

Abstract

Project Code: MRG5680033

Project Title: Investigation of culture-negative bacterial infections; stealth pathogens in pet animals using broad range PCR detection

Investigator: Gunn Kaewmongkol, DVM, MS, PhD

E-mail Address: gunn_kaew@yahoo.com, fvetgunn@ku.ac.th

Project Period: 3 June 2013 – 2 June 2015

Abstract:

This is a two-year study; the aim of the first year is to develop improved broad-range nested PCR methods to detect bacterial DNA in culture-negative specimens in pet animals presented at Veterinary teaching hospital, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. The analytical sensitivity of the nested broad-range PCR targeting the 16S rRNA gene was determined by testing of ten serial 10-fold dilutions which ranged from 10^6 - 10^{-3} bacterial colony forming unit (CFU/ml). The standard serial dilutions were prepared from 6 known bacterial genus and species including *Escherichia coli*, *Staphylococcus* species, *Streptococcus* species, *Pseudomonas* species, *Klebsiella* species and *Proteus* species. According to the analytical sensitivity, the lowest dilution of bacterial culture detected by this tool was 10^{-3} CFU/ml in all bacteria prepared for this study. The aim of the second year is to apply this new technique for diagnosis of bacterial infections in a variety of clinical specimens that all samples were negative results from conventional bacterial culture methods.

Urinary tract infections and bacterial prostatitis are commonly diagnosed and treated by broad-range antibiotics prior to performing of standard bacterial culture and antibiotic sensitivity test. Consequently, conventional bacterial culture techniques frequently fail to isolate pathogenic bacteria from most specimens of these cases. A broad-range nested PCR detection developed in the recent study was applied for the diagnosis of urogenital tract infections in dogs and cats which were pretreated with antibiotics and pathogenic organisms were not isolated from their specimens using standard culture techniques. Total of 118 urine and 46 semen specimens were included in this study that these specimens were negative results from conventional bacterial culture methods. The new

nested PCR detected bacterial 16S rDNA in 25/46 semen specimens (54%) and 51/118 urine specimens (43%).

The uncommon organisms were detected in cerebrospinal fluid (CSF) samples from the CNS patients that those CSF specimens were negative for the conventional bacterial culture techniques. This part reported and discussed rare cases of *Ehrlichia canis* meningoencephalitis in dogs without thrombocytopenia. The organism has been a cause of high morbidity and mortality in dogs in Southeast Asia since being identified in military dogs during the Vietnam War in the late 1980s. However, published reports on this organism in this region, both clinical manifestations and genetic studies, are very limited. According to the uncommon clinical signs and hematological findings of these cases, the veterinary practitioners who treated such the cases excluded *E. canis* infection from the differential diagnosis and consequently, there was no specific ELISA test and specific drug for *E. canis*. Without our report, there could be the same cases occurring again and most veterinary practitioners will not include *E. canis* infection in the cases of meningoencephalitis in dogs without thrombocytopenia. This report demonstrated the advantage of this technique that should be performed routinely in veterinary laboratories, particularly in samples from CNS patients with CSF culture-negative results.

This study also investigated bacterial infections in clinical abscesses from 20 cases using the new broad range PCR technique. Conventional bacterial culture isolated bacteria in 9 abscesses from a total of 20 samples. Interestingly, the PCR detected bacterial DNA in 17 abscesses and fastidious obligate anaerobic bacteria were detected in 10 samples. In contrast to the PCR results, anaerobic bacterial culture could not isolate the anaerobic bacteria in all samples. This broad range PCR was able to detect dominant anaerobic bacteria in abscesses that these dominant bacteria were overlooked by the conventional bacterial culture.

Eighty one anemic dogs with unknown causes were screened for hemotropic bacterial infections using this broad-range PCR technique. The new nested PCR detected bacterial 16S rDNA in 10/81 blood specimens (12.34%). Three types of organisms were detected in these blood samples including *Ehrlichia canis* (5), *Anaplasma platys* (3) and hemotropic *Mycoplasma* spp. (2).

The detection of bacterial 16S rDNA in various clinical specimens suggests the advantage of the broad range PCR technique, developed in this study, for the diagnosis of culture-negative bacterial infections in pet animals. In conclusion, this broad range PCR technique should be recommended in veterinary laboratories, particularly in inflammatory samples with culture-negative results. However, diversity of bacterial species could be found in one clinical sample instead of single species reported in our study. The PCR products amplified in this study could be applied for other next generation sequencing techniques in order to confirm the theory of imbalance bacteria population in clinical specimens.

บทคัดย่อ:

จากโครงการวิจัย 2 ปีครั้งนี้ วัตถุประสงค์ในปีแรกคือการพัฒนาเทคนิคที่เชื่อถือได้สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียหลากหลายชนิดจากตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อการเพาะเชื้อแบบเดิม จากตัวอย่างที่เก็บจากสัตว์ที่เข้ารับการตรวจรักษา ณ โรงพยาบาลสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ทำการวิเคราะห์ความไวของเทคนิคใหม่นี้ โดยทดสอบกับ สารละลายเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยเจือจาง 10 เท่า ตั้งแต่ความเข้มข้น 10^6 - 10^3 CFU/ml สารละลายเจือจางเหล่านี้เตรียมจากแบคทีเรีย 6 ชนิดคือ *Escherichia coli* *Staphylococcus* spp *Streptococcus* spp *Pseudomonas* spp *Klebsiella* spp และ *Proteus* spp จากการทดสอบความไวพบว่าระดับสารละลายเจือจางต่ำที่สุดที่สามารถตรวจได้คือ 10^3 CFU/ml ในแบคทีเรียทุกชนิดที่ทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ จุดประสงค์ของโครงการในปีที่สองคือการนำเทคนิคที่พัฒนาสำเร็จแล้ว ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างทางคลินิก โดยตัวอย่างเหล่านั้นให้ผลลบต่อการเพาะเชื้อแบบปกติ

การติดเชื้อแบคทีเรียในทางเดินปัสสาวะและต่อมลูกหมากในสุนัข มักจะถูกวินิจฉัยและได้รับการรักษาเบื้องต้นโดยการให้ยาปฏิชีวนะแบบวงกว้าง ก่อนการเพาะเชื้อแบคทีเรียและทดสอบความไวของยา ผลที่ตามมาคือความล้มเหลวที่จะวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุโดยการเพาะเชื้อแบบปกติจากตัวอย่างในสัตว์ป่วยเหล่านี้ การศึกษาในครั้งนี้ได้นำวิธีที่เชื่อถือได้แบบวงกว้างที่พัฒนาขึ้นใหม่มาใช้ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างปัสสาวะและน้ำเชื้อที่ให้ผลลบต่อการเพาะเชื้อแบบปกติ และถูกสงสัยว่าเป็นการอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ทำการทดสอบในตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมด 118 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำเชื้อทั้งหมด 46 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อวิธีที่เชื่อถือได้ทั้งหมด 51 ตัวอย่างจาก 118 ตัวอย่างของปัสสาวะ (54%) และ พบผลบวก 25 ตัวอย่างจาก 46 ตัวอย่างของน้ำเชื้อ (43%)

ทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในน้ำไขสันหลังของสุนัขที่ป่วยด้วยอาการทางระบบประสาท โดยตัวอย่างน้ำไขสันหลังให้ผลลบต่อการเพาะเชื้อแบบปกติ ผลตรวจพบเชื้อที่ไม่พบบ่อยและมีรายงานน้อยคือเชื้อแบคทีเรีย *Ehrlichia canis* ที่ทำให้เกิดอาการสมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โดยไม่พบภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ซึ่งถือเป็นค่าความเปลี่ยนแปลงของเลือดที่ใหม่เป็นข้อบ่งชี้สำคัญในการวินิจฉัยการติดเชื้อชนิดนี้ เชื้อ *Ehrlichia canis* เป็นเชื้อที่ก่อโรคและสามารถทำให้สุนัขเสียชีวิตได้สูง ซึ่งถูกรายงานไว้ตั้งแต่ในช่วงทศวรรษที่ 80 ในช่วงสงครามเวียดนามที่มีการนำสุนัขสงครามเข้ามาปฏิบัติภารกิจสงครามในเขตอุษาคเนย์ แต่จนถึงปัจจุบันกลับมีรายงานทางคลินิกและพันธุกรรมของเชื้อชนิดนี้ในประเทศไทยและภูมิภาคนี้ค่อนข้างน้อย จากสัตว์ป่วยที่รายงานในครั้งนี้ไม่พบความผิดปกติของเกล็ดเลือดซึ่งเป็นตัวบ่งชี้สำคัญในการวินิจฉัย สัตวแพทย์ผู้ทำการรักษาจึงไม่ได้รวมสาเหตุการติดเชื้อ *E. canis* เข้ามาในแผนการวินิจฉัยแยกโรค จึงไม่ได้ทำการตรวจยืนยันการติดเชื้อโดยเทคนิคทางภูมิคุ้มกัน ELISA ซึ่งเป็นการตรวจที่ทำเป็นปกติในการยืนยันการติดเชื้อชนิดนี้ เมื่อไม่ได้รวมการติดเชื้อ *E. canis* อยู่ในแผนการวินิจฉัย ดังนั้นจึงไม่มีการให้ยารักษาที่จำเพาะต่อเชื้อชนิดนี้ หากไม่มีการนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้มาใช้ และไม่มีการเผยแพร่ผลงานวิจัยนี้ สุนัขที่มีอาการและการติดเชื้อแบบเดียวกันนี้โดยไม่พบภาวะเกล็ดเลือดต่ำ สัตวแพทย์ผู้รักษาก็จะไม่รวมการติดเชื้อ *E. canis* เข้ามาในแผนการวินิจฉัยแยกโรคดังที่ทำมา

แต่เดิม ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นข้อได้เปรียบของเทคนิคใหม่ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งควรนำมาใช้ในวิธีการตรวจประจำ โดยเฉพาะกรณีสุนัขที่มีอาการทางระบบประสาทที่สงสัยสาเหตุจากติดเชื้อ และน้ำไขสันหลังให้ผลต่อการเพาะเชื้อแบบปกติ

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างฝึหนองทั้งหมด 20 ราย จากผลการเพาะเชื้อปกติพบการติดเชื้อแบคทีเรียใน 9 รายจากทั้งหมด 20 ราย (45%) แต่จากการใช้เทคนิคใหม่ที่พัฒนาขึ้น พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 17 รายจาก 20 ราย (85%) จากผลบวก 17 ราย พบการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดไม่พึ่งพาอากาศ (anaerobic bacteria) ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ในทางกลับกัน การเพาะเชื้อปกติไม่สามารถตรวจพบเชื้อ anaerobes จากตัวอย่างเดียวกันนี้ เทคนิคใหม่ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบแบคทีเรียชนิดหลักที่เป็น anaerobes ในตัวอย่างฝึหนอง โดยเชื้อ anaerobes เหล่านี้ไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีเพาะเชื้อแบบปกติ

เทคนิคใหม่ที่พัฒนาขึ้นในครั้งยังได้นำไปตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือดสุนัขทั้งหมด 81 ตัวอย่าง ที่มีภาวะโลหิตจางและสงสัยสาเหตุโลหิตจางจากการติดเชื้อ แต่ยังไม่สามารถระบุสาเหตุของโลหิตจางได้ ตรวจพบผลบวก 10 ตัวอย่างจากทั้งหมด 81 ตัวอย่าง (12.34%) พบเชื้อ 3 ชนิดคือ *Ehrlichia canis* 5 ตัวอย่าง *Anaplasma platys* 3 ตัวอย่าง และ hemotropic *Mycoplasma* 2 ตัวอย่าง

การตรวจพบการติดเชื้อแบคทีเรียจากหลากหลายตัวอย่างในการศึกษานี้แสดงให้เห็นข้อได้เปรียบของเทคนิคพีซีอาร์แบบวงกว้างที่พัฒนาขึ้น สำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อที่ให้ผลต่อการเพาะเชื้อแบบปกติในสัตว์เลี้ยง จากผลการศึกษาโดยสรุปคือ ควรมีการนำเทคนิคนี้หรือเทคนิคในแนวคิดแบบเดียวกันนี้ มาปรับใช้ในห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์ โดยเฉพาะตัวอย่างจากการอักเสบที่ให้ผลต่อการเพาะเชื้อแบบปกติ อย่างไรก็ตามมีการรายงานการติดเชื้อแบคทีเรียหลากหลายชนิดใน 1 ตัวอย่างทางคลินิก โดยไม่ได้เป็นการติดเชื้อเดี่ยวในแบบที่รายงานในการศึกษานี้ ผลผลิตจากพีซีอาร์ในการศึกษานี้สามารถนำไปตรวจเพิ่มเติมด้วยเทคนิคอื่นๆได้ทันที (Next generation DNA sequencing techniques; Pyrosequencing) เพื่อยืนยันทฤษฎีการก่อโรคจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ที่เกิดจากการเสียดุลของประชากรเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน ที่แต่เดิมไม่ใช่เชื้อก่อโรค

Keywords: culture-negative bacteria, broad-range PCR, clinical specimen, pet animals