

การศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ดื้อยาคัดแยกจากบ่อเลี้ยงกบในจังหวัดกาฬสินธุ์

Characterization of drug resistance *Klebsiella pneumoniae* isolated from frog culture pond in Kalasin Province

ชุตินา การมงคล¹, วุฒิ รัตนวิชัย², ปิยะฉัตร วิริยะอำไพวงศ์¹,
ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร¹ และ อนูพงษ์ ทานกระโทก^{1*}

Chutima Karmmongkol¹, Wutti Rattanavichai², Piyachat Wiriyaumpaiwong¹,
Nattapong Srisamoot¹ and Anupong Tankrathok^{1*}

บทคัดย่อ: จากการศึกษาเพื่อคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกบ สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ 10 ไอโซเลต โดยที่ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s ribosomal DNA พบว่าเป็นเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* จำนวน 7 ไอโซเลต *Providencia* sp. จำนวน 2 ไอโซเลต และ *Citrobacter freundii* จำนวน 1 ไอโซเลต โดยเชื้อ *K. pneumoniae* ที่คัดแยกได้ทั้ง 7 ไอโซเลต แสดงการดื้อต่อยา ampicillin vancomycin azithromycin และ rifampicin อีกทั้ง *K. pneumoniae* TCBS32 แสดงการดื้อต่อยา meropenem และสามารถทำให้เกิด clear zone บนอาหาร blood agar ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดสามารถชี้ให้เห็นได้ว่าการปนเปื้อนเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยาในบ่อเลี้ยงกบ

คำสำคัญ: การเลี้ยงกบ การดื้อยา เชื้อก่อโรค, *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT: A study was undertaken to isolate and characterize bacteria in frog culture pond. Ten bacterial isolates were collected from frog culture pond. All isolates were gram negative bacteria. Using 16s ribosomal DNA sequence analysis, seven isolates were identified as *Klebsiella pneumoniae*, two isolates were *Providencia* sp. and one as *Citrobacter freundii*. All strains of *K. pneumoniae* were resistant to ampicillin vancomycin azithromycin and rifampicin. Moreover, *K. pneumoniae* TCBS32 was exhibited drug resistant to meropenem and performed clear zone on blood agar. The result indicated that frog culture pond was contaminated with drug-resistant *K. pneumoniae*.

Keywords: frog culture, drug resistant, pathogen, *Klebsiella pneumoniae*

¹ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ จ. กาฬสินธุ์ 46000

Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Technology, Kalasin University, Kalasin 46000

² สาขาเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ จ. กาฬสินธุ์ 46000

Department of Fisheries Technology, Faculty of Agricultural Technology, Kalasin University, Kalasin 46000

* Corresponding author: anupong2.ta@ksu.ac.th

บทนำ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน สภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เน้นอัตราการเลี้ยงหนาแน่นเพื่อเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาดผู้บริโภค การเลี้ยงลักษณะนี้มักก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพต่อสัตว์น้ำได้ง่าย เนื่องจากเกิดความเครียดต่อสัตว์น้ำจากการอยู่ในพื้นที่คับแคบ อีกทั้งสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เกิดการสะสมของเสียต่าง ๆ ขึ้นภายในบ่อเลี้ยง หากขาดการดูแลและจัดการที่เหมาะสมมักจะนำไปสู่ปัญหาต่อระบบการเลี้ยง โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาของโรคติดเชื้อชนิดต่าง ๆ

โรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดเป็นโรคและตายเป็นจำนวนมาก ซึ่งโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญ ได้แก่ โรคขาแดง (Red leg disease) Flavobacteriosis Mycobacteriosis และ Chlamydiosis (Densmore and Green, 2007) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ทั่วไปในสภาวะแวดล้อมการเลี้ยงกบ และเมื่อกบมีความต้านทานโรคลดลง รวมทั้งเกิดบาดแผลบนผิวหนัง มักทำให้กบได้รับเชื้อและเพิ่มปริมาณเข้าสู่กระแสโลหิตอย่างรวดเร็ว และแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย ทำให้กบตายในระยะเวลาอันสั้น

เชื้อ *Klebsiella* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคพบว่ามีการติดเชื้อมากกว่าในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวมทั้งสัตว์น้ำ สามารถตรวจพบ *Klebsiella* sp. ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่าง ๆ ทั้งในดิน แหล่งน้ำธรรมชาติ และน้ำทิ้ง จากรายงานที่ผ่านมา พบว่า *K. pneumoniae* เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในปลาคาร์พที่มีสาเหตุมาจากการจัดการในระบบเลี้ยงไม่เหมาะสม (Oliveira et al., 2014) อีกทั้ง เชื้อดังกล่าวสามารถก่อให้เกิดโรคในกบได้ด้วย โดยกบจะแสดงอาการทางคลินิก เช่น เลือดออกใต้ผิวหนัง (hemorrhages) แผลหลุม (ulcers) และเกิดรอยแดงของผิวหนังบริเวณหน้าท้อง สามารถตรวจพบการติดเชื้อที่ หัวใจ ม้าม และตับ (Schadich and, Cole, 2010) นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบเชื้อ *Klebsiella* sp. ที่คือนายในกุ้งแช่แข็งที่ส่งออกจากประเทศไทย (Nawaz et al., 2012) ดังนั้น จากข้อมูลข้างต้น จะเห็นได้ว่าเชื้อ

Klebsiella sp. เป็นอีกหนึ่งปัญหาในระบบอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย ที่ส่งผลกระทบต่อภาคการผลิตทั้งด้านสุขอนามัยของเกษตรกรผู้เลี้ยง และผลผลิตที่ขาดคุณภาพเนื่องจากการปนเปื้อน ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของ *Klebsiella* sp. ที่อาจมีการปนเปื้อนในบ่อเลี้ยงกบนา

วิธีการศึกษา

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจากบ่อเลี้ยงกบนา

ใช้สำลีปลอดเชื้อทำการ swab บริเวณผิวของกบนา และนำมาเพาะเชื้อในอาหาร Luria-Bertani (LB) 100 ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 160 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจาง 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} เท่า เพื่อ spread ลงบนอาหารที่มีความจำเพาะ (selective medium) ประกอบด้วย Salmomella shigella (SS) agar Thiosulfate Citrate bile salts sucrose (TCBS) Agar และ Luria-Bertani (LB) + 50 µg/ml ampicillin (AMP) agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) เพื่อทำการ re-streak จนกระทั่งได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ สังเกตและบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เช่น ขนาด สี และลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร จากนั้นทำการย้อมสีแกรม (Gram's staining) ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีทางชีวโมเลกุล เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จะถูกระบุชนิดโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S ribosomal DNA ตามวิธีการของ บริษัท Macrogen Inc เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16S ribosomal DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซส (PCR) ด้วยไพรเมอร์ 27F primer (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1492R primer (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') จากนั้นทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA จะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) เพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกมาได้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของตัวอย่างแบคทีเรียทั้งหมดจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่มีในฐานข้อมูล เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalW>)

การทดสอบเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Agar disc diffusion

ทำการเลี้ยงเชื้อ *K. pneumonia* ที่คัดแยกได้จากบ่อกบนาในอาหาร LB broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการละลายเชื้อแบคทีเรียและเจือจางด้วยอาหารเหลว LB ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อที่มีค่า OD600 = 0.10-0.12 ทำการผสมสารละลายเชื้อที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 200 µl ใน 0.7 % agar ซึ่งหลอมไว้ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จากนั้นเททับลงไปด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดินแข็งตัว พร้อมกับวางแผ่นยาปฏิชีวนะ 10 µg ampicillin (AMP) 30 µg vancomycin (VAN) 15 µg azithromycin (AZT) 30 µg chloramphenicol (CHL) 25 µg streptomycin (STR) 5 µg rifampicin (RIF) และ 10 µg meropenem บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ปากฉีดยาลดเชื้อเป็นชุดควบคุม จากนั้น

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการคัดแยกเชื้อที่ได้จากผิวน้ำกบนา

จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวน้ำกบนาที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar, SS agar และ LB+AMP agar พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร TCBS agar คัดแยกได้ 3 ไอโซเลต (isolate) ที่มีลักษณะภายนอกของโคโลนีแตกต่างกัน คือ TCBS31 TCBS32 และ TCBS33 ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหาร SS agar สามารถคัดแยกชนิดได้ถึง 4 ไอโซเลต คือ SS1 SS3 SS4 และ SS5 นอกจากนี้ยังสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหาร LB+AMP agar ได้ 3 ไอโซเลต คือ LB+Amp1 LB+Amp2 และ LB+Amp3 จะเห็นได้ว่าลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารที่คัดแยกที่จำเพาะจะมีลักษณะสีของโคโลนีที่ต่างกันออกไป โดยโคโลนีที่พบจะมีลักษณะกลม ผิวเรียบ มีทั้งขนาดใหญ่และเล็ก (Figure 1) ผลจากการย้อมแกรมของเซลล์แบคทีเรียที่คัดแยกจากบ่อกบนาพบว่าแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต ย้อมติดสีแดงของสี Safranin ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Figure 2)

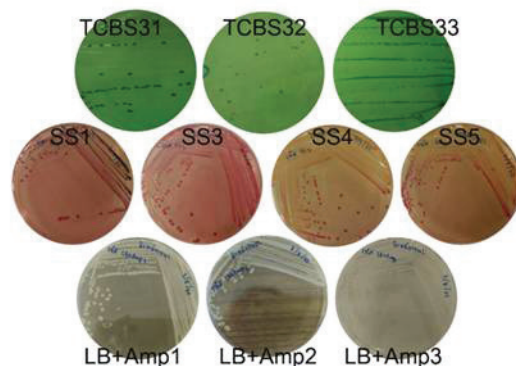


Figure 1 Pure colonies of isolated bacteria plated on TCBS agar, SS agar and LB+AMP agar.

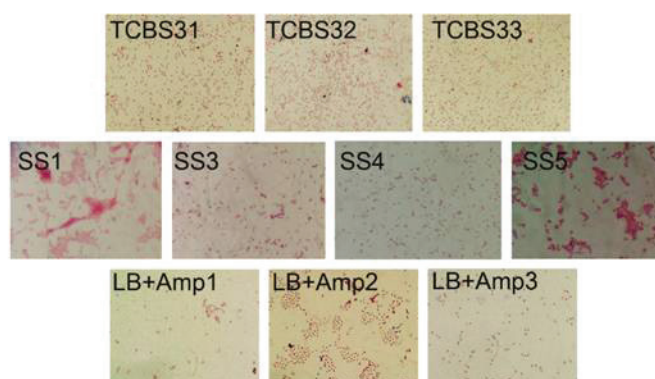


Figure 2 Gram's staining image of bacterial isolates from frog culture pond.

การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากกบนา ด้วยวิธี 16s rDNA

จากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA ของเชื้อที่แยกได้จากกบนาได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต พบว่า ไอโซเลต TCBS31 มีค่าความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ กับ *Providencia* sp. SY-1 ไอโซเลต TCBS32 มีความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ กับ *K. pneumoniae* strain 721005 และไอโซเลต TCBS33 มีค่าความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ กับ *Providencia rettgeri* strain SNCO1_1A ในขณะที่ ไอโซเลต SS1 มีค่าความเหมือนสูงที่สุดกับ *Citrobacter freundii* CFNIH1 แต่ไอโซเลต SS3 SS4 และ SS5 มีความเหมือนกับ *K. pneumoniae* strain 9177 *K. pneumoniae* strain DHQP1605752_NV และ *K. pneumoniae* strain kp757 ตามลำดับ

อีกทั้งไอโซเลต LB+Amp1 LB+Amp2 LB+Amp3 ถูกระบุว่าเป็นเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้ง 3 ไอโซเลตที่มีค่าความเหมือนอยู่ที่ 99 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA ของเชื้อที่แยกได้นั้นมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อที่แยกได้จากกบนาทั้ง 10 ไอโซเลตเป็นเชื้อต่างชนิดกัน ประกอบด้วย *C. freundii* 1 ไอโซเลต *Providencia* sp. 2 ไอโซเลต และ *K. pneumoniae* 7 ไอโซเลต จึงคาดการณ์ได้ว่าในบ่อเลี้ยงกบนามีประชากรของเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับที่สูง ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA ของเชื้อที่แยกได้จากกบนาทั้งหมดได้เผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank ตาม Accession No. ของแต่ละไอโซเลต (Table 1)

Table 1 Identification of isolates bacteria from frog culture pond.

Isolates	Accession No.	GenBank database	Identity (%)
1. TCBS31	MH973167	<i>Providencia</i> sp. SY-1	99
2. TCBS32	MH973168	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 721005	99
3. TCBS33	MH973169	<i>Providencia rettgeri</i> strain SNCO1 1A	99
4. SS1	MH973163	<i>Citrobacter freundii</i> CFNIH1	100
5. SS3	MH973164	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 9177	99
6. SS4	MH973165	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MLST-15	100
7. SS5	MH973166	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain kp757	100
8. LB+Amp1	MH973160	<i>Klebsiella</i> sp. KPN1705	100
9. LB+Amp2	MH973161	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 9177	99
10. LB+Amp3	MH973162	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain zg2010	99

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้บ่อกบนา

จากแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA ของเชื้อจากบ่อกบนา พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ *Providencia* sp. (*Providencia* sp. TCBS31 และ *Providencia*

sp. TCBS33) กลุ่มที่ 2 คือ *C. freundii* (*C. freundii* SS1) และกลุ่มที่ 3 คือ *K. pneumonia* (*K. pneumonia* TCBS32 *K. pneumonia* SS3 *K. pneumonia* SS4 *K. pneumonia* SS5 *K. pneumonia* LB+Amp1 *K. pneumonia* LB+Amp2 และ *K. pneumonia* LB+Amp3) (Figure 3)

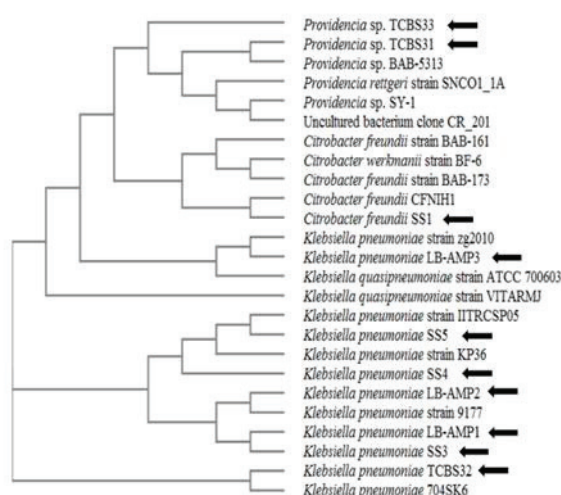


Figure 3 Phylogenetic tree analysis of bacterial isolates based on 16S rRNA nucleotide sequences.

Table 2 Antimicrobial susceptibility analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates from frog culture pond.

Isolates	Resistance ¹						
	AMP	VAN	AZT	CHP	STR	RIF	MER
<i>K. pneumoniae</i> TCBS32	R	R	R	M	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i> SS3	M	R	R	R	R	R	S
<i>K. pneumoniae</i> SS4	R	R	R	S	R	R	S
<i>K. pneumoniae</i> SS5	R	R	R	R	R	R	S
<i>K. pneumoniae</i> LB+Amp1	R	R	R	R	R	R	S
<i>K. pneumoniae</i> LB+Amp2	R	R	M	S	S	R	S
<i>K. pneumoniae</i> LB+Amp3	R	R	R	S	S	R	S

¹Degree of susceptibility: R = resistant (≤ 15 mm); M = moderate (M) (16 - 20 mm); S = sensitive (≥ 21 mm)

ผลการทดสอบเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *K. pneumonia*

จากผลการทดสอบเชื้อดื้อยาด้วยวิธี Agar disc diffusion ของเชื้อ *K. pneumonia* ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงกบนาทั้ง 7 ไอโซเลต พบว่า *K. pneumoniae* ทั้ง 7 ไอโซเลต มีลักษณะการดื้อยาแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน โดยที่เชื้อ *K. pneumoniae* ที่คัดแยกได้ส่วนมาก แสดงลักษณะการดื้อยาทั้ง 7 ไอโซเลต ต่อ ampicillin vancomycin azithromycin และ rifampicin ในขณะที่ผลของ chloramphenicol และ streptomycin ลักษณะการดื้อยาของเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลต มีลักษณะที่แตกต่างกัน พบว่า *K.*

pneumonia LB+Amp2 และ *K. pneumonia* LB+Amp3 ยังคงมีความไวต่อยา ดังกล่าว อีกทั้งผลของ meropenem แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่คัดแยกได้เกือบทั้งหมดยังคงมีความไวต่อ meropenem ยกเว้น *K. pneumoniae* TCBS32 แสดงลักษณะการดื้อยาต่อยานี้ (Table 2) อีกทั้ง พบว่าไอโซเลตดังกล่าวแสดงการเกิด clear zone บนอาหาร blood agar (Figure 4) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า *K. pneumoniae* TCBS32 มีแนวโน้มที่อาจเชื่อได้ว่าเป็นเชื้อก่อโรคที่เกิดการดื้อยา

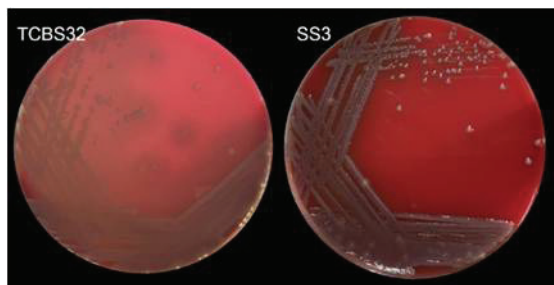


Figure 4 Blood agar analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates.

สรุปผลการศึกษา

สามารถคัดแยกเชื้อจากบ่อเลี้ยงกบนาได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต ประกอบด้วยเชื้อ *K. pneumonia* 7 ไอโซเลต *Providencia* sp. 2 ไอโซเลต และ *C. freundii* 1 ไอโซเลต ผลความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *K. pneumonia* ที่คัดแยกได้ พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลต แสดงการดื้อยาต่อ ampicillin vancomycin azithromycin และ rifampicin อีกทั้ง *K. pneumoniae* TCBS32 แสดงลักษณะของเชื้อดื้อยาและมีแนวโน้มที่อาจเป็นเชื้อก่อโรคที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงกบนา องค์ความรู้จากงานวิจัยนี้จะนำไปสู่ความตระหนักถึงการให้ความสำคัญของการจัดการสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงให้ถูกสุขลักษณะ อีกทั้งแนวทางในการพัฒนาค้นหาสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อต่อสู้กับเชื้อดื้อยาต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณ

รายจ่าย ประจำปีงบประมาณ 2560 และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทดลองในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Densmore, C. L., and D. E. Green. 2007. Diseases of amphibians. ILAR J. 48:235-254.
- Nawaz, M., S. A. Khan, Q. Tran, K. Sung, A. A. Khan, I. Adamu, and R. S. Steele. 2012. Isolation and characterization of multidrug-resistant *Klebsiella* spp. isolated from shrimp imported from Thailand. Int J Food Microbiol. 155:179-184.
- Oliveira, R. V., P. G. Peixoto, D. C. Ribeiro, M. C. Araujo, C. T. B. Santos, C. Hayashi, M. M. Pedreira, and A. Pelli. 2014. *Klebsiella pneumoniae* as a main cause of infection in Nishikigoi Cyprinus Carpio (Carp) by Inadequate Handling. Braz. J. Vet. Pathol. 7:86-88.