การปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อคัดแยกสำหรับการเพาะแยกเชื้อสไปโรคีทในทางเดินอาหารของสุกร

นายกิตติธัช ลักษณ์สมยา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

MODIFICATION OF SELECTIVE MEDIA OF PORCINE INTESTINAL SPIROCHETES

Mr. Kittitat Lugsomya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinay Microbiology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อคัดแยกสำหรับการเพาะแยกเชื้อสไปโรคีทในทางเดินอาหารของสุกร
โดย	นายกิตติธัช ลักษณ์สมยา
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณุวีร์ ประภัสระกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ถ้ามี)	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มงคล เตชะกำพุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณุวีร์ ประภัสระกูล)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. กัมพล แก้วเกษ)

กิตติธัช ลักษณ์สมยา: การปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อคัดแยกสำหรับการเพาะแยกเชื้อสไปโรคีทในทางเดินอาหารของสุกร MODIFICATION OF SELECTIVE MEDIA OF PORCINE INTESTINAL SPIROCHETES อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.น.สพ. ดร. ณุวีร์ ประภัสระกูล ,อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ. น.สพ. ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์ ,91 หน้า.

การศึกษาการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะที่ใช้เพื่อเพิ่มอัตราการเพาะของเชื้อ *Brachyspira hyodysenteriae* และเชื้อในสปีชี่ส์อื่นๆ จากตัวอย่างอุจจาระสุกรที่แสดงอาการป่วยท้องเสียแบบแสดงอาการ การศึกษาค่าความไวรับของยาปฏิชีวนะ flavomycin (F) ด้วยวิธี agar dilution method เท่ากับ 16 ไมโครกรัม/มล. โดยทดสอบกับเชื้อ *Brachyspira* (*B.*) สเตรนมาตรฐาน 5 สเตรน และ *B. hyodysenteriae* ในขณะที่ ยา halquinol (H) เท่ากับ <1 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว flavomycin (f) ที่ความเข้มข้นดังกล่าวจึงถูกเลือกใช้ร่วมกับ colistin (C) rifampicin (R) และ spectinomycin (S) ในรูปแบบของ pre-enrichment และในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเพื่อทดสอบประสิทธิภาพ กับอุจจาระสุกรผสมเชื้อ *Brachyspira* พบว่า การใช้เพาะเชื้อในรูปแบบของ pre-enrichment ไม่สามารถเพิ่มอัตราการพบเชื้อได้แต่อย่างใด สูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 2 ชนิด ถูกนำมา ทดสอบประสิทธิภาพการเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* กับอุจจาระสุกรฟาร์มจำนวน 90 ตัวอย่าง จากฟาร์ม 10 ฟาร์ม พบว่าสูตรอาหารชนิดแข็งที่มีเลือดผสม ร่วมกับยาปฏิชีวนะ F (16 ไมโครกรัม/มล.), S (400 ไมโครกรัม/มล.), R(30 ไมโครกรัม/มล.) and C (25 ไมโครกรัม/มล.) BAM-CSRF) สามารถลดจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช่เชื้อ *Brachyspira* ในอุจจาระ และมีอัตราการพบเชื้อสูงกว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ BAM-CSR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ BAM-CSRF จึงเป็นสูตรอาหารคัดแยกที่มีศักยภาพในการเพาะแยกเชื้อ *B. hyodysenteriae* และสปีชี่ส์อื่นๆ จากตัวอย่างอุจจาระสุกร

ภาควิชา จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2554.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5275552031 : MAJOR PATHOBIOLOGY

KEYWORDS :*BRACHYSPIRA* / FLAVOMYCIN / PORCINE INSTESTINAL SPRIOCHETES / SELECTIVE MEDIUM / SWINE DYSENTERY

KITTITAT LUGSOMYA : MODIFICATION OF SELECTIVE MEDIA OF PORCINE INTESTINAL SPIROCHETES . ADVISOR : ASSIST PROF. NUVEE PRAPASARAKUL, CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PADET TUMMARUK, 91 pp.

This study was to develop a modified selective medium to improve the recovery rate of *Brachyspira hyodysenteriae* and other clinically significant intestinal spirochetes from porcine faces.The susceptibility of five *Brachyspira spp*. type strains and five Thai field isolates of *B. hyodysenteriae* to the antimicrobials halquinol and flavomycin was determined by in vitro susceptibility tests in the agar dilution method, and optimal incorporation rates were confirmed by broth dilution. All the spirochetes were susceptible to halquinol at <1 μg/ml, while 16 μg/ml of flavomycin (F) allowed their growth, and therefore, only the later was selected for further use. F and different combinations of colistin (C), spectinomycin (S) and rifampacin (R) were incorporated into pre-enrichment broths and/or agar plates, and growth of the spirochetes from seeded feces was determined. Two solid media were selected for further testing using feces from 90 finishing pigs on 10 farms. A previously recommended method of pre-enrichment did not increase the recovery rate. The use of blood agar modified medium (BAM) containing F (16 μg/ml), S (400 μg/ml), R (30 μg/ml) and colistin (C, 25 μg/ml)1(assigning as BAM-CSRF) reduced the growth of contaminating intestinal microbiota and resulted in a significantly higher rate of spirochete recovery than the previous recommended medium.In the summary, BAM-CSRF is a useful new selective medium for the isolation of *B. hyodysenteriae* and other intestinal spirochetes from pig feces.

Department of Veterinary Microbiology..... Student's Signature .....

Field of Study Veterinary Pathobiology..... Advisor's Signature .....

Academic Year : 2011..... Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความกรุณา ความช่วยเหลือ ทั้งกำลังกาย กำลังใจและกำลังความคิดจากบุคคลมากมายจึงสำเร็จได้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ

ทุนอุดหนุนการวิจัยส่วนหนึ่งจาก ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยรุ่นที่ 16(3/2554) ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2553

ประธานกรรมการ รศ. น.สพ. ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. น. สพ. ดร. ณุวีร์ ประภัสระกูล ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ความรู้ เทคนิค แนวคิด ข้อคิดเห็น สารเคมี เชื้อมาตรฐานสำหรับการทดสอบ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ. น.สพ. ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์ ที่ให้คำปรึกษา ความรู้เทคนิด แนวคิดทางด้านสถิติ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ รศ. น.สพ. ดร. กัมพล แก้วเกษ ที่ให้ความกรุณา ให้คำปรึกษา และมาสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา และภาคพยาธิวิทยาคณะ สัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และความรู้

คุณวารี นิยมธรรม คุณสุภาพ กำลังแพทย์ คุณธิติมา ไตรพิพัฒน์ ที่มีส่วนช่วยเหลือ ให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บิดา มารดา พี่ชาย ในการสนับสนุน ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่สำคัญ

หน้า

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฐ

สัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฒ

บทที่

1. บทนำ 1
   - 1.1. แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ 1
   - 1.2. วัตถุประสงค์การวิจัย 3
   - 1.3. คำสำคัญ 3
   - 1.4. คำถามสำหรับการวิจัย 4
   - 1.5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 4
2. เอกสารและหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
   - 2.1. เชื้อแบคทีเรียกลุ่มสไปโรคีท (*Spirochetes*) 5
   - 2.2. การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสไปโรคีท 7
   - 2.3. เชื้อแบคทีเรียในตระกูล *Brachyspiraceae* 7
   - 2.4. ประวัติของการจัดลำดับและการเปลี่ยนแปลงชื่อสกุลของ *Brachyspira* 8
   - 2.5. ลักษณะการก่อโรคที่เกิดเนื่องจากการติดเชื้อ *Brachyspira* ในสุกร 10
   - 2.6. ความแตกต่างของคุณสมบัติของเชื้อ *Brachyspira* สปีชี่ส์ต่างๆ ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของสุกร 12
   - 2.7. ประวัติการเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* 14
   - 2.8. การวินิจฉัยโรคจากการติดเชื้อ *Brachyspira* 19
     - 2.8.1. การเพาะแยกเชื้อ 19
     - 2.8.2. การทดสอบทางชีวเคมี 20
       - 2.8.2.1. การทดสอบการสร้างอินโดล 20
       - 2.8.2.2. การทดสอบการสลายฮิปปูเรทด้วยกระบวนการไฮโดรไลส์ 21

หน้า

2.8.2.3. การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อโดยระบบ API-ZPM 21
2.8.3. การทดสอบยืนยันสปีชี่ส์เชื้อโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากเชื้อบริสุทธิ์ 24
2.8.4.การทดสอบทางซีรั่มวิทยาเพื่อวินิจฉัยเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระ 24
2.8.5.การตรวจเชื้อ *Brachyspira* ด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างอุจจาระสุกรโดยตรง 25
2.9. รายงานการศึกษาการดื้อยาของแบคทีเรียกลุ่มที่พบในทางเดินอาหารของสุกรในประเทศไทย 27
2.10. เอกสารที่เกี่ยวข้อง 29
3. วิธีดำเนินการวิจัย 31
3.1. การทดสอบความไวรับและความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยาปฏิชีวนะ Flavomycin และ Halquinol ต่อเชื้อ *Brachyspira* สเตรนมาตรฐาน 31
3.1.1. การเลือกและการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย 31
3.1.2. การเตรียมความเข้มข้นยาต้านจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อ 31
3.1.3. การทดสอบความไวรับของเชื้อแบคทีเรียต่อ flavomycin และ halquinol บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 32
3.1.4. การทดสอบความไวรับของเชื้อแบคทีเรียต่อ flavomycin บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 33
3.2. การทดสอบความสามารถในการคัดเลือกเชื้อ *Brachyspira* จากแบคทีเรียอื่นๆ ในอุจจาระของสูตรอาหารคัดเลือกที่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin 36
3.2.1. การทดสอบความสามารถในการคัดเลือกเชื้อ *Brachyspira* จากแบคทีเรียอื่นๆ ในอุจจาระสุกรที่ผสมเชื้อ *Brachyspira* ซึ่งทราบจำนวน ของสูตรอาหารคัดเลือกที่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin 36
3.2.1.1. การจัดแบ่งกลุ่มสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบ ประสิทธิภาพของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกที่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin 37
3.2.1.2. การเลือกและการการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย 37
3.2.1.3. การเตรียมความเข้มข้นยาต้านจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อ 37
3.2.1.4. การเตรียมอุจจาระที่ผสมเชื้อ *Brachyspira* ที่ทราบปริมาณ 37
3.2.1.5. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นในอุจจาระจากตัวอย่างที่ทราบปริมาณเชื้อ *Brachyspira* ของอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกชนิดแข็ง 38

หน้า

3.2.1.6. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นในอุจจาระจากตัวอย่างที่ทราบปริมาณเชื้อ *Brachyspira* ของอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือก pre-enrichment 38

3.2.2. การทดสอบความสามารถในการคัดเลือกเชื้อ *Brachyspira* จากแบคทีเรียอื่นๆ ในอุจจาระสุกรฟาร์มซึ่งทราบจำนวน ของสูตรอาหารคัดเลือกที่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin 40

...

3.2.2.1. การเก็บตัวอย่างอุจจาระจากสุกรภายในฟาร์ม 40

3.2.2.2. การตรวจเบื้องต้น 40

3.2.2.3. การตรวจยืนยันด้วยเชื้อวิธี multiplex PCR จากอุจจาระ 40

3.2.2.4. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นในอุจจาระจากตัวอย่างฟาร์ม 41

3.2.2.5. การตรวจสอบสปีชี่ส์ของเชื้อที่พบโดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี และ PCR 42

3.2.2.5.1. การทดสอบ indole 42

3.2.2.5.2. การทดสอบ hippurate hydrolysis 42

3.2.2.5.3. การทดสอบด้วยวิธี PCR จากเชื้อบริสุทธิ์ 42

3.2.2.6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 42

4. ผลการทดลอง 44

4.1. การประเมินหาค่าความความเข้มข้นสูงสุดของ flavomycin และ halquinol ที่ไม่ยับยั้งเชื้อ *Brachyspira* สายพันธุ์อ้างอิง 5 สายพันธุ์ และ 1 สายพันธุ์จากตัวอย่างสุกรไทยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 44

4.2. การประเมินหาค่าความความเข้มข้นสูงสุดของ flavomycin ที่ไม่ยับยั้งเชื้อ *Brachyspira* สายพันธุ์อ้างอิง 5 สายพันธุ์ และ 1 สายพันธุ์จากตัวอย่างสุกรไทยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 46

4.3. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นในอุจจาระจากตัวอย่างที่ทราบปริมาณเชื้อ *Brachyspira* ของอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกชนิดแข็ง 47

4.4. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นในอุจจาระจากตัวอย่างที่ทราบปริมาณเชื้อ *Brachyspira* ของอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือก pre-enrichment 49

หน้า

4.5. การทดสอบความสามารถในการคัดเลือกเชื้อ *Brachyspira* จากแบคทีเรียอื่นๆ ในอุจจาระสุกรฟาร์ม ของสูตรอาหารคัดเลือกที่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin 51
5. การอภิปราย 58
6. สรุปผลการวิจัย 64
เอกสารอ้างอิง 65
ภาคผนวก 80
ภาคผนวก ก ปริมาณเชื้อ *Brachyspira* (BFSCR, BSCR) และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ (BCSR, FCSR) ที่พบจากการเพาะแยกเชื้อตัวอย่างอุจจาระที่มีมูกเลือดปน 81
ภาคผนวก ข ปริมาณเชื้อ *Brachyspira* (BFSCR, BSCR)และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ (BCSR, FCSR) ที่พบจากการเพาะแยกเชื้อตัวอย่างอุจจาระสุกรปกติ 84
ภาคผนวก ค ผลการทดสอบการคัดกรองทางแบคทีเรียวิทยาพื้นฐานก่อนการเพาะเชื้อ และ ผลการทำ PCR ยืนยันสปีชี่ส์จากตัวอย่างอุจจาระโดยตรง 85
ภาคผนวก ง การทดสอบการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อลักษณะคล้าย *Brachyspira* และผลการทำ PCR เพื่อยืนยันสปีชี่ส์จากโคโลนีบริสุทธิ์ 89
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 91

หน้า

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	แสดงลักษณะการก่อโรคและโฮสต์ของเชื้อในวงศ์ *Brachyspira*	8
ตารางที่ 2	แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะที่มีผู้ใช้ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* และระดับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (minimal inhibitory concentration: MIC) ของเชื้อ *Brachyspira hyodysenteriae*	16
ตารางที่ 3	สรุปสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเหมาะสมสำหรับการเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* ในสุกร	17
ตารางที่ 4	แสดงอัตราการพบเชื้อ *Brachyspira* จากการเพาะแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	18
ตารางที่ 5	แสดงลักษณะรูปร่างโคโลนี และจุลสัณฐานวิทยาของเชื้อ *B. hyodysenteriae* และเชื้อ *B. pilosicoli*	23
ตารางที่ 6	แสดงการทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้ยืนยันสปีชี่ส์ของเชื้อ *Brachyspira*	23
ตารางที่ 7	แสดงอัตราการพบเชื้อ *Brachyspira* และ *Lawsonia intracelullaris* จากการทำ PCR จากตัวอย่างอุจจาระ	27
ตารางที่ 8	แสดงลำดับการละลายของยาปฏิชีวนะ	32
ตารางที่ 9	แสดงการแบ่งกลุ่มการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อในรูปแบบpre-enrichment	39
ตารางที่ 10	แสดงรายละเอียดข้อมูลจำเพาะของ primers ที่ใช้ในการศึกษา	41
ตารางที่ 11	แสดงการเจริญของเชื้อ *Brachyspira* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin และ halquinol ความเข้มข้นต่างๆ	44
ตารางที่ 12	แสดง จำนวนเชื้อ *Brachyspira* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ผ่านการนับบน hemocytometer	47
ตารางที่ 13	เปรียบเทียบปริมาณของเชื้อ *Brachyspira* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งทั้ง 3 สูตรที่ผสมยาปฏิชีวนะและกลุ่มควบคุม	48
ตารางที่ 14	แสดงปริมาณเชื้อ *Brachyspira* ในสปีชี่ส์ต่างๆ และปริมาณเชื้อจากอุจจาระอื่นๆ จากวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ pre-enrichment ที่เวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่แตกต่างกัน	49
ตารางที่ 15	เปรียบเทียบอัตราการเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีเชื้อ *Brachyspira* และค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในอุจจาระ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ FCSR กับ CSR และ	

หน้า

	อัตราการพบเชื้อด้วยวิธีตรวจ M-PCR	57
ตารางที่ 16	แสดงปริมาณเชื้อ*Brachyspira* (BFSCR,BSCR)และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ (BCSR, FCSR) ที่พบจากการเพาะแยกเชื้อตัวอย่างอุจจาระที่มีมูกเลือดปน	81
ตารางที่ 17	แสดงปริมาณเชื้อ*Brachyspira* (BFSCR,BSCR)และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ (BCSR, FCSR) ที่พบจากการเพาะแยกเชื้อตัวอย่างอุจจาระสุกรปกติ	84
ตารางที่ 18	แสดงผลการทดสอบการคัดกรองทางแบคทีเรียวิทยาพื้นฐานก่อนการ	
ตารางที่ 19	เพาะเชื้อ และ ผลการทำ PCR ยืนยันสปีชี่ส์จากตัวอย่างอุจจาระโดยตรง	85
	แสดงผลการทดสอบการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อลักษณะคล้าย *Brachyspira* และผลการทำ PCR เพื่อยืนยันสปีชี่ส์จากโคโลนีบริสุทธิ์	89

หน้า

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระสุกรที่แสดงอาการบิดมูกเลือดภายหลังเพาะในภาวะไร้ก๊าซออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน a,b คือลักษณะแนวย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic zone) ของเชื้อสไปโรคีท ที่แยกได้แต่ไม่สามารถแยกออกจากเชื้อปนเปื้อนอื่นในอุจจาระ 2

ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างและรูปร่างของเชื้อในไฟลั่ม *Spirochetes* 5

ภาพที่ 3 แสดง Phylogenetic tree ส่วน 16S rDNA ของเชื้อในไฟลั่ม *Spirochetes* 6

ภาพที่ 4 แสดงการเพาะเชื้อแบบ pre-enrichment 19

ภาพที่ 5 แสดงผลทดสอบการสร้าง indole ที่เป็นบวกของเชื้อ *B. hyodysenteriae* (ขวามือ) และผลลบของเชื้อ *B. pilosicoli* (ซ้ายมือ) 20

ภาพที่ 6 แสดงผลทดสอบการสลาย hippurate ด้วยกระบวนการไฮโดรไลส์ ที่เป็นบวกของเชื้อ *B. pilosicoli* (ขวามือ) ที่เป็นบวก *B. hyodysenteriae* ที่เป็นลบ(ซ้ายมือ) 21

ภาพที่ 7 แสดงการทดสอบ API-ZPM 22

ภาพที่ 8 แสดงลักษณะของแถบสีมาตรฐานที่ใช้เทียบผลบวกลบและปริมาณของเอนไซม์ 22

ภาพที่ 9 แสดงการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเพื่อเพาะเชื้อ *Brachyspira* 34

ภาพที่ 10 แสดงการนับเชื้อสไปโรคีทบน hemocytometer 36

ภาพที่ 11 แสดงการแบ่งกลุ่มการศึกษาในการทดลองเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 38

ภาพที่ 12 แสดงการแบ่งกลุ่มการศึกษาในการทดลองเพาะในลักษณะ pre-enrichment 40

ภาพที่ 13 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Brachyspira* สปีชี่ส์ต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin 45

ภาพที่ 14 แสดงเชื้อแบคทีเรียจากอุจจาระที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกลุ่มกัน 48

ภาพที่ 15 แสดงเชื้อแบคทีเรียจากอุจจาระที่เจริญในลักษณะ pre-enrichment เป็นเวลา 10 นาที ที่ลำดับการละลาย 10^{-7} บนอาหารเลี้ยงเชื้อ FCSR ต่างกลุ่มกัน 50

ภาพที่ 16 แสดงเชื้อแบคทีเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 40

หน้า

	เท่าจากลักษณะโคโลนีที่ขึ้นปะปนกันด้วยการป้ายเชื้อสด (fresh smear)	50
ภาพที่ 17	แสดงลักษณะรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาของสุกรบริเวณไส้ตรง และไส้ตันที่พบปื้นเลือดออกที่เยื่อบุชั้นใน	51
ภาพที่ 18	แสดงเชื้อแบคทีเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์จากตัวอย่างอุจจาระสุกรขึ้นปะปนกันด้วยการป้ายเชื้อสด (fresh smear) พบลักษณะแบคทีเรียรูปร่างยาวที่เคลื่อนที่ควงเกลียว (กรอบสีแดง)	52
ภาพที่ 19	แสดงเชื้อแบคทีเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์จากตัวอย่างอุจจาระสุกรขึ้นปะปนกันด้วยย้อมสีแกรม (fresh smear) พบลักษณะแบคทีเรียรูปร่างยาวบิดเป็นเกลียว	52
ภาพที่ 20	แสดงผลผลิตดีเอนเอด้วยวิธี PCR ในการตรวจพิสูจน์เชื้อ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* จากอุจจาระสุกรฟาร์มบนเจลอกาโรส 1% (P1-P20)	53
ภาพที่ 21	แสดงผลผลิตดีเอนเอด้วยวิธี PCR ในการตรวจพิสูจน์เชื้อ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* จากอุจจาระสุกรฟาร์มบนเจลอกาโรส 1% (P21-P40)	53
ภาพที่ 22	แสดงผลผลิตดีเอนเอด้วยวิธี PCR ในการตรวจพิสูจน์เชื้อ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* จากอุจจาระสุกรฟาร์มบนเจลอกาโรส 1% (P41-P60)	54
ภาพที่ 23	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Brachyspira* และเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม FCSR (b,d,f) และ CSR (a,c,e)	55
ภาพที่ 24	แสดงผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ที่มีความจำเพาะต่อสปีชี่ส์ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* บนเจลอกาโรส 1% จากเชื้อบริสุทธิ์	56

สัญลักษณ์และคำย่อ

B.	=	*Brachyspira*
spp.	=	species
CFU	=	colony forming unit
มล.	=	มิลลิลิตร
PCR	=	polymerase chain reaction
tly	=	Hemolysin gene
S.	=	*Serpulina*
mlee	=	multilocus enzyme electrophoresis
DNA	=	deoxyribonucleic acid
S	=	spectinomycin
S400	=	spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล.
CVS	=	colistin 25 ไมโครกรัม/มล. + vancomycin 25 ไมโครกรัม/มล. + spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล.
S+V250	=	spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. + vancomycin 250 ไมโครกรัม/มล.
SCB	=	ยา spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. + colistin 25 ไมโครกรัม/มล. + brilliant green 1 ไมโครกรัม/มล.
BJ	=	spectinomycin 200 ไมโครกรัม/มล. + spiramycin 25 ไมโครกรัม/มล. + rifampin 12.5 ไมโครกรัม/มล. + vancomycin 6.25 ไมโครกรัม/มล. + colistin 6.25 ไมโครกรัม/มล.
CSR	=	spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. + colistin 10 ไมโครกรัม/มล. + rifampicin (rifampin) 30 ไมโครกรัม/มล.
FCSR	=	spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. + colistin 10 ไมโครกรัม/มล. + rifampicin (rifampin) 30 ไมโครกรัม/มล. + flavomycin 16 ไมโครกรัม/มล.
BH	=	*B. hyodysenteriae*
BP	=	*B.pilosicoli*
BM	=	*B. murdochii*
BINT	=	*B. intermedia*

หน้า

BINN	=	*B. innocens*
ATCC	=	American Type Culture Collection
ND	=	not detected : ไม่ได้ทดสอบ
BHI	=	brain heart infusion broth
BAM-SR	=	blood agar modified medium ที่ผสม rifampicin 30 ไมโครกรัม/มล. และ spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล.
TSB	=	tryptic soy broth
TSA	=	tryptic soy agar
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
TE buffer	=	Tris-EDTA buffer
NOX	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
ND	=	Not detect
IFAT	=	indirect fluorescene antibody test
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
CLSI	=	Clinical and Laboratory Standards institute
NC	=	not detect colony
UC	=	uncountable

บทที่ 1

บทนำ

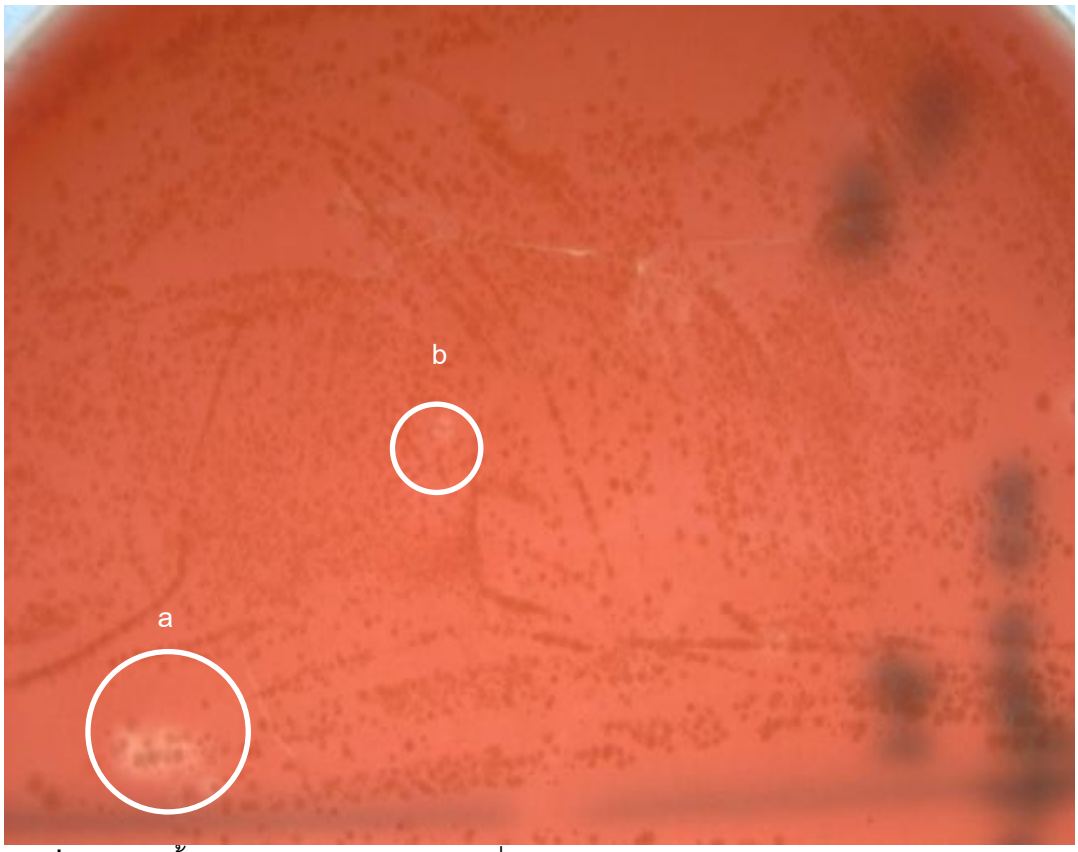
แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ

เชื้อเบรชิสไปร่า (*Brachyspira* : *B.*) เป็นกลุ่มสไปโรคีท (Spirochetes) ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก สุกรที่พบเชื้อ *Brachyspira* ทำให้เกิดอาการอุจจาระเหลวสีเทาจนถึงท้องเสียเป็นมูกเลือด (mucohemorrhagic diarrhea) หรือไม่มีการแสดงอาการป่วย ซึ่งขึ้นกับสปีชี่ส์ของเชื้อ (Hampson et al., 2006) เชื้อ *Brachyspira* spp. ที่พบในสุกรได้แก่ เบรชิสไปร่า ไฮโอดิสเซนเทอริ (*B. hyodysenteriae*) (Taylor and Alexander, 1971) เบรชิสไปร่า พิโลซิโคไล (*B. pilosicoli*) (Taylor et al., 1980) เบรชิสไปร่า อินโนเซนส์ (*B. innocens*) (Kinyon and Harris, 1979) เบรชิสไปร่า อินเตอร์มีเดีย (*B. intermedia*) (Hudson et al., 1976) เบรชิสไปร่า ซูแอนนาทินา (*B. suanatina*) (Råsbäck et al., 2007a) และ เบรชิสไปร่า เมอร์ดอคไค (*B. murdochii*) (Stanton et al., 1997) สำหรับเชื้อสไปโรคีทที่มีความสำคัญก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ได้แก่ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* โดยเป็นสาเหตุของอาการท้องเสียปนเลือดอย่างรุนแรงและท้องเสียแบบมีมูกตามลำดับ สุกรที่ติดเชื้อมักพบในระยะหลังหย่านมและพบมากในสุกรขุนระยะท้าย และสุกรพ่อแม่พันธุ์ (Hampson et al., 2006)

วิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการวินิจฉัยแยกเชื้อ คือ การเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกโดยผสมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม เช่น spectinomycin colistin และ vancomycin เพาะบ่มในภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobes) การแยกเชื้อด้วยอาหารคัดเลือกจะยับยั้งเชื้อปนเปื้อนในอุจจาระอื่นๆ และอนุญาตให้เชื้อสไปโรคีทในระบบทางเดินอาหารเจริญเติบโตได้ แต่ควรต้องมีเชื้อสไปโรคีทที่ปริมาณไม่ต่ำกว่า 10^8 colony forming unit (CFU)/มิลลิลิตร (มล.) ซึ่งมักเป็นระดับที่ก่อให้เกิดความเสียหายที่ลำไส้และสุกรแสดงอาการท้องเสียร่วมด้วย การพิสูจน์วินิจฉัยชนิดของเชื้อทำได้โดยการทดสอบความแตกต่างทางคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical tests) (Fellström et al., 1999) นอกจากนี้มีการพัฒนาการพิสูจน์วินิจฉัยด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล (Neef et al., 1994) ได้แก่ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสของ *tly* (haemolysin) gene หรือ หรือ 16S rDNA gene (La et al., 2003; La et al., 2006a; Råsbäck et al., 2006) ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* และ เชื้อ *B. pilosicoli* วิธีเหล่านี้มีความจำเพาะและความไวสูง ซึ่งสามารถตรวจเชื้อได้ในระดับต่ำกว่าการเพาะเชื้อ คือที่ปริมาณตั้งแต่ 10^2 - 10^3 CFU/มล. แต่วิธีทางอณูชีวโมเลกุลเหล่านี้มีประโยชน์เพียงการพิสูจน์วินิจฉัยไม่สามารถแยกเชื้อเป็นออกมาได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาใช้เพื่อศึกษา

คุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อได้ เช่น การประเมินความไวรับคุณลักษณะที่ก่อความรุนแรงในตัวสัตว์ เป็นต้น

ในประเทศไทยและอีกหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างกว้างขวางและตลอดช่วงเวลาของการเลี้ยงยกเว้นในช่วงก่อนส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ จึงเป็นปัจจัยเสริมให้มีการพัฒนาของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในระบบทางเดินอาหาร (Hanson et al., 2002; Chuanchuen et al., 2007; Chuanchuen et al., 2008; Prapasarakul et al., 2010) ดังนั้นการแยกเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะที่ผ่านมาอาจไม่สามารถกำจัดเชื้อปนเปื้อนจากอุจจาระ (coliform bacteria) ได้เพียงพอ คุณสมบัติของยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้เพื่อปรับปรุงประสิทธิรูปของอาหารคัดเลือกจึงควรมีลักษณะในการเพิ่มความสามารถในการแยกแยะเชื้อสไปโรคีท โดยช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อปนเปื้อนที่มีคุณสมบัติดื้อยา และไม่มีผลในการกดการเจริญเติบโตของเชื้อสไปโรคีท



ภาพที่ 1 แสดงเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระสุกรที่แสดงอาการบิดมูกเลือดภายหลังเพาะในภาวะไร้ก๊าซออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน a,b คือลักษณะแนวย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic zone) ของเชื้อสไปโรคีท ที่แยกได้แต่ไม่สามารถแยกออกจากเชื้อปนเปื้อนอื่นในอุจจาระ

ยาปฏิชีวนะกลุ่ม flavophospholipol มีคุณสมบัติหลักคือสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Clostridium* spp. และ *Streptococcus* spp. โดยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ transglycosylase ในกระบวนการสร้างผนังเซลล์ในส่วนของ peptidoglycan (Van den Bogaard et al., 2002) และยังสามารถยับยั้งกระบวนการส่งผ่าน (conjugation) ของ R-plasmid โดยการทำลายส่วนของผนังเซลล์แกรมลบตรงส่วนที่เป็นสะพานเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ในระหว่างที่มีการส่งผ่าน ดังนั้นยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จึงมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะกลุ่ม coliform bacteria และเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้สารต้านจุลชีพอื่นที่มีประสิทธิรูปในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* คือ halquinol (สารประกอบ 5,7-Dichloro-8-quinolinol ผสมกับ 5-Chloro-8-quinolinol) เป็นสารสังเคราะห์ในกลุ่ม quinolines ออกฤทธิ์เป็น intercalating molecules ต่อ chromosomal DNA ของแบคทีเรียและยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติยับยั้งการขับยาออกนอกเซลล์ (efflux pump) ในเชื้อ multidrugs resistant *Enterobacter* spp. (Mahamoud et al., 2006) flavomycin และ halquinol เป็นสารต้านจุลชีพที่มีคุณสมบัติในการลดปริมาณเชื้อปนเปื้อนและอาจเพิ่มประสิทธิรูปของอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกสำหรับเชื้อสไปโรคีทในระบบทางเดินอาหาร แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการทดสอบความไวรับของเชื้อสไปโรคีทต่อสารต้านจุลชีพดังกล่าวและการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อประโยชน์ข้างต้น การศึกษาติดตามการเปลี่ยนความไวรับต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อและการพิสูจน์เชื้อสปีชี่ส์ใหม่หรือสายพันธุ์ใหม่ และ การศึกษาด้านระบาดวิทยาโมเลกุล (molecular epidemiology) การเพาะเชื้อจึงยังคงมีความจำเป็นเพื่อการต่อยอดการศึกษาดังกล่าว โดยหวังผลในการเพิ่มประสิทธิรูปการคัดเลือกเชื้อสไปโรคีทและการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนตัวอย่างอุจจาระสุกรโดยการเสริมยาปฏิชีวนะชนิดใหม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาประสิทธิรูปของอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกเพื่อเพาะแยกเชื้อสไปโรคีทในระบบทางเดินอาหารสุกรที่สำคัญ ด้วยการเพิ่มชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม

คำสำคัญ

(ไทย) เบรซิสไปร่า ฟลาโวมัยซิน เชื้อสไปโรคีทในระบบทางเดินอาหารสุกร สุกร อาหารเลี้ยงเชื้อคัดกรองแบคทีเรีย

(อังกฤษ) *Brachyspira,* flavomycin, intestinal spirochetes, pig, selective media

คำถามสำหรับงานวิจัย

การผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin หรือ halquinol ในอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกสามารถเพิ่มประสิทธิรูปการแยกเชื้อสไปโรคีทจากระบบทางเดินอาหารของสุกรได้หรือไม่

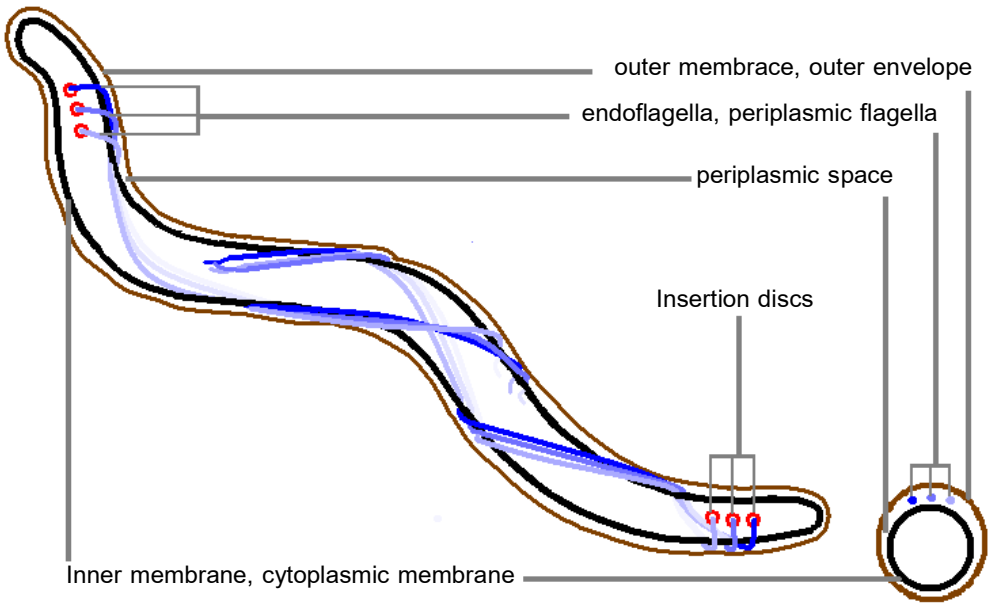
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

เพิ่มประสิทธิรูปการแยกเชื้อสไปโรคีทในระบบทางเดินอาหารของสุกรในแง่ของจำนวนตัวอย่างที่พบ และลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนจากอุจจาระ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

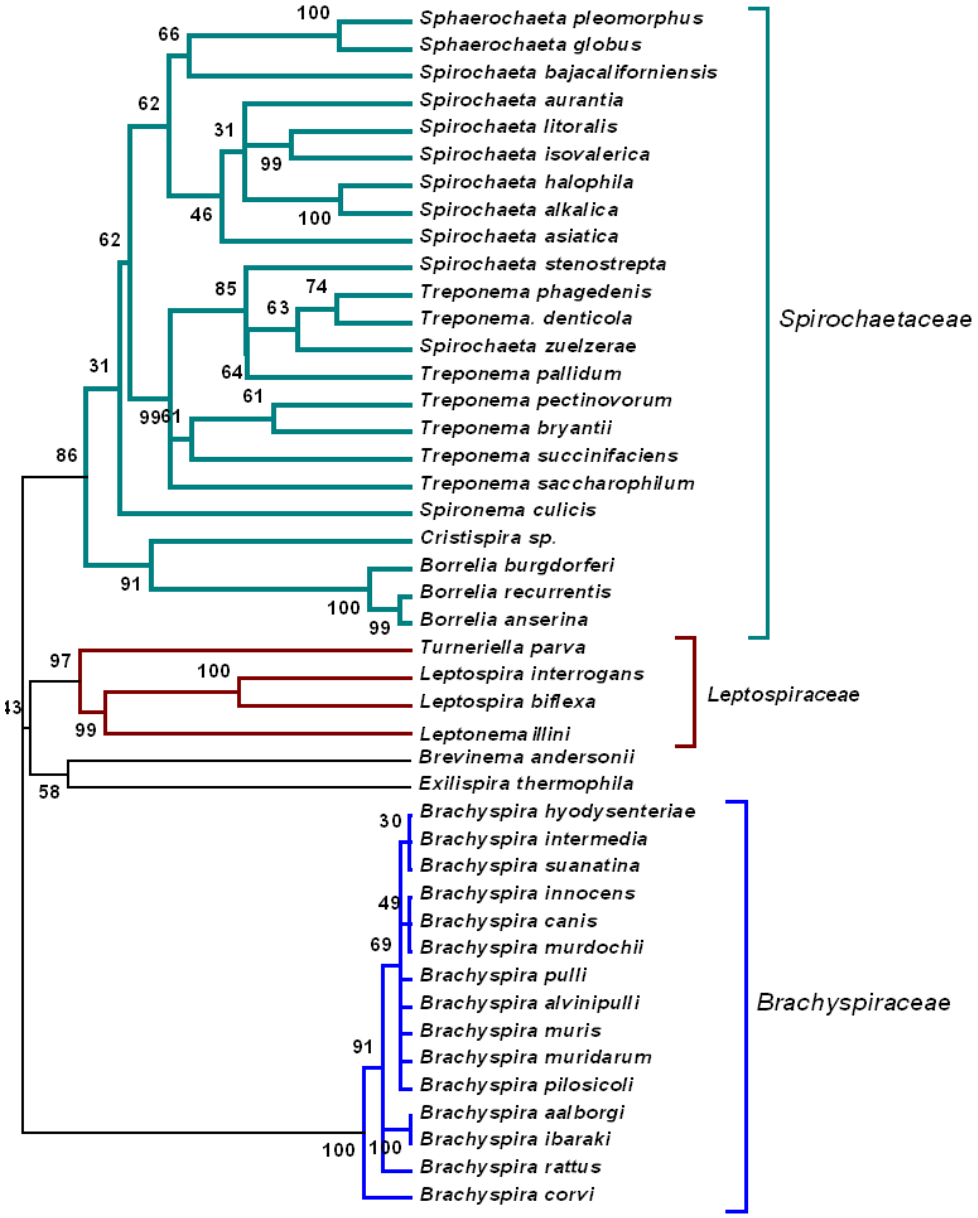
2.1 เชื้อแบคทีเรียกลุ่มสไปโรคีท (*Spirochetes*)



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างและรูปร่างของเชื้อในไฟลั่ม *Spirochetes*

เชื้อสไปโรคีทหมายถึงกลุ่มแบคทีเรียที่อยู่ใน ไฟลั่ม สไปโรคีทส์ (*Spirochaetes*) ทั้งหมด มีลักษณะเฉพาะดังนี้คือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะโครงแนวยาวบิดเป็นเกลียว คล้ายงู (serpentine like bacteria) สามารถเคลื่อนที่แบบหมุนเกลียว (cork-screw movement) มีขนาดที่แตกต่างกันโดยเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 0.09 -0.75 นาโนเมตร และความยาวตั้งแต่ 3-500 นาโนเมตร ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานร่วมของแบคทีเรียในไฟลั่ม ดังแสดงในรูปที่ 2 คือ การมีลักษณะโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์มากกว่า 1 ชั้น คือ ชั้นนอก (outer membrane or outer envelope) ชั้นในที่ห่อหุ้มไซโตพลาสม (cytoplasmic membrane or inner membrane) โดยชั้นของ เปปทิโดไกลแคนส์ (peptidoglycans) จะห่อหุ้มอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน โครงสร้างที่อยู่ภายใต้เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกทั้งหมดเรียกว่าโปรโตพลาสมิก ไซลินเดอร์ (protoplasmic cylinder) มี แฟลกเจลลา (flagella) ยึดเกาะที่บริเวณด้านหัวและท้ายของแบคทีเรีย (terminal end) มีทิศทางยื่นไปทางด้านปลายด้านตรงข้ามของตัวแบคทีเรียและแนบชิดอยู่กับ protoplasmic cylinder อยู่ภายใน เพอริพลาสมิก สเปซ (periplamic space:ช่องว่างระหว่าง outer และ inner membrane) การเคลื่อนที่ยืดหดของ flagella ดังกล่าวทำให้เกิดการเคลื่อนที่แบบบิดเกลียว จำนวน flagella และตำแหน่งการยึดเกาะของแบคทีเรียนั้นมีความแตกต่างกันตามชนิดของสไปโรคีทนั้น (Johnson, 1977)

แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีทั้งลักษณะที่ดำรงชีพเป็นอิสระในสิ่งแวดล้อมเช่น สไปโรคีตา ฮาโลฟิลา (*Spirocheta halophila*) ในแหล่งน้ำเค็ม (Greenberg and Canale-Parola, 1976) และ สไปโรคีตา ออแรนเทีย (*Spirocheta aurantia*) ในแหล่งน้ำจืด (Breznak and Canale-Parola, 1969) หรือกลุ่มที่อาศัยร่วมกับโฮสต์โดยไม่ก่อโรคเช่น มิโสทริชา พาราดอกซา (*Mixotricha paradoxa*) (Konig et al., 2006) ที่เกาะติดกับผนังชั้นนอกของโปรโตซัวในทางเดินอาหารปลวก กลุ่ม คริสติสไปร่า (*Cristispira*) ในทางเดินอาหารของหอย (Noguchi, 1921) และกลุ่มก่อโรคกับโฮสต์ เช่น *Brachyspira hyodysenteriae* ที่เป็นสาเหตุของโรคบิดมูกเลือดในสุกร (Taylor and Alexander, 1971)



ภาพที่ 3 Phylogenetic tree ส่วน 16S rDNA ของเชื้อในไฟลั่ม *Spirochetes*

2.2 การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม spirochetes

แบ่งออกได้เป็น 3 วงศ์ (families) (ดังแสดงในรูป phylogenetic tree (รูปที่ 3)) คือ

1.สไปโรคีตาซิอิ(*Spirochetaceae*) เชื้อที่มีก่อโรคสำคัญคือ ทริโปนิมา พาลิดุม (*Treponema pallidum*) ก่อโรคซิฟิลิส บอริเลีย เบอร์ดอร์ฟเฟอริ (*Borrelia burgdorferi*) ก่อให้เกิดโรคไลม์ (Lyme disease)

2. เลปโตสไปราซิอิ(*Leptospiraceae*) เชื้อที่ก่อโรคที่สำคัญคือ เลปโตสไปร่า อินเตอร์โรแกนส์ *Leptospira interrogans* ก่อโรคฉี่หนู

3. เบรชิสไปราซิอิ (*Brachyspiraceae*) เชื้อที่ก่อโรคสำคัญคือ เบรชิสไปร่า ไฮโอดิสเซอเทอริ (*B. hyodysenteriae*) ก่อโรคบิดมูกเลือด และ เบรชิสไปร่า พิโลซิโคไล (*B. pilosicoli*) ก่อโรคท้องเสียจากการติดเชื้อสไปโรคีท (colonic spirochetosis)

และยังพบเชื้อบางสปีชี่ส์ที่ไม่สามารถจัดเข้าสู่ตระกูลเชื้อใดได้เช่น บรีวินีมา แอนเดอร์สันนิอิ (*Brevinema andersonii*) และเอกซิลิสไปร่า เทอร์โมฟิลา (*Exilispira thermophila*) (Johnson, 1977)

2.3 เชื้อแบคทีเรียในตระกูล *Brachyspiraceae*

เชื้อ *Brachyspira* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในไฟลั่ม สไปโรคีทส์ (*Spirochaetes*) ชั้น สไปโรคีทส(*Spirochetes*) ลำดับ สไปโรคีทาเลส (*Spirochetales*) วงศ์ เบรคิสไปร่าซิอิ (*Brachyspiraceae*) มีลักษณะทางจุลสันฐานวิทยาเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างบิดเป็นเกลียวคล้ายงู ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.35-0.38 ไมครอน ยาว 7-9 ไมครอน เคลื่อนที่แบบควงเกลียว (flexing and rotating motility) เจริญเติบโตในภาวะไร้ก๊าซออกซิเจน (obligate anaerobe) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดสัตว์ 5% พบเป็นโคโลนีกลมขนาดเล็ก 1-2 มิลลิเมตร ขอบเรียบ แบนหรือนูนเล็กน้อย สีขาวใส พบลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้า (β-hemolysis) รอบโคโลนี (Stanton, 2006) ในปัจจุบันแบ่งแยกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ความแตกต่างคุณสมบัติทางชีวเคมี ร่วมกับ ลำดับเบสในส่วน 16S rDNA gene ร่วมกับวิธีการจำแนกทางชีวโมเลกุลอื่นๆ ได้ทั้งสิ้น 16 สปีชี่ส์ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะการก่อโรคและโฮสต์ของเชื้อในวงศ์ *Brachyspira*

เชื้อแบคทีเรียในวงศ์ *Brachyspiraceae*	โฮสต์	ลักษณะการก่อโรค	เอกสารอ้างอิง
B. hyodysenteriae	สุกร เป็ดมัลลาร์ด	บิดมูกเลือด	(Taylor and Alexander, 1971)
B. intermedia	สุกร ไก่	อุจจาระเหลว	(Hudson et al., 1976; McLaren et al., 1997)
B. innocens	สุกร	อุจจาระเหลว	(Kinyon and Harris, 1979)
B. pilosicoli	สุกร มนุษย์ ไก่	อุจจาระเหลว	(Taylor et al., 1980; Lee and Hampson, 1992; Stephens and Hampson, 1999)
B. aalborgi	มนุษย์ ลิงกลุ่ม primates	อุจจาระเหลว	(Hovind-Hougen et al., 1982; Munshi et al., 2003)
B. alvinipulli	ไก่	อุจจาระเหลว	(Swayne et al., 1992)
B. murdochii	สุกร ไก่	ไม่ทราบการก่อโรคแน่ชัด	(Stanton et al., 1997; Stephens and Hampson, 1999)
B. pulli	ไก่	ไม่ทราบการก่อโรคชัด	(McLaren et al., 1997)
B. canis	สุนัข	อุจจาระเหลว	(Duhamel et al., 1998)
*B. ibaraki**	มนุษย์	อุจจาระเหลว	(Mikosza et al., 2004)
B. christianni *	มนุษย์	อุจจาระเหลว	(Mikosza et al., 2004)
*B. suanatina**	เป็ดมัลลาร์ด สุกร	อุจจาระเหลวมีเลือดปน	(Råsbäck et al., 2007a)
B. corvi *	นกวงศ์กา	ไม่ทราบการก่อโรคแน่ชัด	(Jansson et al., 2008)
*B. muris**	หนู mice	ไม่ทราบการก่อโรคแน่ชัด	(Backhans et al., 2010)
*B. muridarum**	หนู mice	ไม่ทราบการก่อโรคแน่ชัด	(Backhans et al., 2010)
*B. rattus**	หนู rats	ไม่ทราบการก่อโรคแน่ชัด	(Backhans et al., 2010)

* การเสนอสปีชีส์ของเชื้อสไปโรคีทอย่างไม่เป็นทางการ

2.4 ประวัติของการจัดลำดับและการเปลี่ยนแปลงชื่อสกุลของ *Brachyspira* ในสุกร

ลักษณะอาการของโรคคล้ายบิดมูกเลือดสุกรได้รับการยืนยันมาตั้งแต่ปี 1921 (Whiting et al., 1921) แต่ยังทราบเพียงลักษณะของเชื้อที่มีรูปร่างบิดเป็นเกลียวจากการส่องดูอุจจาระโดยเชื้อ

ขนาดใหญ่ที่บิดเป็นเกลียวถูกเรียกชื่อว่า ทริโปนิมา ไฮโอดิสเซอเทอริ (*Treponema hyodysenteriae*) (Taylor and Alexander, 1971) จากลักษณะของรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์และความสามารถที่ต้องเจริญในสภาวะไร้ก๊าซออกซิเจนเท่านั้น (Harris et al., 1972a) และ ส่วนเชื้อขนาดเล็กกว่าที่รูปร่างบิดเป็นเกลียวและไม่ก่อโรคในสุกรให้ชื่อว่า วิบริโอ โคไล (*Vibrio coli*) ต่อมาเปลี่ยนเป็น แคมไพโลแบคเตอร์ โคไล (*Campylobacter coli*) (Fernie et al., 1975) เมื่อพบว่าแบคทีเรียมีลักษณะรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกับ *Treponema hyodysenteriae* แต่ไม่ก่อโรคในสุกร จึงเปลี่ยนชื่อเป็น ทริโปนิมา อินโนเซนส์ (*Treponema innocens*) (Kinyon and Harris, 1979) ต่อมามีการกำหนดจีนัสใหม่อีกโดยศึกษาสัดส่วนของความต่างเชิงร้อยละของโมลเบส G+C ของ DNA ระหว่างเชื้อ *Treponema* ที่แยกได้จากอุจจาระสุกรทั้งสองพบว่าอยู่ที่ระดับร้อยละ 25.8 ซึ่งแตกต่างจากเชื้อ *Treponema palidum* โดยพบว่าอยู่ที่ระดับร้อยละ 53 (Miao and Fieldsteel, 1978; Miao et al., 1978) ร่วมกับระดับความเหมือนของลำดับเบสยีน *16S rDNA* อยู่ที่ประมาณร้อยละ 5 (ในขณะที่เชื้อ *T. innocens* และ *T. hyodysenteriae* มีความเหมือนอยู่ที่มากกว่าร้อยละ 99) ดังนั้นเชื้อทั้งสองจึงถูกแยกจากสกุล *Treponema* และตั้งชื่อเป็นสกุลใหม่เป็น เซอพูล่า (*Serpula*) (Stanton et al., 1991) แต่ชื่อดังกล่าวพบว่าถูกใช้ตั้งเป็นชื่อสกุลเชื้อราไปแล้ว ทำให้เชื้อทั้งสองถูกตั้งชื่อสกุลใหม่อีกครั้งเป็น เซอพูลิน่า (*Serpulina* : *S*) ภายหลังการศึกษาต่อมาพบว่าเชื้อที่เพาะแยกจากตัวอย่างอุจจาระสุกร *Serpulina* ที่มีผลการศึกษารูปร่าง การทดสอบทางชีวเคมี (Lee et al., 1993) การทดสอบการก่อโรค (Lemcke and Burrows, 1981) รวมถึงการทดสอบรูปแบบของความต่างของลักษณะประจุเอนไซม์ของแบคทีเรียที่วิ่งผ่านสนามไฟฟ้า (multilocus enzyme electrophoresis: mlee) (Lymbery et al., 1990)และลำดับเบสของส่วน 16S rDNA (Fellström et al., 1995; Pettersson et al., 1996) พบความแตกต่างจนสามารถแยกเชื้อดังกล่าวออกมาเป็นสปีชี่ส์ใหม่จาก *S. hyodysenteriae* โดยที่ชื่อว่า เซอพูลิน่า พิโลซิโคไล (*Serpulina pilosicoli*) (Trott et al., 1996b) (โดยชื่อเดิมคือ แอกัลลินา โคไล (*Auguillina coli*) (Lee and Hampson, 1994)) ต่อมามีผู้ศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบ MLEE ของเชื้อสไปโรคีทที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียในมนุษย์คือเชื้อ เบรชิสไปร่า อัลเบอร์ไก (*Brachyspira aalborgi*) และเชื้อที่แยกได้สไปโรคีทในทางเดินอาหารอื่นๆ ได้แก่ *S. hyodysenteriae* , *S. pilosicoli* และ *S. innocens* พบว่ามีความแตกต่างกันในระดับสปีชี่ส์ แต่เหมือนกันในระดับจีนัส (Lee and Hampson, 1994) แต่เมื่อศึกษาถึงลำดับเบสของส่วน 16S rDNA พบว่าเชื้อทั้งหมดดังกล่าวมีความเหมือนกันมากกว่า 96% ดังนั้นเชื้อทั้งหมดจึงถูกจัดรวมอยู่ในสกุลเดียวกันคือสกุล *Brachyspira* (Ochiai et al., 1997) ในปี 2006 เชื้อ *Serpulina* สปีชี่ส์ เซอพูลิน่า เมอดอร์คไก (*Serpulina murdochii*) และเซอพูลิน่า อินเตอร์มีเดีย (*S. intermedia*) ก็ถูกย้ายไปอยู่ในสกุล

Brachyspira เช่นกัน จากความใกล้เคียงกันของลำดับเบสส่วน 16S rDNA (Hampson and La, 2006) เชื้อ *Brachyspira* สปีชี่ส์ล่าสุดที่มีการในสุกรคือเชื้อ เบรชิสไปร่า ซูแอนนาตินา (*Brachyspira suanatina*) แยกจากเชื้อ *B. hyodysenteriae* จากความแตกต่างของลำดับเบสในส่วน 16S rDNA และยีน *nox* (Råsbäck et al., 2007a)

2.5 ลักษณะการก่อโรคที่เนื่องจากการติดเชื้อ *Brachyspira* ในสุกร

โรคบิดมูกเลือด

สุกรแสดงอาการอุจจาระเหลวโดยมีเลือดและเยื่อเมือกปนออกมากับอุจจาระถูกพบครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกา (Whiting et al., 1921) เกิดจากการติดเชื้อ *B. hyodysenteriae* (Taylor and Alexander, 1971) จนกระทั่งในปัจจุบันพบว่า *B. suanatina* สามารถทำให้เกิดอาการดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน (Råsbäck et al., 2007a) โรคบิดมูกเลือดพบในสุกรได้ตั้งแต่ระยะหลังจากอนุบาล (8 สัปดาห์) จนถึงส่งขาย ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ก่อความรุนแรง ความสามารถสเตรนของเชื้อ (virulent factors) (Lee et al., 1993) โดยพบแล้วว่ามีความเกี่ยวข้องกับพลาสมิด (plasmid) ขนาด 36 กิโลเบสที่พบเฉพาะสเตรนที่มีอัตราการติดเชื้อและก่อโรคในระดับสูง 92% จากการทดลองป้อนเชื้อในสุกร โดย plasmid ดังกล่าวมียีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) และกระบวนการเติมหมู่คาร์โบไฮเดรตเข้าไปในสายเปปไทด์ที่สร้างขึ้น (glycosylation) (La et al., 2011) ส่วนระดับภูมิคุ้มกันของฝูงพบว่ามีส่วนสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้น (Thomson et al., 2001) ระยะการติดเชื้อจนถึงแสดงอาการของโรคที่เร็วที่สุดคือ 5 วัน ช้าที่สุดคือ 10-15 วัน ในบางกรณีสุกรที่รับเชื้อแล้วไม่แสดงอาการของโรคสามารถการปล่อยเชื้อออกมากับอุจจาระได้ถึง 51 วัน(Jacobson et al., 2004) และสุกรที่หายจากโรคแล้วสามารถปล่อยเชื้อออกมากับอุจจาระได้ถึง 90 วันหลังจากวันที่ไม่แสดงอาการของโรค (convarescent period) (Harris et al., 1972a) ในกรณีที่ไม่มีการควบคุมโรคด้วยยาปฏิชีวนะจะพบอัตราการติดเชื้อสูงถึง 90-100% ทั้งฝูงสุกรขุนและสุกรที่ติดเชื้อจะมีอัตราการตาย 20-30% กรณีที่สุกรไม่ตายพบว่าสุกรป่วยจะสูญเสียน้ำหนักและมีประสิทธิภาพในการใช้อาหารที่ลดลง ถึงแม้จะมีรายงานเกี่ยวกับภูมิคุ้มโรคของสุกรภายหลังจากการติดเชื้อ แต่พบว่าสุกรสามารถติดเชื้อซ้ำได้ในอัตราถึง 7-53% เชื้อ *B. hyodysenteriae* (Joens and Glock, 1979; Joens et al., 1979) อาศัยและเพิ่มจำนวนอยู่บริเวณทางเดินอาหารส่วนท้ายของสุกรโดยพบได้ทั้งในส่วนของพื้นผิวชั้นนอกของลำไส้ ภายในหลืบ (crypt) ในส่วนของไส้ตัน ลำไส้ใหญ่ และลำไส้ตรง เชื้อชนิดนี้จะลุกล้ำผ่านเซลล์เยื่อบุลำไส้ เซลล์รูปถ้วยที่มีหน้าที่ผลิตเมือก (globet cell) และชั้น lamina propria (Taylor and Blakemore, 1971; Glock et al., 1974) ความรุนแรงของโรคยัง

ขึ้นกับชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในกลุ่มไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตอีกด้วย การพบเชื้อ *Bacteroides fragilis*, *B. vulgates* และ *Fusobacterium necrophorum* ร่วมกับเชื้อ *B. hyodysenteriae* จะมีความรุนแรงของโรคเพิ่มสูงขึ้น (Whipp et al., 1979)

นอกจากการติดต่อระหว่างสุกรโดยตรง จะเป็นทางที่สำคัญของการแพร่เชื้อโรคในฟาร์ม แล้วพบว่า ผู้เลี้ยง ปัจจัยจากสรูปแวดล้อมภายนอกก็มีผลต่อการคงอยู่ของเชื้อได้ เช่น เชื้อที่ปนเปื้อนในบ่อน้ำทิ้งในฟาร์ม (Glock et al., 1975; Songer et al., 1978) เชื้อที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ในฟาร์มอื่น ๆ เช่น หนู และ แมลงสาบ โดยหนูสามารถปล่อยเชื้อ *B. hyodysenteriae* ออกมากับอุจจาระได้นานถึง 180 วัน (Joens and Glock, 1979)

โรคท้องเสียจากการติดเชื้อ *Brahcyspira* spp.อื่น ๆ ในสุกร

เชื้อโรคท้องเสียจากการติดเชื้อ *Brachyspira* ที่ไม่ใช่กรณีบิดมูกเลือดที่มีผู้ศึกษาวิจัยมากที่สุดคือ *B. pilosicoli* เชื้อนี้ทำให้เกิดอาการท้องเสียอย่างอ่อน ไม่พบลักษณะของอุจจาระปนเลือด มีชื่อเรียกเฉพาะว่า spirochetal diarrhea (Taylor et al., 1980) หรือ porcine intestinal spirochetosis (Trott et al., 1996b) สุกรที่ติดเชื้อจะแสดงอาการท้องร่วงอุจจาระมีสีเทาเหลว บางครั้งพบมูกปนออกมาด้วย พบได้ตั้งแต่หลังจากหย่านม 2 สัปดาห์ อัตราการตายต่ำ ทำให้สูญเสียน้ำหนัก และประสิทธิรูปการใช้อาหาร อาการทั้งสามารถกลับมาเป็นปกติได้ภายหลังจากการติดเชื้อ 1-2 สัปดาห์ บางครั้งพบว่าสุกรไม่พบอาการป่วยแม้ว่าสุกรจะมีแบคทีเรียดังกล่าวเจริญในลำไส้ (Stanton, 2006) พยาธิกำเนิดของเชื้อโดยเชื้อจะใช้ปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์เกาะติดกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ (microvilli) โดยเฉพาะบริเวณไส้ตัน และลำไส้ตรง โดยมีลักษณะเฉพาะ คล้ายแผงของขนแปรงเรียกว่า false brush border (Taylor et al., 1980) กรณีดังกล่าวทำให้เกิดลักษณะการท้องเสียเนื่องจากเชื้อไปปิดกั้นการดูดของเหลวกลับจากตัวอุจจาระของเซลล์เยื่อบุลำไส้(Trott et al., 1995) จากการทดลองเพาะเชื้อ *B. pilosicoli* ร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดจาก human epithelial colorectal adenocarcinoma ($CACO_2$) พบว่าภายหลังจากเกาะที่เซลล์ เชื้อบางส่วนจะแทรกตัวจนเกิดลักษณะเป็นรอยบุ๋มลงไปในพื้นผิวของเซลล์ และเซลล์ดังกล่าวเกิดการหดตัวของนิวเคลียส การแตกหักของโครมาติน (chromatin) และการตายในลักษณะแบบ อพอบโทซิส (apoptosis) ในระดับของการเรียงตัวของเซลล์พบว่าภายหลังจากติดเชื้อพบว่าเกิดการแยกตัวของ โซลูนา ออกคลูเดนส์ 1 (Zoluna occludens1) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของโครงสร้างยึดติด (tight junction) เข้าไปในส่วนของ cytoplasm (Naresh et al., 2009)

2.6 ความแตกต่างของคุณสมบัติของเชื้อ *Brachyspira* สปีชี่ส์ต่างๆ ที่เพาะแยกได้จากทางเดินอาหารของสุกร

Brachyspira hyodysenteriae

ก่อให้เกิดอาการบิดมูกเลือดในสุกร ส่วนใหญ่พบในช่วงสุกรรุ่นถึงสุกรขุน (Stanton, 2006) มีความยาวประมาณ 7 -12 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32-0.38 ไมโครเมตร มี peripalsmic flagella 7-14 เส้น เกาะที่บริเวณด้านปลายแต่ละด้าน มี ร้อยละของโมลเบส G+C ของ DNA เท่ากับ 25.8 โดยทั่วไปแล้วมีความสามารถทำให้เกิดลักษณะของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างรุนแรง (strong beta hemolysis) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสมอยู่ มีความสามารถในการสร้างสารอินโดล (indole) จากทริปโตเฟน (tryptophan) หรือทริปโตน (tryptone) (Stanton et al., 1991) [แต่พบว่ามีการศึกษาที่เชื้อในสปีชี่ส์นี้บางเสตรนไม่สามารถสร้างสาร indole (Hommez et al., 1998)] ไม่สามารถใช้ fructose เป็นพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจนได้ ไม่สามารถย่อยสลาย ฮิปปูเรท (hippurate) โดยวิธีไฮโดรไลส์ (Stanton et al., 1991) ความสามารถการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างรุนแรงเกิดจากการที่เชื้อมียีน *hlyA* ที่สามารถแปลรหัสออกเป็น ฮีโมไลซิน (hemolysin) ที่มีคุณสมบัติย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hsu et al., 2001) ลักษณะการเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบรุนแรงเป็นลักษณะสำคัญของเชื้อในสปีชี่ส์นี้

Brachyspira innocens

เพาะแยกได้จากสุกรที่ไม่ได้แสดงอาการผิดปกติเกี่ยวกับทางเดินอาหาร โดยมีรูปร่างลักษณะคล้าย *B.hyodysenteriae* แต่มีลำดับเบสจากการตรวจสอบโดยวิธี DNA-DNA saturation-reassociation assays เหมือนกับ *B.hyodysenteriae* เพียง 28% (Miao et al., 1978) มีความยาวประมาณ 7 -12 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32-0.38 ไมโครเมตร และ peripalsmic flagella จำนวน 8-14 เส้น เกาะที่บริเวณด้านปลายแต่ละด้าน มีร้อยละของโมลเบส G+C ของ DNA เท่ากับ 26 มีความสามารถทำให้เกิดลักษณะของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างอ่อน (weak beta hemolysis) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสมอยู่ (Hudson et al., 1976)ไม่สามารถสร้างสาร indole จาก tryptophan หรือ tryptone ได้ มีความสามารถในการใช้ fructose เป็นพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจน ไม่สามารถย่อยสลาย hippurate โดยวิธีไฮโดรไลส์ (Stanton et al., 1991)

Brachyspira pilosicoli

ก่อให้เกิดการท้องเสียในลักษณะอุจจาระเป็นสีเทาเหลวในสุกร (porcine colonic spirochetosis) มีความยาวประมาณ 4 -12 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25-0.3 ไมโครเมตร

และ peripalsmic flagella จำนวน 4-7 เส้น เกาะที่บริเวณด้านปลายแต่ละด้าน มี ร้อยละของโมลเบส G+C ของ DNA เท่ากับ 25 (Trott et al., 1996b) มีความสามารถทำให้เกิดลักษณะของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างอ่อน (weak beta hemolysis) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสมอยู่ ไม่สามารถสร้างสาร indole จาก tryptophan หรือ tryptone ได้ มีความสามารถในการใช้ fructose เป็นพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจน สามารถย่อยสลาย hippurate โดยวิธีไฮโดรไลส์ (Fellström and Gunnarsson, 1995) และพบว่าเชื้อ *B. pilosicoli* มียีน *hlyA* เช่นเดียวกับ *B. hyodysenteriae* (Hsu et al., 2001) แต่พบว่ายีนดังกล่าวไม่มีการแสดงออกในเชื้อนี้ จึงทำให้เกิดย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างอ่อน (Zuerner et al., 2004)

Brachyspira intermedia

มีรายงานการก่อให้เกิดการท้องเสียในสุกร ความยาวประมาณ 7.5-10 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32-0.38 ไมโครเมตร และ peripalsmic flagella จำนวน 12-14 เส้น เกาะที่บริเวณด้านปลายแต่ละด้าน มีร้อยละของโมลเบส G+C ของ DNA เท่ากับ 25 มีความสามารถทำให้เกิดลักษณะของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างอ่อน (weak beta hemolysis) ความสามารถในการสร้างสาร indole จาก tryptophan หรือ tryptone ได้ มีความสามารถในการใช้ fructose เป็นพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจน ไม่สามารถย่อยสลาย hippurate โดยวิธีไฮโดรไลส์ ได้ ชื่อของเชื้อในสปีชี่ส์นี้ได้มาจากลักษณะผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่มีลักษณะอยู่กึ่งระหว่าง *B. hyodysenteriae* และเชื้อ *B. innocens* (Stanton et al., 1997)

Brachyspira murdochii

เป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากทางเดินอาหารสุกรปกติ ของสุกร มีความยาวประมาณ 5-8 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.35-0.4 ไมโครเมตร และ peripalsmic flagella จำนวน 11-13 เส้น เกาะที่บริเวณด้านปลายแต่ละด้าน มี ร้อยละของโมลเบส G+C ของ DNA เท่ากับ 27 มีความสามารถทำให้เกิดลักษณะของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างอ่อน (weak beta hemolysis) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสมอยู่ ไม่สามารถในการสร้างสาร indole จาก tryptophan หรือ tryptone ได้ มีความสามารถในการใช้ fructose เป็นพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจน ไม่สามารถย่อยสลาย hippurate โดยวิธีไฮโดรไลส์ (Stanton et al., 1997)

Brachyspira suanatina

เพาะแยกได้จากทางเดินอาหารสุกรที่แสดงอาการท้องเสียแบบมีมูกเลือดปน มีความสามารถทำให้เกิดลักษณะของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างรุนแรง เชื้อ *B. suanatina* ไม่มียีน *hlyA* มีความสามารถในการสร้างสาร indole จาก tryptophan หรือ tryptone ได้ ไม่สามารถย่อยสลาย hippurate โดยวิธีไฮโดรไลส์ (Råsbäck et al., 2007a)

2.7 ประวัติการเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira*

การศึกษาโรคบิดมูกเลือดในสุกรในระยะแรกใช้วิธีสังเกตรูปร่างของเชื้อ การลักษณะการเคลื่อนที่ผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นดำ (dark-field microscopy) ด้วยขนาดกำลังขยาย 400 เท่า ร่วมกับการพิจารณาลักษณะรอยโรคของสุกรและการเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระและลำไส้ที่เกิดรอยโรค ต่อมาได้พัฒนาการเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดนี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งด้วยการกรองสารละลายผนังชั้นในลำไส้ของสุกรกรองผ่าน แผ่นกรองชนิด cellulose acetate ตามลำดับจากขนาดช่องของแผ่นกรองขนาดใหญ่ไปหาเล็ก ดังนี้คือเริ่มการกรองจากแผ่นกรองเส้นผ่านศูนย์กลางของรูความกว้าง 8 ไมครอน แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านแผ่นกรองเส้นผ่านศูนย์กลางของรูเล็กลงไปเรื่อยๆ (5-> 3 -> 1.2 ->0.8 ->0.65) จนถึงขนาดความกว้าง 0.45 ไมครอน แล้วเกลี่ยสารละลายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptose agar ผสมเลือดวัวหรือเลือดม้า 5% บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในโถอัดที่บรรจุก๊าซ ไฮโดรเจน :คาร์บอนไดออกไซด์ ในสัดส่วน 80-95%: 20-5% และเร่งปฏิกิริยาด้วย palladium catalyst โคโลนีของเชื้อ *Brachyspira* มีลักษณะเรียบแบนขนาดเล็ก 0.5-1 มิลลิเมตร ใส (translucent) และพบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้า (Harris et al., 1972b; Harris et al., 1973)

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีกรองเพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีขนาดใหญ่กว่า 0.45 ไมครอนข้างต้น จะตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *Brachyspira* ในช่วงที่สุกรแสดงอาการป่วยในระยะเฉียบพลันเป็นส่วนใหญ่ แต่พบว่าตรวจพบได้จำนวนตัวอย่างน้อยในสุกรที่ติดเชื้อในระยะแรกที่ยังไม่พบอาการ แต่สามารถถ่ายทอดเชื้อไปยังสุกรที่ไวรับต่อโรคได้ (Gorrie, 1946) เพื่อยืนยันเชื้อในสุกรกลุ่มดังกล่าวจึงมีการพัฒนาการเพาะเชื้อโดยผสมยาปฏิชีวนะชนิด spectinomycin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม aminoglycyclitols โดยอาศัยข้อมูลความไวรับของยาต่อเชื้อที่มีในระดับต่ำ (DeGeeter and Harris, 1975) อีกทั้งยังมีความสามารถในการทำลายเชื้อกลุ่มแกรมลบที่อยู่ภายในทางเดินอาหารได้ดี (Finland et al., 1976) เชื้อ *Brachyspira* เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยา spectinomycin ได้ในระดับ 1,000 ไมโครกรัม/มล. แต่ความเข้มข้นของเชื้อจะลดลงไป 10-100 เท่าของความเข้มข้นของเชื้อที่ใส่ลงไปตอนเริ่ม แต่ที่ระดับยา 400 ไมโครกรัม /มล.

spectinomycin (S400) พบว่ามีความเหมาะสมที่สามารถยับยั้งปริมาณแบคทีเรีย ปนเปื้อนในทางเดินอาหารได้ถึง 99.9% และไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Brachyspira* (Songer et al., 1976) spectinomycin จึงเป็นยาปฏิชีวนะพื้นฐานที่ใช้ผสมในอาหารเลี้ยงในการเพาะเชื้อ *Brachyspira* ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ต่อมาได้มีผู้พยายามนำยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆมาใช้ผสมร่วมกับ spectinomycin โดยเลือกจากผลค่าความไวรับของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะในระดับที่ต่ำต่อเชื้อ *B. hyodysenteriae* ดังแสดงในตารางที่ 2 ด้วยการเสริมยาปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบคัดเลือกเปรียบเทียบกับการใช้ spectinomycin เพียงชนิดเดียว เรียงลำดับตามปีการศึกษาดังนี้คือ ในปีค.ศ. 1981 มีการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยา colistin 25 ไมโครกรัม/มล. + vancomycin 25 ไมโครกรัม/มล. + spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. เรียกว่า CVS agar สามารถลดปริมาณเชื้อปนเปื้อนอื่นในอุจจาระจากระดับ 10^8 CFU/มล. จนถึงระดับน้อยกว่า 10^2 CFU/มล. โดยไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. hyodysenteriae* ทั้ง 6 เสตรนที่นำมาทดสอบ (Jenkinson and Wingar, 1981) ในปี ค.ศ. 1982 มีผู้ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยา spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. + spiramycin 5 ไมโครกรัม/มล.เพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์ จนสามารถยืนยันเชื้อสไปโรคีทจากทางเดินอาหารสปีชี่ส์ใหม่ คือ *B.aalborgi* (Hovind-Hougen et al., 1982) ในปี ค.ศ. 1986 มีการศึกษาเปรียบเทียบผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาสองสูตรคือยา spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. + vancomycin 250 ไมโครกรัม/มล. (S+V250) และ ยา spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. + colistin 25 ไมโครกรัม/มล. + brilliant green 1 ไมโครกรัม/มล. (SCB) พบว่าอาหารเลี้ยงที่แยกตัวอย่างแบคทีเรีย *B. hyodysenteriae* ได้มากที่สุดคือ S+V250 และสามารถยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆจากอุจจาระให้อยู่ในระดับ 4.5 x 10^0 CFU/มล. (Szynkiewicz and Binek, 1986) ปี ค.ศ. 1988 ทดสอบประสิทธิรูปของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยา spectinomycin 200 ไมโครกรัม/มล. + spiramycin 25 ไมโครกรัม/มล. + rifampin 12.5 ไมโครกรัม/มล. + vancomycin 6.25 ไมโครกรัม/มล. + colistin 6.25 ไมโครกรัม/มล. (BJ agar) พบว่าสามารถลดระดับเชื้อที่ปนเปื้อนจากระดับ 10^8-10^{10} CFU/มล. ลงมาถึงในระดับที่ไม่พบเชื้อปนเปื้อนเลย และสามารถแยกเชื้อ *B. hyodysenteriae* จำนวน 88 เชื้อและ *B. innocens* จำนวน 11 เชื้อ จาก 461 ตัวอย่างจากอุจจาระสุกรฟาร์ม ซึ่งมากกว่า S-400 (แยกได้ *B. hyodysenteriae* 69 เชื้อ และ *B. inncens* 4 เชื้อ) แต่เมื่อทดสอบกับเชื้ออ้างอิง *B. innocens* strain B256^T พบว่า BJ agar มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Kunkle and Kinyon, 1988) ในปี ค.ศ. 1990 ได้มีผู้ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยา spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. + colistin 10 ไมโครกรัม/มล. + rifampicin (rifampin) 30 ไมโครกรัม/มล. (CSR) ในการเพาะแยกเชื้อสไปโรคีทจากทางเดินอาหารของผู้ป่วย

ในโรงพยาบาลในประเทศโอมาน 1,000 คน พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 114 เชื้อ (Barrett, 1990) ในปี ค.ศ. 1992 มีการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของ CVS agar, BJ agar และ S-400 ในการเพาะแยกเชื้อ *B. hyodysenteriae* จากตัวอย่างอุจจาระสุกรจำนวน 379 ตัวอย่าง โดยคละลักษณะสุขรูป (พบโคโลนีของเชื้อ *Brachyspira* จาก 145 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกเชื้อได้จำนวน 111 เชื้อ จาก CVS agar , 130 เชื้อ จาก BJ agar และ 76 เชื้อ จาก S-400 ตามลำดับ (Achacha and Messier, 1992) (โดยข้อมูลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะที่มีการใช้ในสุกรกล่าวโดยสรุปไว้ในตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะที่มีผู้ใช้ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* และระดับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (minimal inhibitory concentration: MIC)ของเชื้อ *Brachyspira hyodysenteriae*

ชื่อยา	ชนิดของยา	กลไกการออกฤทธิ์	MIC_{90}
spectinomycin	animocyclitols	ยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียโดยจับกับหน่วยไรโบโซมย่อย 30S	>1000[1]
colistin	Polymyxins	ทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์แบคทีเรียชั้นนอกโดยการเปลี่ยนแปลงประจุในตำแหน่งส่วน lipopoysacharide และใช้ตำแหน่ง hydrophobic/hydrophilic จับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำหน้าที่คล้ายสารชำระล้างทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สลายตัว	>100[2]
vancomycin	glycopeptide antibiotic	ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก โดยจับกับส่วน D-alanyl-D-alanine ของเปปไทด์ NAM/NAG ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างสายโพลีเมอร์สายยาวและป้องกันการเชื่อมพันธะระหว่างโพลีเมอร์สายยาว	>100[2]
rifampicin หรือ rifampin	rifamycin	ยับยั้งเอนไซม์ DNA-dependent RNA polymerase โดยจับกับส่วนย่อยเบต้าของเอนไซม์ดังกล่าว ทำให้ไม่สามารถถอดรหัส (transcription) จากสาย DNA ได้	>100[2]
spiramycin	macrolide	ยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียโดยจับกับหน่วยไรโบโซมย่อย 30S	>100[2]

[1] (Songer et al., 1976), [2] (Kitai et al., 1979)

ตารางที่ 3 สรุปสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเหมาะสมสำหรับการเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* ในสุกร

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (ไมโครกรัม/มล.)	เชื้อที่ทำการสำรวจ	ร้อยละของอัตราการพบเชื้อ	ค่าเฉลี่ยของจำนวน *Brachyspira* ที่พบ	จำนวนเท่าของการลดการปนเปื้อน	การทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
Spectinomycin (200)	BH	100(6/6)	$1.1x10^8$	10^4	ทดสอบเพาะเชื้อจากอุจจาระสุกรท้องเสียที่จากการป้อนเชื้อก่อโรค	(Songer et al., 1976)
Spectinomycin (400) (S400 agar)		100(6/6)	$1.4x10^8$	10^4		
Spectinomyicn (400) Colistin (25) Vancomycin (25) (CVS agar)	BH	100(7/7)	$:1.8x10^8$	10^6	ทดสอบเพาะเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระสุกรที่ผสมเชื้อ *Brachyspira*	(Jenkinson and Wingar, 1981)
Spectinomyicn (400)	BH	100(7/7)	$1.5x10^8$	10^4		
Spectinomyicn (400) Colisitn (50) Brilliant green (1) (SCB agar)	BH	66.7(16/24)	ND	ND	ทดสอบเพาะเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระสุกรฟาร์ม	(Szynkiewicz and Binek, 1986)
Spectinomyicn (400) Vancomycin (250) (S+V250)		100(24/24)	ND	ND		
Spectinomyicn (400)		100(24/24)	ND	ND		
Spectinomyicn (200) Spiramycin (25) Rifampicin (12.5) Vancomycin (6.25) Colistin (6.25) (BJ agar)	BH	19.1(88/461)	ND	10^4	ทดสอบเพาะเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระสุกรฟาร์ม	(Kunkle and Kinyon, 1988)
(CVS agar)		ND	ND	10^3		
Spectinomyicn (400)		14.9(69/461)	ND	10^2		
BJ agar	BH	88.3(128/145)	ND	ND	ทดสอบเพาะ	(Achacha
CVS agar		76.6(111/145)	ND	ND		

S400 agar		52.4(76/145)	ND	ND	เชื้อจากตัวอย่างอุจจาระสุกรฟาร์ม	and Messier, 1992)
Spectinomyicn (400) Rifampicin (30) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (BAM-SR broth)30 นาทีก่อนเพาะใน Spectinomyicn (400) Rifampicin (30) in ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (BAM-SR agar)	BH (ATCC27164)	ND	10^2	ND	ทดสอบเพาะเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระสุกรที่ผสมเชื้อ *Brachyspira*	(Calderaro et al., 2005)
	BP (ATCC51139)	ND	10^2			
	BP (AN914:90)	ND	10^3			
	BM(C301)	ND	10^5			

BH : *B. hyodysenteriae*, BP : *B.pilosicoli*, BM : *B. murdochii* ND : ไม่ได้ทดสอบ

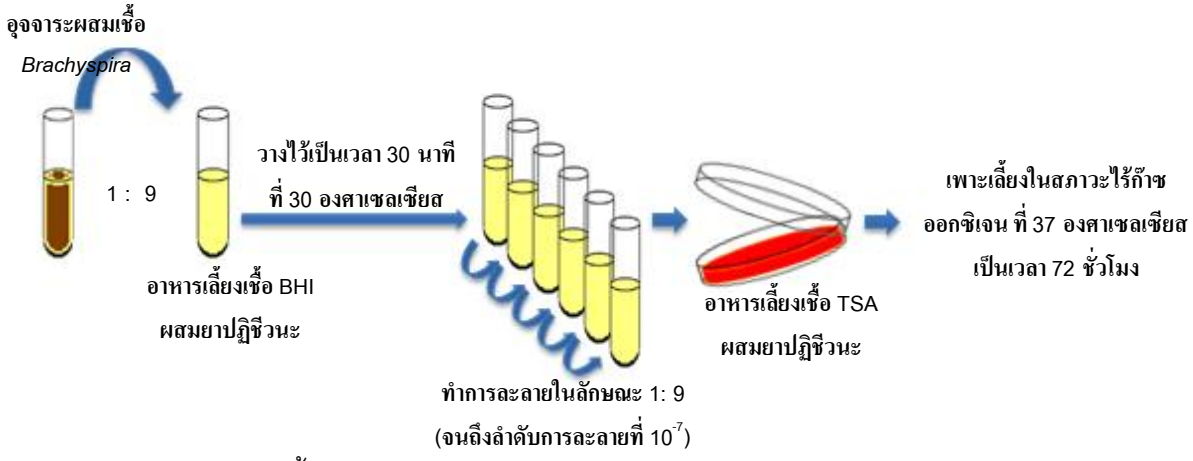
ตารางที่ 4 แสดงอัตราการพบเชื้อ *Brachyspira* จากการเพาะแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

	(Phillips 2009: Australia CVS agar)	(La 2006: Australia CVS agar)	(Jacobson 2005: Sweden CVS agar)		(La 2003 : Australia CVS agar)	(Barcellos :2000: Spain)	(Heinogan 2000:Finland)	(Fellstrom 1996: Sweden, agar)
			Diarrheic pigs	Total pigs				
B. Hyodysenteriae	1/222 (0.5%)	37/192 (19.3%)	0	0	39/178 (21.9%)	29/207 (13.9%)	0	0
B. pilosicoli	0	5/192 (2.6%)	72/244 (29.5%)	392/1048 (37.4%)	5/178 (2.8%)	20/207 (9.6%)	42/428 (9.8%)	232/358 (64.8%)
Brachyspira **สปีชี่ส์อื่น**	60/222 (27.0 %)	0	64/244 (25.4%)	134/1048 (12.8%)	0	15/207 (7.2%)	14/428 (3.3%)	

โดยสรุปแล้วมีชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่พบใช้การศึกษาโดยส่วนใหญ่ในปัจจุบันมี 3 ชนิดคือ S-400, CVS, BJ แต่ละชนิดต่างมีข้อดีข้อเสียต่างกัน S-400 มีข้อดีคือไม่มีผลต่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในวงศ์ *Brachyspiraceae* ทุกชนิด แต่พบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ปนเปื้อนในปริมาณสูง แต่ CVS และ BJ ก็พบรายงานการศึกษาให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. pilosicoli* บางสายพันธุ์ (Trott et al., 1996b)และ *B. hyodysenteriae* (Achacha and Messier,

1992) บางสายพันธุ์ โดยอัตราการเพาะแยกเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ แสดงไว้ตารางที่ 4

นอกจากการวิธีการพื้นฐานที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งในการเพาะแยกเชื้อเพียงอย่างเดียวแล้ว พบว่ามีผู้นำตัวอย่างอุจจาระสุกรผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว brain heart infusion broth (BHI) (Oxiod,UK) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ rifampicin 30 ไมโครกรัม/มล. และ spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. เป็นเวลา 30 นาที เพื่อลดปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนอื่นๆในอุจจาระก่อนนำไปเพาะแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ผสมยาปฏิชีวนะ rifampicin 30 ไมโครกรัม/มล. และ spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. (BAM-SR) ดังแสดงในรูปที่ 4 พบว่าสามารถพบเชื้อ *B. pilosicoli* สายพันธุ์ C62 ในระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^2 เซลล์/มล. เมื่อเทียบกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CVS หรือ S400 ซึ่งจะพบเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^4 CFU/มล. (Calderaro et al., 2005)



ภาพที่ 4 แสดงการเพาะเชื้อแบบ pre-enrichment

2.8 การวินิจฉัยโรคจากการติดเชื้อ *Brachyapira*

2.8.1 การเพาะแยกเชื้อ

การเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* เริ่มจากการนำตัวอย่างลำไส้หรืออุจจาระละลายหรือใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ เช่น tryptic soy broth (TSB) หรือ brain heart infusion broth (BHI) ในลำดับการละลาย 1: 10 จนถึงระดับ 10^{-6} ถึง 10^{-7} แล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง tryptic soy agar (TSA) ที่ผสมเลือดแกะหรือวัวอย่างน้อย 5 % โดยเสริมยาปฏิชีวนะเพื่อลดปริมาณเชื้อชนิดอื่นๆที่ขึ้นปกคลุมทับโคโลนี นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในภาวะไร้ก๊าซออกซิเจนภายในโถไร้ก๊าซออกซิเจน โดยนำโถออกมาตรวจสอบการเจริญของโคโลนีของเชื้อทุกๆ 3 วัน (Hudson et al., 1976) โดยสังเกตลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

แบบรุนแรงในกรณีของเชื้อ *B. hyodysenteriae* และการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบอ่อนในกรณีของเชื้อ *Brachyspira* ในสปีชี่ส์อื่นๆ ดังตารางที่ 5 นอกจากนี้ยังสามารถใช้คุณสมบัติการเคลื่อนที่โดยการป้ายตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรอยกรีดลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อ *B. hyodysenteriae* จะสามารถเคลื่อนที่จากแนวกลางไปตามแนวกรีดไปที่ปลายทั้ง 2 ด้าน สังเกตจากการแตกของเม็ดเลือดแดงแบบรุนแรงที่ปลายรอยกรีด (Duhamel and Joens, 1994)

2.8.2 การทดสอบทางชีวเคมี

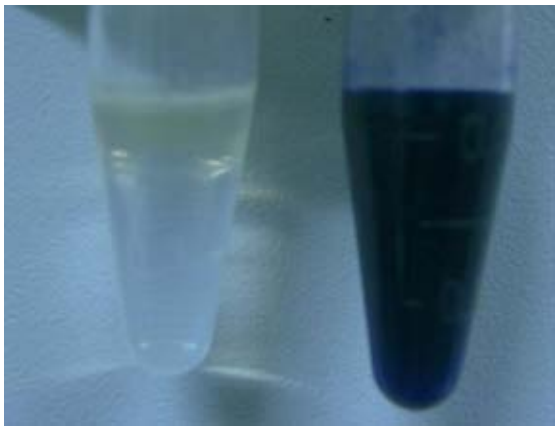
2.8.2.1 การทดสอบการสร้างอินโดล (indole test)

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI ที่มีการเติม tryptophan ลงไปอย่างน้อย 0.1% ของปริมาตรแล้วปิดทับด้วย xylene นำไปเพาะบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายหลังหยดสารละลาย Kovac ลงไป 4-5 หยดสังเกตการเปลี่ยนสีของของเหลวในชั้นของ xylene กรณีพบให้สารละลายสีม่วงชมพู แสดงว่าเป็นเชื้อที่มีเอนไซม์ tryptophanase สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ tryptone ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้กลายเป็นสารประกอบ indole, pyruvate และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยสาร indole ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ p-dimethylaminobenzaldehyde สภาวะที่มีกรดและแอลกอฮอล์ ในสารละลาย Kovac ให้สารประกอบเชิงซ้อนสีแดง (Lee et al., 1993) ดังแสดงในรูปที่ 5

ภาพที่ 5 แสดงผลทดสอบการสร้าง indole ที่เป็นบวกของเชื้อ *B. hyodysenteriae* (ขวามือ) และผลลบของเชื้อ *B. pilosicoli* (ซ้ายมือ)

2.8.2.2 การทดสอบการสลายฮิปปูเรท (hippurate) ด้วยกระบวนการไฮโดรไลส์ (hippurate hydrolysis)

เขี่ยเชื้อลงในสารละลาย hippurate ความเข้มข้น 1% ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland 5 (10^9 CFU/มล.) แล้วทำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ภายหลังหยดสารละลาย 3.5% ninhydrin แล้วเขย่าทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วอ่านผล กรณีที่เชื้อมีเอนไซม์ hippuricase สามารถย่อยสารประกอบ hippurate เป็นกรด benzoic และ glycine ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยารีดิวซ์ได้กับ สารละลาย ninhydrin เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงเข้ม กรณีที่การเกิดสีน้ำเงินอ่อนหรือน้ำเงินใสถือว่าให้ผลลบกับการทดสอบ (Fellström and Gunnarsson, 1995) ดังแสดงในรูปที่ 6

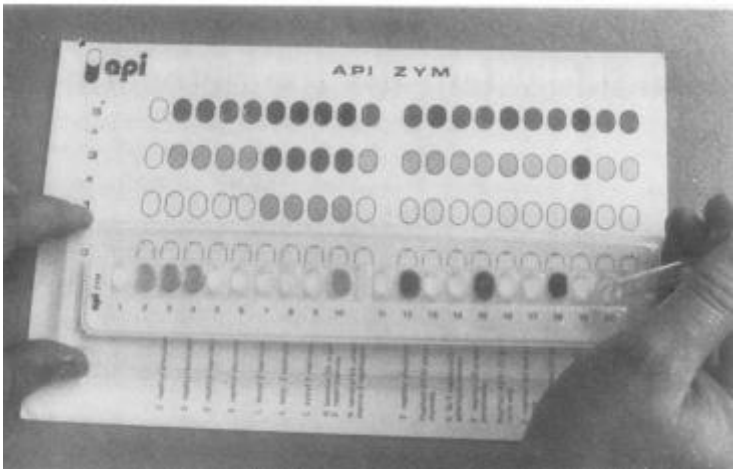


ภาพที่ 6 แสดงผลทดสอบการสลาย hippurate ด้วยกระบวนการไฮโดรไลส์ ที่เป็นบวกของเชื้อ *B. pilosicoli* (ขวามือ) ที่เป็นบวก *B. hyodysenteriae* ที่เป็นลบ(ซ้ายมือ)

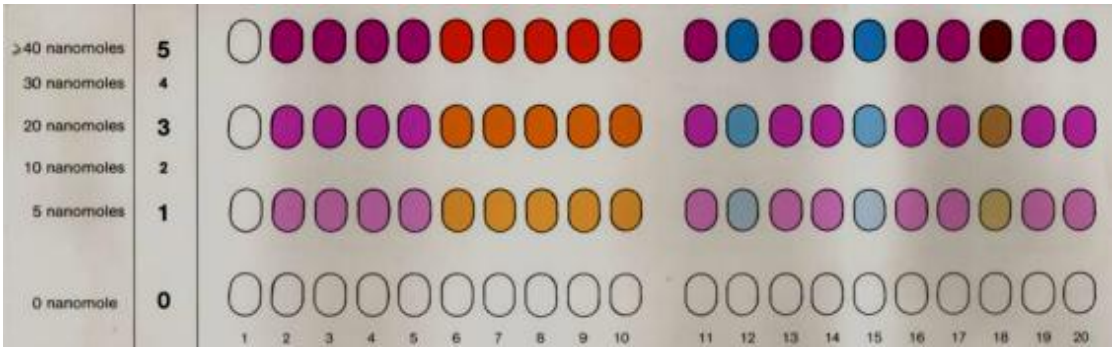
2.8.2.3 การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อโดยระบบ API-ZPM

เป็นการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วย alkaline phosphatase, esterase, esterase lipase, lipase, leucine arylamidase, valine arylamidase, cysteine arylamidase, trypsin, chymotrypsin, phosphatase acid, phosphoamidase, α-galactosidase, β-galactosidase, β-glucuronudase, α-glucosidase, β-glucosidase,N-acetyl-B glucosamonidase, α-monosidase และ α-fucosidase (Humble et al., 1977) ทดสอบโดยเตรียมเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง นำมาละลายในสารละลาย Tris 10 มิลลิโมลาร์ EDTA 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 (TE buffer) 1 มล. ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^5 เซลล์/มล. แล้วหยดสารละลายเชื้อจำนวน 1 หยดลงในแต่ละกระเปาะของชุดทดสอบ นำตัวชุดทดสอบไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมงในที่มืด แล้วหยดสารละลายทดสอบ ZYM A

และ ZYM B อย่างละ 1 หยดลงในแต่ละกระเปาะชุดทดสอบตามลำดับ แล้วนำชุดทดสอบไปวางไว้ในที่แสงอาทิตย์ส่องถึงเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเปรียบเทียบการเปลี่ยนสีของชุดทดสอบและให้คะแนนเทียบเป็นผลบวกลบและปริมาณเอนไซม์ (Hunter and Wood, 1979) ดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8



ภาพที่ 7 แสดงการทดสอบ API-ZPM [ที่มา : (Humble et al., 1977)]

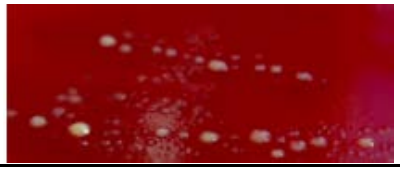
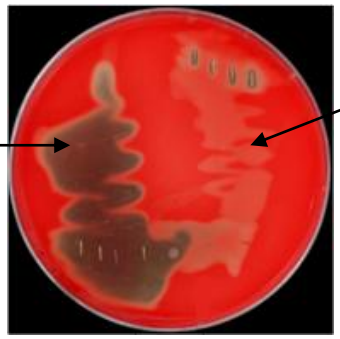
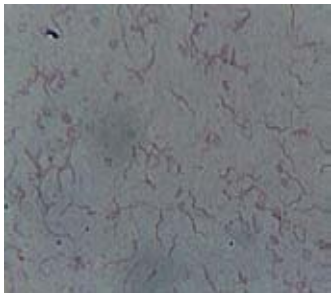


ภาพที่ 8 แสดงลักษณะของแถบสีมาตรฐานที่ใช้เทียบผลบวกลบและปริมาณของเอนไซม์

สำหรับชนิดของเอนไซม์ที่สำคัญต่อการใช้จำแนกสปีชี่ส์ของเชื้อ *Brachyspira* คือ α-glucosidase, α-galactosidase และ β-glucosidase (Fellström and Gunnarsson, 1995; Fellström et al., 1995)

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะรูปร่างโคโลนี และจุลสัณฐานวิทยา ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* และเชื้อ *B. pilosicoli*

	Brachyspira hyodysenteriae	*Brachyspira pilosicoli*
ลักษณะ	กลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร	สีกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3

โคโลนีที่อายุ 3 วัน	ขาวใสถึงเหลืองอ่อน โค้งนูนเล็กน้อย 	มิลลิเมตร สีขาวใส โค้งนูนเล็กน้อย
ลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้า	ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้ารุนแรง (strong β hemolysis)	 ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้าอ่อน(weak β hemolysis)
ขนาดเซลล์	7-12 ไมโครเมตร x 0.32-0.38 ไมโครเมตร	4-12 ไมโครเมตร x 0.25-0.3 ไมโครเมตร
รูปร่างเซลล์เชื้อจากการย้อมแกรม	รูปเกลียวติดสีแกรมลบทั้งเชื้อ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* 	

ตารางที่ 6 แสดงการทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้ยืนยันสปีชี่ส์ของเชื้อ *Brachyspira*

สปีชี่ส์	การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้า	การสร้าง Indole	การย่อยสลาย hippurate	การทำงานของเอนไซม์		
				α-glucosidase	α-galactosidase	β-glucosidase
B. hyodysenteriae	รุนแรง	+/-	-	+/-	-	+
B. pilosicoli	อ่อน	+/-	+	+/-	+/-	-
B. intermedia	อ่อน	+	-	+	-	+
B. murdochii	อ่อน	-	-	-	-	+
B. innocens	อ่อน	-	+	+/-	-	+
B.suanatina	รุนแรง	+	-	ไม่มีผู้ทำการศึกษา	-	+

(Stanton et al., 1991; Stanton et al., 1997; Råsbäck et al., 2007b)

2.8.3 การทดสอบยืนยันสปีชี่ส์เชื้อโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction:PCR) จากเชื้อบริสุทธิ์

การใช้เทคนิค PCR เพื่อยืนยันสปีชี่ส์ เริ่มจากการเลือกตำแหน่งของยีนที่มีลำดับเบสจำเพาะในกลุ่มของสปีชี่ส์ของเชื้อเดียวกัน (conserved region) เช่น ส่วนของยีน 16S rDNA ของเชื้อ *B. pilosicoli* และ *nox* ในส่วนของเชื้อ *B. hyodysenteriae* ยีน *nox* เป็นยีนที่แปลรหัสแล้วเป็นส่วนของเอนไซม์ NADH oxidase ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนออกซิเจนอิสระให้เป็นน้ำ เพื่อลดอันตรายจากอนุมูลอิสระต่อเยื่อบุลำไส้ (Stanton, 1989) ลำดับเบสของยีน *nox* มีความแตกต่างกันระหว่างสปีชี่ส์มากที่สุดถึง 86.3% และถูกใช้เพื่อออกแบบ primers สำหรับยืนยันสปีชี่ส์ดังนี้คือ *B. hyodysenteriae* (NOX1), *B.intermedia* (NOX2), *B. pilosicoli* (NOX3) และ*B. innocens* ใช้ primer ร่วมกันกับ *B. murdochii* คือ(NOX4) โดย primers ที่สามารถทำ PCR แล้วเกิดขนาดผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะในสปีชี่ส์เดียวกันคือ NOX1 (Atyeo et al., 1999)

เชื้อ *B. pilosicoli* ใช้ส่วนของ ยีน 16S rDNA ในการออกแบบ primers จากลำดับเบสที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *B. pilosicoli* จากการศึกษาของ Park และคณะปี 1995 ใช้ส่วนของ forward primer 16S rDNA ที่ความยาว 21 เบส ชื่อ *Auguillina coli1* (*Acoli1*) และใช้ universal eubacterial 16S rDNA sequencing primer (1492r) เป็น reverse primer (Park et al., 1995) ซึ่งการศึกษาอื่นๆ ต่อมาพบว่ายังใช้ส่วนของ *Acoli1* เป็น forward primer และเปลี่ยนเฉพาะส่วน reverse primer (Fellström et al., 1997; La et al., 2003)

ส่วนยีน 23S rDNA ถึงแม้ว่าจะมีความแตกต่างของลำดับเบสกันระหว่างเชื้อคนละสปีชี่ส์ แต่พบว่ามีความแตกต่างกันในลำดับเบสภายในสปีชี่ส์เดียวกันได้ตั้งแต่ 0.16 – 3.15% ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* และ 2.99 – 3.15% ของเชื้อ *B. pilosicoli* และมีช่วงระยะ DNA ที่เบสมีความแตกต่างกันสูงค่อนข้างยาวจึงไม่เหมาะสมที่ใช้สำหรับการออกแบบ primer เพื่อทำ PCR (Leser et al., 1997)

2.8.4 การทดสอบทางซีรั่มวิทยาเพื่อวินิจฉัยเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระ

การใช้แอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเซลล์หลายชนิด (polyclonal antibodies) เพื่อตรวจหาเชื้อ *B. hyodysenteriae* จากตัวอย่างอุจจาระสุกรโดยใช้ polyclonal antiserum จากกระต่ายต่อเชื้อ *B. hyodysenteriae* จับโดยตรงต่อเชื้อ ในอุจจาระ ด้วยวิธี indirect fluorescene antibody test (IFAT) แต่วิธีนี้พบปฏิกิริยาข้ามต่อเชื้อ *Brachyspira* spp. และ แบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ถึงแม้ว่าจะสามารถลดปฏิกิริยาดังกล่าวโดยทำปฏิกิริยาดูดซับแอนติบอดีกับโปรตีนของเชื้อในสปี

ซี่ส์อื่นๆก่อนนำไปทดสอบจริง (pre-absorption) แต่ทำให้ความไวในการตรวจลดลง จึงไม่ได้ถูกพัฒนาต่อเพื่อใช้กับการติดเชื้อในฟาร์ม (Hudson et al., 1976)

การใช้ monoclonal antibodies เพื่อตรวจหาเชื้อ *B. hyodysenteriae* และ *B.pilosicoli* กรณีของเชื้อ *B. hyodysenteriae* มีการผลิต monoclonal antibodies ต่อ 29.7 kDa lipoprotein ซึ่งเป็นส่วนของ outer membrane ของเชื้อซึ่งเมื่อนำมาตรวจกับเชื้อ *Brachyspira* อื่นๆ อีก 20 สายพันธุ์ พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) (Lee and Hampson, 1996) ส่วนเชื้อ *B. pilosicoli* ผลิต monoclonal antibiodies ต่อโปรตีนหุ้มเซลล์ (surface protein) ขนาด 80 kDa (Tenaya et al., 1998) และ 29 kDa lipoprotein ด้วยวิธี indirect fluorescent antibody test พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามเช่นกัน (Lee and Hampson, 1995) ด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยาดังกล่าว มีความไวของการตรวจในระดับต่ำกว่าการวินิจฉัยด้วยวิธีเพาะเชื้อร่วมกับการทำ PCR จึงไม่มีการพัฒนานำมาใช้จริงกับตัวอย่างจากฟาร์ม (Corona-Barrera et al., 2004)

2.8.5 การตรวจเชื้อ *Brachyspira* ด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างอุจจาระสุกรโดยตรง

สำหรับเทคนิคการตรวจเชื้อ *Brachyspira* ด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างอุจจาระสุกรโดยตรงถูกพัฒนาขึ้นสำหรับเชื้อก่อโรคสำคัญในสุกรคือ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* เช่นเดียวกับเทคนิคการทำ PCR จากเชื้อบริสุทธิ์โดยเลือกยีนที่มีลำดับเบสจำเพาะสำหรับเชื้อแต่ละสปีซี่ส์ เช่นส่วนของยีน *nox* ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* หรือ 16S rDNA ของเชื้อ *B. pilosicoli* มาออกแบบ primer และทำการทดสอบความไวรับของปฏิกิริยา PCR ความแม่นยำกับเชื้อในสปีซี่ส์ใกล้เคียงอื่นๆ และลักษณะจำนวนตัวอย่างอุจจาระจากสุกรในฟาร์มจริงที่ให้ผลบวกกับการทำปฏิกิริยา PCR เทียบกับการเพาะแยกเชื้อ

ช่วงแรกของการศึกษามีการคัดเลือกส่วนของ DNA ระบุเป็นลักษณะลำดับเบสโดยไม่ทราบถึงหน้าที่ของยีนในส่วนลำดับเบสนั้นเช่น ส่วน 1.55 กิโลเบส ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *B. hyodysenteriae* (Elder et al., 1994) หริอ 1.3 กิโลเบส (Harel and Forget, 1995) ซึ่งยืนยันความจำเพาะภายในสปีซี่ส์เดียวกันของเชื้อด้วยวิธีต่างๆ เช่น การใช้วิธี restriction fragment length polymorphism ตัด DNA ด้วยเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสแล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะขนาดและรูปแบบเดียวกันในทุกๆ สเตรนของเชื้อ แล้วจึงนำไปออกแบบ primer ด้วยระบบ PCR ที่ออกแบบนี้ สามารถตรวจเชื้อโดยตรงจากอุจจาระได้ที่ ระดับ 1-10 เซลล์/ อุจจาระ 0.1 กรัม (Elder et al., 1994) และมีความไวในการตรวจที่ระดับ 10 เซลล์/ อุจจาระ 1 กรัม (Harel and Forget, 1995)

ต่อมาจึงมีผู้พัฒนาระบบของ PCR ด้วยการใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อ DNA เชื้อ *B. hyodysenteriae* และ primer ที่มีความจำเพาะต่อ DNA เชื้อ *B. pilosicoli* ในระบบร่วมของการปรับอุณหภูมิและเวลาเดียวกัน และตัวอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature) ที่ใกล้เคียงกัน (Duplex PCR) โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นต้องมีความสามารถในการแยกกันอย่างชัดเจนจากความยาวของผลผลิตดีเอนเอที่แตกต่างกัน กรณีการศึกษาของ Atyeo และคณะปี 1998 พบว่ามีความสามารถค่าความไวของการตรวจที่ระดับ 10^3 -10^4 เซลล์ต่อ อุจจาระ 0.2 กรัม (Atyeo et al., 1998) และกรณีของการศึกษาของ La และคณะปี 2003 ที่เลือกใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ NADHoxidase (*nox*) ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* และ 16S rDNA ของเชื้อ *B. pilosicoli* พบว่ามีความสามารถค่าความไวของการตรวจที่ระดับ 10^3 -10^4 เซลล์/อุจจาระ 1 กรัม ทั้งสองสปีชีส์ และไม่เกิดปฏิกิริยาการสร้างผลิตภัณฑ์กับตัวควบคุมลบอื่นๆ คือ เชื้อ *B. aalborgi*, *B. murdochii*, *B. innocens* และ *B. alvinipulli* มีการศึกษาที่เพิ่ม primers ที่มีความจำเพาะเชื้อที่ก่อโรคที่มีอาการใกล้เคียงและติดเชื้อในสุกรในกลุ่มอายุเดียวกันกับเชื้อ *Brachyspia* ได้แก่ *Salmonella spp*., (Suh and Song, 2005) *Lawsonia intracellularis* (La et al., 2006b) ในอดีตการศึกษา PCR เป็นการศึกษาเชิงคุณรูป ไม่สามารถแสดงถึงปริมาณของเชื้อแบคเรียในตัวอย่างได้ จึงมีผู้พัฒนาระบบ real time PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *nox* มีความของสามารถในการบอกปริมาณเชื้อในอุจจาระได้แม่นยำตั้งแต่ 1 เซลล์/มล.(Akase et al., 2009) แต่วิธีนี้ยังมิได้มีการพัฒนาใช้ในระบบการวินิจฉัยโรคจากฟาร์มในทางปฏิบัติ

ทั้งนี้การศึกษาทำ multiplex PCR จากตัวอย่างอุจจาระโดยตรงนั้นจำเป็นต้องลดการเกิดผลบวกลวงจาก DNA ของสิ่งอื่นในอุจจาระ จึงมีการแนะนำให้ใช้เอนไซม์ *Taq polymerase* ในลักษณะที่เริ่มเกิดปฏิกิริยาต่อสาย DNA ของผลิตภัณฑ์ได้เมื่อได้ในกรณีที่อยู่ช่วงอุณหภูมิที่สูง (hot start system) เท่านั้น (Elder et al., 1994; La et al., 2006b) โดยมีลักษณะของแอนติบอดีและโปรตีนบางชนิดมาบังในส่วนตำแหน่งทำหน้าที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว ทั้งนี้เพื่อลดการเกิดการสร้างผลิตภัณฑ์จากการจับกันอย่างไม่จำเพาะของ primers และ DNA สายต้นแบบในช่วงอุณหภูมิต่ำระหว่างการเพิ่มอุณหภูมิ (Paul et al., 2010) อัตราการพบเชื้อ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* จากการทำ PCR จากตัวอย่างอุจจาระนั้น แสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงอัตราการพบเชื้อ *Brachyspira* และ *Lawsonia intracellularis* จากการทำ PCR จากตัวอย่างอุจจาระ

	(Phillips et al., 2009: Australia)	(La 2006: Australia)	(Suh 2005: Korea)	(Herbst 2004 Germany)		(La 2003 : Australia)
				สุกรท้องเสีย	**สุกรปกติ**	
B. Hyodysenteriae	29/207 (13.9%)	36/192 (18.8%)	24/462 (5.2%)	358/2002 (17.9%)	97/1445 (6.7%)	43/178 (29.0%)
B. pilosicoli	20/207 (9.6%)	7/192 (3.6%)	ND	ND	ND	7/178 (3.9%)
Lawsonia intracellularis	15/207 (7.2%)	22/192 (11.5%)	70/462 (15.2%)	388/2002 (19.4%)	105/144 5 (7.3%)	ND

ND = not detect : ไม่ได้ตรวจสอบ

2.9 รายงานการศึกษาการดื้อยาของแบคทีเรียกลุ่มที่พบในทางเดินอาหารของสุกรในประเทศไทย

จากการศึกษาแบคทีเรีย *Salmonella* ดื้อยาจากเนื้อสุกรในประเทศไทยในช่วงปี 2003 พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวดื้อต่อยาปฏิชีวนะ amoxiciliin 15.4% chloramphenicol 15.4% gentamicin 3.9% sulfamethoxazole-trimetroprim 15.4% และ tetracycline 88,5% โดยเปอร์เซนต์ที่ได้คิดจากจำนวน ไอโซเลท ที่แยกได้จะตัวอย่างเนื้อสุกรทั้งหมด (Angkititrakul et al., 2005) ต่อมาพบว่าตัวอย่างเชื้อ *Salmonella* จากฟาร์มสุกรภายในจังหวัดเชียงใหม่และลำปางช่วงปี 2003-2004 พบมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ tetracycline 98% nalidixic acid 2% และ florfenicol 6% จากการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution test (Padungtod and Kaneene, 2006) ในช่วงปี 2004-2005 จากการทดสอบเชื้อ *Salmonella* จากเนื้อสุกรที่แยกได้จากตลาดในประเทศไทยพบดื้อต่อยา tetracycline streptomycin และ ampicillin 50-60% (Bangtrakulnonth et al., 2006) รายงานการศึกษาของ Chuanchuen และคณะพบว่าเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากอุจจาระ ไม้พันสำลีป้ายก้น น้ำดื่ม และอาหารของสุกรและไก่ ระหว่างปี

2004-2006 มีลักษณะการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่า 3 ชนิด (multidrug resistant) ถึง 59% นอกจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแล้วเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับโฮสต์ ในภาวะเกื้อกูลกับโฮสต์ (commensalim) เช่นเชื้อ *E. coli* ที่ไม่ก่อโรคพบ class I intregon ถึง 11.9% ของจำนวนเชื้อที่ศึกษา intregon เป็นส่วนพันธุกรรม (genetic elements) ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งอื่นๆ บนโครโมโซมใน และพลาสมิด โดยเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของลักษณะดื้อยาต่างๆ โดยพบลักษณะของ multidrug resistant bacteiria ร่วมกันในทุกเชื้อที่พบ class I intregon เชื้อ *E. coli* ดังกล่าวมีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะดังนี้ sulphamethoxazole (100%), tetracycline (97.1%), ampicillin (92.8%), streptomycin (89.9%), trimethoprim-sulphamethoxazole (88.1%), nalidixic acid (60.9%), chloramphenicol (58.0%), kanamycin (55.1%), cephalothin (44.9%), gentamicin (39.1%), ciprofloxacin (33.3%), cefoxitin (8.7%), amoxicillin-clavulanic acid (5.8%), และamikacin (2.9%)(Phongpaichit et al., 2007) หรือในกรณีของเชื้อ *Campylobacter coli* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบก่อโรคในเฉพาะช่วงสุกรอายุน้อย และอาจพบเป็นแบคทีเรียไม่ก่อโรคในสุกรโตพบว่า 4.8% ของเชื้อที่เพาะแยกมี class I intregon และ 71% ดื้อต่อยา ciprofloxacin 70% ต่อ nalidixic acid 67% ต่อ tetracycline และ 55% ต่อ erythromycin (Ekkapobyotin et al., 2008) จากการศึกษาของ Chuanchen และคณะ ปี 2009 พบว่าเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากสุกรและไก่พบยีนที่เกี่ยวข้องการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เช่น bla_{TEM} ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยา ampicillin *cmlA* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยา chloramphenicol *tetA* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยา tetracycline *dfrA12* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อ trimethoprim *sul3* ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการดื้อยากลุ่ม sulfonamide และ *aadA1* ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการดื้อยากลุ่ม streptomycin/spectinomycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้เป็นตัวหลักที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Brachyspira* (Chuanchuen and Padungtod, 2009) และการศึกษาของ Prapasarakul และคณะ 2010 พบว่าเชื้อในกลุ่ม hemolytic *E.coli* มีอัตราของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด amoxicillin ,chlortetracycline ,nalidixic acid, tetracycline และ sulfametoxazole/trimethoprim ถึง100%streptomycin ที่ 93.3% colistin (เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อคัดแยกสำหรับ *Brachyspira*) ที่ 51.3% doxycycline ที่ 68.9% enrofloxacin ที่ 87.8% ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาอาการท้องเสียในสุกร แต่ในกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวไม่พบการดื้อต่อสารต้านจุลชีพชนิด halquinol

2.10 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

Songer และคณะ ปี 1976 ทำการศึกษาเพาะเชื้อ *B. hyodysenteriae* ก่อโรคจำนวน 6 เสตรน จากเยื่อเมือกผนังลำไส้ของสุกรที่ป่วยเป็นโรคบิดมูกเลือด และจากอุจจาระของสุกรปกติ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ที่มีเลือดวัวผสมอยู่ 5% และผสม spectinomycin ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน นำไปเพาะแยกที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสโดยมีอัตราส่วนของก๊าซ H_2 :CO_2 เท่ากับ 80%: 20% โดยใช้การเครื่องดูด -ปล่อยก๊าซออก แล้วนับจำนวนโคโลนีของเชื้อเทียบกับสูตรที่ไม่ผสม spectinomycin พบว่าสูตรที่ผสม spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. สามารถยับยั้งปริมาณแบคทีเรียอื่นๆในทางเดินอาหารได้ถึง 99.9% และไม่มีผลต่อจำนวนโคโลนีของเชื้อ และ *B. hyodysenteriae* จากการเพาะเชื้อและเมื่อเชื้อไปป้อนกลับให้สุกรพบว่าสุกรแสดงอาการบิดมูกเลือดได้ จึงสรุปได้ว่าการเพาะแยกเชื้อโดยผสม spectinomycin ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มล. ไม่มีผลต่อการความรุนแรงต่อการก่อโรคของเชื้อ

Jenkinson และ Wingar ปี 1981 ทำการเพาะเชื้อ *B. hyodysenteriae* จำนวน 6 สเตรน และเชื้อจากอุจจาระสุกรสุขรูปปกติ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. กับ colistin 25 ไมโครกรัม/มล. และ vancomycin 25 ไมโครกรัม/มล.(CVS) สามารถลดระดับจำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนจาก 10^8 ลดลงไปถึงระดับ 10^2 CFU/กรัมอุจจาระ การใช้สารต้านจุลชีพระดับดังกล่าวไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Brachyspira* อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ S400

Szynkiewicz และ Binek ปี 1986 ทำการศึกษาหาค่าความไวรับของเชื้อ *B. hyodysenteriae* ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในอาหารเลี้ยงคัดแยก โดยพบว่า vancomyicin ที่มีค่า MIC_{90} อยู่ที่ระดับ 800 ไมโครกรัม/มล. brilliant green อยู่ที่ระดับ 5 ไมโครกรัม/มล.และ colistin อยู่ที่ระดับ 100 ไมโครกรัม/มล. เป็นสารต้านจุลชีพที่มีคุณสมบัติเหมาะสม การเพาะเชื้อ *Brachyspira* จากตัวอย่างที่ได้จากการขูดเยื่อเมือกลำไส้พบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่าง 16 จาก 24 ตัวอย่างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. colistin 50 ไมโครกรัม/มล. และ brilliant green (SCB) และมีจำนวนโคโลนีเชื้อปนเปื้อนเฉลี่ย 4.3 โคโลนี ในกรณีของการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. ร่วมกับ vancomycin 250 ไมโครกรัม/มล. สามารถแยกเชื้อจากตัวอย่างได้ถึง 100% โดยมีจำนวนโคโลนีเชื้อปนเปื้อนเฉลี่ย 32 โคโลนี มล.

Kunkle และคณะ ปี 1988 ทำการศึกษาเพาะเชื้อ *B. hyodysenteriae* และ *B. innocens* จากอุจจาระสุกรปกติจำนวน 11 ตัวอย่าง และ 6 ตัวอย่างอุจจาระสุกรที่มีรอยโรคของบิดมูกเลือดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี spectinomycin 400 ไมโครกรัม /มล. (TSA-400) เปรียบเทียบกับ

spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. colistin 25 ไมโครกรัม/มล. vancomycin 25 ไมโครกรัม /มล. (CVS) Spectinomyicn 200 ไมโครกรัม /มล. Spiramycin 25 ไมโครกรัม /มล. Rifampicin 12.5 ไมโครกรัม/มล. Vancomycin 6.25 ไมโครกรัม/มล. และ Colistin 6.25 ไมโครกรัม /มล. (BJ) บว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อ *B. hyodysenteriae* ที่ขึ้นบนอาการเลี้ยงเชื้อทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างกัน BJ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้จนหมด 14 จาก 17 ตัวอย่าง และจากการตรวจตัวอย่างจากฟาร์ม 69 ตัวอย่าง พบว่ามีเชื้อ *Brachyspira* ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BJ เพียงอย่างเดียวถึง 19 ตัวอย่าง

Achacha และ Messier ปี 1992 ได้นำวิธีการเพาะเชื้อต่างๆไปใช้ในการสำรวจอุบัติการณ์ในฟาร์ม พบว่ามีอัตราการเพาะเชื้อจาก BJ ได้ที่ระดับ 89.7%, CVS ได้ที่ระดับ 76.6% และTSA-S400 ที่ระดับ 52.4% และพบว่า BJ สามารถเพาะแยกเชื้อจากอุจจาระสุกรที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสได้ถึง 10 วันหลังจากการเก็บ กรณีที่เก็บตัวอย่างอุจจาระด้วยไม้พันสำลีและเก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับขนส่งชนิด Stuart สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้ไม่เกิน 3 วันหลังเก็บตัวอย่าง แต่กรณีไม้พันสำลีแห้งควรส่งเพาะเชื้อภายใน 2 วันหลังเก็บตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตัวอย่างอุจจาระสุกรสามารถเก็บได้เพียง 1 วันหลังเก็บตัวอย่าง

Calderaro และคณะ (2001) สามารถเพาะแยกเชื้อ *B. hyodysenteriae* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ที่ผสมยาปฏิชีวนะ rifampicin 30 ไมโครกรัม /มล. และ spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. ปั่นให้เข้ากัน แล้วนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar modified medium (BAM) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ rifampicin 30 ไมโครกรัม /มล. และ spectinomycin 400 ไมโครกรัม /มล.พบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* ได้จากตัวอย่างที่แสดงอาการป่วยได้ 10 จาก 11 ตัวอย่าง Calderaro และคณะ (2005) สามารถเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ที่ผสมยาปฏิชีวนะ rifampicin 30 ไมโครกรัม /มล. และ spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. ปั่นให้เข้ากัน แล้วนำไปเขี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar modified medium (BAM) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ rifampicin 30 ไมโครกรัม /มล. และ spectinomycin 400 ไมโครกรัม /มล. พบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* ได้จากตัวอย่างอุจจาระที่ผสมตัวเชื้อ *B.hyodysenteriae* ATCC 27164 และ *B.pilosicoli* ATCC 51139 พบเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^2 เซลล์/มล. ส่วน *Brachyspira* สปีชี่ส์อื่นๆตรวจวัดได้ในระดับ 10^4 เซลล์/มล.

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การทดสอบความไวรับและความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยาปฏิชีวนะ Flavomycin และ Halquinol ต่อเชื้อ *Brachyspira* สเตรนมาตรฐาน

3.1.1 เชื้อแบคทีเรียและการเพาะเชื้อ

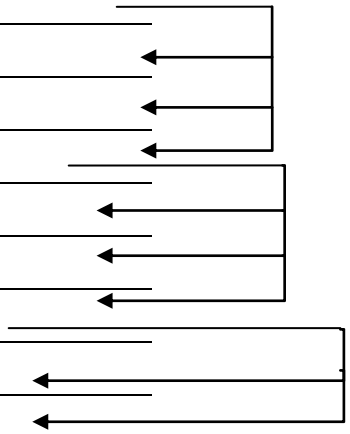
เลือกเชื้อ *Brachyspira* สปีชี่ส์ สายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 5 เชื้อ ได้แก่*B. hyodysenteriae* (American type culture collection) ATCC 27164, *B. pilosicoli* ATCC 51139, *B. intermedia* ATCC 51140, *B.murdochii* ATCC 51284, *B. innocens* ATCC 29796 และ เชื้อ *B. hyodysenteriae* สายพันธุ์จากตัวอย่างสุกรไทย 1 สเตรน (P1/11/6)ได้รับการยืนยันสปีชี่ส์ด้วยด้วยการทำ PCR ที่มีความจำเพาะต่อสปีชี่ส์ *B. hyodysentereriae* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA)(Oxoid, UK) ที่ผสมเลือดแกะ 5% บ่มเพาะในภาวะไร้ก๊าซออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน (Harris et al., 1972b) สังเกตลักษณะเฉพาะของโคโลนีของเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด tryptic soy broth (TSB)(Oxoid, UK) จนสารละลายเชื้อมีความขุ่นเทียบเท่ากับความขุ่นมาตรฐานที่ 0.5 McFarland (ซึ่งจะมีปริมาณเชื้ออยู่ที่ 0.5 – 1.5 x10^8 CFU/มล.) นำสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จนได้เชื้อความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับ 10^6 CFU/มล.

3.1.2 การเตรียมความเข้มข้นยาต้านจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมสารละลายยาต้านจุลชีพทั้งสองชนิดโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เป็นตัวทำละลาย โดยเตรียมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 และ 128 ไมโครกรัม/มล.ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ระหว่างค่าความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration:MIC) ของแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ต่อยาทั้งสองชนิด (Pfaller, 2006; Jeong et al., 2009; Prapasarakul et al., 2010) กรณีที่เตรียมสำหรับ อาหารเลี้ยงเชื้อ แข็ง TSA ที่ผสมเลือดแกะ 5% (blood TSA, BTSA)เตรียมที่ความเข้มข้น 20, 40, 80,160, 320, 640, 1280 และ 2560 ไมโครกรัม/มล.โดยมีลำดับการละลายดังที่แสดงไว้ กรณีที่เตรียมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ให้ความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 และ 1280 ไมโครกรัม/มล.โดยมีลำดับวิธีการละลายตามมาตรฐาน (CLSI, 2007) ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงลำดับการละลายของยาปฏิชีวนะ

สารต้านจุลชีพ	Flavomycin		Halquinol	
ตัวทำละลาย	น้ำกลั่น		DMSO 5%	
หน่วย	ไมโครกรัม/มล.	มล.	ไมโครกรัม/มล.	มล.
1	5180	80	5180	80
2	2560	20	2560	20
3	640	60	640	60
4	320	140	320	140
5	160	20	160	20
6	80	60	80	60
7	40	140	40	140
8	20	20	20	20
9	10	60	10	60



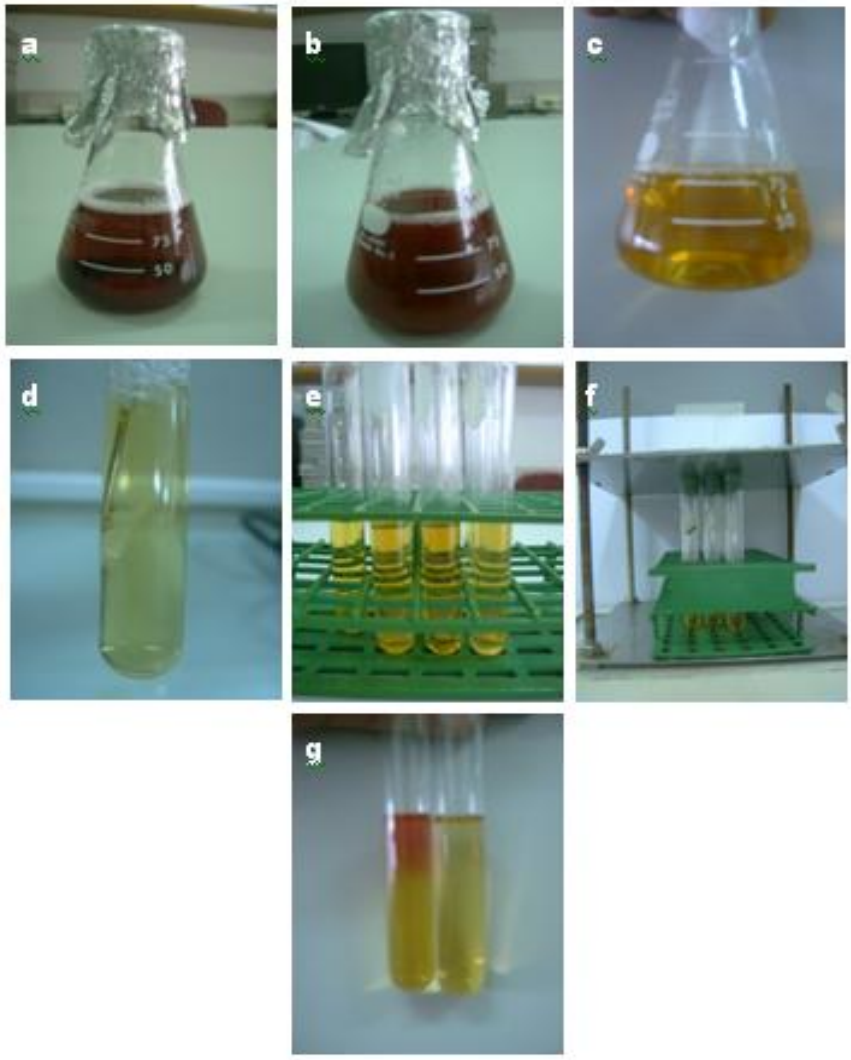
3.1.3 การทดสอบความไวรับของเชื้อแบคทีเรียต่อ flavomycin และ halquinol บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar dilution test)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BTSA 18 มล. ในหลอดทดลอง ภายหลังจากนำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วเทผสมเลือด 1 มล. ผสมสารละลายยาต้านจุลชีพหรือยาปฏิชีวนะ 1 มล. (1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ) หยดสารละลายเชื้อ 50 ไมโครลิตร บนมุมใดมุมหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเกลี่ยสารละลายลงบนบนพื้นที่ 1 ใน 4 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผสมยาต้านจุลชีพที่ความเข้มข้นต่างๆ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเฉพาะเลือดแกะเพียงอย่างเดียวซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมแล้วนำ ไปบ่มเพาะในภาวะไร้ก๊าซออกซิเจนเป็นเวลา 3 วันตามข้อ 3.1.1 อ่านผลการปรากฏโคโลนีของเชื้อ *Brachyspira* ที่เกิดลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้ารอบโคโลนี (Pringle et al., 2006a) เลือกความเข้มข้นสูงสุดของ สารต้านจุลชีพที่ ยังพบโคโลนีของเชื้อเจริญเติบโตอยู่กลุ่มควบคุมไปใช้ในการประเมินความเป็นไปได้ของการใช้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกต่อไป

3.1.4 การทดสอบความไวรับของเชื้อแบคทีเรียต่อ flavomycin บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth dilution test)

เตรียมอาหารเลี้ยง BHI ปริมาตร 9 มล. ผสมใช้ resazurin ความเข้มข้น 0.0001% หรือ 0.1 มิลลิกรัม/ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มล. (Sigma,USA) ต่อปริมาตรทั้งหมด นำไปต้มจนเกิดฟองก๊าซ และสารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเข้ม เปลี่ยนเป็นสีแดง จนกระทั่งเปลี่ยนเป็นไม่มีสี จากปฏิกิริยาให้-รับอิเล็กตรอน (oxidation-reduction) ระหว่างออกซิเจน และ resazurin (resazurin ม่วง <-> resorufin แดง <-> dihydroresorufin ไม่มีสี) ซึ่งถือว่าเป็นสภาวะที่ไม่มีก๊าซออกซิเจนผสมอยู่ (Kunkle and Kinyon, 1988) แล้วนำหลอดนั้นไปปล่อยก๊าซไนโตรเจน 100% ใส่โดยปลายสายยางต่อกับปลายหัวเข็มเหล็กเบอร์ 18 แล้วปล่อยก๊าซให้ลงไปก้นหลอดประมาณ 2-3 นาที ดังรูปที่ 9

แล้วปิดด้วยจุกยางทันทีแล้วปิดทับหลอดด้วยพาราฟิน ล็อคตัวที่วางหลอดเชื้อด้วยด้วยที่หนีบ (clamp) ก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 20 นาที หลอด อาหารเลี้ยงเชื้อต้องไม่เปลี่ยนสีเป็นสีชมพูแดงจากการเกิดปฏิกิริยารับอิเล็กตรอนของ resazurin ระหว่างเก็บรักษาต้องเก็บภายใต้การบีบอัดที่ด้วยที่หนีบเสมอ แล้วใช้หลอดฉีดยาขนาดปลายเข็มเบอร์ 26 ฉีดสารละลายยาต้านจุลชีพเข้าไปในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 1 มล. และฉีดสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาณ 1 มล.เข้าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะแล้ว บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 9 แสดงการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเพื่อเพาะเชื้อ *Brachyspira* a แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังเติม resazurin ลงไปให้ลักษณะสารละลายสีม่วง b แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังต้มจนเดือดเป็นเวลา 5 นาทีให้ลักษณะสารละลายสีแดง c แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังต้มจนเดือดเป็นเวลา 5 นาทีให้ลักษณะสารละลายสีเหลือง d แสดงการเติมก๊าซไนโตรเจนด้วยหัวเข็มเบอร์สิบแปด e แสดงลักษณะของสารละลายภายหลังการเติมก๊าซไนโตรเจน (สารละลายไม่มีสี) f แสดงหลอดสารละลายภายใต้ตัวหนีบเพื่อนำไปอบฆ่าเชื้อ g แสดงลักษณะของสารละลาย (ซ้ายมือ) ภายหลังที่มีออกซิเจนเข้าไปในหลอดเทียบกับหลอดปกติ (ขวามือ)

การนับเชื้อบน hemocytometer โดยนำเชื้อ *Brachyspira* ภายในหลอดโดยดูดเชื้อภายในหลอดด้วยหลอดฉีดยาหัวเข็มเบอร์ 26 มา 100 ไมโครลิตร มาละลายด้วย TSB ปริมาตร 1 มล. และ 10 มล. ดูดสารละลายหลังจากละลายแล้ว นำมาปล่อยระหว่างช่องว่างระหว่างรอยบาก

ตัวฐานของ hemocytometerและกระจกปิดสไลด์ ใช้แรงดึงจากผิวกระจกกับของเหลวดึงสารละลายเข้า hemocytometer แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า เลือกนับแบคทีเรียรูปร่างบิดเกลียว ในบริเวณกริดขนาด 5 ช่อง x 5 ช่องตรงกลาง ซึ่งมีขนาด 0.5 มม. X 0.5 มม. โดยนับแบคทีเรียภายในช่องกริด และแบคทีเรียอยู่คาบเกี่ยวระหว่างเส้นกริดด้านบนและด้านซ้าย ดังรูปที่ 10 โดยนับทั้งหมด 10 ช่อง โดยปรับระยะโฟกัสของรูปให้เห็นในตำแหน่งที่ลึกที่สุด และตื้นที่สุดของ hemocytometer กรณีไม่พบเชื้อให้เปลี่ยนเป็นนับบริเวณ กริดขนาด 4 ช่อง x 4 ช่องตรงขอบ 4 ด้านของ hemocytometer จำนวน 4 ช่องแทน หรือให้เปลี่ยนนำสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำกว่ามานับแทนจนสามารถนับได้ หรือเปลี่ยนเป็นนับบริเวณ dibf จำนวนแบคทีเรียมีหน่วยเป็นเซลล์/มล. คิดจากสูตรคำนวณ ใน

$$\text{จำนวนของเซลล์แบคทีเรีย (5x5)} = \frac{(\text{จำนวนของเซลล์ที่นับ}) \times (\text{dilution factor})}{(\text{จำนวนช่อง}) \times (\text{ปริมาตรช่อง})}$$

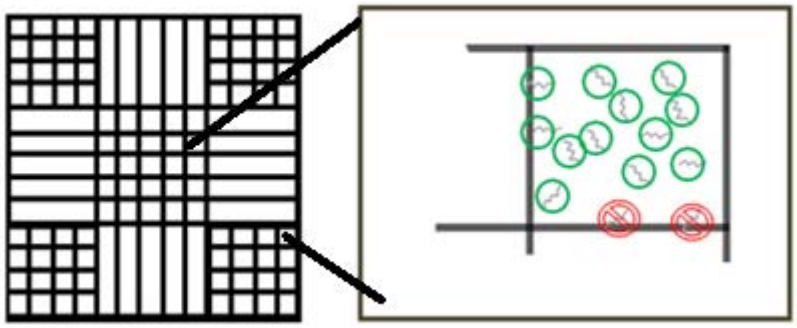
$$= \frac{(\text{จำนวนของเซลล์ที่นับ}) \times (\text{dilution factor})}{10 \times (0.05) \times (0.05) \times (0.1) \times (10^{-3})}$$

$$= \frac{(\text{จำนวนของเซลล์ที่นับ}) \times (\text{dilution factor}) \times 4000000}{10}$$

$$\text{หรือ จำนวนของเซลล์แบคทีเรีย (4x4)} = \frac{(\text{จำนวนของเซลล์ที่นับ}) \times (\text{dilution factor})}{(\text{จำนวนช่อง}) \times (\text{ปริมาตรช่อง})}$$

$$= \frac{(\text{จำนวนของเซลล์ที่นับ}) \times (\text{dilution factor})}{4 \times (1) \times (1) \times (0.1) \times (10^{-3})}$$

$$= \frac{(\text{จำนวนของเซลล์ที่นับ}) \times (\text{dilution factor}) \times 10000}{4}$$



รูปที่ 10 แสดงการนับเชื้อสไปโรคีทบน hemocytometer

เลือกความเข้มข้นสูงสุดของสารต้านจุลชีพที่อนุญาตให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้ในระดับ 10^3 เท่า (3 function log) (modified from Pringle et al., 2006) ไปใช้ในการประเมินประสิทธิรูปของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกต่อไป

3.2 การทดสอบความสามารถในการคัดเลือกเชื้อ *Brachyspira* จากแบคทีเรียอื่น ๆ ในอุจจาระของสูตรอาหารคัดเลือกที่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin

3.2.1 การทดสอบความสามารถในการคัดเลือกเชื้อ *Brachyspira* จากแบคทีเรียอื่น ๆ ในอุจจาระสุกรที่ผสมเชื้อ *Brachyspira* ซึ่งทราบจำนวน ของสูตรอาหารคัดเลือกที่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin

3.2.1.1 การจัดแบ่งกลุ่มสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบประสิทธิรูปสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือก

แบ่งเป็น 3 กลุ่มการศึกษาดังนี้

กลุ่มทดลอง 1 การศึกษาเลือกความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่สูงสุดจากการทดลองข้อ 3.1.3 และ 3.1.4 ที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Brachyspira* สายพันธุ์มาตรฐาน ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ร่วมกับ สารต้านจุลชีพชนิด CSR ประกอบด้วย colitstin (C) 25 ไมโครกรัม/มล. rifampicin(R) 30 ไมโครกรัม/มล. spectinomycin (S) 400 ไมโครกรัม/มล. (X-CSR)

กลุ่มควบคุม 1 อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผสมเลือดแกะ 5 % ผสมด้วย colitstin (C) 25 ไมโครกรัม/มล. rifampicin(R) 30 ไมโครกรัม/มล. spectinomycin (S) 400 ไมโครกรัม/มล. ตามวิธีเดิมที่มีรายงาน (Barret et al., 1990 ; modified from Calderaro et al., 2005)

กลุ่มควบคุม 2 อาหารเลี้ยงเชื้อ BTSA ผสมยาต้านจุลชีพที่มีชนิดและระดับความเข้มข้นเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง (X) โดยความเข้มข้นที่เตรียมเป็นความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีสองชนิดคือ BTSA ใช้ในการทดสอบประสิทธิรูปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (ปริมาตรสุดท้าย 20 มล.) และ BHI ใช้ในการทดสอบประสิทธิรูปในรูปแบบ pre-enrichment ((ปริมาตรสุดท้าย 10 มล.)

3.2.1.2 การเลือกและการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ทำเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1.1

3.2.1.3 การเตรียมความเข้มข้นยาต้านจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อ

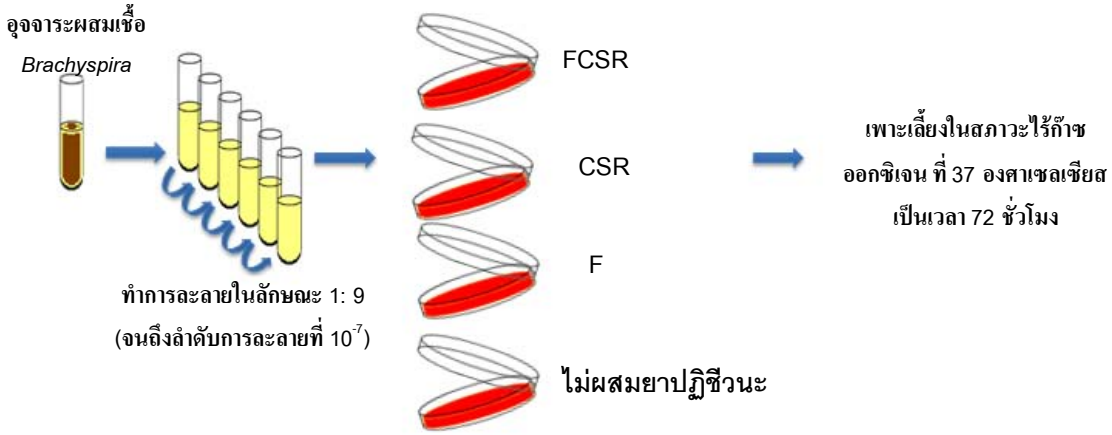
เตรียมสารละลายยา ต้านจุลชีพ โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เป็นตัวทำละลาย โดยเตรียมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายอาหารเลี้ยงเชื้อตามความเข้ มข้นตามกลุ่มการศึกษาที่แบ่งไว้ โดยกรณีที่เตรียมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่ผสมเลือดแกะ 5% (blood TSA, BTSA)ให้เตรียมสารละลายยาต้านจุลชีพที่ความเข้มข้น ยา colitstin (C) 5000 ไมโครกรัม / มล. rifampicin(R) 6000 ไมโครกรัม/มล. spectinomycin (S) 80,000 ไมโครกรัม /มล. ร่วมกับ ยาต้านจุลชีพ X เตรียมไว้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 เท่า ของระดับที่ ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Brachyspira* สายพันธุ์มาตรฐาน เพื่อเตรียมสำหรับการใส่ลงในอาหาร ยาละ 100 ไมโครลิตร ต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (20 มล.) สำหรับการเตรียม อาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว BHI ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 100 เท่าของระดับที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Brachyspira* สายพันธุ์มาตรฐาน ดังนี้ colistin (C) 2500 ไมโครกรัม /มล. rifampicin(R) 3000 ไมโครกรัม /มล. spectinomycin (S) 40,000 ไมโครกรัม/มล. มล. ยาต้านจุลชีพ X และผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยาละ 100 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (10 มล.)

3.2.1.4 การเตรียมอุจจาระ (Brachyspira-free feces) เพื่อผสมเชื้อ *Brachyspira* ที่ทราบปริมาณ

เก็บอุจจาระโดยวิธีล้วงเก็บจากสุกรที่มีลักษณะสุขรูปปกติไม่แสดงอาการของโรคทางเดินอาหาร และไม่ได้รับยาปฏิชีวนะมาเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 28 วัน ขั้นตอนและกระบวนการได้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เก็บรักษา ตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำส่งมายังห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาภายใน 24 ชั่วโมง และนำมาตรวจยืนยันว่าไม่พบ *Brachypira* ด้วยวิธีการเพาะเชื้อ และ วิธี multiplex PCR (Råsbäck et al., 2006) เตรียมอุจจาระปลอดเชื้อสไปโรคีทในอัตราส่วนปริมาณ 1 กรัม ผสมกับนำสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ 1 มล.

3.2.1.5 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนในอุจจาระบนอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกชนิดแข็ง

เจือจางสารละลายอุจจาระที่ผสมกับเชื้อสไปโรคีทที่ทราบจำนวน ด้วยสารละลาย TSB ให้ได้ความเข้มข้นที่ลำดับการละลายที่ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} และ 10^{-7} แล้วนำสารละลายตัวอย่างแต่ละลำดับที่ปริมาตร 100 ไมโครลิตรหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านจุลชีพผสมใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มเพาะที่ภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน นับปริมาณโคโลนีของเชื้อปนเปื้อน (CFU/มล.) และโคโลนีของเชื้อ *Brachyspira* (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 แสดงการแบ่งกลุ่มการศึกษาในการทดลองเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

3.2.1.6 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนในอุจจาระในอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือก pre-enrichment

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BHI 9 มล. ฉีดสารต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นตามกลุ่มการทดลองในข้อ 3.2.1.1 เข้าไปในหลอดชนิดยาต้านจุลชีพละ 100 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของยาต้านจุลชีพในหลอดเป็น colitstin (C) 25 ไมโครกรัม /มล. rifampicin(R) 30 ไมโครกรัม/มล. spectinomycin (S) 400 ไมโครกรัม/มล. และ ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ flavomycin หรือ halquinol จากผลการทดลองข้อ 3.1.3 และ 3.1.4 ในปริมาตรสุดท้าย 10 มล. ภายในหลอดพอดี ฉีดสารละลายอุจจาระ 1 มล.ซึ่งมีปริมาณเชื้อ *Brachyspira* อยู่ระดับ 10^7 CFU/มล. เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ pre-enrichment เพื่อให้ได้ความเข้มข้น ที่ระดับ 10^6 CFU/มล. ในปริมาตรสุดท้าย 10 มล.ภายในหลอดพอดีนำไปตั้งไว้ใน 3 สภาวะ คือ 10 นาที 30 องศาเซลเซียส 30 นาที 30 องศาเซลเซียส ที่บรรยากาศปกติ และ 3 วัน 37 องศาเซลเซียส ในภาวะไร้ก๊าซออกซิเจน (Calderaro et al., 2005) หลังจาก นั้นตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนและเชื้อสไปโรคีทด้วยการเพาะเชื้อ โดย เจือจางสารละลายอุจจาระและเชื้อสไปโรคีทที่

ผสมกันแล้วด้วยสารละลาย TSB ได้ที่ลำดับการละลายที่ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} และ 10^{-7} แล้วปิเปตสารละลายแต่ละลำดับปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงอาหารเลี้ยงเชื้อ BTSA ที่มียาต้านจุลชีพชนิดเดียวกัน แล้วผสมใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มเพาะที่ภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน นับปริมาณโคโลนีของเชื้อปนเปื้อน (CFU/มล.) และโคโลนีของเชื้อ *Brachyspira* (CFU/มล.)ดังตารางที่ 9 และ รูปที่ 12

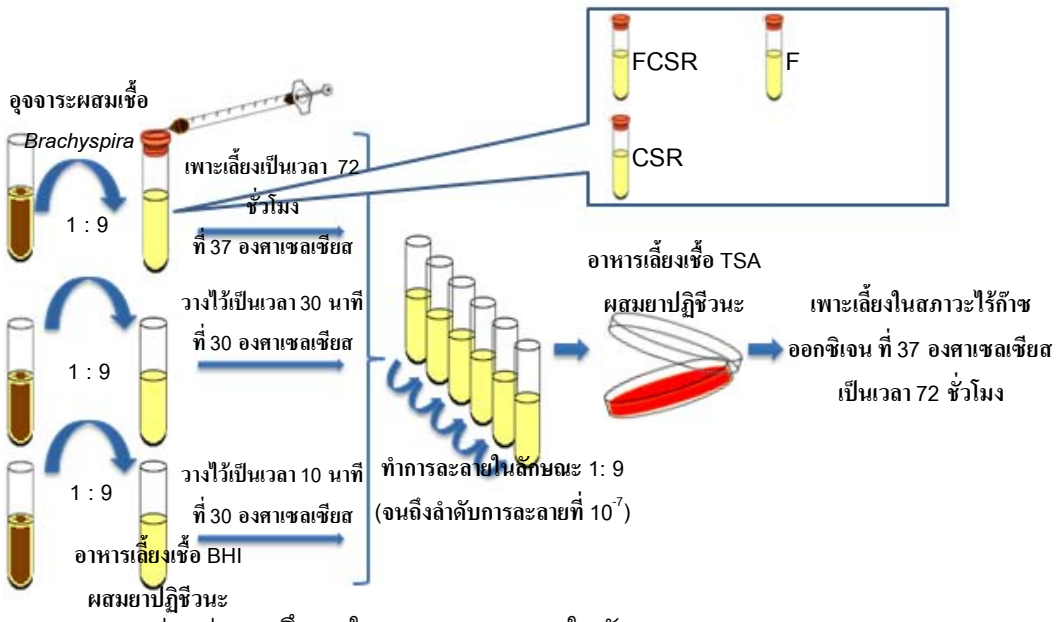
ตารางที่ 9 แสดงการแบ่งกลุ่มการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อในรูปแบบ pre-enrichment

	ระยะเวลา								
	10 นาที			30 นาที			3 วัน		
B. hyodysenteriae ATCC 27164	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F
B. pilosicoli ATCC 51139	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F
B. intermedia ATCC 51140	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F
B. murdochii ATCC 51284	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F
B. innocens ATCC 29796	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F
B. hyodysenteriae สายพันธุ์ P1/11/6	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F

FCSR = colitstin (C) 25 ไมโครกรัม /มล. rifampicin(R) 30 ไมโครกรัม /มล. spectinomycin (S) 400 ไมโครกรัม/มล. และ flavomyicn 16 ไมโครกรัม/มล.

CSR = colitstin (C) 25 ไมโครกรัม /มล. rifampicin(R) 30 ไมโครกรัม /มล. spectinomycin (S) 400 ไมโครกรัม/มล.

F = flavomyicn 16 ไมโครกรัม/มล.



รูปที่ 12 แสดงการแบ่งกลุ่มการศึกษาในการทดลองเพาะในลักษณะ pre-enrichment

3.2.2 การทดสอบประสิทธิรูปของอาหารคัดเลือกเชื้อ *Brachyspira* ที่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin จากการสำรวจในฟาร์มสุกร

3.2.2.1 การเก็บตัวอย่างอุจจาระจากสุกรภายในฟาร์ม

เลือกเก็บอุจจาระจากสุกรอายุ 12 สัปดาห์ขึ้นไปด้วยวิธีล้วงทวารจากสุกรที่มีประวัติอาการท้องเสียแบบมีมูกปนจำนวน 70 ตัวอย่าง และ สุกรอุจจาระสุกรปกติ 20 ตัวอย่าง เก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียสแล้วนำส่งมายังห้องปฏิบัติจุลชีววิทยาภายใน 24 ชั่วโมง

3.2.2.2 การตรวจเบื้องต้น

นำตัวอย่างมาละลายในสารละลาย NaCl 0.85% แล้วหยดลงบนสไลด์ สังเกต ลักษณะแบคทีเรียรูปเกลียวเคลื่อนที่แบบควงเกลียว (flexing and rotating motility) และติดสีย้อมแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.3.3 การตรวจยืนยันเชื้อด้วยวิธี multiplex PCR จากอุจจาระ

นำตัวอย่างอุจจาระสุกรมาสกัด DNA ด้วยชุดสกัด NucleoSpin Tissue® (Machery-Nagel,Germany) ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะกับลำดับเบส *nox* gene ของเชื้อ *B. hyodysenteriae*, 16S rDNA gene ของเชื้อ *B. pilosicoli* และ 16S rDNA gene ของเชื้อ *Lawsonia intercellularis* ในส่วนผสมของ Perfect Taq Plus master Mix (5prime, USA) ลำดับ

เบสของ primers และขั้นตอนการเพิ่มสารพันธุกรรม (thermal cycle) ใช้ตามการศึกษาของ La และคณะ ปี 2006 ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยใช้ DNA template ของ *B. hyodysenteriae* ATCC 27164 *และ B. pilosicoli* ATCC 51139 เป็นตัวควบคุมบวก

ตารางที่ 10 แสดงรายละเอียดข้อมูลจำเพาะของ primers ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อ primer	ยีนที่จำเพาะ	ลำดับเบส	จำนวนเบส
H1	*B. hyodysenteriae* NADH	5'-ACTAAAGATCCTGATGTATTTG-3'	354 bp
H2	oxidase (nox)gene	5'-CTAATAAACGTCTGCTGC-3'	
P1	*B.pilosicoli* 16S rRNA gene	5'-AGAGGAAAGTTTTTTCGCTTC-3'	823 bp
P2		5'-GCACCTATGTTAAACGTCCTTG-3'	

รายละเอียดของลำดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ทำ PCR ตามลำดับ ดังนี้ระยะกระตุ้นเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่มีคุณสมบัติทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิ ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ระยะการเกิดการสลายพันธะไฮโดรเจนของ DNA สายคู่ (denaturation) อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ระยะการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับไพรเมอร์ อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที การเกิดสร้างสาย polymer ของ DNA (extension) อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วินาที (ขั้นตอนที่ 2-4 เกิดปฏิกิริยาขึ้นทั้งหมด 35 รอบ) และการเกิดสร้างสาย polymer ของ DNA ครั้งสุดท้าย(final extension) อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาแยกความแตกต่างของขนาดเบสโดยใช้โหลดลงใน agarose gel (Bioexpress, USA) ความเข้มข้น 1% มาเคลื่อนที่ผ่านความต่างศักย์ไฟฟ้าขนาด 100V เป็นเวลา 25 นาที

3.2.2.4 การทดสอบประสิทธิรูปการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนและอัตราการเพาะเชื้อ *Brachyspira*

เจือจางอุจจาระ ด้วยสารละลาย TSB ให้ได้ความเข้มข้นที่ลำดับการละลาย 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} และ 10^{-7}แล้วนำ100 ไมโครลิตรของสารละลายแต่ละลำดับปริมาตร หยดลงอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละกลุ่มการทดลอง ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปบ่มเพาะที่ภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน นับปริมาณโคโลนีของเชื้อปนเปื้อน (CFU/มล.) และโคโลนีของเชื้อ *Brachyspira*

3.2.2.5 การตรวจสอบสปีชี่ส์ของเชื้อที่พบโดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี และ PCR

3.2.2.5.1 การทดสอบ indole

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI ที่มีการเติม tryptophan ลงไป 0.1% v/v แล้วหยอด xylene บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มเพาะ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หยดสารละลาย Kovac ลงไป 4-5 หยด สังเกตการเกิดเปลี่ยนสีของของเหลวในชั้นของ xylene กรณีพบให้สารละลายสีชมพูแดงแสดงว่าเชื้อที่ทดสอบให้ผลบวกกับการทดสอบ indole

3.2.3.5.2 การทดสอบ hippurate hydrolysis

เขี่ยเชื้อลงในสารละลาย hippurate ความเข้มข้น 1% ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland 5 (10^9 CFU/มล.) แล้วทำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ภายหลังหยดสารละลาย ninhydrin 3.5% แล้วเขย่าทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วอ่านผล กรณีที่เชื้อมีเอนไซม์ hippuricase สามารถย่อยสารประกอบ hippurate เป็นกรด benzoic และ glycine ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยารีดิวซ์ได้กับ สารละลาย ninhydrin เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงเข้มแสดงว่าเชื้อที่ทดสอบให้ผลบวกกับการทดสอบ hippurate hydrolysis

3.2.3.5.3 การทดสอบด้วยวิธี PCR จากเชื้อบริสุทธิ์

ภายหลังจากเพาะเชื้อจนได้โคโลนีบริสุทธิ์ หยดสารละลาย normal saline ลงไปในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 มล. แล้วใช้แท่งแก้วเกลี่ยโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด เก็บใส่หลอดเก็บเชื้อ (eppendorf) แล้วปั่นจนตะตะกอนที่ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาทีเติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ได้ใช้เป็น สาย DNA ต้นแบบจากการทำ PCR ใช้ primers ที่จำเพาะกับลำดับเบส *nox* gene ของเชื้อ *B. hyodysenteriae*, 16S rDNA gene ของเชื้อ *B. pilosicoli* ใช้ Perfect Taq Plus master Mix (5prime, USA) ในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนพันธุกรรม ลำดับเบสของ primers และขั้นตอนการเพิ่มสารพันธุกรรม (thermal cycle) ใช้ตามการศึกษาของ La และคณะ ปี 2006 (ตารางที่ 10) โดยใช้ DNA template ของ *B. hyodysenteriae* ATCC 27164 *และB. pilosicoli* ATCC 51139 เป็นตัวควบคุมบวก

3.2.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลของปริมาณเชื้อ *Brachyspira* spp. และเชื้อแบคทีเรียอื่นที่ปนเปื้อนจะถูกนำเสนอในรูปแบบค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ (Means) (CFU/มล.) เปรียบเทียบปริมาณเชื้อ *Brachyspira* ที่

เพาะขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองด้วยวิธี Wilcoxon's signed rank test และเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ของการพบเชื้อด้วยวิธีการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อคัดแยกต่อวิธี multiplex PCR ระหว่างกลุ่มทดลอง (n=70) และกลุ่มควบคุม (n=70) ต่อ ด้วยวิธี Chi-squared test ค่า $p<0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การประเมินหาค่าความความเข้มข้นสูงสุดของ flavomycin และ halquinol ที่ไม่ยับยั้งเชื้อ *Brachyspira* สายพันธุ์อ้างอิง 5 สายพันธุ์ และ 1 สายพันธุ์จากตัวอย่างสุกรไทยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

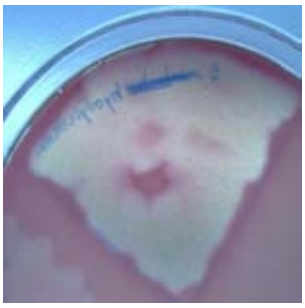
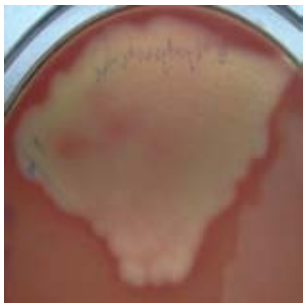
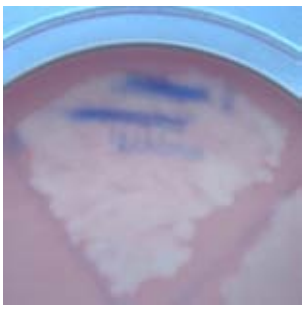
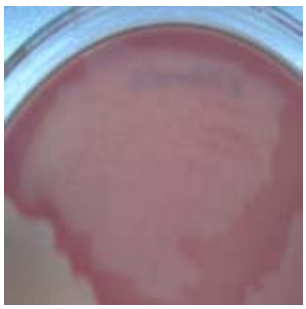
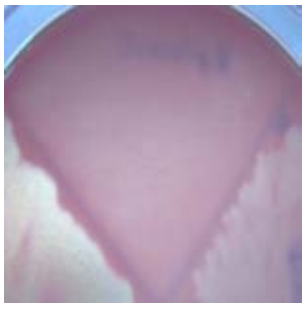
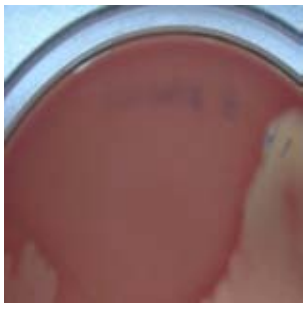
จากการประเมินค่าความไวรับของเชื้อ *Brachyspira* มาตรฐาน ต่อ **ยาปฏิชีวนะ** flavomycin และ halquinol ด้วยวิธี modified agar dilution test ได้ผลตามตารางที่ 11 และรูปที่ 13 พบว่า halquinol เป็นสารต้านจุลชีพที่สามารถยังยั้งเชื้อ *Brachyspira* ทุกสปีชีส์ที่ใช้ทดสอบได้ในระดับต่ำ แต่เชื้อทุกสปีชีส์สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม flavomycin ที่ระดับต่ำกว่าหรือเท่ากับ 16 ไมโครกรัม /มล. เนื่องจากเหตุที่ยา halquinol ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ในระดับที่ต่ำ ยา halquinol จึงไม่เหมาะสมต่อการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการทดสอบอื่นๆ ในขั้นต่อไป ยา halquinol จึงถูกตัดออกจากการศึกษา

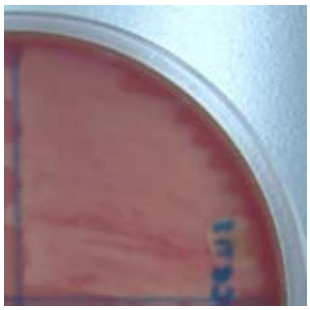
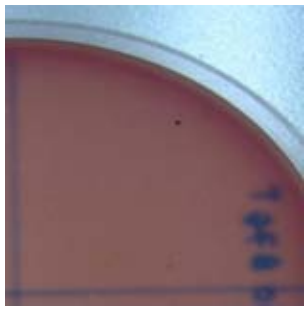
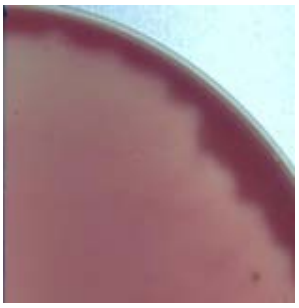
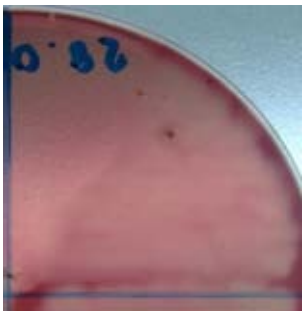
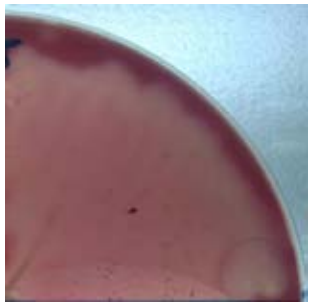
ตารางที่ 11 แสดง การเจริญของเชื้อ *Brachyspira* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin และ halquinol ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Brachyspira* มาตรฐาน	ความเข้มข้นยาปฏิชีวนะ (ไมโครกรัม/มล.)															
	1		2		4		8		16		32		64		128	
	F	H	F	H	F	H	F	H	F	H	F	H	F	H	F	H
B. hyodysenteriae ATCC 27184	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
B. pilosicoli ATCC 51139	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
B. intermedia ATCC 51140	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B. murdochii ATCC 51284	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
B. innocens ATCC 29796	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B. hyodysenteriae สเตรน P1/11/6	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-

F = flavomycin, H = halquinol

รูปที่ 13 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Brachyspira* สปีชี่ส์ต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin (a = *B. hyodysenteriae* ATCC 27164 b = *B. pilosicoli* ATCC 51139 c = *B. murdochii* ATCC 51284 d = *B. intermedia* ATCC 51140)

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Brachyspira* มาตรฐาน	ความเข้มข้นยาปฏิชีวนะ flavomycin (ไมโครกรัม/มล.)		
	8	16	32
B. hyodysenteriae ATCC 27184			
B. pilosicoli ATCC 51139			
B. intermedia ATCC 51140			
B. murdochii ATCC 51284			

B. innocens ATCC 29796			
B. hyodysenteriae สเตรน P1/11/6			

4.2 การประเมินหาค่าความเข้มข้นสูงสุดของ flavomycin ที่ไม่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Brachyspira* สายพันธุ์อ้างอิง 5 สายพันธุ์ และ 1 สายพันธุ์จากตัวอย่างสุกรไทยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

จากการประเมินหาค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารต้านจุลชีพที่ไม่มีผลการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Brachyspira* มาตรฐาน ของสารต้านจุลชีพ flavomycin ด้วยวิธี broth dilution test ได้ผลตามตารางที่ 1 2 พบว่า เชื้อทุกสปีชี่ส์สามารถเพิ่มจำนวนในระดับที่มากขึ้นกว่าเดิมเป็นจำนวนอย่างน้อย 1000 เท่า (3 $\log_{10}$) ซึ่งเป็นอัตราการเจริญของเชื้อปกติ *Brachyspira* ปกติในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Trott et al., 1996a) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม flavomycin ที่ระดับต่ำกว่าหรือเท่ากับ 16 ไมโครกรัม /มล. ความเข้มข้นระดับดังกล่าวสอดคล้องกับค่าความไวรับของเชื้อ *Brachyspira* มาตรฐาน ต่อสารต้านจุลชีพ flavomycin จากผลการทดลอง 4.1 ความเข้มข้นของยา flavomycin จึงถูกเลือกใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นในอุจจาระที่ทราบปริมาณเชื้อ *Brachyspira* และอุจจาระสุกรฟาร์ม

ตารางที่ 12 แสดง จำนวนเชื้อ *Brachyspira* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ผ่านการนับบน hemocytometer

เชื้อ	ความเข้มข้นของยา flavomycin μg/ml)						
	1	2	4	16	32	64	128
B. hyodysenteriae ATCC 27164	1.6×10^{9}	1.4×10^{9}	2.0×10^{9}	1.9×10^{9}	1.4×10^{6}	0	0
B. pilosicoli ATCC 51139	2.0×10^{9}	1.3×10^{9}	2.4×10^{9}	1.2×10^{9}	5.6×10^{5}	0	0
B. intermedia ATCC 51140	1.5×10^{9}	2.0×10^{9}	1.1×10^{9}	1.0×10^{9}	1.4×10^{4}	0	0
B. murdochii ATCC 51284	1.2×10^{9}	2.4×10^{9}	1.3×10^{9}	1.0×10^{9}	1.6×10^{5}	0	0
B. innocens ATCC 29796	1.0×10^{9}	1.1×10^{9}	1.6×10^{9}	1.0×10^{9}	4.0×10^{4}	0	0
B. hyodysenteriae สเตรน P1/11/6	1.2×10^{9}	2.1×10^{9}	1.8×10^{9}	2.2×10^{9}	6.5×10^{5}	0	0

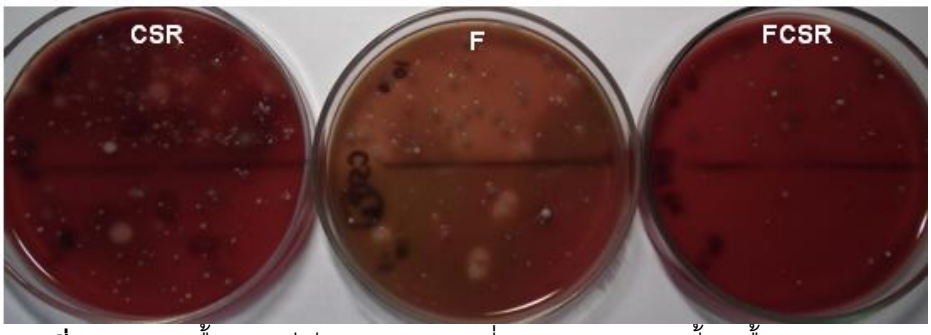
4.3 ประสิทธิรูปการแยกเชื้อ *Brachyspira* และการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนจากตัวอย่างอุจจาระที่มีเชื้อ *Brachyspira* บนอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกชนิดแข็ง

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในตัวอย่างอุจจาระที่ทราบปริมาณเชื้อ *Brachyspira* ด้วยวิธีการเพาะแยกในอาหารเลี้ยงชนิดแข็ง แสดงผลดังตารางที่ 1 3 ในกรณีที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด FCSR ซึ่งประกอบด้วยสารต้านจุลชีพ flavomycin (f) 16 ไมโครกรัม/มล. colitstin (C) 25 ไมโครกรัม/มล. rifampicin(R) 30 ไมโครกรัม/มล. spectinomycin (S) 400 ไมโครกรัม/มล. พบโคโลนีของเชื้อที่ไม่ใช่ *Brachyspira* สามารถเจริญขึ้นมาได้ในปริมาณ 10^{7} CFU/กรัมอุจจาระ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร CSR ที่ประกอบด้วย colistin (C) 25 ไมโครกรัม /มล. rifampicin(R) 30 ไมโครกรัม/มล. spectinomycin (S) 400 ไมโครกรัม/มล. และ สูตรที่ผสมเฉพาะ flavomycin (f) 16 ไมโครกรัม/มล. (F) อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตรพบโคโลนีของเชื้ออื่นๆอุจจาระในระดับ 10^{9} CFU/กรัมอุจจาระ สำหรับสูตรที่ไม่ผสมยาต้านจุลชีพใดๆเลยมีการเจริญของเชื้อในอุจจาระที่มีปริมาณมากกว่า 3.0×10^{10} CFU/กรัมอุจจาระ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร FCSR และ CSR และ F สามารถแยกเชื้อ *Brachyspira* สเตรนมาตรฐาน โดยนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ อยู่ในปริมาณ $10^{5} - 10^{6}$ CFU/กรัมอุจจาระ สำหรับสูตรที่ไม่ผสม ยาต้านจุลชีพใดๆเลย พบเฉพาะโคโลนีของเชื้อ *B. hyodysenteriae* ATCC 27164

และ สายพันธุ์จากตัวอย่างที่แยกได้จากสุกรไทย โดยพบที่ระดับ 10^6 CFU/กรัมอุจจาระ แต่ไม่สามารถแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวได้ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 13 และรูปที่ 14

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบปริมาณของเชื้อ *Brachyspira* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งทั้ง 3 สูตรที่ผสมยาปฏิชีวนะและกลุ่มควบคุม

เชื้อ	FCSR	CSR	F	ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ
B. hyodysenteriae ATCC 27164	5.0×10^6	1.7×10^6	3.0×10^6	1.0×10^6
B. pilosicoli ATCC 51139	8.0×10^6	1.6×10^6	6.5×10^6	-
B. intermedia ATCC 51140	2.2×10^5	2.6×10^5	3.2×10^6	-
B. murdochii ATCC 51284	4.0×10^6	3.0×10^6	3.4×10^6	-
B. innocens ATCC 29796	3.0×10^5	2.0×10^5	2.5×10^6	-
B. hyodysenteriae สเตรน P1/11/6	3.2×10^6	2.0×10^6	2.2×10^6	1.2×10^6
แบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ใช่ *Brachyspira*	6.4×10^7 (7.8±1.4)	2.6×10^9 (9.4±0.2)	3.9×10^9 (9.6±0.1)	$>3.0 \times 10^{10}$



รูปที่ 14 แสดงเชื้อแบคทีเรียจากอุจจาระที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกลุ่มกัน

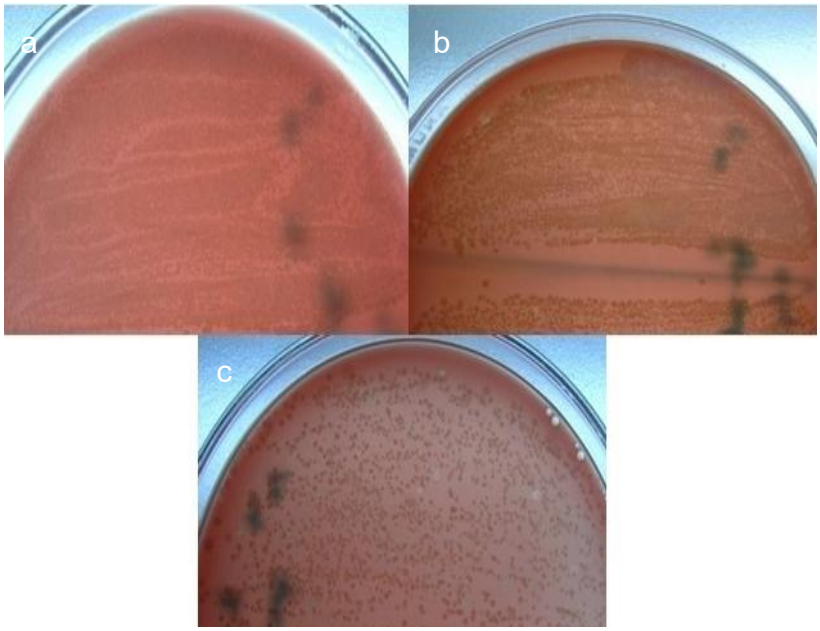
4.4 ประสิทธิรูปการแยกเชื้อ *Brachyspira* และการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นจากตัวอย่างอุจจาระที่ทราบปริมาณเชื้อ *Brachyspira*ด้วยการเพิ่มขั้นตอน pre-enrichment

ผล การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นจากตัวอย่างอุจจาระโดยเพิ่มขั้นตอนการเพาะบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือก pre-enrichment ชนิดเหลว ก่อนการนำไปเพาะเชื้อบนอาหารคัดเลือกชนิดแข็ง แสดงผลดัง ตารางที่ 1 4 พบว่าไม่สามารถแยกโคโลนีของเชื้อ *Brachyspira* เดี่ยวได้เมื่อเพิ่มขั้นตอนนี้ ตามช่วงเวลาที่กำหนด และไม่สามารถนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้เนื่องจากมีปริมาณมากกว่า $3x10^{10}$ CFU/มล. (รูปที่ 15) แต่สามารถสังเกตเห็นลักษณะของแบคทีเรียรูปร่างบิดเกลียวคล้ายงูภายใต้กล้องจุลทรรศน์(รูปที่ 16) ขั้นตอนนี้จึงไม่เหมาะสมที่จะทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

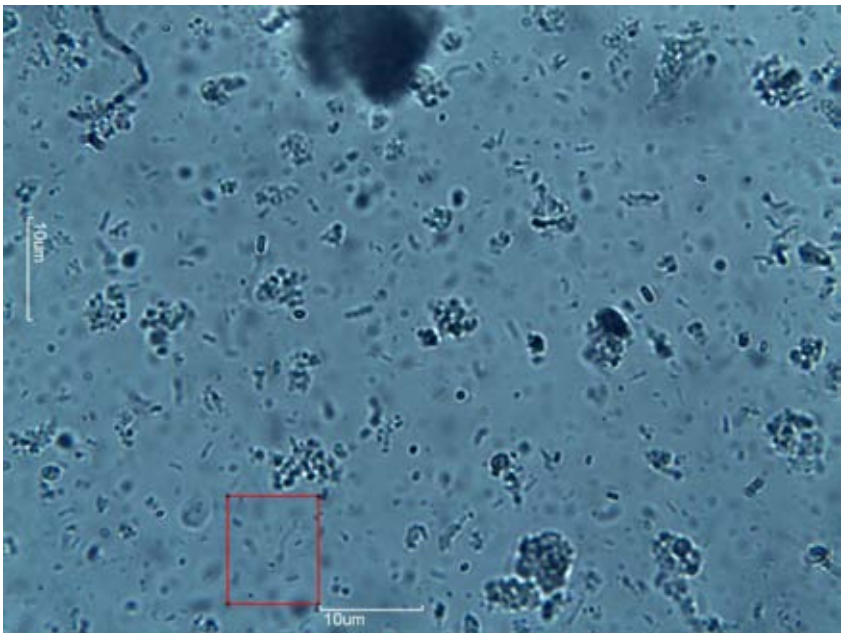
ตารางที่ 14 แสดงปริมาณเชื้อ *Brachyspira* ในสปีชี่ส์ต่างๆ และปริมาณเชื้อจากอุจจาระอื่นๆ จากวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ pre enrichment ที่เวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่แตกต่างกัน

	ความเข้มข้น(µg/ml)								
	10 นาที			30 นาที			3 วัน		
	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F	FCSR	CSR	F
BH	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
OF	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC
BP	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
OF	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC
BINT	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Of	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC
BM	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
OF	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC
BINN	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
of	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC
TBH	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
OF	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC	UC

BH = *B. hyodysenteriae* ATCC 27164, BP = *B. pilosicocoli* ATCC 51139, BINT = *B. intermedia* ATCC 51140, BM = *B.murdochii* ATCC 51284, BINN = *B. innocens* ATCC9796 และTBH = เชื้อ *B. hyodysenteriae* สเตรน P1/11/6OF = เชื้อแบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ใช่ *Brachyspira* NC = not detect colony (ไม่พบโคโลนีของเชื้อ) UC = uncountable (จำนวนโคโลนีมากกว่า 300 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ)



รูปที่ 15 แสดงปริมาณของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียจากอุจจาระที่ได้จากการผ่านขั้นตอน pre-enrichment เป็นเวลา 10 นาที ที่ลำดับการละลาย 10^{-6} บนอาหารเลี้ยงเชื้อ FCSR ต่างกลุ่มกัน (a = CSR b = F c = FCSR)



รูปที่ 16 แสดงเชื้อแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จากตัวอย่างอุจจาระเมื่อผ่านขั้นตอน pre-enrichment พบลักษณะแบคทีเรียรูปร่างเกลียวยาว (กรอบสีแดง)

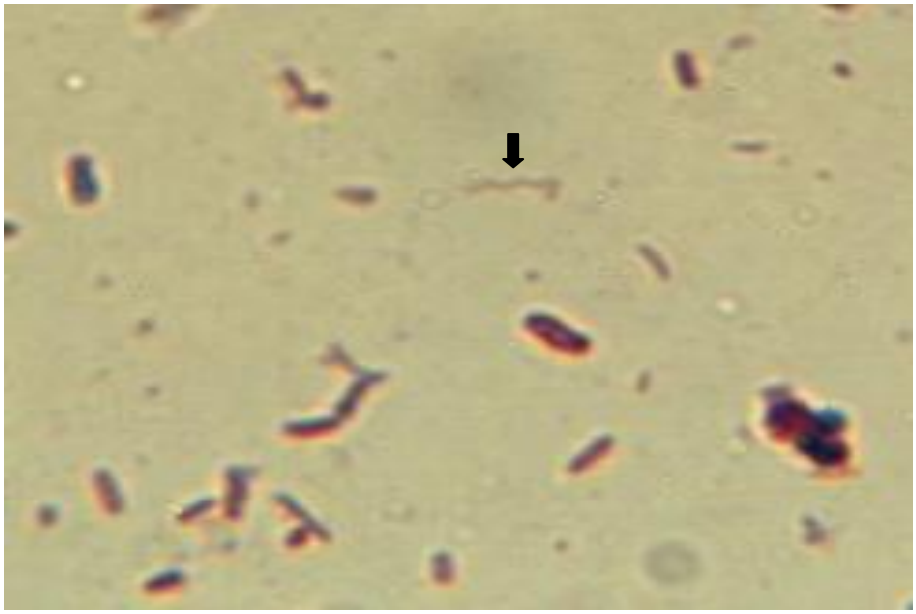
4.5 ประสิทธิรูปอาหารคัดเลือกเชื้อ *Brachyspira* โดยใช้ตัวอย่างอุจจาระที่ได้จากสุกรฟาร์ม

การตรวจเบื้องต้น

ตัวอย่างอุจจาระและ /หรือลำไส้ จำนวนทั้งสิ้น 90 ตัวอย่าง แบ่งเป็น จากสุกรอุจจาระท้องเสียแบบมีมูกเลือดปน 70 ตัวอย่าง สุกรปกติ 20 ตัวอย่าง กรณีที่เป็นตัวอย่างลำไส้ ทำการเปิดผ่าและสำรวจรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาดังแสดงในรูปที่ 17 และตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี fresh smear (ดังแสดงในรูปที่ 18) สังเกตแบคทีเรีย รูปเกลียวเคลื่อนที่แบบควงเกลียว (flexing and rotating motility) พบแบคทีเรียรูปเกลียวย้อมติดสีแกรมลบ (ดังแสดงในรูปที่ 19) จำนวน 42 ตัวอย่าง แบ่งเป็นจากสุกรอุจจาระท้องเสียแบบมีมูกเลือดปน 32 ตัวอย่าง สุกรปกติ 10 ตัวอย่าง

รูปที่ 17 แสดงลักษณะรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาของสุกรที่บริเวณไส้ตรง และไส้ตันที่มีปื้นเลือดออกที่เยื่อบุชั้นใน (hemorrhagic colitis) (ตัวอย่างที่ P7)

รูปที่ 18 แสดงเชื้อแบคทีเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์จากตัวอย่างอุจจาระสุกรขึ้นปะปนกันด้วยการป้ายเชื้อสด (fresh smear) พบลักษณะแบคทีเรียรูปร่างยาวที่เคลื่อนที่ควงเกลียว (กรอบสีแดง)

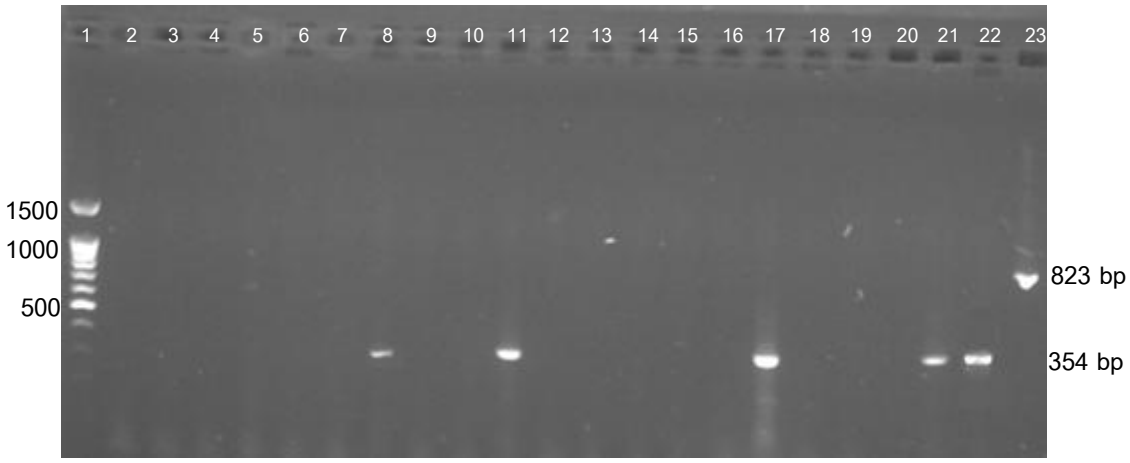


รูปที่ 19 แสดงเชื้อแบคทีเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์จากตัวอย่างอุจจาระสุกรที่ขึ้นปะปนกันด้วยย้อมสีแกรม (Gram strain) พบลักษณะแบคทีเรียรูปร่างยาวบิดเป็นเกลียว (ลูกศรชี้)

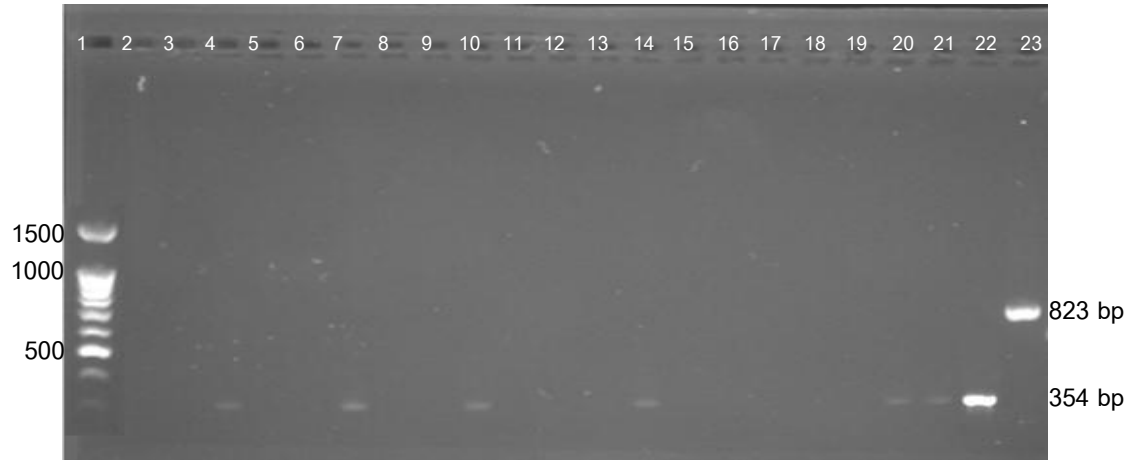
การทดสอบการทำ PCR จากอุจจาระโดยตรง

การทดสอบการทำ PCR จากอุจจาระโดยตรงพบว่าให้ผลบวกที่มีลำดับเบสจำเพาะกับส่วน *nox* (NADPH oxidase) gene ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* จำนวนทั้งหมด 29 ตัวอย่าง (ดัง

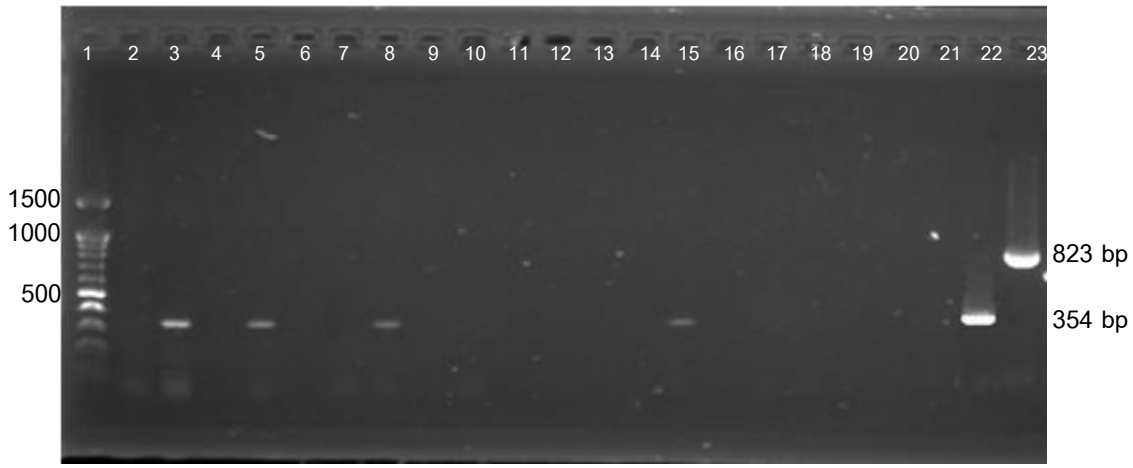
แสดงในรูปที่ 20,21 และ 22) ซึ่งเป็นตัวอย่างจากสุกรที่แสดงอาการท้องเสียแบบมีมูกเลือดปนทั้งหมด และไม่พบผลบวกกับส่วน 16S rDNA gene ของเชื้อ *B. pilosicoli* เลย



รูปที่ 20 แสดงผลผลิตดีเอนเอด้วยวิธี PCR ในการตรวจพิสูจน์เชื้อ*B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* จากอุจจาระสุกรฟาร์มบนเจลอกาโรส 1% (P1-P20) แถวที่ 1 DNA มาตรฐาน 100 คู่เบส แถวที่ 2-21 ตัวอย่างที่ 1-20 P7, P10, P16, P20 แถวที่ 22 ตัวควบคุมบวก *B. hyodysenteriae* ATCC 27164 พบ DNA ขนาด 354 เบส แถวที่ 23 *B. pilosicoli* ATCC 51139 พบ DNA ขนาด 823 เบส



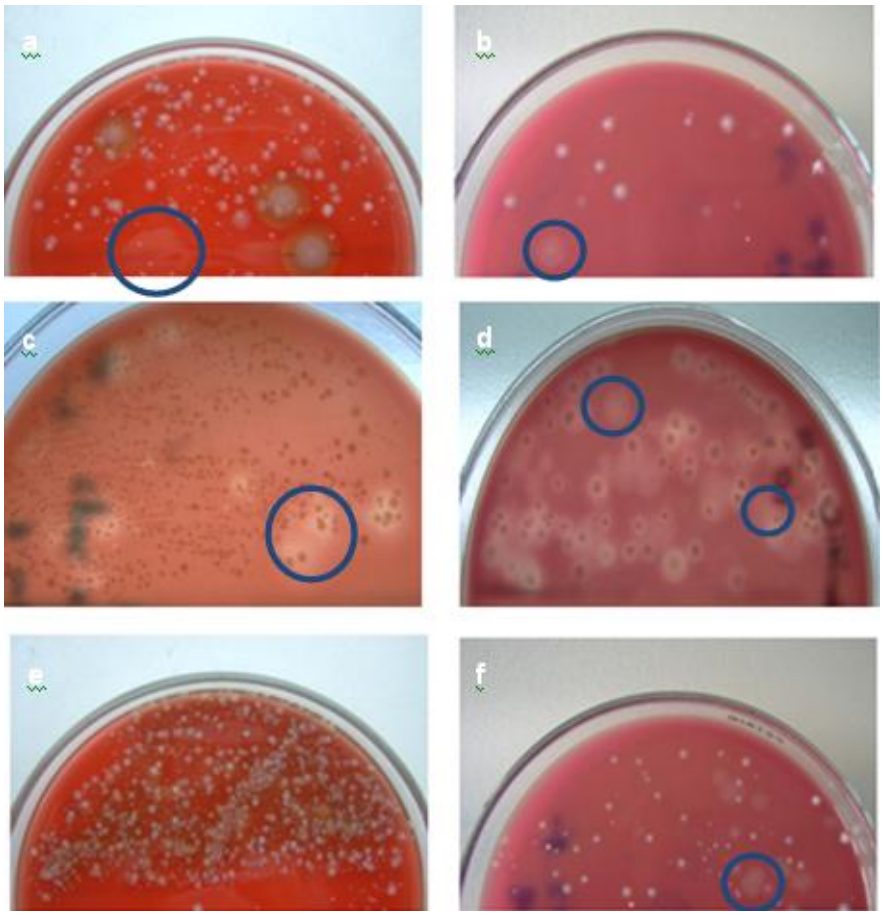
รูปที่ 21 แสดงผลผลิตดีเอนเอด้วยวิธี PCR ในการตรวจพิสูจน์เชื้อ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* จากอุจจาระสุกรฟาร์มบนเจลอกาโรส 1% (P21-P40) แถวที่ 2-21 ตัวอย่างที่ 21-40 P23, P26, P29, P33, P39, P40 แถวที่ 22 ตัวควบคุมบวก *B. hyodysenteriae* ATCC 27164 พบ DNA ขนาด 354 เบส แถวที่ 23 *B. pilosicoli* ATCC 51139 พบ DNA ขนาด 823 เบส



รูปที่ 22 แสดงผลผลิตดีเอนเอด้วยวิธี PCR ในการตรวจพิสูจน์เชื้อ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* จากอุจจาระสุกรฟาร์มบนเจลอกาโรส 1% (P41-P60) แถวที่ 2-21 ตัวอย่างที่ 41-60 P42, P44, P47, P49, P54, พบ DNA ขนาด 354 เบส แถวที่ 22 ตัวควบคุมบวก *B. hyodysenteriae* ATCC 27164 พบ DNA ขนาด 354 เบส แถวที่ 23 *B. pilosicoli* ATCC 51139 พบ DNA ขนาด 823 เบส

ประเมินความสามารถในการแยกเชื้อ *Brachyspira* จากตัวอย่างอุจจาระจากสุกรภายในฟาร์ม

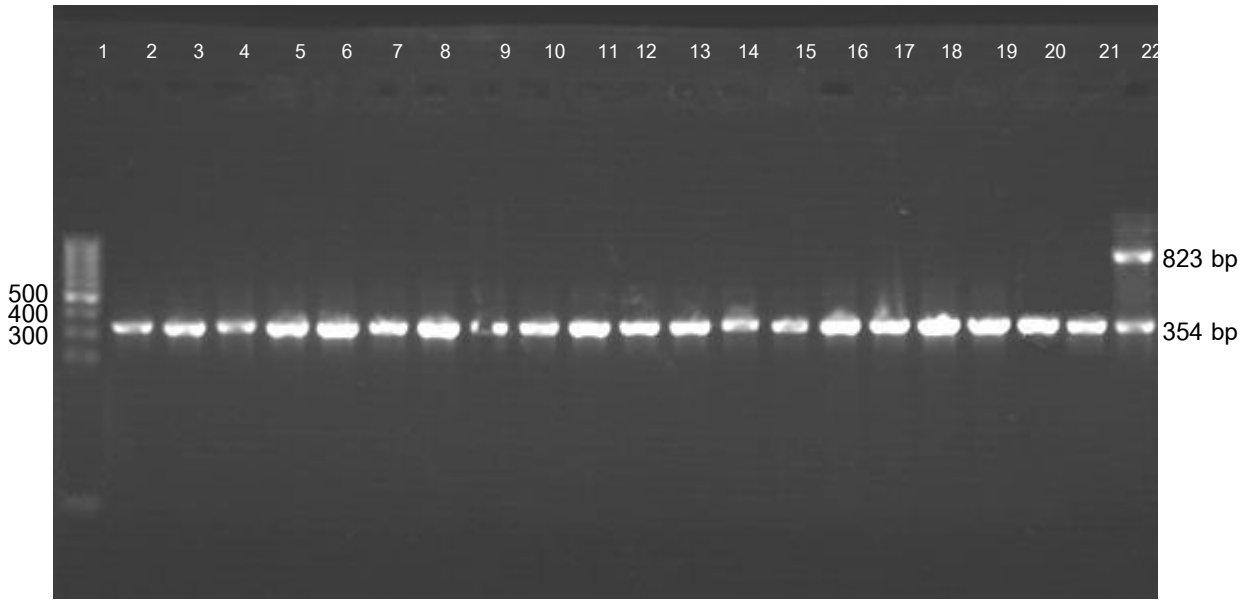
จำนวนเชื้อ *Brachyspira* ปริมาณต่ำสุดที่สามารถเพาะแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม FCSR คือ 1.1x 10^2 CFU/กรัมอุจจาระ ส่วนปริมาณเชื้อ *Brachyspira* ปริมาณต่ำสุดที่สามารถเพาะแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม CSR คือ 1.8x10^3 CFU/กรัมอุจจาระ ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *Brachyspira* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม FCSR เท่ากับ 6.6 x 10^4 CFU/ กรัมอุจจาระ ส่วนค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *Brachyspira* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม CSR เท่ากับ 6.3 x 10^3 CFU/กรัมอุจจาระ ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ แบคทีเรียในทางเดินอาหารอื่นๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม FCSR เท่ากับ 3.3x 10^7 CFU/กรัมอุจจาระ ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ แบคทีเรียในทางเดินอาหารอื่นๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม CSR เท่ากับ 3.4x 10^8 CFU/กรัมอุจจาระ (ดังแสดงในรูปที่ 23)



รูปที่ 23 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Brachyspira* และเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม FCSR (b,d,f) และ CSR (a,c,e) วงกลมสีน้ำเงินในรูปแสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Brachyspira*

การตรวจสอบสปีชี่ส์ของเชื้อที่พบโดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี และ PCR

จากการทดสอบการทำ indole และ hippurate hydrolysis พบว่าเชื้อ *Brachyspira* ที่เพาะแยกได้จาก FCSR ทั้ง 20 เชื้อ และ CSR 6 เชื้อ ให้ผลบวกกับการทดสอบ indole test และให้ผลลบกับการทดสอบ hippurate hydrolysis test ทั้งหมด ส่วนการทดสอบการทำ PCR จากเชื้อโคโลนีบริสุทธิ์พบว่าให้ขนาดผลิตภัณฑ์ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับส่วน *nox* (NADH oxidase) gene ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* จาก FCSR จำนวนทั้งหมด 20 เชื้อ (ดังแสดงในรูปที่ 24) และ CSR จำนวนทั้งหมด 6 เชื้อ และไม่มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับส่วน 16S rDNA gene ของเชื้อ *B. pilosicoli* เลย



รูปที่ 24 แสดงผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ที่มีความจำเพาะต่อสปีชี่ส์ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* บนเจลอกาโรส 1% จากเชื้อบริสุทธิ์ แถวที่ 2-21 เป็นโคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม FCSR แถวที่ 22 แถบ DNA ขนาด 354 เบส เป็นตัวควบคุมบวกจาก *B. hyodysenteriae* ATCC 27164 แถบ DNA ขนาด ขนาด 354 เบส เป็นตัวควบคุมบวกจาก *B. pilosicoli* ATCC 51139 ขนาด 823 เบส

การทดสอบทางสถิติ

จากการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการพบเชื้อ *Brachyspira* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม FCSR แตกต่างกับ CSR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี Chi-squared test ที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.01$ ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *Brachyspira* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม FCSR แตกต่างกับ CSR อย่างทีมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี Wilcoxon's signed rank test ที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$ ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ แบคทีเรียในทางเดินอาหารอื่นๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม FCSR แตกต่างกับ CSR อย่างทีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี Wilcoxon's signed rank test ที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.001$ โดยข้อมูลสรุปการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นจากตัวอย่างอุจจาระสุกรจากฟาร์ม วิธีการเพาะแยกในอาหารเลี้ยงชนิดแข็ง ผลของ PCR จากอุจจาระโดยตรง และผลการวิเคราะห์ทางสถิติได้แสดงไว้ในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบอัตราการเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีเชื้อ *Brachyspira* และค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในอุจจาระบนอาหารเลี้ยงเชื้อ FCSR กับ CSR และอัตราการพบเชื้อด้วยวิธีตรวจ M-PCR

	FCSR	CSR	M-PCR
B. hyodysenteriae (%)	20[a] (28%)	6[a] (8.5%)	29 (41.4%)
B. pilosicoli (%)	-	-	-
ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีเชื้อ *Brachyspira* (CFU/กรัม) (log(CFU/กรัม)±SD)	6.6 x 10[4b] (4.8±1.2)	6.3 x 10[3b] (3.8 ±0.3)	
ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีขอองเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในอุจจาระ (CFU/กรัม) (log(CFU/กรัม)±SD)	3.3x 10[7c] (7.5±0.7)	3.4x 10[8c] (8.5±0.6)	

[a]แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.01$, chi-square test

[b] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

[c]แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.001$, Wilcoxon signed rank test

บทที่ 5

การอภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การอภิปราย

ค่าความไวรับของยาปฏิชีวนะ flavomycin จากทั้งสองวิธี มีความสอดคล้องและเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือที่ 16 ไมโครกรัมต่อมล. มีค่าความไวรับของยาปฏิชีวนะ ในระดับที่ไม่มีผลต่อการเจริญ และการเพิ่มจำนวนของเชื้อ ซึ่งไม่ได้เป็นไปตามแนวโน้มปกติที่พบว่าทดสอบความไวรับของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจะมีค่าต่ำกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งประมาณ 1 log ของความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะในส่วนของกลุ่มแบคทีเรียที่จำเป็นต้องเจริญในภาวะจำเพาะ (*Brachyspira*) อย่างเช่นกลุ่มสกุล *Brachyspira* (Rohde et al., 2004) อย่างไรก็ ตามการพบผลดังกล่าวเป็นเพียงแนวโน้มที่เกิดขึ้น และพบสเตรนที่ผลค่าความไวรับในอาหารเลี้ยงชนิดเหลวสอดคล้องกับความไวรับในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งได้เช่นเดียวกัน (Karlsson et al., 2002)

การศึกษาก่อนหน้านี้ยังไม่พบการแสดงค่าความไวรับและระดับความเข้มข้นของ สารต้านจุลชีพ halquinol และ flavomycin ของเชื้อในสกุล *Brachyspira* ค่าความไวรับของยา halquinol ต่อเชื้อ *Brachyspira* สเตรนมาตรฐานที่พบในสุกร 6 สเตรน อยู่ในระดับต่ำ (<1 ไมโครกรัม/มล.) หมายถึงสามารถให้ผลยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีในห้องปฏิบัติการ halquinol นอกจากจะให้ผลดีต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ก่อโรคแล้ว สามารถใช้ เป็นสารต้านจุลชีพในการ ใช้รักษาโรค บิดมูกเลือด และ colonic spirochetosis ในทางเดินอาหารสุกรได้ เพื่อยืนยันความเป็นไปได้ควร มีการศึกษาหาความไวรับของยาต่อเชื้อสเตรนที่แยกได้จากฟาร์ม และความสามารถในการการทำลายเชื้อในการทดลองในตัวสัตว์เพิ่มเติม

รายงานการศึกษาของ Calderaro และคณะปี 2005 ที่เสนอ การ เพิ่มขั้นตอนการเพาะเลี้ยงด้วยวิธี pre-enrichment broth โดยทำให้สามารถพบเชื้อ *Brachyspira* จากอุจจาระที่มีการผสมเชื้อลงไปได้ตั้งแต่ $10^2 – 10^7$ เซลล์ต่อกรัมอุจจาระ ซึ่งขึ้นอยู่กับสปีชี่ส์และสเตรนของเชื้อ และเมื่อนำมาเพาะแยกในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสามารถพบโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะ เชื้อ จากการศึกษา นี้พบว่าการ เพิ่มขั้นตอนของการเพิ่มจำนวน เชื้อ *Brachyspira* และลดการปนเปื้อน ด้วยวิธี pre-enrichment broth ไม่สามารถ แยก เชื้อ *Brachyspira* สปีชี่ส์ใดๆ ออกมาเป็นโคโลนีเดี่ยวได้เลย แต่ยังส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อในอุจจาระในระหว่างการเพาะบ่ม จึงทำให้พบโคโลนีของเชื้อที่ไม่สามารถนับได้ (มากกว่า 3.0×10^{10} เซลล์/กรัมอุจจาระ) ซึ่งไม่สอดคล้องกับ อาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียในอุจจาระทั้งหมดนั้นไม่ได้

ถูกยับยั้งจากยาปฏิชีวนะที่ ผสม ลงไปในช่วงขั้นตอนการทำ pre-enrichment เชื้อ ที่ยัง คง เจริญเติบโตได้ก็สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งเร็วกว่าเชื้อสไปโรคีทในระบบทางเดิน อาหารถึง 3 เท่า การศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง พบว่า เชื้อ *E. coli* ใช้เวลา เพียง 6 ชั่วโมง ในการ เพิ่ม ปริมาณเชื้อจากปริมาณ 10^3 เซลล์/มล.เป็น 10^9 เซลล์/มล. ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวเชื้อ *Brachyspira* ยังอยู่ในช่วงคงตัวของการเพิ่มจำนวน (stationary phase) เมื่อนำมาเพาะต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดแข็งโคโลนีของเชื้ออื่นๆในอุจจาระจึงขึ้นปกคลุมโคโลนีของเชื้อ *Brachyspira* จนไม่สามารถ นับหรือแยกเพื่อเพาะเชื้อต่อไปได้ (Fujikawa et al., 2004; Fujikawa and Morozumi, 2005) อีก ทั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว จะมีความสามารถในการเติบโตได้ เร็วกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด FCSR จึงมีประสิทธิรูปในการเพาะแยกโคโลนีของเชื้อ *Brachyspira* ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน CSR จากการทดสอบทางสถิติที่พบว่า อัตราการพบเชื้อ *Brachyspira* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ FCSR สูงกว่า CSR อย่างมีนัยสำคัญ log ของจำนวนโคโลนีของ เชื้อ *Brachyspira* บนอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ FCSR สูงกว่า CSR อย่างมีนัยสำคัญ log ของจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ FCSR ต่ำ กว่า CSR อย่างมีนัยสำคัญ และตัวอย่างของที่พบโคโลนีเชื้อบน CSR จะพบโคโลนีควบคู่ไปกับ อาหารเลี้ยงเชื้อ FCSR เสมอ และพบว่าบางตัวอย่างพบโคโลนีของเชื้อเฉพาะบน FCSR เพียง อย่างเดียว

การแยกเชื้อจากตัวอย่างที่ได้รับจากฟาร์มสุกร พบ เฉพาะเชื้อ *B. hyodysenteriae* เท่านั้น ไม่สามารถพบเชื้อ *Brachyspira* ในสปีชี่ส์อื่นๆ เลย สำหรับสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ เลือกใช้พบว่ามีสารต้านจุลชีพ rifampicin มีความไวรับต่อต่อ *B.pilosicoli* ในระดับต่ำ (Trott et al., 1996b) นั่นหมายถึง rifampicin อาจมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อบางเสตรนได้ แต่การทดสอบ แยกเชื้อด้วยอาหารแต่ละสูตร และการทดสอบด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุลก็สามารถยืนยันได้ว่าตัวอย่าง ที่ทำการทดสอบปราศจากเชื้อ *B. pilosicoli* จริงซึ่งไม่ได้เป็นผลจากการยังยั้งของสารต้านจุลชีพที่ ผสมในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนั้นมี รายงานเปรียบเทียบการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี rifampicin เป็นตัวพื้นฐานพบว่า ยังสามารถเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* ชนิดต่างๆ รวมถึง *B. pilosicoli* ด้วย ออกมาได้ถึงจากจำนวนเชื้อที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับ 10^2 เซลล์/กรัม อุจจาระ ในขณะที่สูตรอาหารชนิดอื่นที่มีผู้นิยมใช้กัน (CVS และ BJ) พบว่าสามารถเพาะแยกได้ใน ระดับ 10^3 เซลล์/กรัมอุจจาระ และนอกจากกรณีของการเพาะเชื้อ *B. hyodysneteraie* จาก อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี rifampicin ผสมอยู่ รายงานการศึกษาของ Achacha และคณะปี 1992 พบว่า

มีอัตราการเพาะแยกเชื้อ *B. hyodysenteriae* จากอุจจาระที่ผสมเชื้อลงไปมากว่า 89.7% และ CVS อยู่ที่ 76.6% และ S400 อยู่ที่ 52.1% (Achacha and Messier, 1992)

ผลบวกการเพาะแยกเชื้อทั้งหมดที่ให้ผลบวกให้ผลสอดคล้อง ผลบวกจากการทำ PCR แต่จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลตรวจ PCR เป็นบวกต่อเชื้อ *B. hyodysenteriae* จากอุจจาระโดยตรงนั้นมีความไวต่อการตรวจมากกว่าการตรวจด้วยการแยกเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา เปรียบเทียบการทำ multiplex PCR พบว่าปริมาณเชื้อที่ต่ำที่สุดที่ตรวจได้ที่ 10^2- 10^4 เซลล์/กรัมอุจจาระ และการเพาะเชื้อสามารถพบปริมาณเชื้อที่ 10^2-10^6 เซลล์/กรัมอุจจาระ จากกรณีใช้เชื้อผสมอุจจาระสุกร (Råsbäck et al., 2006) แต่ในการศึกษาตัวอย่างจาก ฟาร์ม พบว่าการเพาะเชื้อที่ให้ผลบวกมักพบในสุกรที่แสดงอาการของโรครุนแรงและไม่ได้รับยาปฏิชีวนะซึ่งจะมีเชื้อปล่อยออกมากับอุจจาระในระดับ 10^7-10^{10} เซลล์/กรัมอุจจาระ (Neef et al., 1994) ด้วยปริมาณนี้จึงมีโอกาสที่อาหารแยกเชื้อ FCSR สามารถแยกเชื้อจากอุจจาระของสุกรโดยเฉพาะตัวที่แสดงอาการท้องเสียได้ แต่การตรวจด้วยวิธี PCR อาจมีประโยชน์ในขั้นการตรวจพาหะนำโรค และในสุกรที่อยู่ในระยะฟักตัวของโรค (Phillips et al., 2009) ถึงแม้ว่าในเชิงการตรวจเชื้อเพื่อการวินิจฉัยโรค การทำ PCR นั้นอาจมีอัตราการตรวจพบเชื้อที่สูงกว่า แต่อย่างไรก็ตามผลบวกที่ได้เป็นผลจากการตรวจดีเอนเอ ซึ่งไม่สามารถจำแนกได้ว่าได้จากเชื้อมีชีวิต หรือเชื้อที่ตายจากยาปฏิชีวนะ การเพาะแยกเชื้อก็ยังมีความสำคัญในแง่ของการนำตัวเชื้อ มีชีวิตที่ได้ไปศึกษาด้าน ชีววิทยาอื่นๆ เช่น ความไวรับต่อยาปฏิชีวนะ การศึกษาด้านระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อในรูปแบบต่างๆ

ในแง่ของการศึกษาระบาดวิทยา อัตราการพบเชื้อ *B. hyodysenteriae* จากการศึกษาครั้งนี้มีอัตราที่สูง 28.5 % (20/70) เมื่อเปรียบกับการศึกษาอื่นๆ เช่น การศึกษาของ Phillips และคณะปี 2009 ที่ประเทศออสเตรเลียพบ 0.5% (1/222) การศึกษาของ La และคณะ ปี 2006 ที่ประเทศออสเตรเลียพบ19.3% (37/192) การศึกษาของ Jacobson และคณะ ปี 2005 ที่ประเทศสวีเดนพบ 0% (0/1048) การศึกษาของ La และคณะ ปี 2003 ที่ประเทศออสเตรเลียพบ 21.9% (39/178) การศึกษาของ Barcellos และคณะ ปี 2000 ที่ประเทศสเปนพบ 13.9% (29/207) การศึกษาของ Heinonen และคณะ ปี 2000 ที่ประเทศฟินแลนด์พบ 0% (0/428) การศึกษาของ FellstrÖm และคณะปี 1996 ที่ประเทศ สวีเดนพบ 0% (0/358) สำหรับการศึกษาในประเทศไทยพบว่าจากการศึกษาของ Tummaruk และ Prapasarakul ปี 2005 พบว่าเพาะแยกเชื้อ *B. hyodysenteriae* จากตัวอย่างอุจจาระสุกรที่แสดงอาการท้องเสียแบบมีมูกเลือดปนได้ 30% จากตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ และจากการศึกษาของ Tasu และคณะ ปี 2008 สามารถไม่สามารถเพาะแยกเชื้อ *Brachypira* สปีชี่ส์ใดๆได้เลยจากตัวอย่างอุจจาระสุกร 400 ตัวอย่างจากฟาร์มในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ปัจจัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างของผล

ดังกล่าวอาจเกิดจากลักษณะของการการกระจายตัวของเชื้อที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ และการเลือกลักษณะตัวอย่างที่เก็บ

ในแง่ของความถูกต้องของผลที่เกิดขึ้นจากการตรวจพบเชื้อด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อ และการทำ PCR นั้น พบว่า เกิดผลลบเทียม (false negative) จากการตรวจโดยการเพาะเชื้อนั้นมีโอกาสเกิดขึ้นได้ จากกรณีที่มีปริมาณเชื้อในที่ระดับต่ำในอุจจาระดังที่กล่าวไว้แล้วในส่วนการอธิบายความไวรับของการตรวจ นอกจากปริมาณเชื้อในอุจจาระแล้วพบว่า วิธีการเก็บตัวอย่าง มีส่วนเพิ่มอัตราการพบเชื้อได้เช่นเดียวกัน โดยการเก็บตัวอย่างทันทีที่ 4 องศาเซลเซียสสามารถเพิ่มอัตราการพบเชื้อในกรณีที่ใช้ระยะเวลาเดินทางมายังห้องปฏิบัติการมากกว่า 24 ชั่วโมงได้ดีกว่าเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส หรือการเก็บตัวอย่างอุจจาระสามารถตรวจพบเชื้อได้ดีกว่าการป้ายเก็บจากไม้พันสำลีแห้ง (Achacha and Messier, 1992) ส่วนลักษณะการเกิดผลบวกเทียม (false positive) จากการตรวจด้วยวิธี PCR โดยตรงจากอุจจาระในระบบของ La และคณะ ปี 2006 นั้นยังไม่มีผู้รายงานในการศึกษาใดมาก่อน ทั้งนี้การพัฒนา PCR ระบบดังกล่าว ผู้พัฒนาได้มีการทดสอบความไวในการตรวจพบ (sensitivity) กับแบคทีเรียในสปีชี่ส์ *B. hyodysenteriae* 19 สเตรน และ *B. pilosicoli* 13 สเตรน พบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *B. hyodysenteriae* (354 คู่เบส) และ *B. pilosicoli* (823 คู่เบส) ตรงตามสปีชี่ส์ทั้งสองสปีชี่ส์ และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปหาลำดับเบสพบว่ามีลำดับเบสที่จำเพาะตรงกันกับยี *น nox* ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* ATCC 27164 และ *16S rDNA* ของเชื้อ *B. pilosicoli* ATCC 51139 นอกจากนี้ยังทำการทดสอบกับแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน ได้แก่ *B. intermedia* , *B. murdochii* , *B. aalborgi* , *B. canis* และ *B. alvinipulli* รวมทั้งแบคทีเรียอื่นๆ ที่มีลักษณะใกล้เคียงและอาศัยในทางเดินอาหารเช่นเดียวกัน ได้แก่ *Helicobacter spp.* , *Campylobacter spp.* , *Archobaccter spp.* และกลุ่มแบคทีเรียที่มีโอกาสพบจากการเพาะแยกตัวอย่างจากสุกรได้แก่ *Escherichia coli* , *Listeria monocytogenes* , *Salmonella* Typhimurium , *S.* Derby , Desulfovibrio desulfuricans, *Bacteroides fragilis*, *Bacillus subtilis* , *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas cichorii* และ *Klebsiella oxytoca* พบว่าไม่เกิดผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ในระบบดังกล่าวแต่อย่างใด การเลือกใช้วิธี multiplex PCR ระบบดังกล่าวเป็นจึงมีความเหมาะสมที่จะใช้ตัวยืนยันการคงอยู่ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* ในตัวอย่างอุจจาระ และระบบ PCR นี้ยังถูกออกแบบให้ตรวจสารพันธุกรรมในส่วน *16S rDNA* ของเชื้อ *Lawsonia intracellularis* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบก่อโรคในบริเวณใกล้เคียงกับตำแหน่งก่อโรคของเชื้อ *Brachyspira* และในการศึกษาพบตัวอย่างที่ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดจำเพาะกับเชื้อ *L. intracellularis* (655 เบส) จำนวน 4 ตัวอย่าง (5.7%)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองมีการผสมยาปฏิชีวนะลงไปถึง 4 ชนิดด้วยกัน ซึ่งในการศึกษาความไวรับของแบคทีเรียในกลุ่มอื่น พบว่าอาจเกิดกรณีที่ความไวรับต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มเท่ากับหรือใกล้เคียงกับผลรวมของการใช้ยาปฏิชีวนะแยกชนิดกัน (additive effects) (Hanaki and Hiramatsu, 1999) หรือมากกว่าผลรวมของการใช้ยาปฏิชีวนะแยกกัน (synergistic effects)(Gunnison et al., 1953; Gunnison et al., 1955) ในกรณีของเชื้อ *Brachyspira* เองพบว่ามีผู้รายงานในกรณีของผลของ griseoviridin และ viridogrisein ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์จับกับไรโบโซมหน่วยย่อย 30S ขัดขวางการสร้างโปรตีนเช่นเดียวกับ spectinomycin ต่อเชื้อ *B. hyodysenteriae* พบว่าสามารถเกิดการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ต่อการติดเชื้อ *B. hyodenteriae* (Asano and Adachi, 2006) แต่ไม่เคยมีรายงานการศึกษาใดกล่าวถึงผลของยาปฏิชีวนะ flavomycin หรือ ยาในกลุ่ม phosphoglycolipids ตัวอื่นๆ ที่มีผลในลักษณะ combination effects และ synergistic effects ต่อเชื้อ spirochetes หรือแบคทีเรียตัวใดเลย และซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ก็ไม่พบผลลักษณะดังกล่าวกรณีใช้ยา flavomycin ร่วมกับ สูตรยา colistin spectinomycin และ rifampicin โดยยังพบเชื้อ แบคทีเรีย *Brachyspira* สปีชี่ส์ต่างๆ ในระดับกำลังเดียวกันทั้งในสูตร CSR และ FCSR

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม flavomycin ลงไปในสูตร CSR นั้นสามารถเพิ่มประสิทธิรูปการเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* ได้จริง รูปแบบการใช้นั้นใช้ในลักษณะเดียวกับการเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* เพียงแต่ผสมยาปฏิชีวนะ flavomycin ลงไปในระดับ 16 ไมโครกรัม/มล. ระหว่างการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับเลือดสัตว์ 5 % แล้วหยดสารละลายอุจจาระที่ทำการละลายในลำดับต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่ว แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงที่ภาวะไร้ก๊าวออกซิเจนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เปิดสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อ ทุก 3 วัน ทำไปจนครบ 12 วัน ในด้านราคาเนื่องจากยาปฏิชีวนะดังกล่าวเป็นยาที่ใช้โดยหลักโดยการผสมในอาหารสัตว์ทำให้ขาดรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์ที่สามารถนำมาผสมอาหารเลี้ยงเชื้อได้ มีแต่เพียงรูปแบบที่ใช้ผสมอาหารสัตว์ซึ่งมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ และรูปแบบที่ใช้ทดสอบความไวรับซึ่งมีราคาต่อหน่วยค่อนข้างสูง 10 มิลลิกรัมราคา 3100 บาท (Sigma-aldrich, Singapore) เฉลี่ยแล้วจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาแพงขึ้น 99 บาท/หนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

นอกจากการประเมินประสิทธิรูปของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมลงไปแล้ว การศึกษายังพบว่าขั้นตอนการเลือกตัวอย่าง การเก็บรักษาตัวอย่าง ก่อนเดินทางมาที่ห้องปฏิบัติการมีความสำคัญต่อการเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* อย่างมีประสิทธิรูปสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ที่พบว่า ควรเลือกเก็บตัวอย่างของสุกรที่เริ่มแสดงอาการและยังไม่ได้รับยาปฏิชีวนะเข้าไป เนื่องจากเชื้อดังกล่าวมีความไวรับต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม pleuromutilin (Fossi et al., 1999; Karlsson et al.,

2001) ที่ใช้ทั่วไปในวงการปศุสัตว์ค่อนข้างสูงถึงแม้ว่าจะพบอุบัติการณ์ของการดื้อยาดังกล่าวในปัจจุบัน (Pringle et al., 2006b) การโดยเก็บตัวอย่างในลักษณะจากตัวชั้นเยื่อเมือกผนังลำไส้ มีโอกาสพบเชื้อมากกว่าเก็บจากอุจจาระโดยตรงหรือการเก็บโดยได้ไม้พันสำลีแห้ง และการเก็บตัวอย่างที่ 4 องศาเซลเซียส สามารถรักษาเชื้อและมีโอกาสเพาะแยกเชื้อพบได้มากกว่าการเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส (Achacha and Messier, 1992)

สรุปผลการวิจัย

การเสริมยาปฏิชีวนะ flavomycin ที่ระดับความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/มล. ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยา colistin 25 ไมโครกรัม/มล. spectinomycin 400 ไมโครกรัม/มล. และ rifampicin 30 ไมโครกรัม/มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar ที่มีเลือดแกะผสมอยู่ 5% สามารถเพิ่มประสิทธิรูปในการเพาะแยกเชื้อเชื้อสไปโรคีทจากทางเดินอาหารสุกรได้

เอกสารอ้างอิง

Achacha, M. and Messier, S. 1992. Comparison of six different culture media for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. J. Clin. Microbiol. 30(1): 249-251.

Akase, S., Uchitani, Y., Sohmura, Y., Tatsuta, K., Sadamasu, K. and Adachi, Y. 2009. Application of real time PCR for diagnosis of Swine Dysentery. J. Vet. Med. Sci. 71(3): 359-362.

Angkititrakul, S., Chomvarin, C., Chaita, T., Kanistanon, K. and Waethewutajarn, S. 2005. Epidemiology of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from pork, chicken meat and humans in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 36(6): 1510-1515.

Asano, T. and Adachi, Y. 2006. Effects of griseoviridin and viridogrisein against swine dysentery in experimental infection by using mice and pigs. J. Vet. Med. Sci. 68(6): 555-560.

Atyeo, R.F., Oxberry, S.L., Combs, B.G. and Hampson, D.J. 1998. Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochaetosis. Lett. Appl. Microbiol. 26(2): 126-130.

Atyeo, R.F., Stanton, T.B., Jensen, N.S., Suriyaarachichi, D.S. and Hampson, D.J. 1999. Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (*nox*) sequence comparisons and nox-based polymerase chain reaction tests. Vet. Microbiol. 67(1): 47-60.

Backhans, A., Johansson, K.E. and Fellström, C. 2010. Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira spp*. isolated from wild rodents Environ. Microbiol. Rep. 2(6): 720-727.

Bangtrakulnonth, A., Pornrungwong, S., Pulsrikarn, C., Boonmar, S. and Yamaguchi, K. 2006. Recovery of *Salmonella* using a combination of selective enrichment media and antimicrobial resistance of isolates in meat in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 37(4): 742-746.

Barcellos, D.E., Mathiesen, M.R., de Uzeda, M., Kader, II and Duhamel, G.E. 2000. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. Vet. Rec. 146(14): 398-403.

Barrett, S.P. 1990. Intestinal spirochaetes in a Gulf Arab population. Epidemiol. Infect. 104(2): 261-266.

Breznak, J.A. and Canale-Parola, E. 1969. *Spirochaeta aurantia,* a pigmented, facultatively anaerobic spirochete. J. Bacteriol. 97(1): 386-395.

Calderaro, A., Bommezzadri, S., Piccolo, G., Zuelli, C., Dettori, G. and Chezzi, C. 2005. Rapid isolation of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* from pigs. Vet. Microbiol. 105(3-4): 229-234.

Chuanchuen, R., Khemtong, S. and Padungtod, P. 2007. Occurrence of qacE/qacEDelta1 genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 38(5): 855-862.

Chuanchuen, R. and Padungtod, P. 2009. Antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine in Thailand. J. Vet. Med. Sci. 71(10): 1349-1355.

Chuanchuen, R., Pathanasophon, P., Khemtong, S., Wannaprasat, W. and Padungtod, P. 2008. Susceptibilities to antimicrobials and disinfectants in *Salmonella* isolates obtained from poultry and swine in Thailand. J. Vet. Med. Sci. 70(6): 595-601.

CLSI. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard-Seven Edition M11-A7. 27(2): 47.

Corona-Barrera, E., Smith, D.G., La, T., Hampson, D.J. and Thomson, J.R. 2004. Immunomagnetic separation of the intestinal spirochaetes *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira hyodysenteriae* from porcine faeces. J. Med. Microbiol. 53(4): 301-307.

DeGeeter, M.J. and Harris, D.L. 1975. Effect of lincomycin and spectinomycin on swine dysentery. J. Anim. Sci. 41(5): 1333-1338.

Duhamel , G.E. and Joens, L.A. 1994. Laboratory procedures for diagnosis of swine dysentery. In: *Serpulina hyodysenteriae*. Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticans. Columbia, USA 2-17.

Duhamel, G.E., Trott, D.J., Muniappa, N., Mathiesen, M.R., Tarasiuk, K., Lee, J.I. and Hampson, D.J. 1998. Canine intestinal spirochetes consist of *Serpulina pilosicoli* and a newly identified group provisionally designated "*Serpulina canis*" *sp. nov*. J. Clin. Microbiol. 36(8): 2264-2270.

Ekkapobyotin, C., Padungtod, P. and Chuanchuen, R. 2008. Antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolates from swine. Int. J. Food Microbiol. 128(2): 325-328.

Elder, R.O., Duhamel, G.E., Schafer, R.W., Mathiesen, M.R. and Ramanathan, M. 1994. Rapid detection of *Serpulina hyodysenteriae* in diagnostic specimens by PCR. J. Clin. Microbiol. 32(6): 1497-1502.

Fellström, C. and Gunnarsson, A. 1995. Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. Res. Vet. Sci. 59(1): 1-4.

Fellström, C., Karlsson, M., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A. and Aspan, A. 1999. Emended descriptions of indole negative and indole positive isolates of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. Vet. Microbiol. 70(3-4): 225-238.

Fellström, C., Pettersson, B., Johansson, K.E., Lundeheim, N. and Gunnarsson, A. 1996. Prevalence of Serpulina species in relation to diarrhea and feed medication in pig-rearing herds in Sweden. Am. J. Vet. Res. 57(6): 807-811.

Fellström, C., Pettersson, B., Thomson, J., Gunnarsson, A., Persson, M. and Johansson, K.E. 1997. Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. J. Clin. Microbiol. 35(2): 462-467.

Fellström, C., Pettersson, B., Uhlen, M., Gunnarsson, A. and Johansson, K.E. 1995. Phylogeny of *Serpulina* based on sequence analyses of the 16S rRNA gene and comparison with a scheme involving biochemical classification. Res. Vet. Sci. 59(1): 5-9.

Fernie, D.S., Griffin, R.M. and Park, W.A. 1975. The possibility that Campylobacter (*Vibrio*) *coli* and *Treponema hyodysenteriae* are both involved in swine dysentery. Br. Vet. J. 131(3): 335-338.

Finland, M., Garner, C., Wilcox, C. and Sabath, L.D. 1976. Susceptibility of "*enterobacteria*" to aminoglycoside antibiotics: comparisons with tetracyclines, polymyxins, chloramphenicol, and spectinomycin. J. Infect. Dis. 134 Suppl: S57-74.

Fossi, M., Saranpaa, T. and Rautiainen, E. 1999. In vitro sensitivity of the swine *Brachyspira* species to tiamulin in Finland 1995-1997. Acta Vet. Scand. 40(4): 355-358.

Fujikawa, H., Kai, A. and Morozumi, S. 2004. Improvement of new logistic model for bacterial growth. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 45(5): 250-254.

Fujikawa, H. and Morozumi, S. 2005. Modeling surface growth of *Escherichia coli* on agar plates. Appl. Environ. Microbiol. 71(12): 7920-7926.

Glock, R.D., Harris, D.L. and Kluge, J.P. 1974. Localization of spirochetes with the structural characteristics of *Treponema hyodysenteriae* in the lesions of swine dysentery. Infect. Immun. 9(1): 167-178.

Glock, R.D., Vanderloo, K.J. and Kinyon, J.M. 1975. Survival of certain pathogenic organisms in swine lagoon effluent. J. Am. Vet. Med. Assoc. 166(3): 273-275.

Gorrie, C.J. 1946. Swine dysentery. Aust. Vet. J. 22(4): 135-138.

Greenberg, E.P. and Canale-Parola, E. 1976. *Spirochaeta halophila sp. n.*, a facultative anaerobe from a high-salinity pond. Arch. Microbiol. 110(23): 185-194.

Gunnison, J.B., Kunishige, E., Coleman, V.R. and Jawetz, E. 1955. The mode of action of antibiotic synergism and antagonism: the effect in vitro on bacteria not actively multiplying. J. Gen. Microbiol. 13(3): 509-518.

Gunnison, J.B., Shevky, M.C., Bruff, J.A., Coleman, V.R. and Jawetz, E. 1953. Studies on antibiotic synergism and antagonism: the effect in vitro of combinations of antibiotics on bacteria of varying resistance to single antibiotics. J. Bacteriol. 66(2): 150-158.

Hampson, D.J., Fellström, C. and Thomson, J.R. 2006. Swine dysentery. In: Diseases of swine. 9th ed. B.E. Straw, J.L. Zimmerman, S. D' Allaire and D.J. Taylor (ed). Iowa: Blackwell Publishing. 785-805.

Hampson, D.J. and La, T. 2006. Reclassification of *Serpulina intermedia* and *Serpulina murdochii* in the genus *Brachyspira* as *Brachyspira intermedia comb. nov*. and *Brachyspira murdochii comb. nov*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56(Pt 5): 1009-1012.

Hanaki, H. and Hiramatsu, K. 1999. Combination effect of teicoplanin and various antibiotics against hetero-VRSA and VRSA. Kansenshogaku Zasshi. 73(10): 1048-1053.

Hanson, R., Kaneene, J.B., Padungtod, P., Hirokawa, K. and Zeno, C. 2002. Prevalence of *Salmonella* and *E. coli*, and their resistance to antimicrobial agents, in farming communities in northern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 33 Suppl 3: 120-126.

Harel, J. and Forget, C. 1995. DNA probe and polymerase chain reaction procedure for the specific detection of *Serpulina hyodysenteriae*. Mol. Cell. Probes. 9(2): 111-119.

Harris, D.L., Glock, R.D., Chirstensen, C.R. and Kinyon, J.M. 1973. Swine Dysentery. Vet. Scope. 17: 2-7.

Harris, D.L., Glock, R.D., Christensen, C.R. and Kinyon, J.M. 1972a. Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction f the disease. Vet. Med. Small Anim. Clin. 67(1): 61-64.

Harris, D.L., Kinyon, J.M., Mullin, M.T. and Glock, R.D. 1972b. Isolation and propagation of spirochetes from the colon of swine dysentery affected pigs. Can. J. Comp. Med. 36(1): 74-76.

Heinonen, M., Fossi, M., Jalli, J.P., Saloniemi, H. and Tuovinen, V. 2000. Detectability and prevalence of *Brachyspira* species in herds rearing health class feeder pigs in Finland. Vet. Rec. 146(12): 343-347.

Herbst, W., Willems, H. and Baljer, G. 2004. Distribution of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* in healthy and diarrhoeic pigs. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 117(11-12): 493-498.

Hommez, J., Castryck, F., Haesebrouck, F. and Devriese, L.A. 1998. Identification of porcine *Serpulina* strains in routine diagnostic bacteriology. Vet. Microbiol. 62(2): 163-169.

Hovind-Hougen, K., Birch-Andersen, A., Henrik-Nielsen, R., Orholm, M., Pedersen, J.O., Teglbjaerg, P.S. and Thaysen, E.H. 1982. Intestinal spirochetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochete *Brachyspira aalborgi gen. nov., sp. nov*. J. Clin. Microbiol. 16(6): 1127-1136.

Hsu, T., Hutto, D.L., Minion, F.C., Zuerner, R.L. and Wannemuehler, M.J. 2001. Cloning of a beta-hemolysin gene of *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* and its expression in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 69(2): 706-711.

Hudson, M.J., Alexander, T.J. and Lysons, R.J. 1976. Diagnosis of swine dysentery: spirochaetes which may be confused with *Treponema hyodysenteriae*. Vet. Rec. 99(25-26): 498-500.

Humble, M.W., King, A. and Phillips, I. 1977. API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. J. Clin. Pathol. 30(3): 275-277.

Hunter, D. and Wood, T. 1979. An evaluation of the API ZYM system as a means of classifying spirochaetes associated with swine dysentery. Vet. Rec. 104(17): 383-384.

Jacobson, M., Fellström, C., Lindberg, R., Wallgren, P. and Jensen-Waern, M. 2004. Experimental swine dysentery: comparison between infection models. J. Med. Microbiol. 53(Pt 4): 273-280.

Jansson, D.S., Fellström, C. and Johansson, K.E. 2008. Intestinal spirochetes isolated from wild-living jackdaws, hooded crows and rooks (genus *Corvus*): provisionally designated "*Brachyspira corvi*" *sp. nov*. Anaerobe. 14(5): 287-295.

Jenkinson, S.R. and Wingar, C.R. 1981. Selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. Vet. Rec. 109(17): 384-385.

Jeong, S.H., Song, Y.K. and Cho, J.H. 2009. Risk assessment of ciprofloxacin, flavomycin, olaquindox and colistin sulfate based on microbiological impact on human gut biota. Regul. Toxicol. Pharmacol. 53(3): 209-216.

Joens, L.A. and Glock, R.D. 1979. Experimental infection in mice with *Treponema hyodysenteriae*. Infect. Immun. 25(2): 757-760.

Joens, L.A., Harris, D.L. and Baum, D.H. 1979. Immunity to Swine dysentery in recovered pigs. Am. J. Vet. Res. 40(10): 1352-1354.

Johnson, R.C. 1977. The spirochetes. Annu. Rev. Microbiol. 31: 89-106.

Karlsson, M., Gunnarsson, A. and Franklin, A. 2001. Susceptibility to pleuromutilins in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. Anim. Health Res. Rev. 2(1): 59-65.

Karlsson, M., Oxberry, S.L. and Hampson, D.J. 2002. Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method. Vet. Microbiol. 84(1-2): 123-133.

Kinyon, J.M. and Harris, D.L. 1979. *Treponema innocens*, a New Species of Intestinal Bacteria, and Emended Description of the Type Strain of *Treponema hyodysenteriae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 29(2): 102-109.

Kitai, K., Kashiwazaki, M., Adachi, Y., Kume, T. and Arakawa, A. 1979. In vitro activity of 39 antimicrobial agents against *Treponema hyodysenteriae*. Antimicrob. Agents Chemother. 15(3): 392-395.

Konig, H., Li, L., Wenzel, M. and Frohlich, J. 2006. Bacterial ectosymbionts which confer motility: *Mixotricha paradoxa* from the intestine of the Australian termite Mastotermes darwiniensis. Prog. Mol. Subcell. Biol. 41: 77-96.

Kunkle, R.A. and Kinyon, J.M. 1988. Improved selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. J. Clin. Microbiol. 26(11): 2357-2360.

La, T., Collins, A.M., Phillips, N.D., Oksa, A. and Hampson, D.J. 2006a. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. Lett. Appl. Microbiol. 42(3): 284-288.

La, T., Collins, A.M., Phillips, N.D., Oksa, A. and Hampson, D.J. 2006b. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis, Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. Lett Appl Microbiol. 42(3): 284-288.

La, T., Phillips, N.D. and Hampson, D.J. 2003. Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. J. Clin. Microbiol. 41(7): 3372-3375.

La, T., Phillips, N.D., Wanchanthuek, P., Bellgard, M.I., O'Hara, A.J. and Hampson, D.J. 2011. Evidence that the 36 kb plasmid of *Brachyspira hyodysenteriae* contributes to virulence. Vet. Microbiol. 153(1-2): 150-155.

Lee, B.J. and Hampson, D.J. 1995. A monoclonal antibody reacting with the cell envelope of spirochaetes isolated from cases of intestinal spirochaetosis in pigs and humans. FEMS Microbiol. Lett. 131(2): 179-184.

Lee, B.J. and Hampson, D.J. 1996. Production and characterisation of a monoclonal antibody to *Serpulina hyodysenteriae*. FEMS Microbiol. Lett. 136(2): 193-197.

Lee, J.I. and Hampson, D.J. 1992. Intestinal spirochaetes colonizing aborigines from communities in the remote north of Western Australia. Epidemiol. Infect. 109(1): 133-141.

Lee, J.I. and Hampson, D.J. 1994. Genetic characterisation of intestinal spirochaetes and their association with disease. J. Med. Microbiol. 40(5): 365-371.

Lee, J.I., Hampson, D.J., Combs, B.G. and Lymbery, A.J. 1993. Genetic relationships between isolates of *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae*, and comparison of methods for their subspecific differentiation. Vet. Microbiol. 34(1): 35-46.

Lemcke, R.M. and Burrows, M.R. 1981. A comparative study of spirochaetes from the porcine alimentary tract. J. Hyg (Lond). 86(2): 173-182.

Leser, T.D., Moller, K., Jensen, T.K. and Jorsal, S.E. 1997. Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. Mol. Cell. Probes. 11(5): 363-372.

Lymbery, A.J., Hampson, D.J., Hopkins, R.M., Combs, B. and Mhoma, J.R. 1990. Multilocus enzyme electrophoresis for identification and typing of *Treponema hyodysenteriae* and related spirochaetes. Vet. Microbiol. 22(1): 89-99.

Mahamoud, A., Chevalier, J., Davin-Regli, A., Barbe, J. and Pages, J.M. 2006. Quinoline derivatives as promising inhibitors of antibiotic efflux pump in multidrug resistant *Enterobacter aerogenes* isolates. Curr. Drug. Targets. 7(7): 843-847.

McLaren, A.J., Trott, D.J., Swayne, D.E., Oxberry, S.L. and Hampson, D.J. 1997. Genetic and phenotypic characterization of intestinal spirochetes colonizing chickens and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. J. Clin. Microbiol. 35(2): 412-417.

Miao, R. and Fieldsteel, A.H. 1978. Genetics of *Treponema*: relationship between *Treponema pallidum* and five cultivable treponemes. J. Bacteriol. 133(1): 101-107.

Miao, R.M., Fieldsteel, A.H. and Harris, D.L. 1978. Genetics of *Treponema*: characterization of T*reponema hyodysenteriae* and its relationship to *Treponema pallidum*. Infect. Immun. 22(3): 736-739.

Mikosza, A.S., Munshi, M.A. and Hampson, D.J. 2004. Analysis of genetic variation in *Brachyspira aalborgi* and related spirochaetes determined by partial sequencing of the 16S rRNA and NADH oxidase genes. J. Med. Microbiol. 53(4): 333-339.

Munshi, M.A., Taylor, N.M., Mikosza, A.S., Spencer, P.B. and Hampson, D.J. 2003. Detection by PCR and isolation assays of the anaerobic intestinal spirochete *Brachyspira aalborgi* from the feces of captive nonhuman primates. J. Clin. Microbiol. 41(3): 1187-1191.

Naresh, R., Song, Y. and Hampson, D.J. 2009. The intestinal spirochete *Brachyspira pilosicoli* attaches to cultured Caco-2 cells and induces pathological changes. PLoS One. 4(12): e8352.

Neef, N.A., Lysons, R.J., Trott, D.J., Hampson, D.J., Jones, P.W. and Morgan, J.H. 1994. Pathogenicity of porcine intestinal spirochetes in gnotobiotic pigs. Infect. Immun. 62(6): 2395-2403.

Noguchi, H. 1921. Cristispira in North American Shellfish. A Note on a Spirillum Found in Oysters. J. Exp. Med. 34(3): 295-315.

Ochiai, S., Adachi, Y. and Mori, K. 1997. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae Comb. Nov*., *Brachyspira innocens Comb. Nov*. and *Brachyspira pilosicoli Comb. Nov*. Microbiol. Immunol. 41(6): 445-452.

Padungtod, P. and Kaneene, J.B. 2006. *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. Int. J. Food Microbiol. 108(3): 346-354.

Park, N.Y., Chung, C.Y., McLaren, A.J., Atyeo, R.F. and Hampson, D.J. 1995. Polymerase chain reaction for identification of human and porcine spirochaetes recovered from cases of intestinal spirochaetosis. FEMS Microbiol. Lett. 125(2-3): 225-229.

Paul, N., Shum, J. and Le, T. 2010. Hot start PCR. Methods Mol. Biol. 630: 301-318.

Pettersson, B., Fellström, C., Andersson, A., Uhlen, M., Gunnarsson, A. and Johansson, K.E. 1996. The phylogeny of intestinal porcine spirochetes (*Serpulina* species) based on sequence analysis of the 16S rRNA gene. J. Bacteriol. 178(14): 4189-4199.

Pfaller, M.A. 2006. Flavophospholipol use in animals: positive implications for antimicrobial resistance based on its microbiologic properties. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 56(2): 115-121.

Phillips, N.D., La, T., Adams, P.J., Harland, B.L., Fenwick, S.G. and Hampson, D.J. 2009. Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs. Vet. Microbiol. 134(3-4): 294-299.

Phongpaichit, S., Liamthong, S., Mathew, A.G. and Chethanond, U. 2007. Prevalence of class 1 integrons in commensal Escherichia coli from pigs and pig farmers in Thailand. J. Food Prot. 70(2): 292-299.

Prapasarakul, N., Tummaruk, P., Niyomtum, W., Tripipat, T. and Serichantalergs, O. 2010. Virulence Genes and Antimicrobial Susceptibilities of Hemolytic and

Nonhemolytic *Escherichia coli* Isolated from Post-Weaning Piglets in Central Thailand. J. Vet. Med. Sci. 72(12): 1603-1608.

Pringle, M., Aarestrup, F.M., Bergsjø, B., Fossi, M., Jouy, E., Landén, A., Mevius, D., Perry, K., Teale, C., Thomson, J., Skrzypczak, T., Veldman, K. and Franklin, A. 2006a. Quality-control ranges for antimicrobial susceptibility testing by broth dilution of the *Brachyspira hyodysenteriae* type strain (ATCC 27164^{T}). Microb. Drug. Resist. 12(3): 219-221.

Pringle, M., Landen, A. and Franklin, A. 2006b. Tiamulin resistance in porcine *Brachyspira pilosicoli* isolates. Res. Vet. Sci. 80(1): 1-4.

Råsbäck, T., Fellström, C., Gunnarsson, A. and Aspan, A. 2006. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. J. Microbiol. Methods. 66(2): 347-353.

Råsbäck, T., Jansson, D.S., Johansson, K.E. and Fellström, C. 2007a. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' *sp. nov*. Environ. Microbiol. 9(4): 983-991.

Råsbäck, T., Jansson, D.S., Johansson, K.E. and Fellström, C. 2007b. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' *sp. nov*. Environ Microbiol. 9(4): 983-991.

Rohde, J., Kessler, M., Baums, C.G. and Amtsberg, G. 2004. Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany. Vet. Microbiol. 102(1-2): 25-32.

Songer, J.G., Glock, R.D., Schwartz, K.J. and Harris, D.L. 1978. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from sources other than swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 172(4): 464-466.

Songer, J.G., Kinyon, J.M. and Harris, D.L. 1976. Selective medium for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. J. Clin. Microbiol. 4(1): 57-60.

Stanton, T.B. 1989. Glucose metabolism and NADH recycling by *Treponema hyodysenteriae*, the agent of swine dysentery. Appl. Environ. Microbiol. 55(9): 2365-2371.

Stanton, T.B. 2006. The Genus *Brachyspira*. In: Prokaryotes. 3rd ed. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt (ed). Vol. 7. Singapore: Springer. 330-356.

Stanton, T.B., Fournié-Amazouz, E., Postic, D., Trott, D.J., Grimont, P.A., Baranton, G., Hampson, D.J. and Saint Girons, I. 1997. Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia sp. nov.* and *Serpulina murdochii sp. nov*. Int. J. Syst. Bacteriol. 47(4): 1007-1012.

Stanton, T.B., Jensen, N.S., Casey, T.A., Tordoff, L.A., Dewhirst, F.E. and Paster, B.J. 1991. Reclassification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* in a new genus, *Serpula gen. nov*., as *Serpula hyodysenteriae comb. nov*. and *Serpula innocens comb. nov*. Int. J. Syst. Bacteriol. 41(1): 50-58.

Stephens, C.P. and Hampson, D.J. 1999. Prevalence and disease association of intestinal spirochaetes in chicken in Eastern Australia. Avian Pathol. 28(5): 447-454.

Suh, D.K. and Song, J.C. 2005. Simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis, Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella spp.* in swine intestinal specimens by multiplex polymerase chain reaction. J. Vet. Sci. 6(3): 231-237.

Swayne, D.E., Bermudez, A.J., Sagartz, J.E., Eaton, K.A., Monfort, J.D., Stoutenburg, J.W. and Hayes, J.R. 1992. Association of cecal spirochetes with pasty vents and dirty eggshells in layers. Avian Dis. 36(3): 776-781.

Szynkiewicz, Z.M. and Binek, M. 1986. Evaluation of selective media for primary isolation of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 9(1): 71-77.

Tasu, C., Padungtod, P. and Yamsakul, P. 2008. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Brachyspira* spp. in Chiang Mai, Thailand Research from the Thai research fund supporting(MRG 4880098): 1-29.

Taylor, D.J. and Alexander, T.J. 1971. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. Br. Vet. J. 127(11): 58-61.

Taylor, D.J. and Blakemore, W.F. 1971. Spirochaetal invasion of the colonic epithelium in swine dysentery. Res. Vet. Sci. 12(2): 177-179.

Taylor, D.J., Simmons, J.R. and Laird, H.M. 1980. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. Vet. Rec. 106(15): 326-332.

Tenaya, I.W., Penhale, W.J. and Hampson, D.J. 1998. Preparation of diagnostic polyclonal and monoclonal antibodies against outer envelope proteins of *Serpulina pilosicoli*. J. Med. Microbiol. 47(4): 317-324.

Thomson, J.R., Smith, W.J., Murray, B.P., Murray, D., Dick, J.E. and Sumption, K.J. 2001. Porcine enteric spirochete infections in the UK: surveillance data and preliminary investigation of atypical isolates. Anim. Health Res. Rev. 2(1): 31-36.

Trott, D.J., Huxtable, C.R. and Hampson, D.J. 1996a. Experimental infection of newly weaned pigs with human and porcine strains of *Serpulina pilosicoli*. Infect. Immun. 64(11): 4648-4654.

Trott, D.J., McLaren, A.J. and Hampson, D.J. 1995. Pathogenicity of human and porcine intestinal spirochetes in one-day-old specific-pathogen-free chicks: an animal model of intestinal spirochetosis. Infect. Immun. 63(9): 3705-3710.

Trott, D.J., Stanton, T.B., Jensen, N.S. and Hampson, D.J. 1996b. Phenotypic characteristics of *Serpulina pilosicoli* the agent of intestinal spirochaetosis. FEMS Microbiol. Lett. 142(2-3): 209-214.

Tummaruk, P. and Prapasarakul, N. 2005. The prevalence and biochemical properties of *Brachyspira hyodysenteriae* in Thailand. Proceedings of the 2nd Asian Pig Veterinary Society Congress. Mandaluyong city. Philippines. 19-21September 2005. 216-217.

Van den Bogaard, A.E., Hazen, M., Hoyer, M., Oostenbach, P. and Stobberingh, E.E. 2002. Effects of flavophospholipol on resistance in fecal *Escherichia coli* and *Enterococci* of fattening pigs. Antimicrob. Agents Chemother. 46(1): 110-118.

Whipp, S.C., Robinson, I.M., Harris, D.L., Glock, R.D., Matthews, P.J. and Alexander, T.J. 1979. Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. Infect. Immun. 26(3): 1042-1047.

Whiting, R.A., Doyle, L.P. and Spray, R.S. 1921. Swine dysentery. Purdue Univ. Agric. Exp. Stn Bull. 257: 3-15.

Zuerner, R.L., Stanton, T.B., Minion, F.C., Li, C., Charon, N.W., Trott, D.J. and Hampson, D.J. 2004. Genetic variation in Brachyspira: chromosomal rearrangements and sequence drift distinguish *B. pilosicoli* from *B. hyodysenteriae*. Anaerobe. 10(4): 229-237.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 16 แสดงปริมาณเชื้อ*Brachyspira* (BFSCR,BSCR)และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ (BCSR, FCSR) ที่พบจากการเพาะแยกเชื้อตัวอย่างอุจจาระที่มีมูกเลือดปน

ลำดับ	หมายเลข	ลักษณะอุจจาระ	FCSR				CSR			
			จำนวนโคโลนีเชื้อ *Brachyspira*	log	จำนวนโคโลนีเชื้อ แบคทีเรียอื่นๆ	log	จำนวนโคโลนีเชื้อ *Brachyspira*	log	จำนวนโคโลนีเชื้อ แบคทีเรียอื่นๆ	log
1	P1	D	0	-	4100000	6.6	0	-	320000000	8.5
2	P2	D	0	-	3600000	6.6	0	-	120000000	8.1
3	P3	D	0	-	320000	5.5	0	-	330000000	8.5
4	P4	D	0	-	420000000	8.6	0	-	100000000	8.0
5	P5	D	0	-	560000000	8.7	0	-	200000000	8.3
6	P6	D	0	-	530000000	8.7	0	-	250000000	8.4
7	P7	D	110	2.0	120000000	8.1	0	-	400000000	8.6
8	P10	D	70000	4.8	14000000	7.1	2300	3.4	300000000	8.5
9	P11	D	0	-	1100000	6.0	0	-	100000000	8.0
10	P12	D	0	-	5100000	6.7	0	-	200000000	8.3
11	P15	D	0	-	7200000	6.9	0	-	320000000	8.5
12	P16	D	23000	4.4	2400000	6.4	0	-	120000000	8.1
13	P17	D	0	-	17000000	7.2	0	-	110000000	8.0
14	P18	D	0	-	6000000	6.8	0	-	530000000	8.7
15	P20	D	50000	4.7	320000	5.5	0	-	330000000	8.5
16	P22	D	0	-	3000000	6.5	0	-	220000000	8.3
17	P23	D	80000	4.9	42000000	7.6	0	-	100000000	8.0
18	P24	D	0	-	6100000	6.8	0	-	310000000	8.5
19	P25	D	0	-	1100000	6.0	0	-	100000000	8.0
20	P26	D	22000	4.3	56000000	7.7	0	-	200000000	8.3
21	P27	D	0	-	5400000	6.7	0	-	470000000	8.7
22	P28	D	0	-	3200000	6.5	0	-	610000000	8.8
23	P29	D	30000	4.5	12000000	7.1	0	-	4000000000	9.6

24	P30	D	0	-	5500000	6.7	0	-	510000000	8.7
25	P31	D	0	-	4100000	6.6	0	-	140000000	8.1
26	P33	D	0	-	5600000	6.7	0	-	470000000	8.7
27	P35	D	0	-	12000000	7.1	0	-	860000000	8.9
28	P36	D	0	-	5700000	6.8	0	-	670000000	8.8
29	P39	D	34000	4.5	17000000	7.2	1900	3.3	430000000	8.6
30	P40	D	60000	4.8	53000000	7.7	0	-	250000000	8.4
31	P41	D	0	-	1100000	6.0	0	-	100000000	8.0
32	P42	D	70000	4.8	5800000	6.8	4300	3.6	540000000	8.7
33	P43	D	0	-	1500000	6.2	0	-	200000000	8.3
34	P44	D	32000	4.5	5900000	6.8	0	-	150000000	8.2
35	P45	D	0	-	4300000	6.6	0	-	120000000	8.1
36	P46	D	0	-	6000000	6.8	0	-	240000000	8.4
37	P47	D	52000	4.7	2200000	6.3	4200	3.8	630000000	8.8
41	P49	D	410000	5.6	3100000	6.5	0	-	600000000	8.8
42	P51	D	0	-	1100000	6.0	0	-	100000000	8.0
43	P52	D	0	-	6300000	6.8	0	-	300000000	8.5
44	P53	D	0	-	6350000	6.8	0	-	190000000	8.3
45	P54	D	300000	5.5	4000000	6.6	24000	4.4	320000000	8.5
46	P55	D	0	-	4450000	6.6	0	-	240000000	8.4
47	P56	D	0	-	4900000	6.7	0	-	180000000	8.3
48	P57	D	0	-	5350000	6.7	0	-	100000000	8.0
38	P58	D	0	-	6100000	6.8	0	-	720000000	8.9
49	P60	D	0	-	5800000	6.8	0	-	400000000	8.6
50	P61	D	0	-	6250000	6.8	0	-	170000000	8.2
51	P62	D	20000	4.3	6700000	6.8	0	-	120000000	8.1
52	P63	D	0	-	7200000	6.9	0	-	550000000	8.7
53	P64	D	0	-	7600000	6.9	0	-	140000000	8.1

54	P65	D	40000	4.6	32000000	7.5	0	-	330000000	8.5
55	P66	D	0	-	8500000	6.9	0	-	250000000	8.4
39	P67	D	0	-	2200000	6.3	0	-	310000000	8.5
40	P68	D	0	-	6200000	6.8	0	-	170000000	8.2
56	P69	D	0	-	1700000	6.2	0	-	200000000	8.3
57	P70	D	0	-	9400000	7.0	0	-	150000000	8.2
58	P73	D	22000	4.3	1100000	6.0	1800	3.3	100000000	8.0
59	P76	D	0	-	32000000	7.5	0	-	170000000	8.2
60	P77	D	0	-	7100000	6.9	0	-	410000000	8.6
61	P78	D	0	-	2300000	6.4	0	-	240000000	8.4
62	P79	D	0	-	2700000	6.4	0	-	170000000	8.2
63	P82	D	0	-	2200000	6.3	0	-	380000000	8.6
64	P83	D	5000	3.7	12000000	7.1	0	-	170000000	8.2
65	P84	D	1000	3	60000000	7.8	0	-	170000000	8.2
66	P85	D	1000	3	5000000	6.7	0	-	250000000	8.4
67	P86	D	0	-	84000000	7.9	0	-	500000000	8.7
68	P87	D	0	-	10000000	7.0	0	-	600000000	8.8
69	P88	D	0	-	4300000	6.6	0	-	220000000	8.3
70	P89	D	0	-	8200000	6.9	0	-	120000000	8.1
	เฉลี่ย		66105.5		33082000	7.5	6417		344142857.1	8.5

D = สุกรท้องเสีย

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 17 แสดงปริมาณเชื้อ*Brachyspira* (BFSCR,BSCR)และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ (BCSR, FCSR) ที่พบจากการเพาะแยกเชื้อตัวอย่างอุจจาระสุกรปกติ

ลำดับ	หมายเลข	ลักษณะอุจจาระ	FCSR				CSR			
			จำนวนโคโลนีเชื้อ *Brachyspira*	log	จำนวนโคโลนีเชื้อ แบคทีเรียอื่นๆ	log	จำนวนโคโลนีเชื้อ *Brachyspira*	log	จำนวนโคโลนีเชื้อ แบคทีเรียอื่นๆ	log
1	P8	N	0	-	6500000	6.8	0	-	780000000	8.9
2	P9	N	0	-	4300000	6.6	0	-	110000000	8.0
3	P13	N	0	-	7200000	6.9	0	-	109000000	8.0
4	P14	N	0	-	5100000	6.7	0	-	121000000	8.1
5	P19	N	0	-	3700000	6.6	0	-	540000000	8.7
6	P21	N	0	-	110000	5.0	0	-	320000000	8.5
7	P32	N	0	-	2100000	6.3	0	-	340000000	8.5
8	P34	N	0	-	5100000	6.7	0	-	230000000	8.4
9	P37	N	0	-	45000000	7.7	0	-	1170000000	9.1
10	P38	N	0	-	2200000	6.3	0	-	920000000	9.0
11	P48	N	0	-	27000000	7.4	0	-	940000000	9.0
12	P50	N	0	-	5100000	6.7	0	-	320000000	8.5
13	P59	N	0	-	10200000	7.0	0	-	101000000	8.0
14	P71	N	0	-	570000	5.8	0	-	430000000	8.6
15	P72	N	0	-	5100000	6.7	0	-	710000000	8.9
16	P74	N	0	-	480000	5.7	0	-	510000000	8.7
17	P75	N	0	-	4700000	6.7	0	-	610000000	8.8
18	P80	N	0	-	870000	5.9	0	-	810000000	8.9
19	P81	N	0	-	12100000	7.1	0	-	670000000	8.8
20	P90	N	0	-	2500000	6.4	0	-	810000000	8.9
		เฉลี่ย			7496500	6.9			527550000	8.6

D = สุกรปกติ

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 18 แสดงผลการทดสอบการคัดกรองทางแบคทีเรียวิทยาพื้นฐานก่อนการเพาะเชื้อ และผลการทำ PCR ยืนยันสปีชี่ส์จากตัวอย่างอุจจาระโดยตรง

ลำดับ	หมายเลข	การพบ spiral shape bacteria จาก fresh smear	การพบ bacteria จากการย้อม Gram stain	ผลบวกจากการทำ multiplex PCR	
				BH	BP
1	P1	-	-	-	-
2	P2	-	-	-	-
3	P3	-	-	-	-
4	P4	-	+	-	-
5	P5	+	+	-	-
6	P6	-	-	-	-
7	P7	+	+	+	-
8	P8	-	-		-
9	P9	-	-		-
10	P10	+	+	+	-
11	P11	+	+	-	-
12	P12	-	-	+	-
13	P13	+	+		-
14	P14	-	-		-
15	P15	-	-	-	-
16	P16	+	+	+	-
17	P17	-	-	-	-
18	P18	-	-	-	-
19	P19	-	-	-	-
20	P20	+	+	+	-

21	P21	+	+		-
22	P22	-	-	-	-
23	P23	+	+	+	-
24	P24	-	-	-	-
25	P25	-	-	-	-
26	P26	+	+	+	-
27	P27	-	-	-	-
28	P28	+	+	-	-
29	P29	+	+	+	-
30	P30	-	-	-	-
31	P31	+	+	-	-
32	P32	+	+	-	-
33	P33	-	-	+	-
34	P34	-	-		-
35	P35	+	+	-	-
36	P36	-	-	-	-
37	P37	-	-	-	-
38	P38	-	-	-	-
39	P39	+	+	+	-
40	P40	+	+	+	-
41	P41	-	-	+	-
42	P42	+	+	+	-
43	P43	-	-	-	-
44	P44	+	+	+	-
45	P45	-	+	-	-

46	P46	-	+	+	-
47	P47	+	+	+	-
48	P48	+	+		-
49	P49	+	+	+	-
50	P50	+	+		-
51	P51	-	+	-	-
52	P52	-	-	-	-
53	P53	-	-	-	-
54	P54	+	+	+	-
55	P55	-	-	-	-
56	P56	-	-	+	-
57	P57	-	-	+	-
58	P58	-	-	-	-
59	P59	+	+	-	-
60	P60	-	-	+	-
61	P61	-	-	-	-
62	P62	+	+	+	-
63	P63	-	-	-	-
64	P64	-	-	-	-
65	P65	+	+	+	-
66	P66	-	-	-	-
67	P67	-	-	+	-
68	P68	-	-	-	-
69	P69	-	-	+	-
70	P70	-	-	-	-

71	P71	-	-	-	-
72	P72	+	+	-	-
73	P73	+	+	+	-
74	P74	-	-		-
75	P75	-	-		-
76	P76	+	+	-	-
77	P77	-	-	-	-
78	P78	-	-	-	-
79	P79	-	-	-	-
80	P80	+	+	-	-
81	P81	+	+	-	-
82	P82	-	-	-	-
83	P83	+	+	+	-
84	P84	+	+	+	-
85	P85	+	+	+	-
86	P86	-	+	-	-
87	P87	+	+	-	-
88	P88	-	-	-	-
89	P89	-	-	-	-
90	P90	+	+	-	-

ภาคผนวก ง

ตารางที่ 19 แสดงผลการทดสอบการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อลักษณะคล้าย *Brachyspira* และผลการทำ PCR เพื่อยืนยันสปีชี่ส์จากโคโลนีบริสุทธิ์

ลำดับ	หมายเลข	ผลการทดสอบ indole test	ผลการทดสอบ hippurate hydrolysis	การทำ PCR เพื่อยืนยันสปีชี่ส์ของเชื้อจากโคโลนีบริสุทธิ์	
				BH	BP
1	P7	+	-	+	-
2	P10	+	-	+	-
3	P16	+	-	+	-
4	P20	+	-	+	-
5	P20	+	-	+	-
6	P23	+	-	+	-
7	P26	+	-	+	-
8	P29	+	-	+	-
9	P39	+	-	+	-
10	P40	+	-	+	-
11	P42	+	-	+	-
12	P44	+	-	+	-
13	P47	+	-	+	-
14	P54	+	-	+	-
15	P62	+	-	+	-
16	P65	+	-	+	-
17	P73	+	-	+	-
18	P83	+	-	+	-
19	P84	+	-	+	-

20	P85	+		-		+	-

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายกิตติธัช ลักษณ์สมยา เกิดเมื่อวันที่ 7 กันายายน พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต ปีการศึกษา 2550 เข้าศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552 เป็นผู้วิจัยที่มีการศึกษาได้รับได้รับการตีพิมพ์ในหัวข้อการศึกษา เรื่อง *Salmonella* serovar distribution in cobras (*Naja kaouthia*), snake-food species, and farm workers at Queen Saovabha Snake Park, Thailand. ในวารสารเรื่อง Journal of Veterinary Diagnostic Investigation เล่มที่ 24 ฉบับที่ 2 ปี 2555 หน้าที่ 288-294 ,Development of a modified selective medium to enhance the recovery rate of B*rachyspira hyodysenteriae* and other porcine intestinal spirochaetes from faeces. ในวารสารเรื่อง Letters in Applied Microbiology เล่มที่ 54 ฉบับที่ 4 ปี 2555 หน้าที่ 330-335 และ Faecal excretion of intestinal spirochaetes by urban dogs, and their pathogenicity in a chick model of intestinal spirochaetosis ในวารสารเรื่อง Research in Veterinary Science เล่มที่ 91, ฉบับที่ 3 ปี 2554 หน้าที่ 38–43