรีย *A. pleuropneumoniae* วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย การตรวจชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ nested และการพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ multiplex จากการศึกษาครั้งนี้ การตรวจชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ nested สามารถตรวจเชื้อแบคทีเรียอ้างอิงทั้ง 13 ชนิด (ชนิดที่ 1 ถึงชนิดที่ 12 รวมทั้งชนิดย่อย 5a และ 5b ของชนิดที่ 5) ได้ผลผลิตของปฏิกิริยาขนาด 442 และ 377 คู่เบสตามลำดับ จากนั้นจึงได้นำวิธีการตรวจชนิดเชื้อด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาตรวจหาเชื้อจากปอดสุกรที่มีการติดเชื้อตามธรรมชาติ ซึ่งก็พบว่าให้ผลบวกต่อเชื้อ *A. pleuropneumoniae*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และจากการทดสอบพบว่าวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีความไวในการตรวจชนิดเชื้อในปริมาณน้อยที่สุดโดยสามารถตรวจได้ในระดับ 22 พิโคกรัมของดีเอ็นเอ และมีความจำเพาะในการตรวจชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *A. pleuropneumoniae* ทั้งจากตัวอย่างปอดที่ติดเชื้อเฉพาะ *A. pleuropneumoniae* หรือติดเชื้อร่วมกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ โดยที่ปอดที่ติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ไม่สามารถแสดงผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ส่วนการพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ multiplex สำหรับเชื้ออ้างอิงทั้ง 13 ชนิดสามารถที่จะพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรียนี้ออกเป็น 10 กลุ่ม ซึ่งแต่ละชนิดของเชื้อแบคทีเรียอ้างอิงแสดงผลผลิตของปฏิกิริยาตามขนาดความยาวของดีเอ็นเอในรูปแบบของแต่ละชนิดของแบคทีเรียเอง ยกเว้นระหว่างชนิดที่ 2 และชนิดที่ 8, ระหว่างชนิดที่ 5a และชนิดที่ 5b, และระหว่างชนิดที่ 9 และชนิดที่ 11 ตามลำดับ ได้นำวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปใช้ในการตรวจและจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *A. pleuropneumoniae* จากนั้นได้นำวิธีนี้มาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกให้บริสุทธิ์จากตัวอย่างปอดที่มีวิการปอดและเยื่อหุ้มปอดอักเสบจำนวน 47 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับวิธี rapid slide agglutination test (SAT) ซึ่งก็ได้ผลการจำแนกชนิดตรงกัน หลังจากนั้นได้นำตัวอย่างปอดสุกรที่มีวิการปอดและเยื่อหุ้มปอดอักเสบ จำนวน 10 ตัวอย่าง ผลการตรวจและพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรียพบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างให้ผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสตรงกับผลผลิตของปฏิกิริยาจากเชื้ออ้างอิงชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 หรือชนิดที่ 8 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับวิธี SAT วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถที่จะใช้ในการตรวจและพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *A. pleuropneumoniae* จากตัวอย่างปอดสุกรที่มีวิการปอดและเยื่อหุ้มปอดอักเสบในห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved