

4

คุณสมบัติของเชื้อ Pasteurella multocida  
ที่แยกได้จากคนและสัตว์ในประเทศไทย



นางสาวคณิ อุ่นจิตติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


พศ. 2532

ISBN - 974-576-724-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015839

Characterization of Pasteurella multocida  
Isolated from Human and Animals in Thailand



Miss Kanee Unchitti

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science  
Inter-Department of Medical Microbiology  
Graduate School  
Chulalongkorn University

1989

ISBN - 974-576-724-7



Thesis title                    Characterization of Pasteurella multocida  
 Isolated from Human and Animals in Thailand

By                                   Miss Kanee Unchitti

Department                    Inter-Department of Medical Microbiology

Thesis Advisor                Associate Professor Somatat Wongsawang,  
 Dr.med.vet.

Thesis Co-advisors          Instructor Kriengsak Saitanu, Ph.D.  
 Associate Professor Nikom Chaisiri,Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn  
 University in Partial Fulfillment of the Requirements for  
 the Master's Degree.

*Thavorn Vajrabhaya*.....Dean of Graduate School  
 (Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D)

Thesis Committee

*Santi Thoongsuwan*.....Chairman  
 (Asso.Prof.Santi Thoongsuwan, Ph.D)

*Somatat Wongsawang*.....Thesis advisor  
 (Asso.Prof.Somatat Wongsawang, Dr.med.vet.)

*Kriengsak Saitanu*.....Member  
 (Instructor Kriengsak Saitanu, Ph.D.)

*Nikom Chaisiri*.....Member  
 (Asso.Prof.Nikom Chaisiri, Ph.D.)

*Prapahd Neramitmansook*.....Member  
 (Prapahd Neramitmansook, D.V.M., M.S.)



พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมเรียงกันเดียว



คดี อุ่นจิตติ : คุณสมบัติของเชื้อ Pasteurella multocida ที่แยกได้จากคนและสัตว์ในประเทศไทย (CHARACTERIZATION OF PASTEURELLA MULTOCIDA ISOLATED FROM HUMAN AND ANIMALS IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษา : รศ.นสพ.ดร.โสมทัต วงศ์สว่าง, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.นสพ.ดร.เกรียงศักดิ์ สายธนู, รศ.ดร.นิคม ชัยศิริ, 130 หน้า.  
ISBN 974-576-724-7

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางแบคทีเรีย, การตรวจซีโรไทป์โดยระบบ Carter-Heddleston และการศึกษา protein patterns ของ whole cell sonicated extracts โดยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis ของเชื้อ P. multocida ที่แยกได้จากคนและสัตว์ในประเทศไทย

ผลการวิจัยพบว่าเชื้อทั้ง 91 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากคน(17), สุนัข(29), เป็ด ไก่(29), สายพันธุ์มาตรฐาน (19) และวัคซีน (3) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็น coccobacilli ที่มีแคปซูล และบางสายพันธุ์เป็นแท่งสั้นหรือเป็นสาย (pleomorphism) คุณสมบัติทางแบคทีเรียคล้ายกัน แต่การหมักย่อยน้ำตาลบางชนิดแตกต่างกัน เช่น การหมักย่อยน้ำตาล arabinose และ xylose

การตรวจซีโรไทป์ โดยระบบ Carter-Heddleston ใช้วิธีตรวจแคปซูลซีโรไทป์โดยวิธี indirect hemagglutination test เพื่อตรวจ type B และ E, hyaluronidase test เพื่อตรวจ type A และ acriflavine test เพื่อตรวจ type D ส่วนการตรวจซีโรไทป์ของผนังเซลล์ใช้วิธี gel diffusion precipitin test (GDPT) โดยใช้แอนติซีรัมจาก National Animal Disease Control (NADC), Iowa และแอนติซีรัมที่เตรียมเองจากกระต่าย ผลการตรวจ P. multocida ซีโรไทป์ในคนและสัตว์พบว่า ซีโรไทป์ส่วนใหญ่คือ A:1, A:3 และ A:3,4 type D พบได้ในเชื้อจากคนและสุนัข แต่ไม่พบในเชื้อจากเป็ดไก่ ไม่พบ type B และ E จากการศึกษาตัวอย่างใดก็ตาม การตรวจ GDPT ด้วยแอนติซีรัมที่เตรียมเอง พบ somatic serotype 1,3 มากในเชื้อที่แยกได้จากสุนัขและพบบ้างในเชื้อที่แยกได้จากคนและเป็ดไก่ และไม่พบซีโรไทป์นี้เมื่อตรวจด้วยแอนติซีรัมจาก NADC

ผลการศึกษาโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ของ whole cell sonicated จากที่คัดเลือกมา 17 สายพันธุ์ พบว่า protein patterns มีความแตกต่างกันในบางซีโรไทป์ ได้แก่ B:2; A:3,4; untypable:3,4; D:3,12 และ D:3,4,12 ส่วนซีโรไทป์อื่น ๆ ไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างได้

ภาควิชา ..... สหสาขาวิชา  
สาขาวิชา ..... จุลชีววิทยาทางการแพทย์  
ปีการศึกษา ..... 2532

ลายมือชื่อนิสิต ..... คดี อุ่นจิตติ  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... โสมทัต วงศ์สว่าง

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



KANEE UNCHITTI : CHARACTERIZATION OF PASTEURELLA MULTOCIDA ISOLATED FROM HUMAN AND ANIMALS IN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SOMATAT WONGSAWANG, Dr. med. vet., THESIS CO-ADVISORS : INSTRUCTOR KRIENGSACK SAITANU, Ph.D and ASSO. PROF. NIKOM CHAISIRI, Ph.D. 130 PP.

This study was to demonstrate the bacteriological characteristics, serological typing by the Carter-Heddleston system and the protein patterns of whole cell sonicated extracts by SDS-PAGE among P. multocida isolated from human and animals in Thailand.

All 91 strains of P. multocida isolated from human(17),pig(23),poultry (29),reference(19)and vaccine(3)were gram negative coccobacilli with capsules. Short rods or filaments (pleomorphism) were seen in some strains. Their bacteriological characteristics were identical except for the fermentation of some carbohydrates such as arabinose and xylose.

For the serological typing by Carter-Heddleston system, indirect hemagglutination test for type B and E, hyaluronidase test for type A and acriflavine test for type D were utilized to detect the capsular types. Reference typing antisera from National Animal Disease Control (NADC), Iowa and somatic typing antisera produced in rabbits were utilized in the gel diffusion precipitin test for detecting the somatic serotypes. The results showed that common serotypes were A:1; A:3 and A:3,4. Type D was found in the isolates of human and pigs but not in poultry whereas type B and E were not found in any isolates. However,by using somatic typing antisera, the incidence of serotype 1,3 was high in pigs, few in human and poultry strains. This serotype was not found when reference typing antisera were used.

Analysis of protein patterns by SDS-PAGE from whole cell sonicated extracts of 17 selected strains revealed that different protein patterns were seen in some serotypes such as B:2; A:3,4; untypable : 3,4; D:3,12 and D:3,4,12 whereas other serotypes were indistinguishable.

ภาควิชา สหสาขาวิชา  
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์  
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต Kanee Unchitti

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Somatat Wongsawang

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Nikom Chaisiri





### ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my esteem for my advisor, Associate Professor Dr.Somatat Wongsawang. His invaluable guidance and encouragement during the course of this thesis are appreciated. I am also grateful to both of my co-advisors, Instructor Dr.Kriengsak Saitanu and Associate Professor Dr.Nikom Chaisiri for their advice and criticism.

My gratitude is given to Professor Dr.Dasnayanee Chandanayingyong, Head of Department of Transfusion Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, for her permission to use donor blood group O.

Special acknowledgement is sincerely due to Associate Professor Churairatana Nilakul, Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, for providing some P. multocida human strains and S. aureus strains.

My acknowledgements are also due to Asso. Prof. Malai Vorachit, Ramathibodi Hospital; Dr.Tien Cheusiri, Animal Health and Technical Services Operation; Miss Nareekul Surapat, Rajavithi General Hospital; Mrs.Surang Dejsirilert, Division of Pathology, Department of Medical Sciences; Dr.Anan Chongthaleong, Chulalongkorn Hospital; Dr.K.R.Rhoades, National Animal Disease Control, USA; and W.T.Derieux, Clemson University, USA; for providing P. multocida strains.

Sincere thanks are extended to the staff of Division of Microbiology, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University for their assistance and cooperation.

I am indebted to the Graduate School for research grant.

Finally, my appreciation is expressed to Mrs. Iris A. Francis, the Consultant to Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, for her assistance in the presentation of this thesis in English.



ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS



	PAGE
ABSTRACT (Thai) .....	iv
ABSTRACT (English) .....	v
ACKNOWLEDGEMENTS .....	vi
TABLES .....	ix
FIGURES .....	xi
ABBREVIATIONS .....	xii
CHAPTERS	
I. INTRODUCTION .....	1
II. MATERIALS .....	25
III. METHODS .....	39
IV. RESULTS .....	58
V. DISCUSSION .....	72
REFERENCES .....	102
APPENDICES .....	120
BIOGRAPHY .....	129

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



LIST OF TABLES

Tables	Page
1. Differential characteristics of the species of the genus <u>Pasteurella</u>	3
2. Characteristics of <u>Pasteurella multocida</u>	7
3. Early serological studies on <u>Pasteurella multocida</u>	16
4. Relationship of the capsular type of <u>Pasteurella multocida</u> and diseases	19
5. <u>P. multocida</u> strains used in the studies of bacterial characteristics and serotypes	27
6. Injected doses of capsular antigens	45
7. Injected doses of somatic antigens	50
8. Physiological characteristics of <u>P. multocida</u>	84
9. Biochemical characteristics of <u>P. multocida</u>	85
10. Results of capsular serotyping of <u>P. multocida</u> reference and vaccine strains as determined by IHA and non-serological tests	88
11. Results of capsular serotypes of <u>P. multocida</u> from human, pig and poultry strains	89
12. Results of somatic serotyping of <u>P. multocida</u> reference and vaccine strains as determined by GDPT	90
13. Results of somatic serotyping of <u>P. multocida</u> from human, pig and poultry strains using reference typing antisera	91

14. Results of somatic serotyping of P. multocida 92  
from human, pig and poultry strains using somatic  
typing antisera
15. Results of P. multocida serotypes from human, 93  
pig and poultry strains in Thailand, using  
reference typing antisera in GDPT
16. Results of P. multocida serotypes from human, 94  
pig and poultry strains in Thailand, using somatic  
typing antisera in GDPT
17. Protein concentrations of whole cell sonicated 95  
extracts of P. multocida selected strains used  
for SDS-PAGE

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figures	Page
1. Schematic representation of cell membrane of gram negative bacteria	4
2. Colony feature of <u>P. multocida</u> type A reference strain on TSB	96
3. Colony feature of <u>P. multocida</u> type B reference strain on TSB	97
4. Hyaluronidase test	98
5. Acriflavine test	99
6. Somatic serotyping by GDPT	100
7. Distribution of <u>P. multocida</u> serotypes from human, pig and poultry strains in Thailand	101
8. SDS-PAGE resulted in protein patterns from different strains of <u>P. multocida</u>	102
9. SDS-PAGE protein profiles of whole cell sonicated extracts showing specific dense bands of <u>P. multocida</u>	103



Abbreviations

AHTSO	= Animal Health and Technical Services Operation
BHI	= Brain heart infusion
BSA	= Bovine serum albumin
C	= Degree celsius
cm	= Centimeter
DSA	= Dextrose starch agar
GDPT	= Gel diffusion precipitin test
g	= Gram or Gravitational acceleration
hr	= hour
IHA	= Indirect hemagglutination test
i.e.	= id est
K	= Kilodalton
Kg	= Kilogram
$\mu$	= microliter
$\mu$ g	= microgram
LPS	= Lipopolysaccharide
lb	= Pound
min	= minute
mg	= milligram
M	= Molar
MW	= Molecular weight
nm	= nanometer
NADC	= National Animal Disease Control, Iowa, USA.
O.D.	= Optical density

- PBS = Phosphate buffer saline solution
- SDS-PAGE= Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel  
electrophoresis
- sec = second
- SS agar = Salmonella - Shigella agar
- W/V = weight/volume
- TSB = Trypticase soy agar with 5% sheep blood plates



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย