บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรสมัยใหม่ ปัญหาหลักของสุกรที่พบเป็นประจำคือ การติดเชื้อโรคในระบบทางเดินหายใจ ซึ่งทวีปัญหามากขึ้นในหลายสิบปีที่ผ่านมา (Christensen and Mousing, 1992; Cowart, 1995; Ferkins, 1998) เชื้อที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคปอดบวมในสุกร ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bordetella bronchiseptica* (Straw et al., 1983; De Jong, 1992), *Pasteurella multocida* (Blood and Rodostitis, 1989), *Streptococcus spp.*(Sanford and Higgins, 1992), *Actinobacillus pleuropneumoniae* ,*Hemophilus parasuis* (Nicolet, 1992), *Actinomyces pyogenes* , ไวรัส (Muirhead and Hamberside, 1980) และเชื้อมัยโคพลาสมา (Ross, 1992)

เชื้อใน genus *Mycoplasma* มีอยู่ 3 ชนิดที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจและส่วนต่างๆ ของสุกร คือ *Mycoplasma hyorhinis (M. hyorhinis)* , *M. hyosynoviae* และ *M. hyopneumoniae* เชื้อ *M. hyorhinis* ปกติอาศัยอยู่ในช่องทางเดินหายใจของสุกร ทำให้เกิดภาวะปอดบวมได้โดยเฉพาะในสุกรเล็ก อายุประมาณ 3 - 10 สัปดาห์ แต่ส่วนใหญ่จะเป็นสาเหตุของข้ออักเสบ (arthritis) รวมทั้งการติดเชื้อของเยื่อเลื่อม (polyserositis) ของอวัยวะในช่องอกและช่องท้อง (Friis, 1974) โดยที่เชื้อนี้สามารถเข้าสู่กระแสโลหิตได้ในยามที่สุกรอ่อนแอจากการติดเชื้อหรือมีความเครียด ทำให้เชื้อเข้าไปอยู่ที่ข้อและเยื่อเลื่อมได้ (serous membrane) *M. hyorhinis* เป็นเชื้อที่เพาะขึ้นง่ายทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและวุ้น มีขนาดโคโลนีประมาณ 0.5 - 1 มม. ลักษณะโคโลนีเป็นรูปไข่ดาว (fried egg colony) ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของเชื้อมัยโคพลาสมา

M. hyosynoviae อาศัยอยู่ในช่องทางเดินหายใจและฟาริงซ์ของสุกร เป็นสาเหตุของข้ออักเสบในสุกรอายุประมาณ 12 - 24 สัปดาห์ เชื้อนี้เพาะขึ้นง่ายและลักษณะโคโลนีเป็น

รูปไข่ดาวเช่นกัน แต่ที่แตกต่างจาก *M . hyorhinis* คือ *M. hyosynoviae* สามารถสลายอาร์จีนีนในอาหาร และเกิดลักษณะ film และ spot บนวุ้นอาหาร

เชื้อมัยโคพลาสมาชนิดที่สำคัญที่สุดในสุกร และมีอุบัติการการติดเชื้อมากที่สุด คือ *M. hyopneumoniae* เชื้อนี้เพาะขึ้นยาก ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงให้มีความเหมาะสมต่อเชื้อเป็นอย่างมาก การเจริญเติบโตใช้เวลานาน บางสายพันธุ์ต้องใช้เวลาในการผ่านเชื้อหลายครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เชื้อจึงจะขึ้นบนวุ้นอาหารได้ และบางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญบนวุ้นอาหารได้ (Whittlestone,1979) ลักษณะโคโลนีของ *M. hyopneumoniae* ไม่เป็นรูปไข่ดาว ซึ่งแตกต่างจากเชื้อมัยโคพลาสมาทั่วไป

เชื้อ *M .hyopneumoniae* เป็นสาเหตุของโรค Mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) ซึ่งเป็นโรคในระบบทางเดินหายใจของสุกรที่เป็นปัญหากับการเลี้ยงสุกรทั่วโลก สุกรที่เกิดโรคจะมีอัตราการตายค่อนข้างต่ำ แต่มีอัตราการป่วยสูง สุกรแสดงอาการไอแห้งๆ ปอดบวมเรื้อรัง อันเป็นสาเหตุนำให้ติดเชื้อแทรกซ้อนอื่นๆ และตายได้ จากการศึกษาของ Caruso และ Ross (1990) พบว่า สัตว์ที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* มาก่อน จะทำให้แมคโครฟาจมีคุณสมบัติในการเก็บกินเชื้อทุติยภูมิได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าเชื้อนี้สามารถเป็นสาเหตุนำของการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสุกรป่วยอาจจะแคระแกร็น หรือมีอัตราการเจริญเติบโตและการแลกเนื้อลดลงโดยที่สุกรยังคงกินอาหารได้ปกติ ดังนั้นฟาร์มสุกรที่มีปัญหาโรคนี้ระบาด นอกจากสุกรจะติดเชื้อเกือบทั้งฟาร์มแล้ว จะต้องเลี้ยงสุกรนานกว่าปกติจึงจะสามารถขายสู่ตลาดได้ ผู้เลี้ยงสุกรต้องใช้ต้นทุนสูงขึ้น ฟาร์มใดที่เคยเกิดโรคขึ้นแล้วก็จะเป็นแหล่งสะสมโรคทำให้เกิดปัญหากับสุกรอยู่เสมอทุกๆ ปี เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

Hill และคณะ (1992) พบว่าฟาร์มสุกรที่มีการติดโรค MPS สุกรมีค่าเฉลี่ยการเพิ่มน้ำหนักตัวต่อวันลดลง 41.1 กรัม ซึ่งทำให้ต้องเลี้ยงเพิ่มอีก 16.7 วันจึงจะได้น้ำหนักส่งโรงฆ่า เช่นเดียวกับที่ Parker รายงานในปี 1989 พบว่าสุกรติดเชื้อที่ไม่ได้รับการรักษาต้องใช้เวลาเลี้ยงเพิ่มขึ้นอีกถึง 13 วัน จึงจะได้น้ำหนัก ซึ่งคิดเป็นค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นถึง 7.02 เหรียญสหรัฐต่อตัวสุกร (Ross, 1990 b) ในสหราชอาณาจักร ในปี1976 (Muirhead and Hamberside, 1980) พบว่าค่าเลี้ยงดูสุกรที่ต้องใช้จ่ายเพิ่มขึ้นในฟาร์มที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จะสูงกว่าฟาร์มที่

ปลอดโรค จาก 0.14 เป็น 0.6 - 7.4 เหรียญสหรัฐต่อตัว ขึ้นกับสถานการณ์การเกิดโรคในฟาร์ม Pointon และคณะ (1985) ทดลองเลี้ยงสุกรปกติร่วมกับสุกรที่ติดเชื้อ พบว่าสุกรจะติดเชื้อในที่สุด และมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง ร้อยละ 12.7 การเพิ่มน้ำหนักตัวต่อวันลดลง ซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น 2.8 เหรียญต่อตัว ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการประเมินความสูญเสียจากโรคนี้ปีหนึ่งๆ เป็นเงินถึง 200 - 320 ล้านเหรียญสหรัฐ (Armstrong, 1994) นอกจากนี้ในด้านการรักษาซึ่งต้องใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องและยาวนาน อาจจะทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อคุณภาพเนื้อสุกร ในอนาคตการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยซึ่งมีศักยภาพที่จะเป็นศูนย์กลางการผลิตสุกรเพื่อการส่งออก จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องผลิตเนื้อสุกรให้มีคุณภาพตามมาตรฐานสากลเพื่อการขายสู่ต่างประเทศ ดังนั้นคุณภาพซากที่ไม่ได้มาตรฐาน เช่น ซากที่แสดงการติดเชื้อ ซากที่ไม่สมบูรณ์ มียาปฏิชีวนะและสารตกค้าง จะไม่เป็นที่ยอมรับและไม่สามารถจำหน่ายได้ในต่างประเทศ จึงเป็นปัญหาอย่างยิ่งในการผลิตสุกรเพื่อการส่งออก

นอกจากจะมีรายงานการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ไปทั่วโลกแล้ว ในประเทศไทยก็มีการรายงานอุบัติการของปอดอักเสบ MPS โดยดูรอยโรคด้วยตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยาในระหว่างปี พ.ศ. 2528 พบว่า จากปอด 2562 ตัวอย่าง มีรอยโรคของ MPS 1550 ตัวอย่าง คิดเป็น 60% (เทอด และคณะ, 2529) แต่จากการศึกษาของ Armstrong และคณะ (1984) พบว่าจำนวนสุกรที่มีรอยโรคทั้งตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา (gross and histopathological lesion) ให้ผลบวกต่อการเพาะเชื้อและ / หรือ indirect immunofluorescense (IIF) เพียงร้อยละ 68 ในขณะที่สุกรที่ไม่พบรอยโรคตาเปล่าและ/ หรือจุลพยาธิวิทยา ยังให้ผลบวกต่อการเพาะเชื้อและ / หรือ IIF ถึงร้อยละ 19 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการดูรอยโรคเพียงอย่างเดียวไม่สามารถวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ได้อย่างแม่นยำ เกรียงศักดิ์และคณะ (2531) ได้รายงานอุบัติการของ MPS จากการสำรวจในปี พ.ศ. 2530 โดยการเพาะเชื้อจากปอดสุกรทั้งสิ้น 119 ตัวอย่าง แบ่งเป็นปอดกลุ่มที่ 1 คือ ปอดที่มีรอยโรคที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ จำนวน 53 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากปอดทั้ง 53 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 คือปอดที่ได้จากการผ่าซากชันสูตรรายวัน จำนวน 19 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *M. hyopneumoniae* 9 ตัวอย่าง และกลุ่มสุดท้ายได้แก่ ปอดที่ได้จากฟาร์มสุกรที่มีอาการของโรคระบบทางเดินหายใจ จำนวน 47 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ 14 ตัวอย่าง นับเป็นครั้งแรกที่มีรายงานการเพาะเชื้อชนิดนี้ได้ในประเทศไทย เป็นการยืนยันว่าเชื้อ *M. hyopneumoniae* มีการระบาดอยู่แล้วในประเทศไทย

อย่างไรก็ตามการสำรวจโรคนี้ในประเทศไทยไม่ได้กระทำอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่มีการตรวจพบเชื้อนี้ ทำให้ไม่ทราบสถานการณ์ของโรคในปัจจุบัน ปัจจัยที่ทำให้มีการศึกษาโรคนี้ในประเทศน้อยน่าจะเป็นเพราะเชื้อ *M. hyopneumoniae* เป็นเชื้อที่เพาะยาก และต้องใช้เวลานานในการทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ การวินิจฉัยโรคส่วนใหญ่จึงดูรอยโรคของปอดด้วยตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่แม่นยำนัก

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาสาเหตุของโรคต่างๆ ซึ่งมีประโยชน์มากโดยเฉพาะในการตรวจหาเชื้อโรคที่เพาะเลี้ยงยากและใช้เวลานานในการชันสูตร *M. hyopneumoniae* เป็นเชื้อที่มีปัญหาดังกล่าว จึงได้มีนักวิจัยหลายท่านพัฒนาการใช้เทคนิคพีซีอาร์นี้โดยการออกแบบ primers ที่มีความจำเพาะในการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ จากการใช้ *M. hyopneumoniae* สายพันธุ์อ้างอิงเป็นต้นแบบ Mattsson และคณะ (1995) ได้ออกแบบ primers จาก 16S rRNA gene ของเชื้อที่ให้ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ (PCR product) ขนาด 649 bp. ซึ่งได้ทดสอบแล้วว่ามีความจำเพาะกับเชื้อ *M. hyopneumoniae* โดยเมื่อทำการตรวจหาดีเอ็นเอจากปอดสุกรที่ฉีดเชื้อนี้แล้วให้ผลบวกทุกตัวอย่าง และให้ผลลบกับเชื้อแบคทีเรียและมัยโคพลาสมาชนิดอื่น Kobayashi และคณะ (1996) พัฒนาน้ำยาซึ่งประกอบด้วย proteinase K และ CHAPS (3-[(3 cholamidopropyl) dimethylammonio] -1-propanesulfonate) เพื่อใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างปอดที่จะตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายโดยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งใช้ได้ผลดีเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาที่มีคุณสมบัติคล้ายกันหลายชนิด นอกจากนี้น้ำยาชนิดนี้ยังเตรียมง่ายและราคาถูก

เพื่อที่จะสำรวจอุบัติการของการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ในสุกรที่เลี้ยงขุนทั่วประเทศ อันจะทำให้ทราบสถานการณ์การเกิดโรค MPS ในปัจจุบัน ผู้วิจัยจึงได้ทำการเก็บตัวอย่างปอดสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ในท้องที่ที่ครอบคลุมพื้นที่เลี้ยงสุกรส่วนใหญ่ของประเทศ นำมาเพาะหาเชื้อ *M. hyopneumoniae* และพิสูจน์ชนิดของเชื้อตามวิธีมาตรฐาน ร่วมกับการตรวจรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา และการใช้เทคนิคพีซีอาร์ตามวิธีของ Mattsson และคณะ (1995) โดยใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างตามวิธีของ Kobayashi และคณะ (1996) เป็นเครื่องมือร่วมกันทั้ง 3 วิธีเพื่อให้ผลการตรวจการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* มีความถูกต้อง,แม่นยำและรวดเร็วยิ่งขึ้น

พระมหาวิทยาลัย สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

สำรวจหาอัตราการติดเชื้อ *Mycoplasma hyopneumoniae* จากสุกรขุนที่เลี้ยงในประเทศไทยโดยวิธีการเพาะเชื้อ และพีซีอาร์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างปอดสุกรที่เข้าโรงฆ่าสัตว์ จากฟาร์ม 12 ฟาร์ม จำนวนทั้งสิ้น 200 ตัวอย่าง โดยเก็บครั้งละ 10-20 ตัวอย่างจนครบจำนวน ทำการเพาะแยกเชื้อ *M. hyopneumoniae* และใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อหาดีเอ็นเอของเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากปอดทุกตัวอย่าง

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1. กำหนดวิธีการคัดเลือกตัวอย่างในการวิจัย
2. เก็บตัวอย่างปอด
3. เพาะแยกเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากตัวอย่าง ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และพิสูจน์เชื้อ
4. ตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *M. hyopneumoniae* โดยการใช้เทคนิคพีซีอาร์
5. รวบรวมและวิเคราะห์ผล
6. สรุปผลและเขียนรายงานวิทยานิพนธ์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. นำวิธีการตรวจหาเชื้อ *M. hyopneumoniae* โดยวิธีพีซีอาร์มาใช้เพื่อให้การชันสูตรได้ผลดี ถูกต้อง รวดเร็ว และเป็นที่ยอมรับได้

2. เพิ่มประสิทธิภาพและความสามารถในการเพาะเชื้อ *M. hyopneumoniae* ในการพิสูจน์และวินิจฉัยโรค MPS ในประเทศไทย

3. ทราบสถานการณ์การเกิดโรค MPS เพื่อเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวัง และติดตามแก้ไขปัญหาการกระจายโรคนี้ในประเทศไทย