



ความชุกและคุณลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียคลามัยเดียในสัตว์เลื้อยคลานในสวนสัตว์ จังหวัดเชียงใหม่

กิตติกร บุญศรี^{1,*} พินิจ บุญทอง² สาคร เดชขจร³ ฟ้าดาว กองเงิน³ และกฤษฎาภรณ์ พริ้งเพระ^{1,4}

¹ศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์ โรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมือง เชียงใหม่ 50100;

²สวนสัตว์เชียงใหม่ องค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย เมือง เชียงใหม่ 50200; ³เชียงใหม่ไนท์ซาฟารี หางดง เชียงใหม่ 50230;

⁴ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมือง เชียงใหม่ 50100

บทคัดย่อ: การศึกษานี้เป็นการสำรวจความชุกของเชื้อแบคทีเรียคลามัยเดียในสวนสัตว์จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของยีน 16S rRNA และทำการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้โดยทำการวิเคราะห์ทางวิวัฒนาการของลำดับในตำแหน่ง variable domain 2 (VD2) ของยีน outer membrane protein A (*ompA*) ตัวอย่างปัสสาวะจากช่องทวารร่วมของสัตว์เลื้อยคลาน จำนวน 115 ตัวอย่าง ที่เลี้ยงในสวนสัตว์สองแห่ง ได้ถูกนำมาตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อตรวจความจำเพาะของสกุลเชื้อและชนิดที่จำเพาะของเชื้อ ผลการตรวจพบความชุกของ *Chlamydia* spp., *C. psittaci* และ *C. pneumoniae* ที่ ร้อยละ 9.57 ร้อยละ 9.5 และ ร้อยละ 0 ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่างที่ได้ผลบวกไปทำการวิเคราะห์ทางวิวัฒนาการจำนวน 11 ตัวอย่างพบว่าตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงในสปีชีส์ *C. psittaci* และมีตัวอย่างจำนวน 8 ตัวอย่างอยู่ในสปีชีส์ *C. pecorum* มี จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *Chlamydia* หลากหลายสายพันธุ์สามารถพบได้ในสัตว์เลื้อยคลานที่ไม่แสดงอาการป่วยในสวนสัตว์จังหวัดเชียงใหม่ ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคจึงมีความจำเป็นเพื่อป้องกันและควบคุมโรคสำหรับสัตว์ในสวนสัตว์

คำสำคัญ: ความชุก คุณลักษณะทางพันธุกรรม เชื้อคลามัยเดีย สัตว์เลื้อยคลาน

#ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2565. 17(1): 61-70.

E-mail address: Kittikorn.boonsri@cmu.ac.th

Prevalence and Genetic Characterization of *Chlamydia* spp. in Captive Reptiles in Zoos, Chiang Mai

Kittikorn Boonsri^{1,#}, Pinich Boontong², Sakorn Dechkajorn³, Fahdaow Kong-ngoen³, and Kidsadagon Pringproa^{1,4}

¹Veterinary Diagnostic Center, Chiang Mai University Small Animal Hospital, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand; ²Chiang Mai Zoo, The Zoological Park Organization, Chiang Mai 50200, Thailand; ³Chiang Mai Night Safari, Hang Dong 50230, Thailand; ⁴Department of Veterinary Biosciences and Veterinary Public Health, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand

Abstract: This study investigated the prevalence of *chlamydia* among captive reptiles in zoos, Chiang Mai, Thailand. The method was conducted by polymerase chain reaction (PCR) of the 16S rRNA gene and further characterized these bacteria by performing phylogenetic analysis of the sequences of the variable domain 2 (VD2) region of the *ompA* gene, which encodes the *Chlamydia* major outer membrane protein. Cloacal swabs were collected from 115 reptile animals in two zoos and examined for their genus and species specification. The prevalence of *Chlamydia* spp., *C. psittaci* and *C. pneumoniae* were found to be 9.57%, 9.57% and 0%, respectively. Phylogenetic analysis from 11 samples showed that three samples were similar to *C. psittaci* and eight samples were *C. pecorum*. This study demonstrated for the first time that diverse *Chlamydia* species could be found in asymptomatic reptiles in zoos of Chiang Mai province. Therefore, disease monitoring is necessary to prevent and control chlamydiosis in zoo animals.

Keywords: Prevalence, Genetic characterization, Chlamydia, Reptiles

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2022 17(1): 61-70.

E-mail address: Kittikorn.boonsri@cmu.ac.th

บทนำ

เชื้อแบคทีเรียใน family Chlamydiaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็น intracellular ส่วนใหญ่พบที่สามารถเกิดโรคที่สำคัญทั้งในสัตว์และในมนุษย์ (Storz and Kaltenboeck, 1993b) สำหรับเชื้อที่มีความสำคัญทางสัตวแพทย์ คือ เชื้อ *Chlamydia psittaci* ในนกจะทำให้เกิดโรค psittacosis ซึ่งทำให้เกิดอาการติดเชื้อทั่วร่างกาย โดยอาการจะเป็นได้ทั้งแบบ

เฉียบพลัน เรื้อรัง หรือแม้กระทั่งการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ ซึ่งมักเกิดโรคในนกแก้ว สัตว์ปีกที่เลี้ยง และนกป่า (Vanrompay et al., 1995) เชื้อ *Chlamydia pneumoniae* ซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะปอดอักเสบในมนุษย์ (Grayston et al., 1990) โดยมีการประมาณการว่าร้อยละ 10 ของผู้ป่วยจากภาวะปอดอักเสบในแหล่งชุมชน เกิดจากการติดเชื้อ *C. pneumoniae* (Gaydos et al., 1994) นอกจากนี้ยังพบ DNA ของเชื้อในสัตว์

ได้แก่ การป้ายเชื้อ palpebral และ urogenital organs ในโคละล่า (Jackson et al, 1999) จากม้าที่มีภาวะ nasopharyngeal conjunctivitis (Wills et al., 1990) และจากอวัยวะภายในต่างๆ ของสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Bodetti et al., 2002; Reed et al., 2000) อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่พบการติดเชื้อ *C. pneumoniae* จากสัตว์สู่คน (Myers et al, 2009)

เชื้อแบคทีเรีย *Chlamydia* spp. ในสัตว์ปีกจะถูกแบ่งเป็นอย่างน้อย 15 genotypes ได้แก่ สายพันธุ์ A, B, C, D, E, F, C/B, I, J, 1V, 6N, Matl16, R54, YP84 และ CPX0308 และ genotype ที่ไม่พบในสัตว์ปีกได้แก่ สายพันธุ์ WC และ M56 (Beeckman and Vanrompay, 2009) โดยการจำแนก genotype จะใช้ความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *ompA* ซึ่งเป็นยีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของ major outer membrane protein (MOMP) (Sachse et al., 2015) ภายในยีน *ompA* จะมีการเรียงลำดับ DNA ที่มีความแตกต่างกันในส่วนย่อยที่เรียกว่า variable domain (VD) โดยแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ VD1, VD2, VD3 และ VD4 ซึ่งพบว่า VD จำนวน 3 ส่วน ที่อยู่บนพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรีย และบรรจุ antigenic peptides ภายใน ซึ่งความแตกต่างของการเรียงลำดับเบสในส่วน VD ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Chlamydia* spp. ที่แยกจากสัตว์ปีกส่วนใหญ่จะอยู่ใน genotype A, B, C, D, E, F และ E/B ยกเว้น genotype WC และ M56 ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Beeckman and Vanrompay, 2009)

มีรายงานการสำรวจเชื้อ *Chlamydia* spp. ด้วยวิธี PCR ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก และสัตว์เลื้อยคลานของสวนสัตว์ในประเทศญี่ปุ่น (Kabeya et al., 2015) พบว่า เชื้อ *C. psittaci* และเชื้อ *C. pneumoniae* สามารถตรวจได้จากสัตว์เลื้อยคลานมากที่สุด และเชื้อ *C. pneumoniae* ยังมีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่แยกได้จากมนุษย์ในประเทศไทยมีการสำรวจเชื้อ *C. psittaci* ใน

อุจจาระนกพิราบพบ 1.3 % (Wannaratana et al., 2017) ในนกสวยงามพบ 7.87 % (Suksai et al., 2016) และมีการสำรวจในนกป่าพบจำนวน 4.9% ในนกปากห่าง (Suksai et al., 2019) โดยยังไม่มีรายงานในสัตว์เลื้อยคลาน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจความชุกของเชื้อ *Chlamydia* spp. ในสัตว์เลื้อยคลาน ในสวนสัตว์จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษานี้ได้รับการพิจารณารับรองการอนุญาตให้ใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่โครงการ R9/ 2562 และได้รับการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพระดับส่วนงาน ชุดที่ 7 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่โครงการ CMUIBC-0762018

กลุ่มตัวอย่าง

ทำการศึกษาในสัตว์เลื้อยคลานของสวนสัตว์ที่อยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ได้แก่ สวนสัตว์เชียงใหม่ และเชียงใหม่ไนท์ซาฟารี โดยวิธีการสุ่มตัวอย่างอย่างง่าย (Simple random sampling) โดยไม่เลือกเพศ อายุ คำนวณจำนวนตัวอย่างจากสูตร

$$n = \frac{z^2 P(1 - P)}{d^2}$$

เมื่อ n = จำนวนตัวอย่าง

P = ความชุกประมาณการ = 0.081

d = ขนาดความคลาดเคลื่อน = 0.05

z = ระดับความเชื่อมั่น 95%

ได้ตัวอย่างจากการคำนวณทั้งสิ้น 115 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจากการป้ายเชื้อช่องทวารร่วมในการศึกษา

ชนิดสัตว์เลี้ยงคาน	สวนสัตว์เชียงใหม่	เชียงใหม่ไนท์ซาฟารี	รวม
เต่าเหลือง (<i>Indotestudo elongata</i>)	13	7	20
เต่าหับ (<i>Cuora amboinensis</i>)	13	3	16
เต่าใบไม้ (<i>Cyclemys dentate</i>)	18	0	18
เต่าหวาย (<i>Heosemys spinosa</i>)	20	0	20
เต่าปึง (<i>Hieremys annandalei</i>)	7	0	7
เต่าหกดำ (<i>Manouria emys phayrei</i>)	1	0	1
เต่าซัลคาต้า (<i>Geochelone sulcata</i>)	1	1	2
เต่าแก้มแดง (<i>Trachemys scripta elegans</i>)	0	4	4
เต่าดาวรัศมี (<i>Astrochelys radiata</i>)	0	1	1
เต่านา (<i>Malayemys subtrijuga</i>)	0	3	3
เต่าบัว (<i>Python bivittatus</i>)	0	2	2
เตงู (<i>Tupinambis teguixin</i>)	0	1	1
อิกัวน่า (<i>Inguanidae inguana</i>)	11	7	18
งูหลามทอง (<i>Python bivittatus</i>)	0	2	2
รวม	84	31	115

วิธีการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างจากการป้ายเชื้อจากช่องทวารร่วม (cloacal swab) เก็บในเก็บในหลอดพลาสติกเก็บตัวอย่างขนาด 15 มิลลิเมตร ที่บรรจุด้วย PBS ปริมาตร 3 มิลลิเมตร จากนั้นนำตัวอย่างไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการต่อไป

การสกัดสารพันธุกรรม

นำ PBS จากการป้ายเชื้อช่องทวารร่วมไปปั่นให้ตกตะกอนแล้วนำส่วนใส ปริมาตร 200 µl แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม NucleoSpin blood (Macherey-Nagel®, German) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

การตรวจหาเชื้อ *Chlamydia* spp., *C. psittaci* และ *C. pneumonia*

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ชุดเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม Quick Taq HS DyeMix (Toyobo®, Japan) จำนวน 20 µl ใช้ forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 10 µM/µl โดยอุณหภูมิและเวลาสำหรับทำปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Chlamydia* spp., *C. psittaci* และ *C. pneumonia* ทั้ง 3 ชนิดใช้เวลาและอุณหภูมิเดียวกันดังมีรายละเอียดต่อไปนี้ ขั้นตอนการ pre-denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ในขั้นตอนทั้งสามนี้ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มา

ตารางที่ 2 แสดง primer ที่ใช้ในการทดสอบ และขนาด PCR product ทั้งหมด

ชนิดการตรวจ	primer	Primer sequence 5'-3'	ยีนเป้าหมาย	ขนาด ผลิตภัณฑ์
Genus-specific	16S-FCh	ACG GAA TAA TGA CTT CGG	16S rRNA (Messmer et al., 1997)	436 bp
	16S-RCh	TAC CTG GTA CGC TCA ATT		
<i>C. psittaci</i>	Cpsi_F	ATA ATG ACT TCG GTT GTT ATT	16S rRNA (Messmer et al., 1997)	221 bp
	Cpsi_R	TGT TTT AGA TGC CTA AAC AT		
<i>C. pneumoniae</i>	Cpne_F	ATA ATG ACT TCG GTT GTT ATT	16S rRNA (Messmer et al., 1997)	127 bp
	Cpne_R	CGT CAT CGC CTT GGT GGG CTT		
Sequencing test	CMGP-1F	CCT TGT GAT CCT TGC GCT ACT TG	ompA VD2 (Chahota et al., 2006) *(Kabeya et al., 2015)	1,047 bp
	CMCP-1R	GTG AGC AGC TCT TTC GTT GAT		
	CMGP-2F	GCC TTA AAC ATC TGG GAT CG		
	CMGP-2Fc/t*	GCC TTA AAC ATT TGG GAT CG		
	CMPG-2R	GCA CAA CCA CAT TCC CAT AAA G		

ทำ electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 1X TBE (Tris-borate-EDTA) ใช้เวลา 30 นาที

การตรวจหาคุณลักษณะของยีน *ompA*

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกต่อ *Chlamydia* spp. มาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ต่อยีน *ompA* VD2 ดังแสดงในตารางที่ 2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ชุดเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม Quick Taq HS DyeMix (Toyobo®, Japan) จำนวน 20 µl forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 10 µM/µl โดยอุณหภูมิและเวลาสำหรับทำปฏิกิริยาที่มีรายละเอียดต่อไปนี้ ขั้นตอนการ pre-denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ในขั้นตอนทั้งสามนี้ ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ นำมาทำ electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel

ใน 1X TBE (Tris-borate-EDTA) ใช้เวลา 30 นาที ตัวอย่างที่ให้ผลิตภัณฑ์ที่ 251 bp เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป การวิเคราะห์คุณลักษณะของเชื้อโดยการเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม Mega7

ผลการทดลอง

ผลการตรวจหาเชื้อ *Chlamydia* spp., *C. psittaci* และ *C. pneumoniae*

ผลการตรวจ PCR ของตัวอย่าง cloacal swab ทั้งหมด 115 ตัวอย่าง ต่อยีน 16S rRNA (Messmer et al., 1997) ซึ่งเป็น genus specific ทำให้เกิดแถบเรืองแสงที่ 436 bp โดยให้ผลบวกจำนวน 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 9.57) ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยหากจำแนกตามสวนสัตว์แต่ละแห่ง พบว่าสวนสัตว์เชียงใหม่มีความชุก ร้อยละ 10.71 (9/84) ซึ่งพบในเต่าเหลืองจำนวน 1 ตัวอย่าง เต่าหัวจำนวน 2 ตัวอย่าง เต่าใบไม้จำนวน 2 ตัวอย่าง เต่าหวายจำนวน 2 ตัวอย่าง เต่าปึงจำนวน 1 ตัวอย่าง และอีกัวน่าจำนวน 1 ตัวอย่าง ส่วนในสวนสัตว์ไนท์

ตารางที่ 3 ผลการตรวจ การตรวจหาเชื้อ *Chlamydia* spp., *C. psittaci* และ *C. pneumonia*

ชนิดสัตว์เลี้ยงคลาน	จำนวนตัวอย่าง	Genus	Species identification	
		identification	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pneumoniae</i>
เต่าเหลือง	20	1	1	0
เต่าหับ	16	2	2	0
เต่าใบไม้	18	2	2	0
เต่าหวาย	20	2	2	0
เต่าปึง	7	1	1	0
เต่าหกดำ	1	0	0	0
เต่าซัลคาต้า	2	0	1	0
เต่าแก้มแดง	4	0	0	0
เต่าดาวรัศมี	1	0	0	0
เต่านา	3	0	0	0
เต่าบัว	2	0	0	0
เตงู	1	0	0	0
อีกัวน่า	18	3	3	0
งูหลามทอง	2	0	0	0
รวม	115	11	11	0

ซาฟารีพบความชุก ร้อยละ 6.45 (2/31) โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกมาจากอีกัวน่าจำนวน 2 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อยีน 16S rRNA ทั้ง 11 ตัวอย่างไปทำ multiplex PCR เพื่อจำแนกชนิด *Chlamydia psittaci* และ *C. pneumoniae* (Messmer et al., 1997) พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวก 11 ตัวอย่างให้แถบเรืองแสงขนาดประมาณ 127 bp ของ *C. psittaci* ทั้งหมด

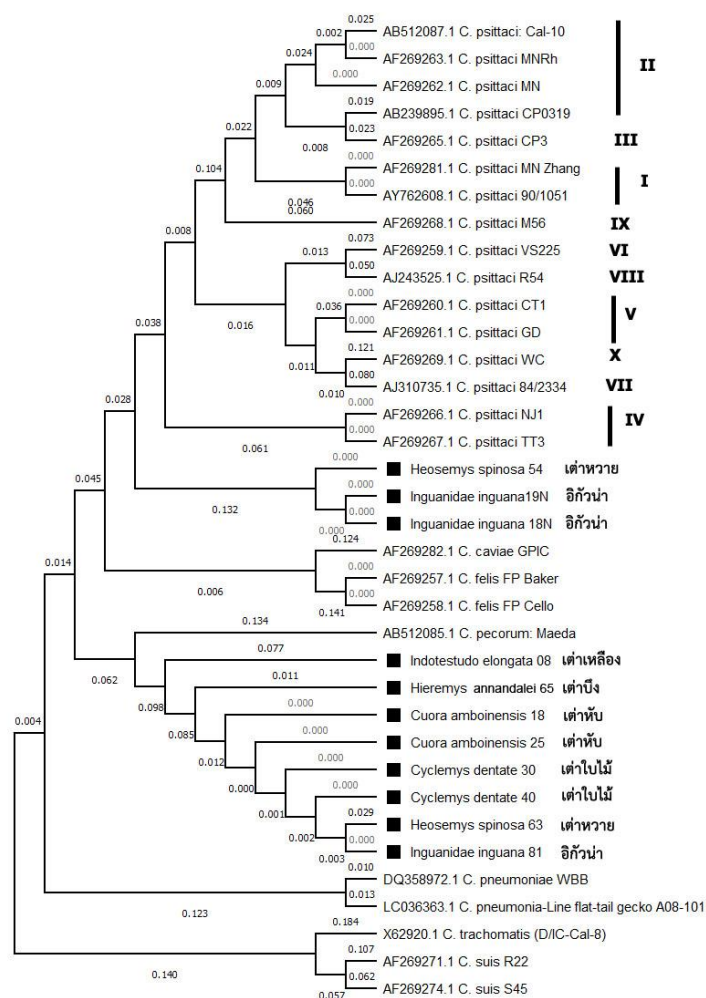
ผลการตรวจคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรียคลามัยเดีย

ผลการทำ alignment ของลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียคลามัยเดียเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงจาก Genbank พบว่าเชื้อแบคทีเรียคลามัยเดียที่เพาะแยกได้เชื้อที่แยกได้จาก เต่าหวายจำนวน 1 ตัวอย่างจากสวนสัตว์เชียงใหม่ และอีกัวน่าจำนวน 2 ตัวอย่าง จากเชียงใหม่ในซาฟารีซึ่งคล้ายกับเชื้อ *C. psittaci* โดยเชื้อ

ส่วนใหญ่จำนวน 8 สายพันธุ์ที่มาจากสวนสัตว์เชียงใหม่ แบ่งเป็นเชื้อที่มาจาก เต่าเหลืองจำนวน 1 ตัวอย่าง เต่าหับจำนวน 2 ตัวอย่าง เต่าใบไม้จำนวน 2 ตัวอย่าง เต่าหวายจำนวน 1 ตัวอย่าง เต่าปึงจำนวน 1 ตัวอย่าง และอีกัวน่าจำนวน 1 ตัวอย่าง มีลักษณะคล้ายเชื้อ *Chlamydia pecorum* ดังรูปที่ 1

วิจารณ์

จากการดำเนินโครงการวิจัยนี้ การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Chlamydia* spp. ด้วยวิธี conventional PCR ของยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นการตรวจ genus specific และการตรวจ multiplex PCR เพื่อจำแนก *C. psittaci* และ *C. pneumoniae* ตามวิธีของ Messmer และคณะ (1997) ให้ผลการตรวจที่ดี ซึ่งการตรวจด้วยวิธีดังกล่าวเป็นหนึ่งวิธีที่ทางองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่าง



รูปที่ 1 แสดง Phylogenetic tree ที่ได้จากการทำ sequencing เทียบกับเชื้อแบคทีเรียคลาไมเดียในการศึกษานี้กับสายพันธุ์อ้างอิง (สำหรับอักษรโรมัน I-X เป็นการจำแนกกลุ่มของเชื้อ *Chlamydia psittaci* ตามวิธีของ Chahota และคณะ 2006; ■ คือ ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้)

ประเทศ (Office International des Epizooties; OIE) ได้แนะนำสำหรับการตรวจ avian chlamydiosis ว่ามีความจำเพาะและมีความไวในการตรวจเทียบเท่ากับวิธีการเพาะแยกเชื้อ (OIE, 2012) จึงมีความเหมาะสมหากจะนำวิธีการตรวจดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นงานบริการสำหรับการตรวจคัดกรองการติดเชื้อ *chlamydia* spp. แต่อาจมีข้อด้อยในเรื่องของความจำเพาะในการแยกเชื้อ *C. psittaci* และ *C. pneumoniae* เนื่องจากการทดลองนี้ เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ *Chlamydia* spp. และให้ผลบวกต่อ *C. psittaci* แล้ว

นำไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกดังกล่าวเป็นเชื้อแบคทีเรีย *chlamydia* สายพันธุ์ที่เป็น *C. psittaci* เพียง 3 ตัวอย่าง ดังนั้นหากในงานชันสูตรโรคสัตว์ กรณีที่เป็นสิ่งส่งตรวจทางคลินิกแล้วต้องการตรวจการติดเชื้อ *C. psittaci* ควรเลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *ompA* จะมีความเหมาะสมสำหรับการตรวจจำแนกเชื้อมากกว่า (Kaltenboeck et al., 1997; Yoshida et al., 1998; Sachse et al., 2009; Pantchev et al., 2009)

จากผลทางอณูชีววิทยา ด้วยวิธี PCR พบความชุกของเชื้อแบคทีเรีย *Chlamydia psittaci* ของสัตว์เลื้อยคลานที่ไม่แสดงอาการป่วยในสวนสัตว์ที่ตั้งอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ ร้อยละ 9.57 โดยพบมากกว่ารายงานก่อนหน้านี้ในสวนสัตว์ของประเทศญี่ปุ่นซึ่งพบร้อยละ 7.2 (Kabeya et al., 2015) สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการสำรวจในสัตว์เลื้อยคลาน แต่มีการศึกษาในนกสวยงามที่เลี้ยงไว้ โดย Suksai และคณะ ในปี 2016 ที่พบความชุกร้อยละ 7.87 ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *C. psittaci* ที่พบในสัตว์เลื้อยคลานมีความชุกมากกว่าในนกสวยงาม ซึ่งเป็นเรื่องที่ต้องมีศึกษาต่อเพิ่มเติม เพื่อการเฝ้าระวังทางสาธารณสุขเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียนี้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาการระบาดของโรค psittacosis ยังพบว่าสาเหตุของการติดเชื้อมักมาจาก นก หรือ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นหลัก (Kabeya et al., 2015)

ผลการตรวจ PCR ตามวิธีของ Messer และคณะ (1997) ยังมีข้อสังเกตในขั้นตอนการทำ multiplex PCR ซึ่งตัวอย่างทั้งหมด ให้ผลบวกต่อเชื้อ *C. psittaci* แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสปรากฏว่าเชื้อที่พบเป็นเชื้อ *C. psittaci* และ *C. pecorum* แสดงให้เห็นว่าหากมีการตรวจพบ *C. psittaci* ด้วยวิธีของ Messmer และคณะ (1997) ในสัตว์เลื้อยคลาน ควรทำการวิเคราะห์ลำดับเบสร่วมด้วยเพื่อเป็นการยืนยันการวินิจฉัย

เนื่องจากยีน *ompA* อยู่ในกลุ่ม major outer membrane protein (MOMP) โดยจะประกอบไปด้วย 4 variable domain (VD) ซึ่ง VD แต่ละส่วนจะขนานไปด้วย conserved region ดังนั้นการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียคลามัยเดีย และการระบุสปีชีส์ที่จำเพาะจะต้องศึกษาลำดับเบสของ conserved region ที่ตำแหน่ง VD ซึ่งโดยทั่วไปจะเป็น VD2 และ VD4 (Sachse et al., 2009) สำหรับการศึกษาได้นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *Chlamydia* spp. ด้วยวิธี PCR จำนวน 11 ตัวอย่าง ได้ถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสของ

ยีน *ompA* VD2 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่าเชื้อที่ให้ผลบวกส่วนใหญ่คล้ายเชื้อ *C. pecorum* ซึ่งเป็นเชื้อคลามัยเดียที่ก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็นสัตว์ปศุสัตว์ ได้แก่ วัว แกะ แพะ และสุกร นอกจากนี้ยังพบการก่อโรคได้ในสัตว์ป่ารวมถึงโคะละ (Walker et al., 2015) โดยรอยโรคที่มักพบคือภาวะข้ออักเสบหลายข้อ (polyarthritis) สำหรับเชื้อที่แยกได้จากเต่าหวายและอีกัวน่า มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. psittaci* ในกลุ่มที่ 4 เนื่องจากสัตว์เลื้อยคลานในการศึกษานี้อยู่ในสวนสัตว์ซึ่งมีสัตว์หลายชนิด จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษา จึงควรต้องมีการเฝ้าระวังโรคที่เกิดจากเชื้อ *C. pecorum* รวมถึงเชื้อคลามัยเดียชนิดอื่น ที่อาจเป็นสาเหตุให้สัตว์ในสวนสัตว์ป่วยได้ นอกจากนี้ผู้ดูแลหรือแม้กระทั่งสัตว์แพทย์ที่ต้องดูแลรักษาสัตว์ ที่ต้องปฏิบัติหน้าที่ทำให้ต้องมีการเดินทางจากแหล่งเลี้ยงสัตว์ชนิดหนึ่งไปยังแหล่งเลี้ยงสัตว์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งทำให้มีโอกาสที่จะมีทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไปในสัตว์หลายชนิดได้ ดังนั้นจึงควรจัดระบบป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อให้มีความเหมาะสมในแต่ละสวนสัตว์เพื่อลดการแพร่กระจายของเชื้อคลามัยเดีย หรือเชื้ออื่นๆที่ทำให้เกิดโรคในสวนสัตว์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยเงินรายได้ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2562 และขอขอบคุณสวนสัตว์และเชียงใหม่ไนท์ซาฟารีที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างสำหรับงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Beeckman, D.S. and Vanrompay, D.C. 2009. Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infectious from a clinical perspective. Clin. Microbiol. Infect. 15(1): 11-17.

- Bodetti, T.J., Jacobson, E., Wan, C., Hafner, L., Pospischil, A., Rose, K. and Timms, P. 2002. Molecular evidence to support the expansion of the host range of *Chlamydia pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. Syst. Appl. Microbiol. 25: 146-52.
- Gaydos, C.A., Roblin, P.M., Hammerschlag, M.R., Hyman, C.L., Eiden, J.J., Schachter, J. and Quinn, T.C. 1994. Diagnostic utility of PCR-enzyme immunoassay, culture, and serology for detection of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients. J. Clin. Microbiol. 32: 903-5.
- Grayston, J.T., Campbell, L.A., Kuo, C.C., Mordhorst, CH., Saikku, P., Thom, D.H., Wang, S.P. 1990. A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. J. infect. Dis. 161: 618-25.
- Jackson, M., White, N., Giffard, P. and Timms, P. 1999. Epizootiology of Chlamydia infections in two free-range koala populations. Vet. Microbiol. 65: 255-64.
- Kabeya, H., Sato, S. and Maruyama, S. 2015. Prevalence and characterization of Chlamydia DNA in zoo animals in Japan. Microbiol. Immunol. 59: 507-515.
- Kaltenboeck, B., Heard, D., DeGraves, F.J., Schmeer, N. 1997a. Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortigenic *Chlamydia psittaci* in ruminants. J. Clin. Microbiol. 35: 2293-2298.
- Myers, G.S., Mathews, S.A., Eppinger, M., Mitchell, C., O'Brien, K.K., White, O.R., Benahmed, F., Brunham, R.C., Read, T.D., Ravel, J., Bavoil, P.M. and Timms, P. 2009. Evidence that human Chlamydia pneumoniae was zoonotically acquired. J. Bacteriol. 191: 7225-33.
- Messmer, T.O., Skelton, S.K., Moroney, J.F., Daugherty, H. and Fields B.S. 1997. Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. J. Clin. Microbiol. 35: 20436.
- Office International des Epizooties. (2012). Avian chlamydiosis. OIE terrestrial Manual 2012: 401-414.
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J. and Sachse, K., 2009. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. Vet. J. doi:10.1016/j.tvjl.2008.02.025
- Reed, K.D., Ruth, G.R., Meyer, J.A. and Shukla, S.K. 2000. *Chlamydia pneumonia* infection in a breeding colony of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). Emerg. Infect. Dis. 6: 196-9.
- Sachse, K., Bavoil, PM., Kaltenboeck, B., Stephens, R.S., Kuo, C.C., Rossello-Mora, R. and Horn, M. 2015. Emendation of the family Chlamydiaceae: proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently

- recognized species. Syst. Appl. Microbiol. 38:99-103.
- Sachse K., Vretou E., Livingstone M., Borel N., Pospischil A. & Longbottom D. (2009). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections (review). Vet. Microbiol. 135: 2–21.
- Storz, J. and Kaltenboeck, B. 1933(b). Diversity of Chlamydia-Induce Disease. In: Woldehiwet, Z. and Ristic, M. (Eds), Rickettsial and Chlamydial disease of domestic animal, Pergamon Press, Oxford, UK, pp.363-393.
- Suksai, P., Lorsunyaluck, B., Dittawong, P., Sanyathitiseree, P. and Lertwatcharasarakul, P. 2016. Genetic detection and identification of *Chlamydophila psittaci* in captive psittacine birds in Thailand. Thai. J. Vet. Med. 46(1): 67-75.
- Suksai, P., Onket, R., Wiriyarat, W., Sangkachai, N., Lekcharoen, P. and Sariya, S. 2019. Occurrence of *Chlamydia* spp. in wild birds in Thailand. Asian. Pac. J. Trop. Med. 12(2): 67-71.
- Vanrompay, D., Ducatelle, R. and Haesebrouck, F. 1995. *Chlamydia psittaci* infection: a review with emphasis on avian chlamydiosis. Vet. Microbiol. 45: 93-119.
- Wannaratana, S., Thontiravong, A., Amonsin, A. and Pakpinyo S. 2017. Persistence of *Chlamydia psittaci* in various temperatures and times. Avian Disease. 61: 40-45.
- Walker, E., Lee, E.J., Timms, P. and Polkinghorne, A. 2015. *Chlamydia pecorum* infections in sheep and cattle: a common and under-recognised infectious disease with significant impact on animal health. Vet. J. 206:252–260.
- Wills, J.M., Watson, G., Lusher, M., Mair, T.S., Wood, D. and Richmond, S.J. 1990. Characterization of *Chlamydia psittaci* isolates from horse. Vet. Microbiol. 24: 11-19.
- Yoshida, H., Kishi, Y., Shiga, S., Hagiwara, T., 1998. Differentiation of *Chlamydia* species by combined use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Microbiol. Immunol. 42: 411-414.

