ทุนอุดหนุนโครงการวิจัยเงินทุนคณะประจำปี พ.ศ. 2548

เรื่อง

ผลของยาต้านจุลชีพต่อการเจริญของเชื้อบิดมูกเลือดที่แยกจากสุกรในประเทศไทย

In vitro activities of antimicrobial agents against *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from pigs in Thailand.

โดย

เผด็จ ธรรมรักษ์

ณุวีร์ ประภัสระกูล

วารี นิยมธรรม

ธิติมา ไตรพิพัฒน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตุลาคม 2548

ชื่อโครงการ : ผลของยาต้านจุลชีพต่อการเจริญของเชื้อบิดมูกเลือดที่แยกจากสุกรในประเทศไทย

ชื่อผู้วิจัย : เผด็จ ธรรมรักษ์ ณุวีร์ ประภัสระกูล วารี นิยมธรรม และ ธิติมา ไตรพิพัฒน์

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความชุกของเชื้อ *Brachyspira spp.* จากสุกรที่แสดงอาการท้องเสียปนเลือดหรือสุกรจากฟาร์มที่เคยมีประวัติของการถ่ายอุจจาระปนเลือดและศึกษาผลของยาต้านจุลชีพ 6 ชนิดต่อการเจริญของเชื้อบิดมูกเลือดที่แยกได้ ตัวอย่างที่ทำการศึกษาได้จากการเก็บ อุจจาระ หรือจากเยื่อบุผนังลำไส้สุกร ตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บได้มีจำนวน 126 ตัวอย่าง ได้จากสุกรที่มีอาการถ่ายเหลวปนเมือกและ/หรือปนเลือดจำนวน 74 ตัวอย่าง กับสุกรที่ถ่ายปกติจำนวน 52 ตัวอย่าง การทดลองพบว่าสามารถแยกเชื้อ *Brachyspira hyodysenteriae* ได้จำนวน 14 ตัวอย่าง จากสุกรที่มีปัญหาท้องเสีย จำนวน 74 ตัว ตัวอย่างที่ได้จากสุกรที่ถ่ายปกติ 52 ตัวอย่างผลการตรวจไม่พบเชื้อ *Brachyspira spp.* แม้จะมีเคยมีประวัติการเกิดโรคนี้ในฟาร์ม ความชุกของการพบเชื้อคิดเป็นร้อยละ 19.8% (14/74) ของประชากรสุกรที่มีอาการถ่ายเหลว มีฟาร์มที่พบเชื้อ *Brachyspira hyodysenteriae* จำนวน 9 ฟาร์มจาก 19 ฟาร์มคิดเป็นร้อยละ 47.3 สุกรที่ตรวจพบเชื้อส่วนใหญ่เป็นสุกรขุนอายุ 20-24 สัปดาห์ จากการศึกษาค่า MIC ของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิดพบว่า valnemulin มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสไปโรคีทที่ทำการศึกษาโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-4 μg/ml ในขณะที่ tylosin มีค่าให้ MIC สูงที่สุด และสูงกว่า actylisovaleryltylosin ซึ่งเป็นกลุ่มยาเดียวกัน เชื้อทุกตัวมีค่า MIC ในระดับที่สูงต่อ lincomycin ส่วน doxycycline ให้ค่า MIC ที่ 4 และ 8 μg/ml จากการทดลองพบแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยาที่นำมาศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title: *In vitro* activities of antimicrobial agents against *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from pigs in Thailand.

Name of the investigators : Padet Tummarak, Nuvee Prapasarakul, Waree Niyomtom, and Titima Tripipat

Abstract

The objective of the present study is to investigate the prevalence of *Brachyspira spp* in bloody diarrhea pig. The fecal sample and intestinal mucosa were obtained from the pigs with clinical symptoms of bloody diarrhea and from pig in the herd with a history of bloody diarrhea. A total number of 126 samples, 74 bloody diarrhea/mucus diarrhea and 52 normal feces, were submitted for bacterial culture and identification. Fourteen isolations were obtained from 74 fecal samples of diarrhea pig. *Brachyspira hyodysenteriae* could not be isolated from the pigs with normal feces (n=52), although the herds have a history of bloody diarrhea. The prevalence was 19.8% (14/74) among the pig with diarrhea. *Brachyspira hyodysenteriae* was found in 9 out of 19 herds in this study representing 47.3% of prevalence among the herd. Most of the pig that found the spirochete was between 20-24 wk of age and one sample were isolated from a sow. The MICs of 6 antimicrobials were carried out by agar dilution technique. Valnemulin had the lowest MIC values (ranged 0.5-4 μg/ml) when compared with others. Tylosin yielded the least sensitivity to the organisms. All isolates had somewhat high MIC values when tested with lincomycin. As expected, actylisovaleryltylosin the second generation of tylosin, yielded lower MIC than that of TS. The doxycycline MICs showed a biphasic distribution, with an intermediate level of susceptibility. Our results suggest the trend of increasing multiple drug resistances.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

เชื้อสไปโรคีทในระบบทางเดินอาหารอยู่ในจีนัส *Brachyspira* เป็นเชื้อไม่อาศัยออกซิเจนในการเจริญเติบโต (anaerobic bacteria) สามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงแบบอ่อนถึงแบบรุนแรง (β-hemolysis) (Songer *et al.,* 1978) การศึกษาโรคที่เกิดจากเชื้อสไปโรคีทส่วนใหญ่มุ่งความสำคัญในการก่อโรคในสุกร โรคที่สำคัญได้แก่โรคบิดมูกเลือด (swine dysentery) และบิดสไปโรคีท (porcine colonic intestinal spirtochetosis) ที่มีสาเหตุจาก *Brachyspira* (*B.*) *hyodysenteriae* (Tayler and Alexander, 1971) และ *B. pilosicoli* (Trott *et al.,* 1997) ตามลำดับ ในปัจจุบันมีการศึกษาอาการท้องร่วงที่เกิดจาก *B. pilosicoli* (Intestial Spirochetosis, IS) และพบว่าสามารถก่อโรคในสัตว์ต่างๆได้หลายชนิดเช่น สุนัข,หนู, สัตว์ปีก รวมทั้งคนด้วย (Prapasarakul *et al.,* 2002, Trott *et al.,* 1996, 1997และ Stanton *et al.,* 1998) ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าเป็นหนึ่งในโรคสัตว์ติดคน (Koopman *et al.,* 1993, De Smet *et al.,* 1998 and Trott *et al.,* 1997) อย่างไรก็ตามการศึกษาแยกเชื้อและวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียที่ไม่อาศัยออกซิเจนจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคพิเศษและความชำนาญการเฉพาะทาง จึงยังไม่มีการศึกษากันมากนักในประเทศไทยอย่างจริงจัง ในอดีตการวินิจฉัยชนิดของเชื้ออาศัยลักษณะของโคโลนี คุณสมบัติการแตกของเม็ดเลือดแดง และปฏิกิริยาทางชีวเคมีเช่น indole test และ hippulate hydrolysis test (Fellström and Gunnarsson, 1995) แต่ในปัจจุบันพบว่ามีผลลบปลอม (false negative) เกิดขึ้นในบางพื้นที่ (Fellström *et al.,* 1999) ทำให้นักแบคทีเรียวิทยาพัฒนาวิธีการวินิจฉัยด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลเช่น polymerase chain reaction แต่วิธีนี้แม้ว่าจะรวดเร็วแต่ยังให้ผลความแม่นยำไม่ถึง 100% พบว่ายิ่งมีการค้นพบเชื้อสไปโรคีทชนิดใหม่ๆ ขึ้นมาทำให้พบผลบวกปลอมมากขึ้น (false positive) (Atyeo, *et al*., 1999, Park, *et al*., 1995 และ Leser, *et al*., 1997) นอกจากปัญหาในห้องปฏิบัติการของการแยกเชื้อและการวินิจฉัยแล้ว ปัญหาในพื้นที่ที่เลี้ยงสุกรในประเทศไทยที่สำคัญคือความสูญเสียจำนวนมหาศาลจากการใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อควบคุมโรคบิดมูลเลือดซึ่งแยกได้เป็น

1. ความสูญเสียจากการเลือกยาต้านจุลชีพที่ไม่เหมาะสมมาใช้ในฟาร์มสุกรแต่ไม่สามารถลดปัญหาได้
2. ความสูญเสียจากการกลับมาของอาการบิดมูกเลือดอีกภายหลังจากหยุดการรักษา โดยเฉพาะในสุกรพ่อแม่พันธุ์และเกิดขึ้นไม่ต่ำกว่า 3 ครั้งต่อปี
3. ความสูญเสียจากการที่พ่อแม่พันธุ์ และสุกรขุน ตายภายหลังจากแสดงอาการเพียงไม่นาน
4. การเกิดภาวะดื้อยาบางชนิดของเชื้อภายหลังจากการเลือกใช้ชนิดของยา ความเข้มข้นและระยะเวลาการให้ยาที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะยาต้านจุลชีพที่ผสมลงในอาหารเพื่อเร่งการเจริญเติบโต

การสำรวจสาเหตุของโรคท้องร่วงในสุกรที่ประเทศอังกฤษพบว่า มีสาเหตุหลักมาจาก *B. hyodysenteriae* ซึ่งมีสาเหตุรองลงมาจาก *B. pilosicoli, Lawsonia spp., Salmonella spp.* และ *Yersinia spp.* ตามลำดับ (Thomson *et al.,* 2001) ในทางปฏิบัติการใช้ยาในฟาร์ม สัตวแพทย์ในพื้นที่, สัตวบาลหรือเจ้าของฟาร์มจะเป็นผู้พิจารณาเลือกโดยอาศัยสมมติฐานจากอาการสุกรป่วยที่แสดงออก เอกสารอ้างอิงจากต่างประเทศ และโฆษณาอ้างอิงจากบริษัทยา ทำให้บ่อยครั้งที่ไม่สามารถควบคุม และกำจัดโรคไปได้หมด และพบว่าโรคนั้นกลับมาปรากฏอีกเป็นช่วงๆ ซึ่งก่อความสูญเสียในมูลค่าของยาและสุขภาพสุกรจำนวนมหาศาล การศึกษาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) เป็นการหาปริมาณต่ำสุดของยาที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จากข้อมูลทั่วโลกพบว่าเชื้อ *B.*

hyodysenteriae ที่แยกได้ต่างพื้นที่และต่างเวลามีการตองสนองต่อชนิดของยาต่างกันและในปริมาณที่ไม่เท่ากัน (Galvin *et al.,* 1997) ดังนั้นการเลือกเก็บตัวอย่างในบริเวณที่มีการระบาดอย่างต่อเนื่องและการทดสอบหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของยาในการควบคุมโรคในพื้นที่นั้น จึงมีความจำเป็นต่อการควบคุมโรค การหาค่า MIC มีหลายวิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นเช่น agar dilution technique, broth dilution technique และการหาค่าการตอบสนองของเชื้อหนึ่งต่อยาอย่างคร่าวๆคือ disc diffusion assay (NCCLS, 2000) สำหรับเชื้อสไปโรคีทที่ไม่อาศัยออกซิเจน วิธีที่น่าเชื่อถือและได้รับการยอมรับสำหรับนักจุลชีววิทยาทั่วโลกคือ agar dilution technique (Kitai *et al.,* 1979, and Kitai *et al.,* 1987) ทำโดยเจือจางยาต้านจุลชีพที่ความเข้มข้นต่างๆผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อและอ่านผลจะได้ค่า MIC ของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อที่ทดสอบ นอกจากนี้ที่ประเทศสวีเดนยังมีการประยุกต์วิธี broth dilution มาใช้หาค่า MIC โดยพิจารณาจากความขุ่นใสของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว แม้ว่าจะได้ค่าที่ใกล้เคียงแต่ผลจากการใช้สารอินทรีบางชนิดเพื่อเร่งการเจริญของเชื้อจะมีผลต่อการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพหรือไม่ยังไม่มีใครตอบได้ อีกทั้งการอ่านค่า MIC อาจมีความผิดพลาดเนื่องจากการปนเปื่อนของเชื้อแบคทีเรียอื่น (Karlsson *et al.,* 2002)

ในปัจจุบันมีความพยายามเพื่อพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจาก *B. hydysenteriae* ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร (Olsen *et al.,* 1994) ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรจึงพิจารณาการใช้สารต้านจุลชีพเพื่อการรักษาทันทีหลังจากที่สุกรแสดงอาการ และมีการใช้สารเร่งการเจริญเติบโต (feed additive) ที่ผสมยาต้านจุลชีพในระดับต่ำๆ ผสมลงในอาหารเพื่อควบคุมโรคซึ่งใช้กับทั้งสุกรขุนและสุกรพ่อแม่พันธุ์ ยาต้านจุลชีพที่นิยมผสมในสารเร่งการเจริญเติบโตได้แก่ยาในกลุ่ม macrolides เช่น tylosin, erythromycin ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย จากการศึกษาพบว่าภายหลังจากการให้ยาในระดับต่ำๆติดต่อกันเป็นเวลานาน มีแนวโน้มให้เชื้อ *Brachyspira spp.* เกิดภาวะดื้อยาเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงบนยีน (gene mutation) ที่เป็นจุดเกาะของยา (target site) ที่บริเวณ domain 5 ของ 23s rRNA ของเชื้อ (Karlsson *et al.,* 1999 and Prapasarakul *et al.,* 2003) นอกจากนั้นการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณนี้ แต่การศึกษาผลของการใช้ยาต้านจุลชีพในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเพื่อประโยชน์ในการรักษาหรือเร่งการเจริญเติบโตนั้นได้มีการศึกษากันมาในช่วงปี 2000 ด้วยการใช้เชื้อ *B. hyodysenteriae* จำนวน 7 เชื้อ และพบภาวะดื้อยาต่อ tylosin ทุกเชื้อ ในขณะที่ยาในกลุ่ม pleuromutilin ยังคงมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคบิดมูกเลือดได้อยู่ ในขณะที่ค่า MIC ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* ต่อยาดังกล่าวที่ออสเตเรีย ยุโรปและอเมริกายังต่ำกว่ามากเมื่อเทียบกับค่า MIC ของเชื้อที่พบในเมืองไทย (Buller *et al.,* 1994, Duhamel et al., 1998, Fellstrom et al., 1996, และ Ronne et al., 1990) อย่างไรก็ตามการแยกเชื้อให้ได้มากและได้จากหลายๆแหล่งในประเทศไทยจะเป็นข้อมูลที่ช่วยประเมินประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อ และยังเป็นประโยชน์ในการประเมินสถานการณ์การเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาและการใช้ยาที่มากเกินความจำเป็นในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศได้

โครงการวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจแยกและวินิจฉัยเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคบิดมูกเลือดจากสุกรและเพื่อศึกษาหาชนิดและปริมาณยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมในการควบคุมโรคบิดมูกเลือด

วัสดุและวิธีการ

1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากสุกรพ่อและแม่พันธุ์ในฝูงขนาด 1,000 แม่ขึ้นไปจำนวน 5 ฟาร์มในประเทศไทย ฟาร์มที่ใช้มีการจดบันทึกข้อมูลอย่างมีมาตรฐาน และเป็นฟาร์มที่มีประวัติการเกิดโรคบิดมูกเลือดติดต่อเป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 6 เดือน ทำการศึกษาประวัติการให้ยาผสมอาหารและยารักษาโรค เก็บอุจจาระสุกรที่แสดงอาการอย่างชัดเจนได้แก่ ถ่ายเหลว มีสีแดงถึงสีดำ กลิ่นคาว สุกรมีอาการซึม เตะท้อง เก็บอุจจาระโดยตรงจากลำไส้ใหญ่ ใส่ในภาชนะที่ปลอดเชื้อและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และทำการเพาะเชื้อภายใน 48 ชั่วโมง

2 การตรวจสอบเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบตัดแสง (phase contrast microscopy)

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาตรวจสอบหากลุ่มแบคทีเรียรูปร่างยาวและขดเป็นเกลียว (serpenline-like microorganism) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบตัดแสงและบันทึกผลเพื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการแยกเชื้อ

3 การเพาะเชื้อสไปโรคีท

นำตัวอย่างมาชั่งและเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว trypticase soy broth (TSB) และนำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (trypticase soy agar) ที่ผสมด้วยเลือด 5% และยาปฏิชีวนะชนิด spectinomycin ที่ความเข้มข้นที่ 400 μg/ml ภายใต้สภาพไร้ออกซิเจน เพาะเลี้ยงที่ 37 °C เป็นเวลา 3-14 วัน (Songer *et al.,* 1976)

4 การตรวจเชื้อเพื่อยืนยันผล

3.4.1 นำเชื้อที่สงสัยมาตรวจยืนยันผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบตัดแสง

3.4.2 ทำการตรวจแยกเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติการสร้างเอมไซน์ hemolysin บนอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน (trypticase soy agar) ผสมเลือด 10% โดยเปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิง

B. hyodysenteriae ATCC 27164

B. hyodysenteriae ATCC 31212

B. pilosicoli ATCC 51139

B. innocens ATCC 29796

Canine intestinal spirochetes D6b/6/15 (Japanese strain)

4 การพิสูจน์เชื้อด้วยปฏิกิริยาชีวเคมี

นำเชื้อที่เพาะในข้อ 3 มาทดสอบด้วยวิธี Sliced agar media, Indole test, hypulate hydrolysis และ hemolysin บน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดแกะ 10% (FellstrÖm et al., 1995, FellstrÖm., 1997 และ Olson, 1996)

5 วิธีหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

5.1 การเตรียมเชื้อเพื่อทำการทดสอบ

ทำการเพาะเชื้อตามข้อ 3 หลังจากเพาะบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์โดยการล้างผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย trypticase soy broth ปรับความเข้มข้นของเชื้อสไปโรคีทโดยปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ MacFarland No. 1 และเจือจางลง 10 เท่าจะได้ค่า CFU/ml ประมาณ 10^7-10^8 (Kitai *et al.,* 1979, 1988)

5.2 การเตรียมยาต้านจุลชีพและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ยาต้านจุลชีพที่เลือกใช้คือ Valnemulin, Tiamulin, Tylosin, Actylisovaleryltylosin ของ tylosin, Lincomycin และ Doxycyclin ละลายยาต้านจุลชีพด้วยสารละลายที่เหมาะสมให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1.28 mg/ml **(ตารางที่ 3)** เจือจางยาต้านจุลชีพครั้งละ 2 เท่า (twofold-dilution)ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 μg/ml ตามลำดับ นำสารละลายที่เตรียมได้ 1 มิลลิลิตรผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพสุดท้ายที่ทำการทดสอบคือ 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 μg/ml ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาต้านจุลชีพจะถูกใช้ทดสอบภายใน 1 สัปดาห์

ตารางที่ 3 สารละลายที่เหมาะสมในการละลายยาต้านจุลชีพ (manufacturing recommendation)

ยาต้านจุลชีพ	สารละลาย
Valnemulin	Sterile distilled water
Tiamulin	Sterile distilled water
Lincomycin	Sterile distilled water
Doxycycline	0.1M KH_2PO_4 pH4.5
Tylosin	Ethanol
Actylisovaleryltylosin	Ethanol

6.3 การทดสอบหาค่า MIC

เพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย microplanter บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน บันทึกความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ไม่ปรากฏโคโลนีและบริเวณใส (hemolytic zone)

6.4 การแปรผล

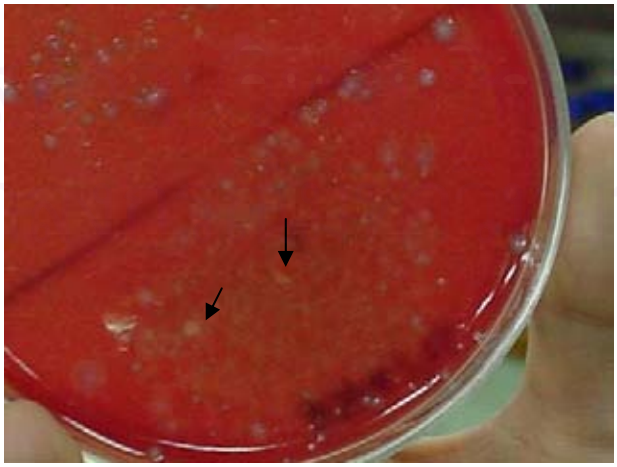
ใช้โปรแกรม WHONET version 5 ช่วยในการวิเคราะห์ผล

ผลการทดลอง

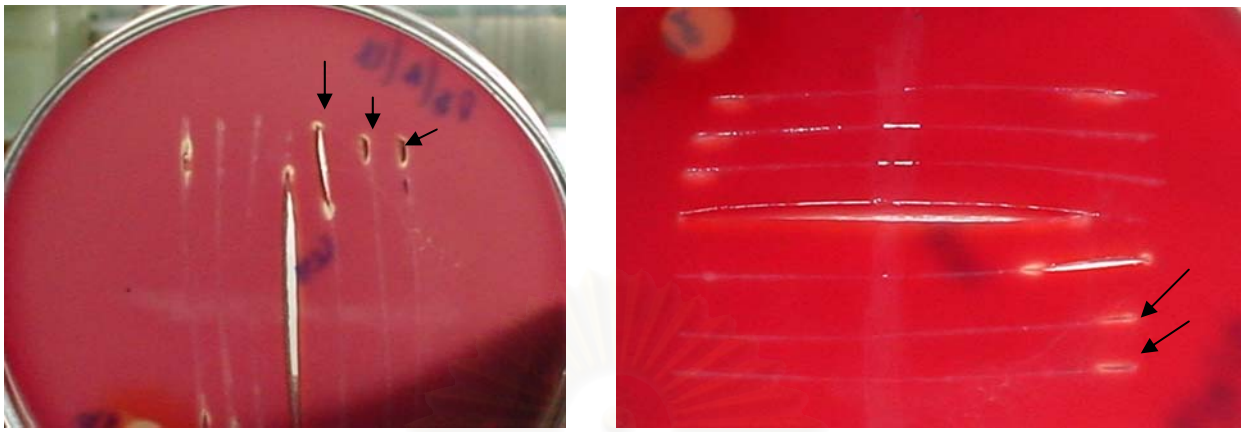
อุจจาระและเยื่อบุผนังลำไส้ 126 ตัวอย่าง ได้จากสุกรที่มีอาการท้องเสียปนเลือด 74 ตัวอย่าง และสุกรปกติ 52 ตัวอย่าง ผลการตรวจหาเชื้อบิดมูกเลือดในสุกร โดยการสุ่มตัวอย่างทำการหาเชื้อโดยวิธี fresh smear จำนวน 45 ตัวอย่าง พบเชื้อสไปโรคีท 9 ตัวอย่าง (20%) การตรวจหาเชื้อด้วยวิธี fresh smear พบเชื้อเฉพาะในกลุ่มสุกรที่มีอาการท้องเสีย ไม่พบเชื้อในสุกรปกติ ผลการการย้อมสีแกรม จำนวน 36 ตัวอย่าง จากกลุ่มสุกรที่มีอาการท้องเสีย พบเชื้อสไปโรคีทติดสีแกรมลบ (รูปที่ 1) 14 ตัวอย่าง (38.8%) และการการย้อมสีแกรม จำนวน 52 ตัวอย่างในกลุ่มสุกรปกติ พบเชื้อสไปโรคีท 3 ตัวอย่าง (5.8%)

สุกรที่มีปัญหาท้องเสียสามารถแบ่งลักษณะอุจจาระได้เป็น 3 ลักษณะ คือ อุจจาระเหลว 26 ตัวอย่าง (35%) อุจจาระเหลวเป็นมูก 15 ตัวอย่าง (20%) และอุจจาระเป็นมูกเลือด 33 ตัวอย่าง (45%) สุกร 1 ตัว พบอาการท้องเสียปนเลือดร่วมกับการพบตัวเต็มวัยของพยาธิแส้ม้า (*Trichuris suis*) จากการศึกษาพบว่า เชื้อ *Brachyspira spp.* สามารถถูกเพาะแยกได้จากตัวอย่างอุจจาระ 14 ตัวอย่าง ในสุกรที่มีปัญหาท้องเสีย 74 ตัว (18.4 %) พบฟาร์มที่สามารถเพาะเชื้อบิดมูกเลือด 9 ฟาร์มจาก 19 ฟาร์ม (47.3%) ผลการตรวจสุกรที่มีอุจาระปกติจำนวน 52 ตัว จากฟาร์มสุกรที่เคยมีประวัติการเกิดปัญหาท้องเสียปนเลือดไม่พบเชื้อบิดมูกเลือด

อุจจาระของสุกรที่สามารถถูกเพาะแยกเชื้อได้ มาจากสุกรขุนอายุระหว่าง 20-24 สัปดาห์ 10 ตัวอย่าง และมาจากแม่สุกร 1 ตัวอย่าง อีก 3 ตัวอย่างไม่ได้บันทึกชนิดของสุกรที่เป็นแหล่งที่มา ตัวอย่างอุจจาระที่พบผลบวกจากวิธี fresh smear 10 ตัวอย่าง สามารถเพาะแยกเชื้อได้ 1 ตัวอย่าง (10%) และอุจจาระที่พบผลบวกจากการย้อมสีแกรม 16 ตัวอย่าง สามารถเพาะแยกเชื้อได้ 4 ตัวอย่าง (25%) เชื้อสไปโรคีทที่แยกได้มีลักษณะโคโลนีใส ผิวเรียบ ขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร จนถึงขนาดเท่าปลายเข็มหมุด แสดงคุณสมบัติย่อยเม็ดเลือดแดงแบบรุนแรง (รูปภาพที่ 1) ด้วยวิธี Slice technique พบว่าเชื้อสไปโรคีทสามารถเคลื่อนที่ได้และพบที่บริเวณส่วนปลายของรอยกรีด (รูปภาพที่ 2A และ 2B)



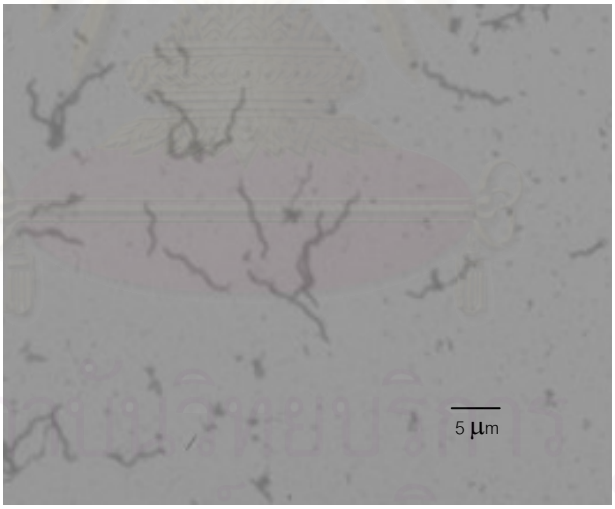
รูปภาพที่ 1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *B. hyodysenteriae* และย่อยเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (strong beta-hemolysis)บนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเลือดแกะ 5% ผสม spectinomycin 400 μg/ml (ลูกศร) ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างอุจจาระ



A **B**

รูปภาพที่ 2 ภาพแสดงบริเวณใส (hemolytic zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเลือดแกะ 5 % ที่บริเวณปลายรอยกรีด (ลูกศรชี้) แสดงถึงความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อสไปโรคีทชนิด *Brachyspira hyodysenteriae* ซึ่งใช้เป็นวิธีหนึ่งในการวินิจฉัยเบื้องต้น

การยืนยันผลการทดลองการแยกเชื้อโดยการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ ทุกตัวอย่างพบเชื้อแบคทีเรียรูปร่างยาว เกลียว ปลายเรียว ทั้ง 2 ข้างและติดสีแกรมลบ (รูปภาพที่ 3)



รูปภาพที่ 3 แสดงลักษณะของเชื้อสไปโรคีทที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรที่มีอาการท้องเสียเป็นเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียมีลักษณะยาว บิดเป็นเกลียว หัวท้ายแหลม และเคลื่อนที่ได้

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Brachyspira spp.* ที่แยกได้ 14 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อทั้ง 14 ตัวอย่างเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติ strong hemolysis ให้ผลลบต่อปฏิกริยา hippurate hydrolysis และให้ผลบวกต่อปฏิกริยา indole จากการเปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิงพบว่าเชื้อสไปโรคีททั้ง 14 ตัวอย่าง เป็น *Brachyspira hyodysenteriae*

จากการศึกษาค่า MIC ของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิดพบว่า valnemulin มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสไปโรคีทที่ทำการศึกษาโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-4 μg/ml และ doxycycline มีประสิทธิภาพที่ดีรองลงมาโดยมีค่าระดับ MIC อยู่ในช่วง 4-8 μg/ml ในขณะที่สารต้านจุลชีพตัวอื่นๆแสดงค่า MIC

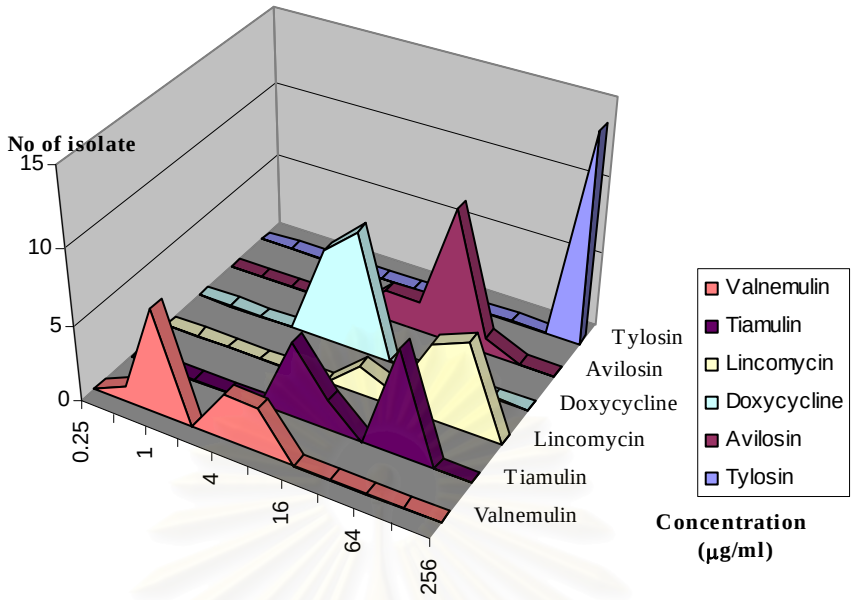
อยู่ในระดับสูงได้แก่ tylosin, actylisovaleryltylosin, lincomycin และ tiamulin โดยมีค่าMIC อยู่ในช่วง 512->512 μg/ml , 8-64 μg/ml, 128-16 μg/ml และ 8-64 μg/ml ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) (μg/ml)ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* จำนวน 14 เชื้อ ต่อสารต้านจุลชีพ 6 ชนิด

Strain no.	TS	AS	DC	LM	TM	VM
P1/16/7	>512	32	8	64	64	1
P2/27/7	512	8	8	32	8	0.5
P1/21/8	512	8	8	16	8	0.5
P1/19/9	>512	32	4	128	64	4
P2/19/9	>512	32	4	128	64	4
P1/6/10	>512	32	4	64	16	1
P4/6/10	>512	64	8	128	64	4
P1/24/10	512	32	8	128	64	4
P2/24/10	>512	32	8	64	64	4
P1/29/10	>512	16	4	64	8	1
P2/29/10	>512	8	4	128	64	0.5
P11/1/4	512	32	8	128	8	1
P1/11/6	>512	32	8	32	8	1
P15/1/14	>512	32	8	128	16	1

หมายเหตุ TS, Tylosin; AS, Actylisovaleryltylosin; DC, Doxycycline; LM, Lincomycin; TM, Tiamulin; VM, Valnemulin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปภาพที่ 4 เปรียบเทียบค่า MIC เชื้อสไปรีททั้ง 14 เชื้อ ต่อสารต้านจุลชีพ 6 ชนิด

จากรูปภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งหมดมีค่า MIC ที่แตกต่างกันและมีค่าการกระจายตัวของค่า MIC ต่อยาในระดับสูงโดยเฉพาะ ต่อ actylisovaleryltylosin, tiamulin, และ valnemulin ในขณะที่เชื้อสไปโรคีทส่วนใหญ่แสดงค่า MIC ต่อ doxycycline, tylosin และ lincomycin ที่ใกล้เคียงกัน

วิจารณ์

จากการศึกษาพบว่าความชุกของเชื้อบิดมูกเลือดในกลุ่มสุกรที่มีอาการท้องเสีย ที่มีลักษณะถ่ายเหลวปนมูกหรือ มีมูกเลือด คิดเป็นร้อยละ 20.3 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Fellström *et al*. (1998) ซึ่งพบความชุกของ *B. hyodysenteriae* ในประเทศสวีเดน (ปี 1996-1997) เท่ากับร้อยละ 27 การศึกษาความชุกของโรคบิดมูกเลือดในประเทศไทย โดยการเพาะเชื้อจากอุจจาระจากฟาร์มสุกรในเขตภาคกลาง พบเชื้อร้อยละ11 (อินทิรา และคณะ 1992) และ การศึกษาความชุกของโรคนี้โดยการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยาพบความชุกร้อยละ 14 (อินทิรา และคณะ 1991) การศึกษาครั้งนี้พบอุบัติการของโรคบิดมูกเลือด 9 ฝูง จาก 19 ฝูง คิดเป็น ร้อยละ 47.3 ใกล้เคียงกับการศึกษาความชุกของบิดมูกเลือดด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา โดยอินทิรา และคณะ (1991) ซึ่งพบความชุกในระดับฝูงสุกรร้อยละ 42.9 แสดงให้เห็นว่าความชุกของโรคบิดมูกเลือดในประเทศไทยทั้งในระดับฝูงและเป็นรายตัวมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น บ่งชี้ว่าโรคนี้ยังคงเป็นปัญหาในฝูงสุกรในประเทศไทย สาเหตุส่วนหนึ่งอาจเนื่องจากฟาร์มสุกรส่วนใหญ่นิยมใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องในอาหาร ทำให้เชื้อโรคไม่ถูกกำจัดออกจากฝูง แต่สุกรที่ติดเชื้อไม่แสดงอาการเท่านั้น ทำให้สุกรที่เป็นตัวอมโรคยังคงอยู่ในฝูง

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อสไปโรคีทที่แยกได้ เชื้อ *Brachyspira spp.* ที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้เป็น *Brachyspira hyodysenteriae* ทั้งหมดไม่พบอุบัติการณ์ของเชื้อ *Brachyspira spp.* ชนิดอื่นๆ จากฟาร์มที่ทำการศึกษาจำนวน 19 ฟาร์ม บ่งชี้ว่า *Brachyspira hyodysenteriae* เป็นเชื้อที่พบความชุกและก่อปัญหากับฟาร์มสุกรมากที่สุดในกลุ่ม *Brachyspira spp.* อย่างไรก็ดีเคยมีรายงานการตรวจพบ *Brachyspira pilosicoli* ในประเทศ

ไทย ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction ซึ่งมีความไวในการตรวจสูงกว่าการเพาะแยกเชื้อซึ่งใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (อภัสราและวันทนีย์ 2002) คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Brachyspira hyodysenteriae* ส่วนใหญ่จะให้ผลบวกต่อปฏิกริยา indole อย่างไรก็ดีภายหลังพบว่าเชื้อ *Brachyspira hyodysenteriae* บางสายพันธุ์ให้ผลลบต่อปฏิกริยา indole (Fellström *et al*., 1999) การศึกษานี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทยที่พบเชื้อ *Brachyspira hyodysenteriae* สายพันธุ์ที่ให้ผลลบต่อปฏิกริยา indole ซึ่งเชื้อสายพันธุ์นี้เคยแยกได้ในประเทศเบลเยียม และแคนาดาเช่นกัน (Hommez *et al*. 1998; Belanger and Jacques, 1991) สาเหตุที่พบเชื้อบิดมูกเลือดทั้งสองสายพันธุ์ในประเทศไทยอาจเกิดจากประเทศไทยมีการนำเข้าสุกรจากประเทศต่างๆ ทั่วโลก รวมทั้งแคนาดาและเบลเยี่ยม บ่งชี้ว่าประเทศไทยควรมีมาตรการในการควบคุมการนำโรคเข้าประเทศที่เข้มงวดขึ้น เพื่อลดความเสี่ยงต่อเกิดปัญหาบิดมูกเลือดที่ควบคุมได้ยากในฟาร์มสุกร

โดยปกติโรคบิดมูกเลือดพบได้ในสุกรเกือบทุกช่วงอายุ แต่ส่วนใหญ่พบว่าสุกรขุนมีโอกาสเป็นโรคนี้ได้มากที่สุด (Alexander and Taylor, 1969) จากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อจำแนกสุกรตามกลุ่มอายุ พบว่าสามารถแยกเชื้อบิดมูกเลือดได้จากสุกรขุนช่วงอายุ 20-24 สัปดาห์มากที่สุด เหตุผลส่วนหนึ่งอาจเกิดจากสุกรขุนในระยะนี้มักไม่ได้รับยาปฏิชีวนะในอาหารแล้วเนื่องจากเป็นระยะหยุดยาก่อนส่งโรงฆ่า ทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้และก่อปัญหาในฟาร์ม อย่างไรก็ดีสามารถแยกเชื้อได้จากแม่สุกรเช่นกัน บ่งชี้ว่าแม่พันธุ์อาจเป็นแหล่งอมโรคที่สำคัญอีกแหล่งในฟาร์มสุกรที่ผลิตทั้งสุกรขุนและสุกรพ่อแม่พันธุ์

ในการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างส่วนใหญ่ถูกส่งมาจากจังหวัดนครปฐมและราชบุรีจึงตรวจพบเชื้อจากสองจังหวัดนี้มากที่สุด อย่างไรก็ดีผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ อินทิราและคณะ (1991) ที่ตรวจพบความชุกของเชื้อบิดมูกเลือดสูงสุดในสองจังหวัดที่มีพื้นที่ติดต่อกัน คือ จังหวัดนครปฐมและราชบุรี ซึ่งเป็นแหล่งที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่นทำให้โรคนี้มีโอกาสติดต่อจากฟาร์มหนึ่งไปยังอีกฟาร์มหนึ่งได้ค่อนข้างง่าย การนำสุกรจากแหล่งที่มีความชุกของโรคนี้สูงเข้ามาในฟาร์มจึงควรมีการระมัดระวัง ควรทำการกักโรคก่อนนำฝูงสุกรใหม่เข้าฟาร์ม และตรวจสอบแหล่งที่มาว่าไม่มีประวัติการระบาดของโรคนี้ก่อน อย่างไรก็ดีควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในจังหวัดอื่นๆ และจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาควรมีปริมาณที่ใกล้เคียงกันในแต่ละจังหวัดที่ทำการศึกษา โดยทั่วไปสุกรที่ป่วยเป็นโรคบิดมูกเลือดหลังจากหายป่วยแล้วยังสามารถแพร่โรคได้อยู่เป็นเวลาถึง 70 วันหรืออาจกลับมาแสดงอาการอีกภายใน 3-4 สัปดาห์หลังจากหายเป็นปกติ (Harris *et al*., 1999) ฟาร์มที่เคยมีประวัติการเกิดโรคนี้จึงอาจตรวจพบเชื้อบิดมูกเลือดได้ในสุกรที่ปกติ

Kramomtong *et al*. (1996) พบอัตราการติดเชื้อในฟาร์มสุกรที่มีประวัติการติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการถึงร้อยละ 23 โดยใช้การตรวจทางซีรั่มวิทยา อย่างไรก็ดีในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเชื้อบิดมูกเลือดจากสุกรปกติจำนวน 52 ตัว เหตุผลอาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่สุ่มตรวจยังไม่มากพอ หรือการที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาที่ได้ผลอาจลดจำนวนเชื้อที่ปล่อยออกมาในแต่ละครั้งจนต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจพบได้

สุกรท้องเสียที่ตรวจพบเชื้อบิดมูกเลือดในการศึกษาครั้งนี้ ส่วนใหญ่มาจากฟาร์มที่มีการระบาดใหม่อีกครั้งหลังจากที่โรคสงบไปแล้วเนื่องจากการหยุดใช้ยา แสดงว่ามีการติดเชื้อวนเวียนอยู่ในฟาร์ม ดังนั้นการตรวจหาสุกรที่เป็นสุกรที่เป็นตัวอมโรคในฟาร์ม สัตว์อื่นๆ เช่น นก หนู สุนัข ที่อาจเป็นตัวนำโรคในฟาร์มเป็นเรื่องที่จะต้องมี

การศึกษาและวางมาตรการในการกำจัดแหล่งที่มาของโรคในฟาร์มต่อไป การเฝ้าระวังโรคอย่างสม่ำเสมอโดยการส่งตัวอย่างอุจจาระสุกรที่สงสัยว่าเป็นบิดมูกเลือดส่งตรวจในห้องปฏิบัติการ การตรวจสอบแหล่งที่มาของสุกร และการมีสุขศาสตร์การป้องกันโรคภายในฟาร์มที่ดีเป็นสิ่งที่ต้องทำควบคู่กันไป (Taylor, 1995) การศึกษาในครั้งนี้สามารถเพาะแยกเชื้อบิดมูกเลือดได้จากสุกรที่แสดงอาการถ่ายเหลวปนเลือดร่วมกับการพบตัวเต็มวัยของพยาธิแส้ม้า (*Trichuris suis*) ในอุจจาระในฟาร์มสุกรแห่งหนึ่ง บ่งชี้ว่าอาการท้องเสียปนเลือดในสุกรขุนอาจไม่ได้เกิดจากเพียงสาเหตุเดียว การวินิจฉัยแยกแยะโรคบิดมูกเลือดจึงมีความจำเป็นต้องทำควบคู่ไปกับการตรวจพยาธิแส้ม้าหรือโรคอื่นๆ ที่ไม่ได้ทำการตรวจในการศึกษาครั้งนี้ เช่น *Lawsonia intracellularis.* และ *Salmonella spp.* เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจุบันการรักษาโรคนี้ด้วยยาปฏิชีวนะบางครั้งไม่ได้ผลเนื่องจาก พบอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยามากขึ้น ทำให้การแสดงอาการของโรคยังคงมีอยู่ การวินิจฉัยจึงจำเป็นต่อการรักษาได้อย่างถูกต้องซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าเชื้อสไปโรคีทนั้นดื้อต่อยาส่วนใหญ่ที่ใช้ในการควบคุมอาการท้องเสียโดยเฉพาะอย่างยิ่ง tylosin จากการศึกษาของ Prapasarakul และคณะ (2003) พบว่าเชื้อสไปโรคีทมีความสามารถปรับตัวภายใต้สภาวะที่มีสารต้านจุลชีพในกลุ่ม macrolides ได้ง่าย เชื้อปรับตัวโดยการเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทป์บริเวณตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาเมื่อเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม macrolide ในปริมาณต่ำภายใน 3-5 ครั้ง (passages) มีผลให้ยาไม่สามารถจับบนสาย 23S rRNA ได้ tylosin และ actylisovaleryltylosin เป็นยาในกลุ่ม macrolides และมีค่า MIC ต่อเชื้อที่ศึกษาระดับที่ดื้อยาทุกเชื้อ อาจแสดงให้เห็นว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มที่มากเกินความจำเป็นไม่ว่าจะอยู่ในรูปของสารเร่งการเจริญเติบโตหรือการรักษาให้ยาในขนาดที่สูงแบบปูพรมโดยที่มิได้มีการวินิจฉัยแยกเชื้อหาสาเหตุก่อน เหล่านี้เป็นการเพิ่มเงื่อนไขเพื่อให้เชื้อแบคทีเรียมีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดภายในตัวสัตว์ (selective pressure) นอกจากนี้พบว่าค่า MIC ของเชื้อทุกตัวต่อยา lincomycin อยู่ในระดับที่ดื้อ ซึ่งเนื่องมาจากบน 23S rRNA (ที่บริเวณ domain V) ของเชื้อสไปโรคีทที่เป็นจุดเกาะ (target side) ของ lincomycin นั้นมีตำแหน่งที่เป็นบริเวณเป้าหมายของยาอีก 2 ชนิดร่วมกันคือ macrolides และ streptogramin B (MLS_B antibiotic) ดังนั้นกลไกการดื้อยาจึงเหมือนกันและยังหมายถึงว่าการดื้อต่อยาตัวใดตัวหนึ่งในกลุ่มจะส่งผลให้มีการดื้อต่อยากลุ่มอื่นๆ แม้ว่าเชื้อจะยังไม่เคยได้รับยานั้นเลย (Vester and Douthwaite, 2000)

tiamulin และ valnemulin เป็นสารต้านจุลชีพในกลุ่ม pleuromutilin แต่ valnemulin เป็นกลุ่ม pleuromutilin สังเคราะห์ใหม่ (new pleuromutilin derivative) ยากลุ่มนี้มีเป้าหมายอยู่ที่ 23S rRNA เช่นเดียวกับกลุ่ม macrolide แต่มีตำแหน่งเป้าหมายที่จำเพาะคนละส่วน (domain VI) กับ MLS_B จากรายงานของ Karlson และคณะ (2001) พบว่าระยะเวลาในการปรับตัวของเชื้อจนถึงระดับที่ดื้อยาจะช้ากว่ากลุ่ม macrolide มาก โดยพบว่าจะต้องเพาะเลี้ยงเชื้อสไปโรคีทในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาในกลุ่ม pleuromutilin ผสมอยู่ด้วยมากกว่า 30-60 ครั้ง และพบว่าเชื้อที่ทำการทดสอบมีค่า MIC ต่อ tiamulin สูงกว่า valnemulin แต่ยังไม่พบว่าเชื้อที่แยกได้ในประเทศสวีเดนดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าแปลกใจว่าการทดลองในครั้งนี้พบเชื้อที่ดื้อต่อ tiamulin จำนวนมากและมีเชื้อบางตัวที่ดื้อต่อ valnemulin ด้วย แม้ว่ายาชนิดนี้ยังมิได้มีการจดทะเบียนและจำหน่ายในประเทศซึ่งเท่ากับว่าในประเทศไทยพบเชื้อ *B. hyodysenteriae* ที่ไม่สามารถทำลายได้ด้วยสารต้านจุลชีพที่ใช้ในปัจจุบัน การทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองที่สาธารณรัฐเชคซึ่งพบการเพิ่มขึ้นของเชื้อ *B. hyodysenteriae* ที่ดื้อต่อยา valnemulin และ

tiamulin ซึ่งมีสาเหตุมูลฐานมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่มากเกินความจำเป็นและในระยะเวลาที่ไม่เหมาะสม (Sperling et al., 2004) เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลค่า MIC ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* ที่แยกได้ในปี 2544 พบว่าเชื้อที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้มีค่า MIC50 สูงกว่าในปี 2544 อย่างชัดเจน โดยเฉพาะค่า MIC ต่อยาในกลุ่ม pleuromutilin

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่า MIC ของเชื้อ *B. hyodysenteriae* ที่แยกได้ในปี 2544 และ 2548

Antimicrobial agents	MIC_{50} (μg/ml)	
	2544 [a]	2548
Tylosin	512	>512
Lincomycin	64	64
Tiamulin	2	8
Valnemulin	0.25	4
Doxycycline	-	8
Actylisovaleryltylosin	-	32

[a] Luengyosluechakul S, *et al.* 2002.

จากข้อมูลทำให้ทราบความชุกของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคบิดมูกเลือดและสถานการณ์การดื้อต่อยาของต่อยาทั้ง 6 ชนิด ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้วางมาตราการการรับมือกับการระบาดของโรค การวางแผนการรักษาตลอดจนเป็นการแสดงข้อพึงระวังถึงการใช้ยาปฏิชีวนะที่มากเกินความจำเป็น อย่างไรก็ดีการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ครอบคลุมจังหวัดในเขตภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และตะวันออก และยังมิได้ทำการศึกษาการออกฤทธิ์ของยาต่อเชื้อในกลุ่มยากลุ่มอื่นๆ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมที่ครอบคลุมมากขึ้น และมีการวางแผนในการกำจัดโรคออกจากฟาร์มอย่างจริงจัง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. อภัสรา วรราช และ วันทนีย์ เนรมิตมานสุข 2002 (2545) การตรวจพบเชื้อ *Brachyspira pilosicoli* จาก caecum ของสุกรท้องเสีย. สัตวแพทยสาร 52 (1): 25-33
2. อินทิรา กระหม่อมทอง วันทนีย์ เนรมิตมานสุข และ จตุพร สมิตานนท์ 1991 (2534) ความชุกของโรคบิดมูกเลือดในสุกรในเขตภาคกลาง รายงานวิจัยการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 18 4-9 พฤศจิกายน 2534 หน้า 163-169
3. อินทิรา กระหม่อมทอง วันทนีย์ เนรมิตมานสุข ทิพา ตันติเจริญยศ และ คัมภีร์ กอธีระกุล 1992 (2535) การตรวจซีโรไทป์ของเชื้อ *ทริโปนีมา ไฮโอดิสเซนเทอเรีย* ที่แยกได้จากสุกรป่วยด้วยโรคบิดมูกเลือดในเขตภาคกลาง เวชชสารสัตวแพทย์ 22 (3): 147-154
4. **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. Veterinary Microbiology. **67,** 47-60.
5. **Buller, N. B., and Hampson D. J.** (1994) Antimicrobial susceptibility testing of *Serpulina hyodysenteriae*. Australian Veterinary Journal. **71,** 211-214.
6. **De Smet, K.A., Worth, D.E., and Barret, S.P.** (1998) Variation amongst human isolates of *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* based on biochemical characterization and 16S rRNA gene sequencing. International Journal of Systemic Bacteriology. **48,** 1257-1263.
7. **Duhamel, G.E., Kinyon J. M., Mathiesen M. R., Murphy D. P., and Walter D.** (1998) In vitro activity of four antimicrobial agents against North American isolates of porcine *Serpulina pilosicoli*. Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation. **10**, 350-356.
8. **Fellström, C., Gunnarsson A.** (1995) Phenotypic characterization of intestinal spirochetes isolated from pigs. Research of Veterinary Science. **59:** 1-4.
9. **Fellström, C., Gunnarsson, A., Holmström, G., and Franklin, A.** (1996) *In vitro* activity of the 7 antimicrobials against 4 phenotypical variants of *Serpulina* species. In: Proceeding of the International Pig Veterinary Society Congress. p.292.
10. **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. Journal of Clinical Microbiology. **35,** 462-467.
11. **Fellström, C.**, **Karlsson, M., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A. and Aspan, A.** (1999) Emended descriptions of indole positive isolates of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. Veterinary Microbiology. **70,** 225-238.

12. **Galvin, J. L., Harris D. L., and Wannaemuehler M. J.** (1997) Prevention and control of intestinal spirochetal disease: immunological and pharmacological mechanisms. In: Hampson, D. J. and T. B. Stanton (eds) Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans, 1st edn. The UK at the university Press. Cambridge, pp. 343-374.

13. **Harris, D.L., Hampson, D.J. and Glock, R.D.** (1999) Swine Dysentery. In: Straw, B.E., D' Allaire, S., Mengeling, W.L. and Taylor, D.J. (Eds.). Diseases of Swine. 8th Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. pp 579-600.

14. **Karlsson, M., Fellström C., Heldtander M. U. K., Johansson K. E. and Franklin A.** (1999). Genetic basic of macrolide and lincosamide resistance in *Brachyspira* (*Serpiluna*) *hyodysenteriae*. FEMS Microbiology Letters. **172,** 255-260.

15. **Karlsson, M, Oxyberry S. L. and Hampson D. J.** (2002). Antimicrobial susceptibility testing of Australia isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution. Veterinary Microbiology. **84,** 123-133.

16. **Kitai, K., Kashiwasaki, M., Adachi, Y., Kume, T., and Arakawa, A.** (1979). In vitro activity of 39 antimicrobiol agents against *Treponema hyodysenteriae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **15,** 392-395.

17. **Kitai, K., Kashiwasaki, M., Adachi, Y., Kunugita, K., and Arakawa, A.** (1987). In vitro antimicrobial activity against reference strains and field isolates of *Treponema hyodysenteriae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **31**, 1935-1938.

18. **Koopman, M. B. H., Kabohrer, A., Beckmann, G. B. A. M. v. d. Z. and Kusters, J. G.** (1993). Genetic similarity of intestinal spirochetes from humans and various animal species. Journal of Clinical Microbiology. **31,** 711-716.

19. **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of the structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227,** 680-685.

20. **Leser, D.L., Moller, K. Jansen, K. and Jorsal, S.E.** (1997). Specific detection of Serpulina hyodysenteriae and potentially pathogenic weakly b-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction. Molecular Cell Probes. **11,** 363-372.

21. **Luengyosluechakul S**, **Wattanaphansak, S., Chulpetch, C., Wongareesawat, S., Inthawaree, S., Seeluang, H., Kortheerakul., Kramontong, I.**. (2002) A study on the minimum inhibition concentration of some antimicrobial agents against *Brachyspira hyodysenteriae* isolates detected from fattening farm in Thailand. In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress. Vol. 2 p. 230.

22. **National Committee for Clinical Laboratory Standard.** 2000. Performance standard of antimicrobial susceptibility testing. Minimal Inhibitory Concentration Interpretive Standard M100-S7. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Villanova, Pa.

23. **Ochiai, S., Adachi, Y. and Mori, K.** (1997). Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira* and proposals of *Brachypira hyodysenteriae* comb. nov., *Brachypira innocens* comb. nov. and *Brachyspira pilosicoli* comp. nov. Microbiology and Immunology. **41,** 445-452.

24. **Olson, L.D.** (1996). Enhanced isolation of *Serpulina hyodysenteriae* by using sliced agar media. Journal of Clinical Microbiology. **34:** 2937-2941.

25. **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 spirochetes recovered from cases of intestinal spirochaetosis. FEMS Microbiology Letter. **125,** 225-230.

26. **Prapasarakul, N., Monma, N, Tasu, C and Adachi, Y.** (2002) Genetic and serological characterization of Japanese canine intestinal spirochetes. In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress. Vol. 2 p.59.

27. **Prapasarakul, N., Kouzo, H., Adachi, Y.** (2003) In vitro susceptibility and a new point mutation associated with Tylosin-resistance in Japanese canine intestinal spirochetes. Journal of Veterinary Medical Science. p.1275-1280.

28. **Rønne, H., and Szancer J.** (1990). In vitro susceptibility of Danish isolates of *Treponema hyodysenteriae* to chemotherapeutics in swine dysentery (SD) therapy. In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress. p.126.

29. **Songer, J. G., Kinyon, J. M. and Harris, D. L.** (1976). Selective medium for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. Journal of Clinical Microbiology. **4,** 57-60.

30. **Sperling, D.**, Smola, J., Cizek, A. (2004) Incidence of *B. hyodysenteriae* with decreased susceptibility to pleuromutilins on pig farms in the Czech Republic between 1999-2003. In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress. Vol. 2 p. 547.

31.

32. **Taylor, D.J. and Alexander, T.J.L.** (1971). The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochete. British Veterinary Journal. **127,** 58-61.

33. **Thomson, J.R., Smith, W.J., Murray, B.P., Murry, D., Dick, J.E., Sumption, K.J.** (2001) Porcine enteric spirochete infections in UK: syrveillance data and preliminary investigation of atypical isolates. Animal Health Research Review. **2,** 31-36.

34. **Trott, D.J., Stanton, T.B., Jensen, N.S., Duhamel, G.E., Johnson, J.L. and Hampson, D.J.** (1996c)

Serpulina pilosicoli sp. nov.: the agent of porcine intestinal spirochetosis. International Journal of Systemic Bacteriology. **46,** 206-215.

35. **Trott, D.J., Combs, B.G., Mikosza, A.S., Oxberry, S.L., Robertson, I.D., Passey, M., Taime, J., Sehuko, R., Alpers, M.P., and Hampson, D.J.** (1997). The prevalence of *Serpulina pilosicoli* in humans and domestic animals in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. Epidemiology and Infection. **119,** 369-379.
36. **Vester, B. and Douthwaite, S**. (2001) Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrobial agents and chemotherapy. **45**, 1-12.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย