รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุ่ม* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่จำแนกด้วยวิธีแรนดอมลี แอมพลิฟายด์ โพลีมอร์ฟิก ดีเอ็นเอ (อาร์เอพีดี) จากฟาร์มไก่ในประเทศไทย

สมศักดิ์ ภัคภิญโญ
จิโรจ ศศิปรียจันทร์

สิงหาคม 2549

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุ่ม* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่จำแนกด้วย
วิธีแรนดอมลี แอมพลิฟายด์ โพลีมอร์ฟิก ดีเอ็นเอ (อาร์เอพีดี) จากฟาร์มไก่ในประเทศไทย

1. สมศักดิ์ ภัคภิญโญ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. จิโรจ ศศิปรียจันทร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Drug sensitivity on various *Mycoplasma gallisepticum* (MG) strains differentiated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) from chicken farms in Thailand

Somsak Pakpinyo[a,*], Jiroj Sasipreeyajan[a]

[a]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri Dunant Rd., Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

Abstract

The drug sensitivity against *Mycoplasma gallisepticum* (MG) isolated from 45 chicken farms from the eastern and central parts of Thailand was investigated. Twenty MG isolates were identified by immunofluorescence and polymerase chain reaction. All isolates were classified into groups by RAPD analyses. The field isolates and the reference strains including S6, F, ts-11, and 6/85 were then used for determination of the MIC levels of eleven registered antibiotics by a serial broth dilution method. The results revealed that 20 isolates of the identified MG were classified into 5 groups by RAPD patterns. The MIC levels against all isolates were 0.099, 0.099-0.782, and 0.099-1.563 µg/ml for tiamulin, doxycycline, and oxytetracycline and tylosin, respectively. The MIC levels of 0.198-6.25, 0.396-6.25, and 0.099-12.5 µg/ml were chlortetracycline, enrofloxacin, and lincomycin and tilmicosin, respectively. Finally, MIC levels of 0.099-50, and 0.198-50 µg/ml were erythromycin and josamycin combined with trimethoprim, and josamycin, respectively. For the reference strains, the MIC levels of 0.396-0.792, and 1.563-3.125 µg/ml were oxytetracycline, and chlortetracycline and lincomycin. The MIC levels of the remaining antibiotics were 0.099-0.396 µg/ml. This study indicated that isolated MG from the same or nearby district gave the similar or not wide range of MICs. In conclusion, the antibiotics, tiamulin and doxycycline had the lowest MIC

values. Tylosin, oxytetracycline, chlortetracycline and enrofloxacin showed moderately inhibitory effect against MG. Erythromycin, josamycin, josamycin combined with trimethoprim, tilmicosin and lincomycin had a wide range of MIC values depending on the MG isolates. These results are the first report of MIC against MG isolates in Thailand and would be useful for planning of the effective prophylactic and therapeutic programs.

Keywords: Mycoplasma gallisepticum; MIC; Chicken; Thailand; Antibiotics

---

*Corresponding author. Tel.: 662 218 9404; fax: 662 255 3910

E-mail address: somsak.pa@chula.ac.th

ความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุ่ม* สายพันธุ์ต่างๆ ที่จำแนกด้วยวิธีแรนดอมลี แอมพลิฟายด์ โพลีมอร์ฟิก ดีเอ็นเอ จากฟาร์มไก่ในประเทศไทย

สมศักดิ์ ภัคภิญโญ* จิโรจ ศศิปรียจันทร์

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330

บทคัดย่อ

ศึกษาความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุ่ม* (เอ็มจี) สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากไก่จำนวน 45 ฟาร์ม จากภาคตะวันออกและภาคกลางของประเทศไทย เชื้อเอ็มจีจะถูกนำมาแยกและพิสูจน์ด้วยวิธีอิมมิวโนฟลูออเรสเซนต์และโพลีเมอร์เรส เชน รีแอคชั่น (พีซีอาร์) และผ่านการวิเคราะห์ด้วยวิธีแรนดอมลี แอมพลิฟายด์ โพลีมอร์ฟิก ดีเอ็นเอ (อาร์เอพีดี) เชื้อเอ็มจีที่แยกได้และเชื้อเอ็มจีมาตรฐานได้แก่ เอส6 เอฟ ทีเอส-11 และ 6/85 ถูกนำมาศึกษาระดับค่าความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็มจี (เอ็มไอซี) ของยาปฏิชีวนะที่ได้รับการขึ้นทะเบียนยาจำนวน 11 ชนิดด้วยวิธีการเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ผลพบว่าสามารถแยกเชื้อเอ็มจีได้ 20 เชื้อและจำแนกได้เป็น5 กลุ่มด้วยวิธีอาร์เอพีดี ระดับค่าเอ็มไอซีต่อเชื้อเอ็มจีคือ 0.099, 0.099 – 0.782 และ 0.099 – 1.563 มคก/มล สำหรับ ไทอามูลิน ด๊อกซี่ซัยคลิน และ อ๊อคซี่เตตร้าซัยคลินและไทโลซิน ตามลำดับ ระดับค่าเอ็มไอซีต่อเชื้อเอ็มจีคือ 0.198 – 6.25, 0.395 – 6.25 และ 0.099 – 12.50 มคก/มล สำหรับ คลอร์เตตร้าซัยคลิน เอ็นโรฟล้อกซาซิน และ ลินโคมัยซินและทิลมิโคซิน ตามลำดับ ท้ายสุดคือ 0.099 - 50 และ 0.198 – 50 มคก/มล สำหรับ อีริโทรมัยซินและโจซามัยซินรวมกับไตรเมทโทรพริม และ โจซามัยซิน ตามลำดับ สำหรับ ระดับค่าเอ็มไอซีต่อเชื้อเอ็มจีมาตรฐานคือ 0.396 – 0.792 และ 1.563 – 3.125 มคก/มล สำหรับ อ๊อคซี่เตตร้าซัยคลิน คลอร์เตตร้าซัยคลิน และ ลินโคมัยซิน ส่วนยาปฏิชีวนะชนิดอื่น มีระดับค่าเอ็มไอซี 0.099 – 0.396 มคก/มล การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อเอ็มจีที่แยกได้มาจากบริเวณเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน มีระดับค่าเอ็มไอซีเหมือนหรือใกล้เคียงกัน โดยสรุป ยาปฏิชีวนะไทอามูลิน และ ด๊อกซี่ซัยคลิน มีระดับค่าเอ็มไอซีต่ำที่สุด ไทโลซิน อ๊อคซี่เตตร้าซัยคลิน คลอร์เตตร้าซัยคลิน และ เอ็นโรฟล้อกซาซิน มีระดับค่าเอ็มไอซีปานกลาง อีริโทรมัยซิน โจซามัยซินโจซามัยซินรวมกับไตรเมทโทรพริม ทิลมิโคซิน และ ลินโคมัยซิน มีระดับค่าเอ็มไอซีกว้างขึ้นอยู่กับเชื้อเอ็มจี ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นการรายงานครั้งแรกของค่าเอ็มไอซีต่อเชื้อเอ็มจีที่แยกได้ในประเทศไทยและเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนโปรแกรมการป้องกันและการรักษาต่อไป

คำสำคัญ:มัยโคพลาสมา กัลลิเซพติกุ่ม เอ็มไอซี ไก่ ประเทศไทย ยาปฏิชีวนะ

*ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์: 662 218 9404 โทรสาร: 662 255 3910

Executive Summary

In this study, molecular characterization and determination of antimicrobial resistance of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) isolates obtained from chicken farms from the eastern and central part of Thailand was investigated. Twenty MG isolates and the reference strains including S6, F, ts-11, and 6/85 were classified into groups using RAPD patterns and further used for determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) levels of eleven registered antibiotics. The results revealed that the 20 isolates of the identified MG could be classified into 5 groups by RAPD patterns. The same or nearby district showed the same group or same RAPD pattern. The average of MIC $\pm$ standard deviation against all isolates was chlortetracycline (2.73 $\pm$ 2.14 μg/ml), doxycycline (0.20 $\pm$ 0.23 μg/ml), enrofloxacin (2.46 $\pm$ 1.64 μg/ml), erythromycin (8.80 $\pm$ 18.55 μg/ml), josamycin (7.25 $\pm$ 16.20 μg/ml), josamycin combined with trimethoprim (9.40 $\pm$ 18.93 μg/ml), lincomycin (2.50 $\pm$ 3.01 μg/ml), oxytetracycline (0.25 $\pm$ 0.34 μg/ml), tiamulin (0.10 $\pm$ 0.00 μg/ml), tilmicosin (1.93 $\pm$ 4.21 μg/ml) and tylosin (0.33 $\pm$ 0.51 μg/ml). This study indicated that isolated MG from the same or nearby district gave the similar or narrow range of MICs. In conclusion, all isolates were susceptible to lincomycin, oxytetracycline, tiamulin and tylosin, whereas josamycin was possibly classified as intermediate against all isolates. Finally, enrofloxacin and erythromycin were classified as resistance. These results are the first report of molecular characterization and MIC values against MG isolates in Thailand and would be useful for planning of the effective prophylactic and therapeutic programs.

1. Introduction

Mycoplasma gallisepticum (MG) infections are commonly referred to a chronic respiratory disease (CRD) of chickens (Ley, 2003). MG is able to transmit by either horizontal and/or vertical routes. Affected birds exhibit respiratory signs including rales, sneezing, nasal and ocular discharge and even death. MG infection also has adverse effects on feed conversion rate, weight gain, egg production (Ley, 2003). Airsacculitis due to MG infections is mostly the cause of increasing condemnation at the processing plants. Various diagnostic methods have been used to identify the infection such as serum plate agglutination, ELISA, microbial culture and polymerase chain reaction (PCR) (Kleven and Yoder, 1989; Lauerman, 1998).

Prevention and control are the most important methods to manage MG infections. One of the practical ways to control and reduce the economic loss caused by MG infections is the use of antibiotics. Several antibiotics have been widely used for the control and prevention of avian mycoplasmas in many countries including Thailand. For *in vitro* study against various veterinary mycoplasmas, many groups of antibiotics including macrolides, tetracyclines, pleuromutilin, and fluoroquinolones were determined by Bradbury et al. (1994) and Hannan et al. (1997). It has also been observed that antibiotic usage for a long period of time can induce antibiotic resistance to the microorganisms (Lin, 1987; Gautier-Bouchardon et al., 2002). Therefore, antibiotic sensitivity test should be determined prior to launching a massive treatment. The Thai poultry industry has been using several antibiotics including chlortetracycline, doxycycline, enrofloxacin, erythromycin, josamycin, the combination of josamycin and trimethoprim, lincomycin, oxytetracycline, tiamulin, tilmicosin, and tylosin for the treatment of MG. However, information regarding the

minimum inhibitory concentration (MIC) of these drugs against MG isolates in Thailand has never been determined.

The purpose of this study was to classify the MG isolated from chicken farms in Thailand, using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and, then determined for the minimum inhibitory concentration (MIC) against these MG isolates. The result will be useful for planning of the effective prophylactic and therapeutic programs in the chicken farms in Thailand.

2. Materials and methods

2.1 Media

All mycoplasmas were cultured in Frey's broth medium (GIBCO Diagnostics, Madison, Wisconsin) supplemented with 15% swine serum (FMS) (Kleven and Yoder, 1989). The sterile broth was supplemented with swine serum, dextrose, cysteine, nicotinamide adenine dinucleotide, penicillin, thallium acetate, and phenol red. The agar medium was prepared by addition of 1% agar medium (Noble agar, Difco® Becton Dickinson, MD, USA) to the previously mentioned broth with the exception of phenol red.

2.2 Isolation and identification of field isolates

Samples were collected from 15 broiler farms and 30 broiler breeder farms, 15 samples of each farm, from the central and eastern parts of Thailand. Microbial cultures were obtained from trachea of chickens using sterile cotton swabs. The samples were inoculated into broth medium, and incubated at 37 ^{o}C. When the color of phenol red had changed from red to orange or yellow, the cultured broths were plated onto the agar medium further incubated at 37 ^{o}C. Mycoplasma colonies were identified as MG by a direct immunofluorescent assay (Kleven and Yoder, 1989) using fluorescein-conjugated rabbit antiserum provided by S.H. Kleven (Department of Avian Medicine, University of Georgia, Athens, GA). The original MG isolated cultures in the broth medium were then passaged and propagated until log phase then aliquoted and stored at –70 ^{o}C until used.

2.3 MG reference strains

MG S6 strain (ATCC 15302) was obtained from American Type Culture Collection. MG F (Schering-Plough Animal Health, Thailand), ts-11 (Fort Dodge

Animal Health, Thailand) and 6/85 (Nobilis®, Intervet International B.V., Thailand) strains were provided by local distributor of each vaccine strain.

2.4 Preparation of MG DNA for randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

The preparation of MG DNA was performed using the previously described protocol (Ley et al., 1997). Briefly, two ml of MG aliquot cultures consisting of approximately 10^9 colony forming unit (CFU) were pelleted by centrifugation, and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), resuspended with 25 µl of PBS. The pellete was then boiled for 10 min, quickly placed on ice for 5 min, and centrifuged. The supernatant containing DNA was collected and stored at 4 ^{o}C for PCR and RAPD testing.

2.5 PCR reaction

Amplified reaction was performed in a 50 µl volume as previously described by Lauermann (1998), each PCR mixture consisted of 2.5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP (Fermentas, USA), 10 pmole primer F (5' GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC 3'), 10 pmole primer R (5' GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC 3') (Qiagen, Germany), 2.5 U of Taq polymerase (Fermentas, USA), and 5 µl of MG DNA. Each reaction was performed concurrently with the S6 strain as a positive and the distilled water as a negative control. The amplification conditions were 94 ^{o}C for 30 sec, 55 ^{o}C for 30 sec, and 72 ^{o}C for 1 min for 40 cycles. The final extension cycles were 72 ^{o}C for 5 min. The expected amplification product was 185 base pairs (bp).

2.6 RAPD reaction

Two primer sets used for RAPD analyses were modified by Ley et al. (1997). Briefly, Geary primer set (Geary et al., 1994) was performed in a 50 µl volume, each RAPD mixture consisted of 2 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP (Fermentas, USA), 500 ng primer 1254 (5' CCGCAGCCAA 3') (Qiagen), 2.5 U of Taq polymerase (Fermentas,

USA) and 1 μl of MG DNA containing 50 to 100 ng DNA. The amplification conditions were performed starting with four cycles of 94 ^{o}C for 5 min, 36 ^{o}C for 5 min, and 72 ^{o}C for 5 min, ended by 30 cycles of 94 ^{o}C for 1 min, 36 ^{o}C for 1 min, and 72 ^{o}C for 1 min, and finally a cycle of 72 ^{o}C for 10 min. Fan primer set (Fan et al., 1995) was performed in a 50 μl volume, each RAPD mixture consisted of 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP (Fermentas, USA), 500 ng each primer M16SPCR5' (5' AGGCAGCAGTAGGGAAT 3'), S10LIGO3' (5' CATAACTAACATAAGGGCAA 3') M13F (5' GTAAAACGACGGC 3') (Qiagen, Germany) (1), 2.5 U of Taq polymerase (Fermentas, USA) and 1.5 μl of MG DNA containing 300 to 500 ng DNA. The amplification conditions were performed starting with three cycles of 94 ^{o}C for 15 sec, 28 ^{o}C for 2 min, and 74 ^{o}C for 3 min, ended by 35 cycles of 94 ^{o}C for 15 sec, 45 ^{o}C for 2 min, and 74 ^{o}C for 3 min, and finally a cycle of 72 ^{o}C for 10 min. The PCR banding pattern or genotypic profile will be analyzed by gel electrophoresis.

2.7 Gel electrophoresis

Amplified DNA products were separated by gel electrophoresis. A volume of 10 μl of amplified DNA was loaded to 2 % agarose (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) gels at 100 V. The gel was stained with 0.5 μg/ml ethidium bromide, and analysed by gel documentation system (Vilber Lourmat, France).

2.8 Mycoplasmas

All MG isolates were differentiated by RAPD and classified as groups by RAPD pattern. The similar pattern was classified as the same group. All isolates were propagated in FMS broth, aliquoted and stored at -70 ^{o}C until used.

2.9 Antibiotics

All tested antibiotics were registered and approved by Food and Drug Administration, Ministry of Public Health, Thailand. Eleven antibiotics including

chlortetracycline, doxycycline, enrofloxacin, josamycin, josamycin combined with trimethoprim, lincomycin, oxytetracycline, tiamulin, tilmicosin, and tylosin were used in this study. All drugs were formulated and diluted in FMS broth.

2.10 Titration of inoculum

Each isolate from frozen stocks was serially 10-folded dilution in FMS broth then dropped on a FMS agar plate, and incubated at 37 ^{o}C for 7 days. All cultured broths and agar plates were observed twice daily until the color of broth medium changed to yellow color and the colony was found on the agar plate under an inverted microscope. All cultured agar plates were determined as colony forming units (CFU)/ml then prepared as inocula for MIC determinations.

2.11 Determination of MICs by a serial broth dilution method

The determination of MICs by a serial broth dilution methods were previously described by Wang et al. (2001). Briefly, duplicate antibiotics were serially made twofold dilution in a 50 μl of FMS broth in sterile 96-well, flat-bottomed microtitration plates. The 150 μl of FMS broth containing MG organisms was added to each well containing antibiotics. The final MG organisms approximately 10^4 CFU/ml and the concentrations of antibiotics were 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.792, 0.396, 0.198, and 0.099 μg/ml. The positive and negative controls consisting of only MG organisms and FMS broth, respectively, were also included in each plate. The MICs were recorded on days 1, 2 and 7 after the positive control broth color was changed. The final MIC was observed after 14 days of incubation. The lowest concentration of each antibiotic that completely prevented the broth change of color from red to yellow was considered as MIC.

3. Results

Twenty MG isolates were identified by the direct immunofluorescence test. All twenty MG isolates were confirmed by PCR (Fig 1). All MG isolates were subsequently differentiated by RAPD with 2 sets of primers. Geary primer set could amplify and differentiate into 5 groups (A –E) (Fig 2), but the other 6 isolates could not be amplified then designed as unclassified group. However, the Fan primer set could identify all 5 different groups (Fig 3). All 5 groups amplified by both primer sets were concordance in each others. MG isolates classified in the same group were originated from the same or nearby district; however, all 5 groups were isolated from different farm locations. Furthermore, MG isolated in this study originated from the field strains, not originated from vaccine strains (Fig 2 and 3). In this study, all 20 MG isolates were further determined the MIC of antibiotics.

The MICs of the tested antibiotics including chlortetracycline, doxycycline, enrofloxacin, josamycin, josamycin combined with trimethoprim, lincomycin, oxytetracycline, tiamulin, tilmicosin, and tylosin against 20 MG isolates and four reference strains were shown in Table 1. The MICs against 20 MG isolates were classified into 8 ranges; 0.099 µg/ml as tiamulin, 0.099 – 0.792 µg/ml as doxycycline, 0.099 – 1.563 µg/ml as oxytetracycline and tylosin, 0.198 – 6.25 µg/ml as chlortetracycline, 0.396 – 6.25 µg/ml as enrofloxacin, 0.099 – 12.5 µg/ml as lincomycin and tilmicosin, 0.099 – 50 µg/ml as erythromycin and josamycin combined with trimethoprim, 0.198 – 50 µg/ml as josamycin. The MICs against MG reference strains including F, ts-11, 6/85 and S6 were classified into 3 ranges; 0.099 – 0.396 µg/ml as doxycycline, enrofloxacin, erythromycin, josamycin, josamycin combined with trimethoprim, tiamulin, tilmicosin and tylosin, 0.396 – 3.125 µg/ml as

oxytetracycline, and chlortetracycline, and 1.563 – 3.125 μg/ml as lincomycin, respectively.

Group A consisted of 3 MG isolates which showed the low levels of MICs of antibiotics including tiamulin, erythromycin, and doxycycline. Group B gave the low levels of MICs of antibiotics including doxycycline, tiamulin, and tylosin. Group C consisted of 4 MG isolates which gave the low levels of MICs of antibiotics including tiamulin, erythromycin, tilmicosin, and tylosin. Group D consisted of 4 MG isolates which gave the low levels of MICs of antibiotics including tiamulin, tylosin, and oxytetracycline. Group E consisted of 2 MG isolates which gave the low levels of MICs of antibiotics including tiamulin, doxycycline, and oxytetracycline. Unclassified group consisted of 6 MG isolates which gave the low levels of MICs of antibiotics including oxytetracycline, tiamulin, tilmicosin and tylosin. MG isolated in each group showed the similar or not wide range of MICs.

In this study, doxycycline and tiamulin gave the lowest level of MIC against all tested MG, whereas the oxytetracycline and tylosin had slightly higher level of MIC. Meanwhile, the MICs of erythromycin, josamycin and josamycin combined with trimethoprim were lower compared to other remaining antimicrobials except for groups B and E. In general, chlortetracycline, enrofloxacin and lincomycin had higher MICs, whereas tilmicosin showed a fluctuation of MIC levels depending on MG isolates.

4. Discussion

In this study, MG were isolated and identified by culture, and PCR methods, which are known as a gold standard diagnosis (Ley, 2003). Furthermore, all MG isolates were confirmed by direct immunofluorescence technique, which have been widely used in several laboratories (Gardella et al., 1983; Talkington and Kleven, 1983).

For the MG differentiation, primers designed by Geary et al. (1994) and Fan et al. (1995) were used in this study. Both sets of primers could relatively classify the Thai MG isolates into 5 groups (A, B, C, D, and E). RAPD analyses are useful for MG group identification and for molecular epidemiology (Ley et al., 1997). It was found that all 5 MG groups originated from different farm locations. This study also suggested that MG outbreaks in the same or nearby district were caused by the same isolate of MG.

At present, there were no studies on *in vitro* antimicrobial sensitivities and MIC against the MG isolates of Thailand. Numerous types of antibiotics have extensively applied to prevent and control MG infection. Therefore, chances of the antibiotic resistance developed in a farm are probably high (Lin, 1987). Due to the first MG study in Thailand, it is difficult to determine the differences in resistance among MG groups; therefore, this study has used S6 strain and other live vaccine strains including 6/85, ts-11 and F as reference strains compared with local isolates.

The liquid method for MICs against MG was determined in this study because of the simple and convenient method compared to agar or solid method (Hannan, 2000). Furthermore, the inhibitory zone of the agar method against MG has not been determined for some antibiotics (Jordan and Horrocks, 1996). Generally, the FMS broth medium usually consists of penicillin antibiotic, which inhibits the growth of

the other bacteria. In this study, penicillin was not added into the broth medium because all isolated MG were not contaminated by other bacteria. In addition, the effect of incompatibility between penicillin and tested antibiotics was not involved in this study. However, penicillin antibiotic can be added into the broth medium without any effects on MIC results (Whithear et al., 1983).

The MIC of tiamulin in the present study was the lowest, agreed to other reports (Jordan and Knight, 1984; Lin, 1987). This was possibly due to a little or rarely use of tiamulin in prevention and treatment of MG infection. Furthermore, there is a major concern on the adverse drug effect on the chicken health when used in combination with monensin, narasin, and salinomycin. Nevertheless, several groups reported that tiamulin is more effective to MG than tylosin, chlortetracycline, and erythromycin (Baughn et al., 1978; Jordan and Knight, 1984).

Doxycycline and oxytetracycline but not chlortetracycline showed a favorable MIC result at the concentration less than 0.396 µg/ml. The result was similar to the previous reports (Kleven and Anderson, 1971; Newnham, 1963). In this study, we demonstrated the resistance of MG to chlortetracycline possibly due to its frequent usage for a long period of time. The low MIC levels of doxycycline and oxytetracycline was probably because these antibiotics were just recently introduced in Thailand.

Interestingly, some macrolides such as erythromycin, josamycin, and tilmicosin gave a wide range of MICs. This is similar to the findings of Wu et al. (2005) that a high resistance to erythromycin and tilmicosin can be developed easily as quickly as within 8 passages. The resistance of erythromycin and related antibiotics to MG is probably due to mutations in the domain V loop of the 23S rRNA gene, leading to a reduction in the affinity of macrolides to ribosome (Lucier et al.,

1995; Gautier-Bouchardon et al., 2002, Wu et al., 2005). For this study, the used MG cultures were the first or second passage, thus it is unlikely test resistance was induced during the passage. However, the history of antibiotics uses in most of the farms indicated the use of prevention program with these antibiotics. Therefore, a wide range of MICs was possibly due to frequent usage of the antibiotics.

Groups A, C, and D exhibited similar profile of the MICs. Groups B and E of MG are likely to give such high MIC values compared with others. From the RAPD observation, the banding patterns obtained from groups B and E were also similar compared to each other. Furthermore, both groups were isolated from the adjacent farms. This indicated that groups B and E probably shared a conserved region resulting in a similar level of MICs.

In conclusion, the Thai MG isolates could be differentiated into 5 groups, and 6 unclassified isolates. The antibiotics, tiamulin and doxycycline both had the lowest MIC values against all 5 MG groups. Tylosin, oxytetracycline, chlortetracycline and enrofloxacin showed moderately inhibitory effect against MG. Erythromycin, josamycin, josamycin combined with trimethoprim, tilmicosin and lincomycin had a wide range of MIC values depending on a group of MG. To our knowledge, this is the first MIC determinations against Thai isolates. These data will be useful for the health management of poultry industry and a guideline for treatment of MG infection in poultry industry in Thailand.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Funds 2004-2006, MRG 4780010.

The authors would like to thank to the farm personals and the representatives of vaccine and pharmaceutical companies who collected samples from chicken farms.

References

Baughn, C.O., Alpaugh, W.C., Linkenheimer, W.H., Maplesden, D.C. 1978. Effect of tiamulin in chickens and turkeys infected experimentally with avian mycoplasma. Avian Dis. 22, 620-626.

Bradbury, J.M., Yavari, C.A., Giles, C.J. 1994. In vitro evaluation of various antimicrobials against *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by the micro-broth method, and comparison with a commercially prepared test system. Avian Pathol. 23, 105-115.

Fan, H.H., Kleven, S.H., Jackwood, M.W. 1995. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis. 39, 729 – 735.

Gardella, R.S., DelGiudice, R.A., Tully, J.G. 1983. Immunofluorescence. In: Razin, S., Tully, J.G. (Eds.), Methods in Mycoplasmology, vol. I, Mycoplasma Characterization. Academic Press, New York, pp. 431-439.

Gautier-Bouchardon, A.V., Reinhardt, A.K., Kobisch, M., Kempf, I. 2002. In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae*. Vet Microbiol. 88, 47-58.

Geary, S.J., Forsyth, M.H., Aboul Saoud S., Wang, G., Berg D.E., Berg C.M. 1994. *Mycoplasma gallisepticum* strain differentiation by arbitrary primer PCR (RAPD) fingerprinting. Mol Cell Probes. 8, 311 – 316.

Hannan, P.C.T., Windsor, G.D., de Jong, A. Schmeer, N., Stegemann, M. 1997. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. 41, 2037-2040.

Hannan, P.C.T. 2000. Guidelines and recommendation for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Vet Res. 31, 373-395.

Jordan, F.T.W., Knight, D. 1984. The minimum inhibitory concentration of kitasamycin, tylosin and tiamulin for *Mycoplasma gallisepticum* and their protective effect on infected chickens. Avian Pathol. 13, 151-162.

Jordan, F.T.W., Horrocks, B.K. 1996. The minimum inhibitory concentration of tilmicosin and tylosin for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and a comparison of their efficacy in the control of *Mycoplasma gallisepticum* infection in broiler chicks. Avian Dis. 40, 326-334.

Kleven, S.H., Anderson, D.P. 1971. In vitro activity of various antibiotics against *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis. 15, 551-557.

Kleven, S.H., Yoder, H.W. Jr. 1989. Mycoplasmosis. In: Purchase, H.G., Arp, L.H., Domermuth, C.H., Pearson, J.E. (Eds), A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, pp. 57-62.

Lauerman, L. H. 1998. Mycoplasma PCR assays In: Lauerman, L.H. (Ed.), Nucleic and Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Turlock, CA, pp. 41-42.

Ley, D.H., Berkhoff, J.E., Levisohn, S. 1997. Molecular epidemiology investigations of *Mycoplasma gallisepticum* conjunctivitis in songbirds by randomly amplified polymorphic DNA analyses. Emerg Infect Dis. 3, 375 –380.

Ley, D.H. 2003. *Mycoplasma gallisepticum* infection In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Swayne, D.E. (Eds.), Diseases of Poultry. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 122-144.

Lin, M.Y. 1987. In vitro comparison of the activity of various antibiotics and drugs against new Taiwan isolates and standard strains of avian mycoplasma. Avian Dis. 31, 705-712.

Lucier, T.S., Heitzman, K., Liu, S.K., Hu, P.C. 1995. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 39, 2770-2773.

Newnham, A.G. 1963. Antibiotics in the eradication of avian respiratory mycoplasmosis. A review of the literature together with the results of laboratory trials using chlortetracycline and demethylchlorotetracycline. Res Vet Sci. 4, 491.

Talkington, F.D., Kleven, S.H. 1983. A classification of laboratory strains of avian mycoplasma serotypes by direct immunofluorescence. Avian Dis. 27, 422-429.

Wang, C., Ewing, M., A'arabi, S.Y. 2001. In vitro susceptibility of avian Mycoplasmas to enrofloxacin, sarafloxacin, tylosin, and oxytetracycline. Avian Dis. 45, 456-460.

Whithear, K.G., Bowtell, D.D., Ghiocas, E., Hughes, K.L. 1983. Evaluation and use of a micro-broth dilution procedure for testing sensitivity. Avian Dis. 27, 937-949.

Wu, C.M., Wu, H., Ning, Y., Wang, J., Du, X., Shen, J. 2005. Induction of macrolide resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro and its resistance-related mutations within domain V of 23S rRNA. FEMS Microbiol Lett. 247, 199-205.

Table 1. MICs (μg/ml) against 5 local MG groups (A, B, C, D, and E), unclassified MG group (UC) and 4 reference strains (F, ts-11, 6/85, and S6)

Antimicrobials	Groups generated by RAPD and the reference isolates									
	A (3)*	**B (1)**	**C (4)**	**D (4)**	**E (2)**	**UC (6)**	**strain F**	**strain ts-11**	**strain 6/85**	**S6**
Chlortetracycline	0.198-1.563	6.25	3.125-6.25	1.563-6.25	3.125-6.25	0.396-1.563	1.563	3.125	3.125	3.125
Doxycycline	0.099	0.099	0.099-0.792	0.099-0.396	0.099-0.792	0.099	0.099	0.198	0.198	0.198
Enrofloxacin	0.792-3.125	3.125	0.792-3.125	1.563-6.25	3.125-6.25	0.396-3.125	0.099	0.099	0.099	0.099
Erythromycin	0.099-0.198	> 50	0.099	0.099-12.5	> 50	0.099-3.125	0.099	0.099	0.099	0.099
Josamycin	0.396	> 50	0.396-0.79	0.198-1.563	6.25-50	0.198-6.25	0.099	0.099	0.198	0.396
Josamycin +Trimetoprim	0.099-1.563	> 50	0.099	0.099-25	> 50	0.099-0.792	0.099	N.D.	0.099	0.099
Lincomycin	0.099-3.125	12.5	0.792-3.125	1.563-3.125	6.25	0.198-1.563	1.563	1.563	3.125	3.125
Oxytetracycline	0.099-1.563	0.396	0.099-0.198	0.099-0.198	0.396	0.099	0.396	0.792	3.125	0.792
Tiamulin	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099
Tilmicosin	0.099	12.5	0.099	1.563-0.099	3.125-12.5	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099
Tylosin	0.099	1.563	0.099	0.099	0.792-1.563	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099

N.D. = not determined

* ( ) = numbers of isolates of each MG group

Fig. 1. Gel electrophoresis analysis of MG DNA amplicon (185 bp). Lane 1: 100-bp ladder, 2: negative control, 3: 6/85, 4: ts-11, 5: F strain, 6: S6 strain, lane 7 –14 are samples from field isolates.

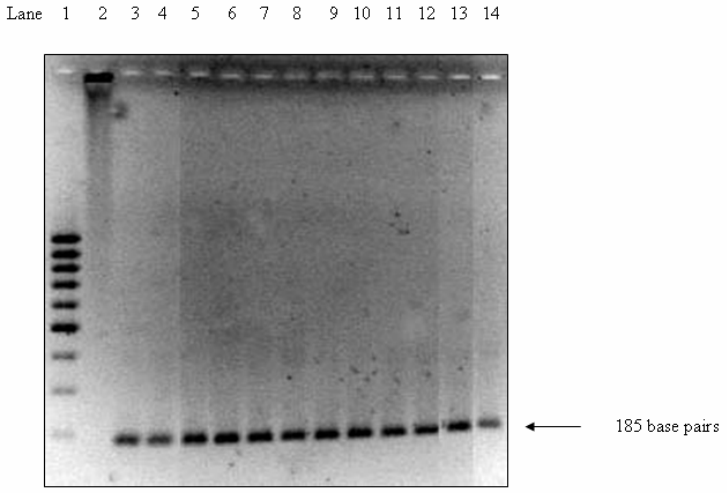


Fig. 2. RAPD analysis by Geary primer set. Lanes 1 and 16: 100-bp ladder, 2: and 17: negative control, 3: 6/85, 4: ts-11, 5: F strain, 6: S6 strain, 7 – 15 and 18 – 28 are samples from field isolates. A-E are groups generated by RAPD

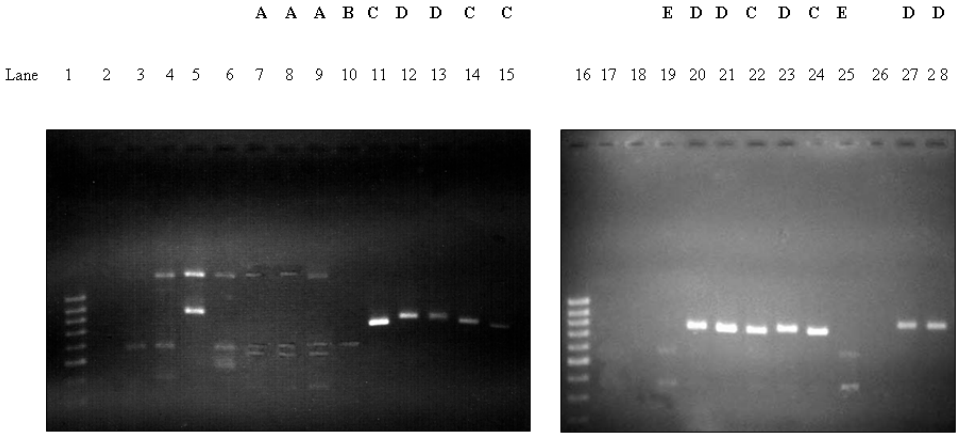
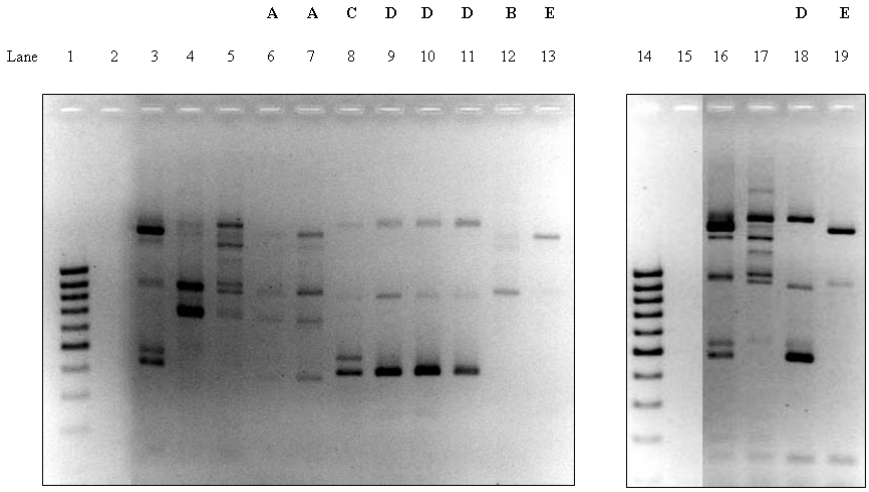


Fig. 3. RAPD analysis by Fan primer set. Lanes 1 and 14: 100-bp ladder, 2: and 15: negative control, 3: and 16: 6/85, 4: ts-11, 5 and 17: F strain, 6 – 13 and 18 – 19: samples are field isolates. A-E are groups generated by RAPD



Output

1. การเผยแพร่ผลงานวิจัยสู่สาธารณะชน

1.1. สัมมนาเชิงวิชาการแก่เกษตรกร และผู้สนใจ หัวข้อเรื่อง “Strategic Eradication of Avian Mycoplasma” ในวันที่ 3 และ 6 มีนาคม 2549 ณ. โรงแรมเมอร์เคียว กรุงเทพมหานคร จัดโดยบริษัทโนวาร์ตีส (ประเทศไทย) จำกัด

1.2. อบรมทางวิชาการ หัวข้อเรื่อง “ความสำคัญของปัญหามัยโคพลาสมา การหาค่า MIC ของเชื้อเอ็มจีในประเทศไทย” ในวันที่ 2 พฤษภาคม 2549 ณ. ห้องประชุมบริษัท เวท อะกริเทค จำกัด

1.3. อบรมทางวิชาการ หัวข้อเรื่อง “Update Mycoplasmosis in Poultry” ในวันที่ 16 มิถุนายน 2549 ณ. บริษัทอีไล ลิลลี่ เอเชีย อิงค์ (สาขาประเทศไทย)

2. Menuscript Draft submitted to Elsevier Editorial System ™ for Veterinary Microbiology

“Molecular characterization and determination of antimicrobial resistance of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from chickens in Thailand”

ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของเชื้อเอ็มจีในประเทศไทย

(ทุนวิจัย: สนับสนุนโดยคณะกรรมการอุดมศึกษาร่วมกับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2547; MGF4780010)

การศึกษาระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่ำสุด (minimum inhibitory concentration; MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็มจีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ซึ่งเชื้อเอ็มจีนี้แยกได้จากฟาร์มไก่บริเวณภาคกลางและภาคตะวันออกของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2545 - 2546 จำนวน 20 เชื้อ และนำมาผ่านการจัดแยกกลุ่มด้วยวิธีระดับดีเอ็นเอ (randomly amplified polymorphic DNA) หรือ fingerprinting procedure โดยผู้เขียน ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้จำนวน 5 กลุ่ม (A, B, C, D, and E) จากนั้นนำเชื้อเอ็มจี 5 กลุ่มนี้มาทำการศึกษาโดยดัดแปลงตามวิธีการของ Wang และคณะ (2001) การศึกษาครั้งนี้ใช้ยาปฏิชีวนะที่ได้รับการขึ้นทะเบียนยาในประเทศไทย และ ได้ผลต่อการรักษาโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ และ/หรือ โรคติดเชื้อมัยโคพลาสมา ดังนี้

กลุ่ม tetracyclines ได้แก่ chlortetracycline, doxycycline, oxytetracycline เป็นต้น

กลุ่ม macrolides ได้แก่ erythromycin, tylosin, tilmicosin, josamycin เป็นต้น

กลุ่ม fluoroquinolones ได้แก่ enrofloxacin เป็นต้น

กลุ่ม lincosamides ได้แก่ lincomycin เป็นต้น

กลุ่ม pleuromutilins ได้แก่ tiamulin เป็นต้น

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ค่า MIC ต่ำสุดคือ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.099 μg/ml คือ doxycycline และ tiamulin ค่า MIC ระหว่าง 0.198 – 0.395 μg/ml คือ oxytetracycline ค่า MIC ระหว่าง 0.099 – 1.563 μg/ml คือ tylosin ค่า MIC ระหว่าง 1.563 – 3.125 μg/ml คือ enrofloxacin ค่า MIC ระหว่าง 1.563 – 6.25 μg/ml คือ chlortetracycline ขณะที่ ค่า MIC ของ josamycin, josamycin combined with trimethoprim, lincomycin และ tilmicosin ค่อนข้างแตกต่างกันคือ ระหว่าง 0.198 – มากกว่า 50, น้อยกว่า 0.099 – มากกว่า 50, 3.125 – 12.5, และน้อยกว่า 0.099 – 12.5 μg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1: แสดงค่าระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่ำสุด (minimum inhibitory concentration; MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็มจีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ซึ่งเชื้อเอ็มจีนี้แยกได้จากฟาร์มไก่บริเวณภาคกลางและภาคตะวันออกของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2545 – 2546 จำนวน 5 กลุ่ม

Antimicrobial (μg/ml)	MG Group				
	A	B	C	D	E
Chlortetracycline	≤ 1.563	≤ 6.25	≤ 3.125	≤ 1.563	≤ 3.125
Doxycycline	< 0.099	≤ 0.099	< 0.099	< 0.099	≤ 0.099
Enrofloxacin	≤ 3.125	≤ 3.125	≤ 1.563	≤ 1.563	≤ 3.125
Erythromycin	< 0.099	> 50	< 0.099	< 0.099	> 50
Josamycin	≤ 0.395	> 50	≤ 0.395	≤ 0.198	> 50
Josamycin+Trimethoprim	< 0.099	> 50	< 0.099	< 0.099	> 50
Lincomycin	≤ 3.125	≤ 12.5	≤ 3.125	≤ 3.125	≤ 6.25
Oxytetracycline	≤ 0.395	≤ 0.395	≤ 0.198	≤ 0.198	≤ 0.395
Tiamulin	< 0.099	< 0.099	< 0.099	< 0.099	< 0.099
Tilmicosin	< 0.099	≤ 12.5	< 0.099	< 0.099	≤ 12.5
Tylosin	< 0.099	≤ 1.563	< 0.099	< 0.099	≤ 1.563

จากตารางที่ 1 พบว่าค่า MIC ของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อเอ็มจีแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกัน ซึ่งหากเปรียบเทียบกับค่า MIC ของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อเอ็มจีในไก่ที่แยกได้ในต่างประเทศที่รายงานโดย Burch และ Valks (2002) พบว่า ค่า MIC ของยา doxycycline, oxytetracycline, tiamulin และ tylosin ต่อเชื้อเอ็มจีที่แยกได้จากฟาร์มไก่ของประเทศไทยอยู่ในช่วงเดียวกันกับของค่า MIC ของยาเหล่านี้ต่อเชื้อเอ็มจีที่แยกได้ในต่างประเทศ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2: ค่า MIC ต่อเชื้อเอ็มจีในไก่ที่แยกได้ในประเทศและต่างประเทศ [a]

Antimicrobial (μg/ml)	Thai MG isolates (5)	Non Thai MG isolates (241)
Chlortetracycline	1.563 - 6.25	0.05 - 1.56
Doxycycline	≤ 0.099	0.006 - 0.2
Enrofloxacin	1.563 - 3.125	0.01 - 2.0
Erythromycin	≤ 0.099 - 50	1.5 – 75 [b]
Josamycin	0.198 - 50	2.7 [b]
Josamycin+Trimethoprim	≤ 0.099 - 50	no data
Lincomycin	3.125 - 12.5	3 [b]
Oxytetracycline	0.198 - 0.396	0.05 - 200
Tiamulin	≤ 0.099	0.0039 - 0.78
Tilmicosin	≤ 0.099 - 12.5	0.002 – 0.0025 [c]
Tylosin	≤ 0.099 - 1.563	0.006 - 400

[a] = ค่า MIC นำมาจาก Burch และ Valks (2002)

[b] = ค่า MIC นำมาจาก Lin (1987) (ทดสอบในอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อมัยโคพลาสมา)

[c] = ค่า MIC นำมาจาก Jordan และ Horrocks (1996)

อย่างไรก็ตาม การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะควรจะพิจารณา ความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสม่าภายหลังจากการกินยา (Cmax) ปกติในการรักษาหรือทำลายเชื้อโรคที่ได้ผลนั้น ค่า Cmax ควรสูงกว่าค่า MIC ขณะที่ค่าความเข้มข้นของยาในพลาสม่าภายหลังจากกินยาแล้ว 12 ชั่วโมง (C12 hrs) นั้นเป็นการพิจารณาว่าหลังจากการกินยาแล้ว 12 ชั่วโมง มีความเข้มข้นของยาในพลาสม่ามากน้อยเพียงไร สูงกว่าหรือต่ำกว่า MIC ซึ่งมีผลต่อการให้ยารักษา ได้แก่ จำเป็นต้องให้กินยาต่อเนื่องหรือไม่ ระยะเวลาการดูดซึมยาภายหลังจากการกินเข้าสู่กระแสเลือดเร็วหรือช้าอย่างไร นอกจากนี้การขจัดยาออกจากร่างกายเร็วหรือช้าอย่างไร ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการรักษาโรคติดเชื้อมัยโคพลาสมา (ตารางที่ 3)

ค่าความเข้มข้นของยาที่คงที่ในพลาสม่า หรือ steady state โดยคำนวณจากปริมาณความเข้มข้นของยาภายหลังจากการกินยาโดยเฉพาะยาในรูปละลายน้ำหรือผสมในอาหาร และความเข้มข้นของยาที่ร่างกายขจัดออก ว่ามีปริมาณความเข้มข้นเหลือเท่าใด

จากตารางที่ 3 พบว่าค่า C12 hrs ของยาที่แสดงในตาราง ลดลงอย่างมาก นอกจากนี้ยาบางกลุ่ม เช่น tilmicosin พบว่า รูปแบบการขจัดยาออกจากร่างกายค่อนข้างช้า มีการศึกษาทางเภสัชจลน์ศาสตร์ โดยให้ยา tilmicosin แก่ไก่กระทงตามขนาดที่แนะนำ พบว่า อนุมูลของยาที่ตกค้าง (residues) ในตับของวันที่ 3 คือ 2.6 ppm และ ของวันที่ 17 คือ 0.13 ppm (Botsoglou and Fletouris, 2001) แสดงว่ายาชนิดนี้คงอยู่ในร่างกายได้นานและอาจช่วยยับยั้งเชื้อหรือทำลายเชื้อได้ยาวนานขึ้น แต่ต้องพิจารณาระยะเวลาการตกค้างของยาในเนื้อเยื่อ หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ นอกจากนี้ ยาชนิดนี้ยังสามารถคงอยู่ในเนื้อเยื่อปอดได้นานถึง 48 ชั่วโมง โดยมีความเข้มข้นของยา 2.30 $\pm$ 0.72 μ/g ของเนื้อเยื่อปอด (Warren et al., 1997) จากการศึกษาของ Bernard และ Shryock (1998) พบว่าเม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่เก็บกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytes) สามารถดูดซึมยาและกระจายไปสู่บริเวณที่ติดเชื้อเอ็มจีได้ แต่อาจมีข้อจำกัดที่ว่าบริเวณที่มีการติดเชื้อนั้นต้องมีหลอดเลือดไปหล่อเลี้ยงจึงจะทำการรักษาได้ผล โดยปกติถุงลมนั้นเป็นบริเวณที่ไม่มีหลอดเลือดมาหล่อเลี้ยงหรือมีหลอดเลือดน้อยมาก เนื่องจากเม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่เก็บกินสิ่งแปลกปลอมนั้นจะอาศัยอยู่ภายในหลอดเลือด

ตารางที่ 3: ค่าเภสัชจลน์ศาสตร์ (pharmacokinetic data) ของยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ในไก่

Antimicrobial	Dose (mg/kg)	Conc. in water (ppm)	C max (µg/ml)	C12 hrs (µg/ml)	Steady state (µg/ml)	Reference
Chlortetracycline	25		0.2	0.04		
	50		0.4	0.14		
	100		2	0.2		Williams (1954)
	16	200			0.2	
	32	400			0.35	
	64	800			0.55	Ziv et al. (1997)
Doxycycline	20		54.58	7		Anadon et al. (1994)
	11 - 15	100	2.2		1.9 - 2.2	Espigol et al. (1997)
Enrofloxacin	10		1.88	0.25		Knoll et al. (1999)
	10	60 - 65			0.84	Ganiere et al. (1997)
Oxytetracycline	25		0.4	0.1		
	50		0.7	0.14		
	100		2	1.4		Williams (1954)
Tiamulin	25		1.7	0.17		
	50		3.56	0.59		Laber and Schutze (1977)
		125	0.65		0.38	(Reviewed by
		250	1.4		0.78	Burch and Valks, 2002)
Tylosin	50		4.2	0.25		(Reviewed by Burch and Valks, 2002)
		500	0.2		0.12	(Reviewed by Burch and Valks, 2002)

Cmax = ความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสม่าภายหลังจากกินยา

C12 hrs = ความเข้มข้นของยาในพลาสม่าภายหลังจากกินยาแล้ว 12 ชั่วโมง

Steady state = ความเข้มข้นของยาที่คงที่ในพลาสม่า

Doxycycline และ oxytetracycline เป็นยาปฏิชีวนะที่มีค่า MIC ค่อนข้างต่ำสำหรับการศึกษาครั้งนี้ อีกทั้งค่า Cmax และ ความไวของยา (sensitive) อยู่ในเกณฑ์ที่ดี แต่เนื่องจากยา

ชนิดนี้สามารถตรวจพบการตกค้างในไข่ค่อนข้างยาวนานถึง 13 วัน จากการให้ไก่ไข่กินยา oxytetracycline ละลายน้ำติดต่อกันนาน 7 วัน (Botsoglou and Fletouris, 2001)

Tiamulin เป็นยาปฏิชีวนะที่มีค่า MIC ต่ำที่สุดสำหรับการศึกษาครั้งนี้ส่วนค่า Cmax มีระดับค่าที่สูงกว่าค่า MIC รวมถึงค่า steady state และ ความไวของยาอยู่ในเกณฑ์ที่ดี (ตารางที่ 4 และ 5) แต่มีข้อจำกัดด้านการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดนี้ คือห้ามใช้ร่วมกันกับยากันบิด monensin, narasin และ salinomycin ในปริมาณที่เกินกว่าคำแนะนำของการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดนี้ มิฉะนั้นอาจจะเป็นพิษต่อตัวไก่ ไก่งวง หรือสัตว์ชนิดอื่น

ตารางที่ 4: การเปรียบเทียบระหว่างค่า Cmax และ steady state และ ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อเอ็มจีที่แยกได้ในประเทศไทย (µg/ml)

Antimicrobial	MIC	Cmax	Steady state
Chlortetracycline	1.563 - 6.25	2	0.55
Doxycycline	0.099	54.58	2.1
Enrofloxacin	1.563 - 3.125	1.88	0.84
Oxytetracycline	0.198 - 0.396	2	no data
Tiamulin	0.099	3.56	0.78
Tylosin	0.099 - 1.563	4.2	0.12

จากการศึกษาของ Lin (1987) ยาปฏิชีวนะที่มีค่า MIC_{90} (ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็มจีได้จำนวน 90 ตัวอย่างจากจำนวน 100 ตัวอย่างที่ศึกษา) ได้กล่าวว่า

ค่า MIC_{90} น้อยกว่า 5 µg/ml จัดว่า มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมโรคมัยโคพลาสโมซิสในท้องที่

ค่า MIC_{90} 6 - 10 µg/ml จัดว่ามีประสิทธิภาพดีในการควบคุมโรคมัยโคพลาสโมซิส

ค่า MIC_{90} 21 - 30 µg/ml จัดว่ามีประสิทธิภาพปานกลางในการควบคุมโรคมัยโคพลาสโมซิส เนื่องจากระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ทำการรักษาในกระแสเลือดนั้น สูงกว่าค่า MIC นี้ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมัยโคพลาสมา และลดความรุนแรงของรอยโรคในไก่ได้

ค่า MIC_{90} มากกว่า 30 µg/ml จัดว่าไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคมัยโคพลาสโมซิส

จากการรวบรวมข้อมูลของ Hannan (2000) ที่มีการกำหนดค่า MIC แล้วเปรียบเทียบเป็นความไวของยา (sensitive) ความไวปานกลาง (intermediate) และความต้านทาน (resistant) ต่อเชื้อเอ็มจี ซึ่งค่าที่แสดงนี้เป็นค่าที่ช่วยในการแปลผล และการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็มจี (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5: ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะที่แสดงระดับความไวของยา (sensitive) ความไวปานกลาง (intermediate) และ ความต้านทาน (resistant) ต่อเชื้อเอ็มจี

Antimicrobial	ค่า MIC (μg/ml)		
	Sensitive	Intermediate	Resistant
Enrofloxacin	≤ 0.05	≤ 1	≥ 2
Erythromycin	≤ 1	≤ 2	≥ 4
Josamycin	≤ 2-8	≤ 8	> 8
Lincomycin	≤ 2-8	≤ 8	> 8
Oxytetracycline	≤ 4	8	≥ 16
Tiamulin	≤ 8	-	≥ 16
Tylosin	≤ 1	≤ 2	≥ 4

ที่มา: ดัดแปลงมาจากการรวบรวมของ Hannan (2000) p: 391

การรักษาโรคติดเชื้อเอ็มจี

1. เชื้อเอ็มจีมีความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดได้แก่ กลุ่มแมคโคลีด (macrolides) เตตร้าซัยคลิน (tetracyclines) ฟลูโอโรควิโนโลน (fluoroquinolones) และอื่น ๆ

2. ยาปฏิชีวนะที่ได้ผลสามารถรักษาโรคติดเชื้อเอ็มจีของทางเดินหายใจ และช่วยลดปัญหาไข่ลดและการแพร่เชื้อผ่านไข่ และอาจจะช่วยลดอาการของโรค รอยโรค และจำนวนเชื้อเอ็มจีของทางเดินหายใจ

3. ห้ามนำยาปฏิชีวนะต่างๆมาใช้รักษาโรคติดเชื้อเอ็มจีในไก่ไข่ เนื่องจากอาจจะมีการตกค้างของยาในไข่

4. ยาปฏิชีวนะที่มีรายงานการใช้ได้แก่ ยาอ๊อกซี่เตตร้าซัยคลิน (oxytetracycline) หรือคลอร์เตตร้าซัยคลิน (chlortetracycline) ในการผสมอาหาร ไทโลซิน (tylosin) ผสมน้ำกินหรือฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ไทอามูลิน (tiamulin) ไทอามูลินร่วมกับซาลิโนมัยซิน (salinomycin) สเตรปโตมัยซิน

(streptomycin) ไดไฮโดรสเตรปโตมัยซิน (dihydrostreptomycin) อีริโทรมัยซิน (erythromycin) สไปรามัยซิน (spiramycin) ฟลูโอโรควิโนโลน และทิลมิโคซิน (tilmicosin)

ยาที่ใช้สามารถทำได้ทั้งการผสมยาในอาหาร ผสมยาในน้ำ หรือจับฉีดเป็นรายตัว

ไทอามูลิน ห้ามใช้ร่วมกับยากันบิดโมเนนซิน นาราซิน และซาลิโนมัยซิน แต่สามารถใช้ร่วมกับยากันบิดตัวอื่นได้

5. การควบคุมการแพร่เชื้อเอ็มจีผ่านไข่ ด้วยวิธีการฉีดยาปฏิชีวนะลินโคสเป็คตินเข้าสู่ไข่หรือจุ่มไข่ในน้ำที่ผสมยาปฏิชีวนะไทโลซินหรือเจนต้ามัยซินภายใต้อุณหภูมิและความดันที่เหมาะสม แต่อาจจะมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ฟักและการปนเปื้อนจากแบคทีเรียชนิดอื่น

6. การกำจัดโรคติดเชื้อเอ็มจีด้วยวิธีการใช้ยาปฏิชีวนะภายในฝูงไก่ (mass antimicrobial therapy) อาจไม่ได้ผลตามที่คาดหวัง และควรคำนึงถึงความคุ้มทางเศรษฐกิจ และการตกค้างของยาในผลิตภัณฑ์

บทสรุป

ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการที่จะพิจารณาในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุม ป้องกัน หรือรักษาโรคติดเชื้อเอ็มจี ซึ่งผู้เขียนได้รวบรวมค่า MIC ต่อเชื้อเอ็มจีจากที่มีการรายงานของตางประเทศเพื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ต่อเชื้อเอ็มจีของบ้านเรา อย่างไรก็ตามค่า MIC ของยาปฏิชีวนะชนิดเดียวกันต่อเชื้อเอ็มจีบางกลุ่มที่พบในบ้านเรานั้น มีค่า MIC ที่ค่อนข้างแตกต่างกันอาจเนื่องจาก เชื้อเอ็มจีที่นำมาศึกษาเกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดนั้น

การใช้ยาปฏิชีวนะให้ได้ผลดีต่อเชื้อเอ็มจีนั้น ตัวยาหรือตัวออกฤทธิ์จะต้องสัมผัสโดยตรงกับตัวเชื้อเอ็มจี แต่หากมีการอักเสบแบบหนองหรือไฟบรินคลุมบริเวณที่มีเชื้อเอ็มจี ทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถแทรกผ่านไฟบรินหรือหนองเข้าไปสัมผัสกับเชื้อเอ็มจี เชื้อเอ็มจีก็ไม่ถูกทำลายด้วยยา ดังนั้น ตัวไก่ยังคงมีเชื้อเอ็มจีต่อไป แต่อาการและความรุนแรงของโรคติดเชื้อที่ไก่แสดงออกมาอาจดีขึ้นได้เนื่องจากยาปฏิชีวนะที่ให้นั้นช่วยยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนอื่น นอกจากนี้เชื้อเอ็มจีอาจยึดเกาะติดกับถุงลม (airsacs) ซึ่งถุงลมเป็นอวัยวะที่ไม่มีหลอดเลือดมาหล่อเลี้ยง ทำให้ยาปฏิชีวนะที่อยู่ในกระแสเลือดไม่สามารถผ่านเข้าไปทำลายเชื้อเอ็มจี

การกำจัดโรคติดเชื้อเอ็มจีด้วยวิธีการใช้ยาปฏิชีวนะภายในฝูงไก่ (mass antimicrobial therapy) อาจไม่ได้ผลตามที่คาดหวัง และควรคำนึงถึงความคุ้มทางเศรษฐกิจ และการตกค้างของยาในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ แต่การรักษาด้วยยาจะเป็นการบรรเทาความรุนแรงของโรคและความ

สูญเสียทางเศรษฐกิจในระยะสั้น มากกว่าเป็นการแก้ปัญหาระยะยาว และจำเป็นอย่างยิ่งที่จะทำให้ฟาร์มปลอดจากเชื้อเอ็มจีด้วยวิธีต่าง ๆ ที่สำคัญคือความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity)

เอกสารประกอบการเรียบเรียง

Anadon, A., Martinez-Larranaga, M.R., Diaz, M.J., Bringas, P., Fernandez, M.C., Fernandez-Cruz, M.L., Iturbe, J., and Martinez, M.A. 1994. Pharmacokinetics of Doxycycline in Broiler Chickens. Avian Pathol. 23 (1): 79-90.

Burch, D.G.S. and Valks, M. 2002. Comparison of Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) against Chicken Mycoplasma of Tiamulin and Other Antimicrobials and their Concentrations in the Blood. Proceedings of the World Veterinary Poultry Congress, Cairo, Egypt. January 2002. p: 322.

Bernard, S., and Shryock, T.R. 1998. Intracellular Accumulation, Subcellular Distribution, and Efflux of Tilmicosin in chicken Phagocytes. Poult Sci. 77 (10): 1510-1521.

Botsoglou, N.A., and Fletouris, D.J. 2001. Antibacterial Drugs. In: Drug Residues in Foods, Pharmacology, Food Safety, and Analysis. Marcel Dekler, Inc., NY. p: 27-115.

Espigol, C., Artigas, C., Palmada, J., and Pages, A. 1997. Serum Levels of Doxycycline during Water Treatment in Poultry. J Vet Pharmacol Therp. 20 (Suppl.1): 192-193.

Ganiere, J.P., Hervouet, P., Delaporte, J., and Froyman, R. 1997. Serum Kinetics of Enrofloxacin in Chickens during Continuous Drinking Water Medication. J Vet Pharmacol Therp. 20 (Suppl.1): 202-203.

Hannan, P.C.T. 2000. Guidelines and Recommendations for Antimicrobial Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Testing Against Veterinary Mycoplasma Species. Vet Res. 31 (4): 373-395.

Jordan, F.T.W., and Horrocks, B.K. 1996. The Minimum Inhibitory Concentration of Tilmicosin and Tylosin for Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae and a Comparison of Their Efficacy in the Control of Mycoplasma gallisepticum Infection in Broiler Chicks. Avian Dis. 40(2): 326-334.

Knoll U, Glunder G. and Kietzmann M. 1999. Comparative study of the plasma pharmacokinetics and tissue concentrations of danofloxacin and enrofloxacin in broiler chickens. J Vet Pharmacol Ther. 22 (4): 239-246.

Laber, G. and Schutze, E. 1977. Blood Level Studies in Chickens, Turkey Poults and Swine with Tiamulin, a New Antibiotic. J Antibiot (Tokyo). 30 (12): 1119-1122.

Lin, M.Y. 1987. In Vitro Comparison of the Activity of Various Antibiotics and Drugs against New Taiwan Isolates and Standard Strains of Avian Mycoplasma. Avian Dis. 31 (4): 705-712.

Wang, C., Ewing, M., and A'arabi, S.Y. 2001. In Vitro Susceptibility of Avian Mycoplasma to Enrofloxacin, Sarafloxacin, Tylosin, and Oxytetracycline. Avian Dis. 45 (2): 456-460.

Warren, M.J., Peters, A.R., Brett, T.R., and Stocker, J. 1997. Lung and airsac concentrations of tilmicosin following oral administration in chicken. J Vet Pharmacol Therp. 20 (1): 195-196.

Williams, S.H. 1954. Serum Levels of Penicillin, Dihydrostrptomycin, Chloramphenicol, Aureomycin and Terramycin in Chickens. J Comp Pathol. 64 (3): 225-233.

Ziv, G., Shem-Tov, M., Glickman, A., Weisman, Y., and Saran, A. 1997. Serum Oxytetracycline and Chlortetracycline Concentrations in Broilers and Turkeys Treated with High Doses of the Drugs via the Feed and Water. J Vet Pharmacol Therp. 20 (Suppl.1): 181-182.

บทความนี้ได้เผยแพร่โดยการจัดสัมมนาเชิงวิชาการแก่เกษตรกร และผู้สนใจ หัวข้อเรื่อง "Strategic Eradication of Avian Mycoplasma" ในวันที่ 3 และ 6 มีนาคม 2549 ณ. โรงแรมเมอร์เคียว กรุงเทพมหานคร จัดโดยบริษัทโนวาร์ตีส (ประเทศไทย) จำกัด

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary Microbiology

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Molecular characterization and determination of antimicrobial resistance of Mycoplasma gallisepticum isolated from chickens in Thailand

Article Type: Research Paper

Section/Category:

Keywords: Mycoplasma gallisepticum; RAPD; MIC; Chicken; Thailand; Antibiotics

Corresponding Author: Dr. Somsak Pakpinyo, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Chulalongkorn University

First Author: Somsak Pakpinyo, DVM., Ph.D.

Order of Authors: Somsak Pakpinyo, DVM., Ph.D.; Jiroj Sasipreeyajan, DVM., Ph.D.

Manuscript Region of Origin:

Abstract:

Molecular characterization and determination of antimicrobial resistance of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from chickens in Thailand

Somsak Pakpinyo[a,*], Jiroj Sasipreeyajan[a]

[a]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri Dunant Rd., Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

*Corresponding author. Tel.: 662 218 9404; fax: 662 255 3910

E-mail address: somsak.pa@chula.ac.th

Molecular characterization and determination of antimicrobial resistance of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from chickens in Thailand

Somsak Pakpinyo[a.*], Jiroj Sasipreeyajan[a]

[a]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri Dunant Rd., Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

Abstract

In this study, molecular characterization and determination of antimicrobial resistance of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) isolates obtained from chicken farms from the eastern and central part of Thailand was investigated. Twenty MG isolates and the reference strains including S6, F, ts-11, and 6/85 were characterized and classified by the RAPD patterns and further used for determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) levels of eleven registered antibiotics. The results revealed that the 20 isolates of the identified MG could be classified into 5 groups (A – E) and 1 unclassified group. Interestingly, the MG isolated from same or nearby district exhibited similar RAPD pattern. The overall means MICs were chlortetracycline (2.73 µg/ml), doxycycline (0.20 µg/ml), enrofloxacin (2.46 µg/ml), erythromycin (8.80 µg/ml), josamycin (7.25 µg/ml), josamycin combined with trimethoprim (9.40 µg/ml), lincomycin (2.50 µg/ml), oxytetracycline (0.25 µg/ml), tiamulin (0.10 µg/ml), tilmicosin (1.93 µg/ml) and tylosin (0.33 µg/ml). Break point comparisons suggested that the Thai MG isolates were sensitive to lincomycin, oxytetracycline, tiamulin and tylosin, intermediately sensitive to josamycin and resistant to enrofloxacin and erythromycin. The results also indicated that MG isolated from the same or nearby district had similar patterns of antimicrobial resistance and the frequent use of antibiotics could be related to the patterns of antimicrobial resistance among the MG isolates. To our knowledge, these results are

the first report of molecular characterization and MIC values against MG isolates in Thailand. The information from this result will be useful for planning of the effective prophylactic and therapeutic programs.

Keywords: Mycoplasma gallisepticum; RAPD; MIC; Chicken; Thailand; Antibiotics

*Corresponding author. Tel.: 662 218 9404; fax: 662 255 3910

E-mail address: somsak.pa@chula.ac.th

1. Introduction

Mycoplasma gallisepticum (MG) infection is commonly referred to a chronic respiratory disease (CRD) of chickens (Ley, 2003). MG is able to transmit by horizontal and/or vertical routes. Affected birds exhibit respiratory signs including rales, sneezing, nasal and ocular discharges and even death. MG infection also has adverse effects on feed conversion rate, weight gain, egg production (Ley, 2003). Airsacculitis due to MG infections is mostly the cause of increasing condemnation at the processing plants. Various diagnostic methods have been used to identify the infection such as serum plate agglutination, ELISA, microbial culture and polymerase chain reaction (PCR) (Kleven and Yoder, 1989; Lauerman, 1998).

Prevention and control is the important methods to manage MG infection. One of the practical ways to control and reduce the economic loss by MG infection is the use of antibiotics. Several antibiotics have been widely used for the control and prevention of avian mycoplasmas in poultry industry worldwide. For *in vitro* study against various veterinary mycoplasmas, many groups of antibiotics including macrolides, tetracyclines, pleuromutilin, and fluoroquinolones were shown to be effective (Bradbury et al., 1994; Hannan et al., 1997). It has also been observed that antibiotic usage for a long period of time can induce antibiotic resistance to the MG organisms (Lin, 1987; Gautier-Bouchardon et al., 2002). Therefore, antibiotic sensitivity test should be determined prior to launching a massive treatment. The Thai poultry industry has been using several antibiotics including chlortetracycline, doxycycline, enrofloxacin, erythromycin, josamycin, the combination of josamycin and trimethoprim, lincomycin, oxytetracycline, tiamulin, tilmicosin, and tylosin for the treatment of MG infection. However, information regarding the minimum

inhibitory concentration (MIC) of these drugs against MG isolates in Thailand has never been determined.

The purpose of this study was to characterize the MG isolated from chicken farms in Thailand, using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Furthermore, the minimum inhibitory concentration (MIC) levels against these MG isolates were determined.

2. Materials and methods

2.1 Media

All mycoplasmas were cultured in Frey's broth medium (GIBCO Diagnostics, Madison, Wisconsin) described by Kleven and Yoder, 1989. The sterile broth was supplemented with 15% swine serum, dextrose, cysteine, nicotinamide adenine dinucleotide, penicillin, thallium acetate, and phenol, and referred as Frey's broth medium supplemented with swine serum (FMS). For determination of MIC values, penicillin was omitted in FMS. The agar medium was prepared by addition of 1% agar medium (Noble agar, Difco® Becton Dickinson, MD, USA) to the FMS with the exception of phenol red.

2.2 Isolation and identification of the field isolates

Samples (15 samples /farm) were collected from 15 broiler farms and 30 broiler breeder farms from the central and eastern part of Thailand. Microbial cultures were obtained from tracheal swabs. The samples were inoculated into broth medium, and incubated at 37 ^{o}C. When the broth color changed from red to orange or yellow, the cultured broths were then plated onto the agar medium and further incubated at 37 ^{o}C. *Mycoplasma gallisepticum* colonies were identified by a direct immunofluorescent assay (Kleven and Yoder, 1989) using fluorescein-conjugated

rabbit antiserum provided by S.H. Kleven (Department of Avian Medicine, University of Georgia, Athens, GA). The original MG cultures in the broth medium were then passaged and propagated until log phase, then aliquoted and stored at –70 °C until used.

2.3 MG reference strains

MG S6 strain (ATCC 15302) was obtained from American Type Culture Collection. MG F (Schering-Plough Animal Health, Thailand), ts-11 (Fort Dodge Animal Health, Thailand) and 6/85 (Nobilis®, Intervet International B.V., Thailand) vaccine strains were provided by local distributors.

2.4 Preparation of MG DNA for randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

The preparation of MG DNA was performed using the previously described protocol (Ley et al., 1997). Briefly, two ml of MG aliquot cultures consisting of approximately 10^9 colony forming unit (CFU) were pelleted by centrifugation, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended with 25 µl of PBS. The pellet was then boiled for 10 min, quickly placed on ice for 5 min, and centrifuged. The supernatant containing DNA was collected and stored at 4 °C for further PCR and RAPD analyses.

2.5 PCR reaction

Amplified reaction was performed in a 50 µl volume using the previously described protocol (Lauermann, 1998), each PCR mixture consisted of 2.5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP (Fermentas, USA), 10 pmole primer F (5' GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC 3'), 10 pmole primer R (5' GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC 3') (Qiagen, Germany), 2.5 U of Taq polymerase (Fermentas, USA), and 5 µl of MG DNA. Each reaction was performed concurrently with the S6 strain as a positive and the distilled water as a negative control. The

amplification conditions were 94 °C for 30 sec, 55 °C for 30 sec, and 72 °C for 1 min for 40 cycles. The final extension cycles were 72 °C for 5 min. The expected amplification product was 185 base pairs (bp).

2.6 RAPD reaction

The primer set for RAPD analyses were modified from Ley et al. (1997). Briefly, Geary primer set (Geary et al., 1994) was performed in a 50 µl volume, each RAPD mixture consisted of 2 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP (Fermentas, USA), 500 ng primer 1254 (5' CCGCAGCCAA 3') (Qiagen, Germany), 2.5 U of Taq polymerase (Fermentas, USA) and 1 µl of MG DNA containing 50 to 100 ng DNA. The amplification conditions were performed starting with four cycles of 94 °C for 5 min, 36 °C for 5 min, and 72 °C for 5 min, ended by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 36 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, and finally a cycle of 72 °C for 10 min. The PCR banding pattern or genotypic profile was analyzed by agarose gel electrophoresis.

2.7 Gel electrophoresis

A volume of 10 µl of the amplified DNA products was loaded to 2 % agarose (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) gels, and separated by agarose gel electrophoresis. The gel was stained with 0.5 µg/ml ethidium bromide, and analyzed by gel documentation system (Vilber Lourmat, France).

2.8 Antibiotics

All tested antibiotics were registered and approved by Food and Drug Administration, Ministry of Public Health, Thailand. Eleven antibiotics including chlortetracycline, doxycycline, enrofloxacin, josamycin, josamycin combined with trimethoprim, lincomycin, oxytetracycline, tiamulin, tilmicosin, and tylosin were used in this study. All drugs were formulated and diluted in FMS broth.

2.9 Titration of inoculum

Each isolate from frozen stocks was 10-folded, serially dilution in FMS broth then dropped on a FMS agar plate, and incubated at 37 ^{o}C for 7 days. All cultured broths and agar plates were observed twice daily until the color of the broth medium changed to yellow color and the colony was found on the agar plate under an inverted microscope. The concentration of MG on the cultured agar plates were determined as colony forming units (CFU)/ml. The frozen stocks were used as inocula for MIC determinations.

2.10 Determination of MICs by a serial broth dilution method

The determination of MICs by a serial broth dilution methods were previously described by Wang et al. (2001). Briefly, duplicate wells of antibiotics were two-folded, serially diluted in a 50 µl of FMS broth in sterile 96-well, flat-bottomed microtitration plates. The 150 µl of FMS broth containing MG organisms was added to each well containing antibiotics. The final concentrations of antibiotics were 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.792, 0.396, 0.198, and 0.099 µg/ml. The final concentration of the MG organisms was approximately 10^4 CFU/ml. The positive and negative controls consisting of only MG organisms and FMS broth, respectively, were also included in each plate. The MICs were recorded on days 1, 2 and 7 after the positive control broth color was changed. The final MIC was assessed 14 days following incubation. The lowest concentration of each antibiotic that completely prevented the broth change of color from red to yellow was considered as MIC.

3. Results

One hundred and thirty four MG isolates from 12 broiler farms and 8 broiler breeder farms were identified by the direct immunofluorescence test. All MG isolates

were confirmed by PCR. Twenty MG isolates were chosen as the representatives of each farm and 8 MG isolates were shown in Fig 1. All 20 MG isolates were subsequently characterized by RAPD. The Geary primer set could amplify and differentiate MG isolates to 5 groups (A –E), except the 2 isolates which were designed as unclassified group (U) (Fig 2). Interestingly, MG isolates classified in the same group were originated from the same or nearby district. But all 5 groups were isolated from different farm locations, approximately at least 40 kilometers in distance (data not shown). All 20 MG isolates were further determined the MIC of antibiotics.

It should be noted that the range of MIC levels among MG isolated with in the same group were apparently similar exception with enrofloxacin and erythromycin showed a wide range of MIC values. However, groups A, C and D showed the similar patterns of MIC values; meanwhile, groups B and E had a wide range of the MIC values of erythromycin, josamycin, josamycin combined with trimethoprim lincomycin and tilmicosin. In this study, doxycycline and tiamulin gave the lowest level of MIC against all the tested MG isolates, whereas the oxytetracycline and tylosin had slightly higher level of MIC. In general, chlortetracycline, enrofloxacin and lincomycin had higher MICs, whereas tilmicosin showed a fluctuation of MIC levels depending on MG isolates. Interestingly, all tested antibiotics against all reference strains had a narrow range of the MIC levels.

The MICs of the tested antibiotics including chlortetracycline, doxycycline, enrofloxacin, josamycin, josamycin combined with trimethoprim, lincomycin, oxytetracycline, tiamulin, tilmicosin, and tylosin against the 20 MG isolates and four reference strains were shown in Table 1. Comparing with the break points of MIC levels, all isolates were sensitive to lincomycin, oxytetracycline, tiamulin and tylosin, whereas josamycin was possibly classified as intermediately sensitive against all

isolates. Finally, enrofloxacin and erythromycin were classified as resistance. Furthermore, all tested antibiotics could be classified as the sensitive against the reference strains. However, antimicrobial sensitivities of chlortetracycline, doxycycline, josamycin combined with trimethoprim and tilmicosin against MG isolates could not be determined because there were no reports of the breakpoint data.

From history taking of each farm in groups B and E, they frequently used antibiotics including enrofloxacin, erythromycin, and lincomycin in prevention, control and therapeutic of respiratory diseases and vaccine reaction. In addition, the frequent usage of enrofloxacin of farms in groups A, C and D showed similar patterns of antimicrobial resistance (data not shown).

4. Discussion

In this study, MG were isolated and identified by culture, and PCR methods, which are known as a gold standard diagnosis (Ley, 2003). Furthermore, all MG isolates were confirmed by direct immunofluorescence technique, which have been widely used in several laboratories (Gardella et al., 1983; Talkington and Kleven, 1983).

The liquid method for MICs against MG was used in this study because of the simple and convenient method compared to agar or solid method (Hannan, 2000). Furthermore, the inhibitory zone of the agar method against MG has not been determined for some antibiotics (Jordan and Horrocks, 1996). Generally, the FMS broth medium usually consists of penicillin antibiotic, which can inhibit the growth of the other bacteria. It has also been shown that penicillin can be added into the broth medium without any effects on MG organisms (Whithear et al., 1983). In this study,

1 penicillin was not added into the broth medium; therefore, there was no interference
2 effect caused by interaction between penicillin and tested antibiotics in this study.
3 RAPD analyses are useful for MG group identification and for molecular
4 epidemiology (Ley et al., 1997). For characterization of the MG isolates, primer set
5 designed by Geary et al. (1994) was used in this study. The primer set could classify
6 the Thai MG isolates into 5 groups (A, B, C, D, and E). The 5 MG groups were
7 originated from different farm locations, suggesting that MG outbreaks in the same or
8 nearby district were likely to cause by the closely related MG strains. This
9 information should be useful for determination of routes of transmission and
10 designing of the prevention and control program of MG in each area.
11 Numerous types of antibiotics have extensively applied to prevent and control
12 MG infection. At present, there were no studies on *in vitro* antimicrobial sensitivities
13 and MIC against the MG isolates of Thailand. Therefore, chances of the antibiotic
14 resistance developed in a farm are probably high (Lin, 1987). Due to the limited
15 information, it is difficult to compare levels of antibiotic resistance among the MG
16 groups. Therefore, this study has used the S6 strain and other live vaccine strains
17 including 6/85, ts-11 and F as reference strains, which are not exposed to antibiotics
18 against mycoplasma, compared with MG isolates. This suggested that MG isolates of
19 Thailand developed the antibiotic resistance including enrofloxacin and erythromycin.
20 Consistent to other reports (Hannan, 2000; Jordan and Knight, 1984; Lin,
21 1987), the MIC of tiamulin in the present study was the lowest which could be
22 classified as the effective antibiotics against MG. This was possibly due to little or
23 rarely use of tiamulin in prevention and treatment of MG infection. Furthermore,
24 there is a major concern on the adverse drug effect on the chicken health when used in
25 combination with monensin, narasin, and salinomycin (Horrox, 1980). Nevertheless,

several groups reported that tiamulin is more effective to MG than tylosin, chlortetracycline, and erythromycin (Baughn et al., 1978; Jordan and Knight, 1984).

Doxycycline and oxytetracycline but not chlortetracycline showed a favorable MIC result at the concentration less than 0.254 µg/ml. The result was similar to the previous reports (Kleven and Anderson, 1971; Newnham, 1963). The MIC breakpoint of oxytetracycline was greater than 16 µg/ml (reviewed in Hannan, 2000); therefore, all isolates were susceptible to oxytetracycline. Unfortunately, microbial resistant to doxycycline and oxytetracycline of the present study could not be analyzed since the MIC breakpoint data of both doxycycline and chlortetracycline have not been reported. In this study, we demonstrated the resistance of MG to chlortetracycline. This finding is possibly due to its frequent usage of the antibiotics for a long period of time in Thai chicken farms. The low MIC levels of doxycycline and oxytetracycline was probably because these antibiotics were just recently introduced in Thailand.

Some macrolides such as erythromycin, josamycin, and tilmicosin gave a wide range of MICs. This is similar to the findings of Wu et al. (2005) that a high resistance to erythromycin and tilmicosin can be developed as quickly as within 8 passages. The resistance of erythromycin and related antibiotics to MG is probably due to mutations in the domain V loop of the 23S rRNA gene, leading to a reduction in the affinity of macrolides to ribosome (Lucier et al., 1995; Gautier-Bouchardon et al., 2002, Wu et al., 2005). For this study, the tested MG cultures were the first or second passage, thus it is unlikely test resistance was induced during the passage. However, the history of antibiotics uses in most of the farms indicated the use of these antibiotics in the prevention program. Therefore, a wide range of MICs was possibly due to frequent usage of the antibiotics.

Interestingly, the MG isolates in groups A, C, and D exhibited similar profiles of the MICs, while the groups B and E of MG were likely to give high MIC values compared to others. From history taking, growers frequently use or add antibiotics in broiler breeder feed to prevent and control of MG clinical signs. This suggested that MG organisms in these areas possibly resist to most antibiotics that were previously used for control and prevention of mycoplasma.

In conclusion, the 20 Thai MG isolates could be characterized into 5 groups by RAPD analysis. All 5 MG groups were isolated from different farm locations; however, the MG isolates in each group were originated in the same or nearby district. In addition, all groups exhibited similar patterns of antimicrobial resistance, probably suggesting that determination of the RAPD patterns of MG isolates may be useful for the planning of prophylactic and therapeutic programs. Finally, the frequent use of antibiotics could be related to the patterns of antimicrobial resistance among the MG isolates. To our knowledge, these results are the first report of molecular characterization and MIC values against MG isolates in Thailand. Information obtained from this work would be useful for planning of the effective prophylactic and therapeutic programs against MG.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Funds 2004-2006, MRG 4780010.

The authors would like to thank to the farm personals and the representatives of vaccine and pharmaceutical companies who collected samples from chicken farms. The authors also would like to thank Assoc. Prof. Dr. S. Suradhat for her suggestion to this paper.

References

Baughn, C.O., Alpaugh, W.C., Linkenheimer, W.H., Maplesden, D.C. 1978. Effect of tiamulin in chickens and turkeys infected experimentally with avian mycoplasma. Avian Dis. 22, 620-626.

Bradbury, J.M., Yavari, C.A., Giles, C.J. 1994. In vitro evaluation of various antimicrobials against *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by the micro-broth method, and comparison with a commercially prepared test system. Avian Pathol. 23, 105-115.

Gardella, R.S., DelGiudice, R.A., Tully, J.G. 1983. Immunofluorescence. In: Razin, S., Tully, J.G. (Eds.), Methods in Mycoplasmology, vol. I, Mycoplasma Characterization. Academic Press, New York, pp. 431-439.

Gautier-Bouchardon, A.V., Reinhardt, A.K., Kobisch, M., Kempf, I. 2002. In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae*. Vet Microbiol. 88, 47-58.

Geary, S.J., Forsyth, M.H., Aboul Saoud S., Wang, G., Berg D.E., Berg C.M. 1994. *Mycoplasma gallisepticum* strain differentiation by arbitrary primer PCR (RAPD) fingerprinting. Mol Cell Probes. 8, 311 – 316.

Hannan, P.C.T., Windsor, G.D., de Jong, A. Schmeer, N., Stegemann, M. 1997. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. 41, 2037-2040.

Hannan, P.C.T. 2000. Guidelines and recommendation for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Vet Res. 31, 373-395.

1 Horrox, N.E. 1980. Monensin-tiamulin interaction risk to poultry. Vet Rec. 106,
2 278.
3 Jordan, F.T.W., Knight, D. 1984. The minimum inhibitory concentration of
4 kitasamycin, tylosin and tiamulin for *Mycoplasma gallisepticum* and their
5 protective effect on infected chickens. Avian Pathol. 13, 151-162.
6 Jordan, F.T.W., Horrocks, B.K. 1996. The minimum inhibitory concentration of
7 tilmicosin and tylosin for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma*
8 *synoviae* and a comparison of their efficacy in the control of *Mycoplasma*
9 *gallisepticum* infection in broiler chicks. Avian Dis. 40, 326-334.
10 Kleven, S.H., Anderson, D.P. 1971. In vitro activity of various antibiotics against
11 *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis. 15, 551-557.
12 Kleven, S.H., Yoder, H.W. Jr. 1989. Mycoplasmosis. In: Purchase, H.G., Arp, L.H.,
13 Domermuth, C.H., Pearson, J.E. (Eds), A Laboratory Manual for the Isolation
14 and Identification of Avian Pathogens. American Association of Avian
15 Pathologists, Kennett Square, PA, pp. 57-62.
16 Lauerman, L. H. 1998. Mycoplasma PCR assays In: Lauerman, L.H. (Ed.), Nucleic
17 and Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases. American
18 Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Turlock, CA, pp. 41-42.
19 Ley, D.H., Berkhoff, J.E., Levisohn, S. 1997. Molecular epidemiology investigations
20 of *Mycoplasma gallisepticum* conjunctivitis in songbirds by randomly
21 amplified polymorphic DNA analyses. Emerg Infect Dis. 3, 375 –380.
22 Ley, D.H. 2003. *Mycoplasma gallisepticum* infection In: Saif, Y.M., Barnes, H.J.,
23 Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Swayne, D.E. (Eds.), Diseases
24 of Poultry. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 122-144.

1 Lin, M.Y. 1987. In vitro comparison of the activity of various antibiotics and drugs
2 against new Taiwan isolates and standard strains of avian mycoplasma. Avian
3 Dis. 31, 705-712.
4 Lucier, T.S., Heitzman, K., Liu, S.K., Hu, P.C. 1995. Transition mutations in the 23S
5 rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*.
6 Antimicrob Agents Chemother. 39, 2770-2773.
7 Newnham, A.G. 1963. Antibiotics in the eradication of avian respiratory
8 mycoplasmosis. A review of the literature together with the results of
9 laboratory trials using chlortetracycline and demethylchlorotetracycline. Res
10 Vet Sci. 4, 491.
11 Talkington, F.D., Kleven, S.H. 1983. A classification of laboratory strains of avian
12 mycoplasma serotypes by direct immunofluorescence. Avian Dis. 27, 422-
13 429.
14 Wang, C., Ewing, M., A'arabi, S.Y. 2001. In vitro susceptibility of avian
15 Mycoplasmas to enrofloxacin, sarafloxacin, tylosin, and oxytetracycline.
16 Avian Dis. 45, 456-460.
17 Whithear, K.G., Bowtell, D.D., Ghiocas, E., Hughes, K.L. 1983. Evaluation and use
18 of a micro-broth dilution procedure for testing sensitivity. Avian Dis. 27,
19 937-949.
20 Wu, C.M., Wu, H., Ning, Y., Wang, J., Du, X., Shen, J. 2005. Induction of
21 macrolide resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro and its resistance-
22 related mutations within domain V of 23S rRNA. FEMS Microbiol Lett. 247,
23 199-205.

1 Table 1. MICs (µg/ml) of antibiotics against 5 local MG groups (A, B, C, D, and E),

2 unclassified MG group (U) and 4 reference strains (F, ts-11, 6/85, and S6).

Fig. 1. Gel electrophoresis of MG DNA amplicon (185bp). Lane 1: 100-bp ladder, 2: negative control, 3: 6/85, 5: F strain, 6: S6 strain, lane 7 – 14 some samples from field isolates.

Fig. 2. RAPD analysis by Geary primer set. Lanes 1 and 16: 100-bp ladder, 2: and 17: negative control, 3: 6/85, 4: ts-11, 5: F strain, 6: S6 strain, 7 – 15 and 18 – 28 are samples from field isolates. A-E are groups generated by RAPD

Figure
Click here to download high resolution image

Fig. 1. Gel electrophoresis of MG DNA amplicon (185bp). Lane 1: 100-bp ladder, 2: negative control, 3: 6/85, 5: F strain, 6: S6 strain, lane 7 – 14 some samples from field isolates.

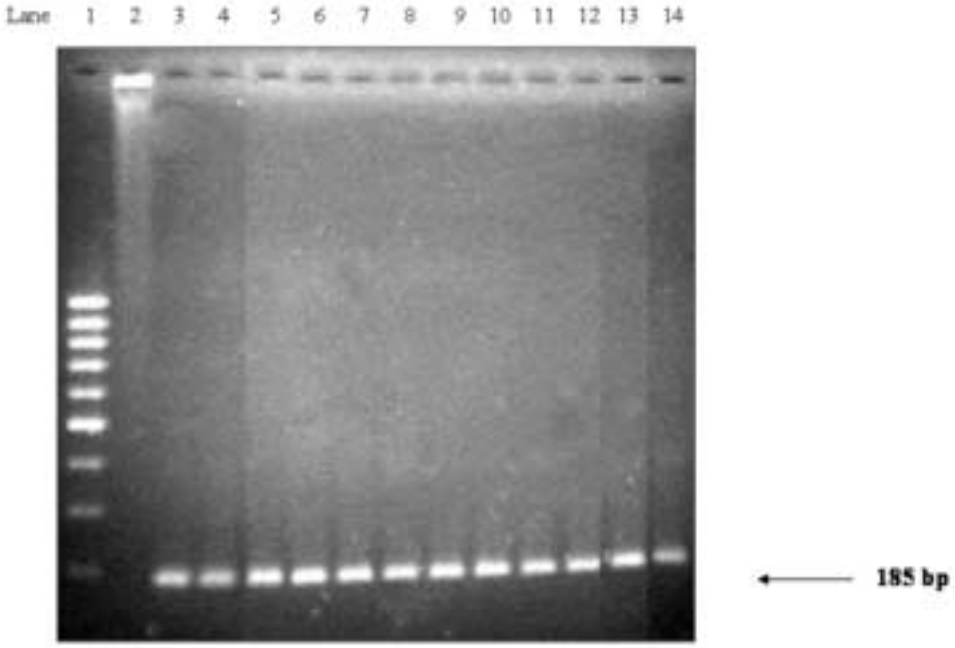
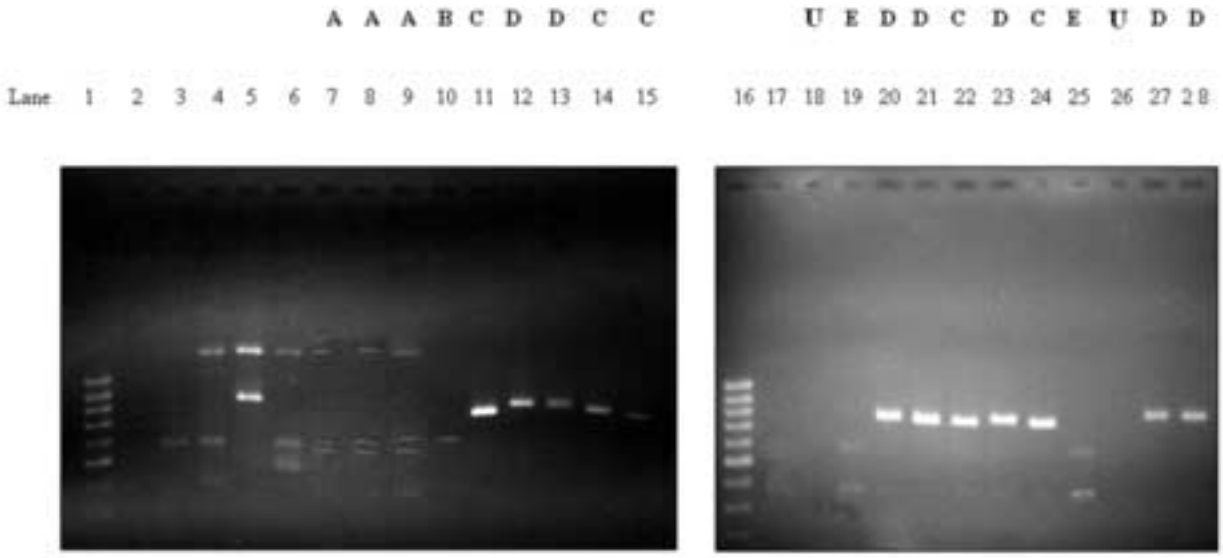


Figure
Click here to download high resolution image

Fig. 2. RAPD analysis by Geary primer set. Lanes 1 and 16: 100-bp ladder, 2: and 17: negative control, 3: 6/85, 4: ts-11, 5: F strain, 6: S6 strain, 7 – 15 and 18 – 28 are samples from field isolates. A-E are groups generated by RAPD



Table

Table 1. MICs (µg/ml) of antibiotics against 5 local MG groups (A, B, C, D, and E), unclassified MG group (U) and 4 reference strains (F, ts-11, 6/85, and S6).

Antibiotics	Groups generated by RAPD and the reference isolates									
	A (3)[3]	B (1)	C (5)	D (7)	E (2)	U (2)	Mean ± SE[1]	Reference strains	Mean ± SE[2]	Break Points[4]
Chlortetracycline	0.20-1.56	6.25	3.13-6.25	1.56-6.25	3.13-6.25	0.40-1.56	2.73 ± 0.78	1.56-3.13	2.73 ± 0.29	no data
Doxycycline	0.10	0.10	0.10-0.79	0.10-0.40	0.10-0.79	0.10	0.20 ± 0.12	0.10-0.20	0.17 ± 0.03	no data
Enrofloxacin	0.79-3.13	3.13	0.79-3.13	1.56-6.25	3.13-6.25	0.40-3.13	2.46 ± 0.67	0.10	0.10 ± 0	≥ 2
Erythromycin	0.10-0.20	> 50	0.10	0.10-12.50	> 50	0.10-3.13	8.80 ± 2.11	0.10	01.0 ± 0	≥ 4
Josamycin	0.40	> 50	0.40-0.79	0.20-1.56	6.25-50	0.20-6.25	7.25 ± 2.23	0.10-0.20	0.20 ± 0.07	≥ 8
Josamycin +Trimetoprim	0.10-1.56	> 50	0.10	0.10-25	> 50	0.10-0.79	9.40 ± 2.01	0.10	0.10 ± 0	no data
Lincomycin	0.10-3.13	12.50	0.79-3.13	1.56-3.13	6.25	0.20-1.56	2.50 ± 1.20	1.56-3.13	2.34 ± 0.38	≥ 8
Oxytetracycline	0.10-1.56	0.40	0.10-0.20	0.10-0.20	0.40	0.10	0.25 ± 0.14	0.40-3.13	1.28 ± 0.98	≥ 16
Tiamulin	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0	0.10	0.10 ± 0	≥ 16
Tilmicosin	0.10	12.50	0.10	0.10-1.56	3.13-12.50	0.10	1.93 ± 0.22	0.10	0.10 ± 0	no data
Tylosin	0.10	1.56	0.10	0.10	0.79-1.56	0.10	0.33 ± 0.15	0.10	0.10 ± 0	≥ 4

[1] means mean of MICs of all 20 isolates ± standard error of mean. [2] means mean of MICs of all reference isolates ± standard error of mean.

[3] ( ) = numbers of isolates of each MG group. [4] (µg/ml) means resistant levels (reviewed in Hannan, 2000).