รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การประเมินมาตรการการป้องกันและควบคุมเชื้อมัยโคพลาสมาในฟาร์มสุกรในประเทศไทย

Evaluation of routine control and preventive strategies of *Mycoplasma* sp. in Thai pig farms

โดย

ณุวีร์ ประภัสระกูล และคณะ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

ประจำปีงบประมาณ 2555

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจาก เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2555 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ หน่วยแบคทีเรีย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และบุคคลากร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และความสะดวกในการดำเนินการศึกษา

สัญญาเลขที่ GRB_APS_๒๖_๕๕_๓๑_๐๓

ชื่อโครงการวิจัย การประเมินมาตรการของการป้องกันและควบคุมเชื้อมัยโคพลาสมาในฟาร์มสุกรในประเทศไทย

Evaluation of routine control and preventive strategies of *Mycoplasma* Spp. in Thai pig farms

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ณุวีร์ ประภัสระกูล[1]

ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช[2]

สัตวแพทย์หญิง เมตตา เมฆานนท์[1]

สัตวแพทย์หญิง พัชรี ทองคำคูน[3]

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2554 **จำนวนเงิน** 1,500,000 **บาท**

ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี **ตั้งแต่ 1 ตุลาคม** 2554 **ถึง 1 ตุลาคม** 2555

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประเมินรูปแบบการดื้อยาของเชื้อมัยโคพลาสมา ที่แยกได้จากสุกรที่อายุแตกต่างกัน และ แสดงรูปแบบลายนิ้วมือดีเอนเอของเชื้อที่มีการระบาดในฟาร์มและช่วงเลาที่ศึกษา เชื้อ *Mycoplasma* spp. จำนวน 209 เชื้อ แบ่งเป็น *M. hyosynoviae, M. hyopneumoniae,* และ *M. hyorhinis* จำนวน 13, 26, และ 170 เชื้อตามลำดับ ประเมินค่าความไวรับด้วยวิธี broth microdilution ต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด ได้แก่ doxycycline, tiamulin, valnemulin, tylosin, enrofloxacin และ lincomycin ทำการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี pulsed field gel electrophoresis เลือกเชื้อตัวแทนจากทุกกลุ่มตามความแตกต่างของพื้นที่ และช่วงอายุสุกร วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของประวัติการใช้ยา รูปแบบการดื้อยา และรูปแบบลายนิ้วมือดีเอนเอ ในห้องปฏิบัติการยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด tiamulin และ valnemulin รองลงมาคือ doxycycline และ lincomycin ส่วนเชื้อมัยโคพลาสมาดื้อต่อ enrofloxacin และ tylosin ในระดับสูง (ประมาณ 40 %) และรูปแบบการดื้อยาไม่สัมพันธ์กับสูตรการให้ยาต้านจุลชีพในฟาร์ม พบรูปแบบลายนิ้วมือดีเอนเอตั้งแต่ 4 รูปแบบขึ้นไป เชื้อ *M. hyopneumoniae* สายพันธุ์ A และ *M. hyosynoviae* สายพันธุ์ B เป็นสายพันธุ์หลักที่มีการระบาดในพื้นที่ที่ศึกษาประเทศไทย ส่วนเชื้อ *M. hyorhinis* มีความหลายหลายสูงแต่ไม่มีความจำเพาะในพื้นที่ที่สำรวจ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสุกรขุน/สุกรอนุบาล และระหว่างการเก็บตัวอย่างต่างช่วงเวลา รูปแบบการให้ยาต้านจุลชีพในระบบการผลิตสุกรของประเทศไทยไม่มีความสัมพันธ์กับรูปแบบการดื้อยา และไม่มีผลต่อการเร่งอัตราการดื้อยาในช่วงเวลาที่สำรวจ การศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลแย้งที่สำคัญว่าเชื้อดื้อยาที่ระบาดในมนุษย์อาจไม่ได้มีสาเหตุจากการจัดการทางปศุสัตว์ แต่อาจเป็นเพียงการแสดงออกพื้นฐานของสายพันธุกรรมดั้งเดิมของเชื้อมัยโคพลาสมาในช่วงเวลาปัจจุบัน และสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทยมีความแข็งแรงมากพอที่จะคงอัตตลักษณ์หรือแบบแผนการแสดงออกในช่วงเวลาที่ศึกษา

[1] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2218-9581 Email: Nuvee.P@chula.ac.th

[2] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2218-9615

[3] สถาบันสุขภาพสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900 โทร 0-2579-8908-14

Abstract

The aims of this study were to determine antibiogram profiles of porcine mycoplasmas isolated from different pig age and evaluate a DNA finger print pattern of the pathogen distributing in the tested farms. A total of 209 *Mycoplasma* spp. comprising 13 *M. hyosynoviae,* 26 *M. hyopneumoniae,* and 170 *M. hyorhinis* were tested for susceptibility level by broth microdilution method against six antimicrobials; doxycycline, tiamulin, valnemulin, tylosin, enrofloxacin and lincomycin. To evaluate intra-species variation, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was utilized and the patterns of representative mycoplasmas derived from each area and each age group, were compared. The relation among history of antibiotic uses, antibiogram and finger printing patterns were statistical analyzed. Tiamulin and valnemulin was the most *in vitro* effective antimicrobials against porcine mycoplasmas, followed by doxycycline and lincomycin. While, high incidence of mycoplasmas resistant to enrofloxacin and tylosin was revealed at approximately 40% especially for *M. hyorhinis*. At least 4 PFGE patterns were detected among each species of porcine mycoplasmas. *M. hyopneumoniae* type A and *M. hyosynoviae* type B were predominantly found in our studied area in Thailand, whereas high genetic diversity of *M. hyorhinis* was found without geographical relation. Neither PFGE patterns nor use of antimicrobials in each farm did relate to among antibiograms. Considering to nursery and fattening pigs or longitudinal sampling, antibiotic consuming time did not show an inducible resistant effect. Thus, this may be controversially deducible that antibiotic resistant microorganism might not cause by livestock management but it might cause by an intrinsic genetic profile at the present. In Thailand, high fitness cost of mycoplasma genetic were demonstrated by consistency of genetic identity during study.

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญตารางในภาคผนวก	iV
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการ	7
ผลการทดลอง	13
บทวิจารณ์	30
สรุป	34
เอกสารอ้างอิง	35

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การจัดการของฟาร์ม 9 ฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง 8

ตารางที่ 2 ข้อมูลการใช้ยาต้านจุลชีพในสุกรแยกตามความแตกต่างของช่วงอายุ และวิธีการให้ยา 11

ตารางที่ 3 ข้อมูลการใช้ยาของฟาร์ม 9 ฟาร์มที่เก็บตัวอย่างระหว่างปี 2550-2554 15

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบค่าความไวรับในหน่วย minimal inhibitory concentration (MIC) และ สัดส่วนการดื้อยา (%) ของ *Mycoplasma* spp.[a] ที่แยกจากสุกรอนุบาลและสุกรขุน (N=209) ต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด 17

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบค่าความไวรับในหน่วย minimal inhibitory concentration (MIC) และ สัดส่วนการดื้อยา (%) ของ *Mycoplasma* spp. ต่างชนิด ที่แยกจากสุกรอนุบาล และสุกรขุน ต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด 18

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การดื้อยา (%) ของ *Mycoplasma* spp. แต่ละชนิด ต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด 19

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ของค่า MICs และเปอร์เซ็นต์การดื้อยาของเชื้อ *M. hyorhinis* ที่แยกได้จากสุกรอนุบาลและสุกรขุน 20

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การดื้อต่อยาของเชื้อ *Mycoplasma* spp. แต่ละชนิด ในฟาร์มที่ศึกษา 9 ฟาร์ม 21

ตารางที่ 9 แสดงการกระจายตัวของกลุ่มของมัยโคพลาสมาที่พบในแต่พื้นที่ในประเทศไทย 29

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ 1 แสดง dendrogram ของเชื้อ *M. hyopneumoniae* จำนวน 15 เชื้อจาก 5 ฟาร์มที่ให้ผลบวกและ เชื้อมาตรฐาน เปรียบเทียบกับรูปแบบการดื้อยา (antibiograms) 24

รูปภาพที่ 2 แสดง dendrogram ของ *M. hyosynoviae* 12 เชื้อ จาก 2 ฟาร์ม และ เชื้อมาตรฐาน เปรียบเทียบกับรูปแบบการดื้อยา (antibiogram) 25

รูปภาพที่ 3 แสดง dendrogram ของ *M. hyorhinis* 27 strains จาก 9 ฟาร์ม โดยการเก็บตัวอย่างแบบ cross-sectional และ BTS-7 strain (เชื้อมาตรฐาน) เปรียบเทียบกับรูปแบบการดื้อยา (antibiogram) 27

รูปภาพที่ 4 แสดง dendrogram ของ *M. hyorhinis* 13 เชื้อจาก 2 ฟาร์ม (B และ F) โดยการเก็บตัวอย่างแบบ longitudinal และ BTS-7 strain (เชื้อมาตรฐาน) เปรียบเทียบกับรูปแบบการดื้อยา (antibiogram) 28

สารบัญตารางในภาคผนวก

ตารางที่ 1 ข้อมูลแหล่งที่มาของเชื้อ *M. hyopneumoniae* จำนวน 15 เชื้อ พร้อมค่ารอยโรคปอด (%) ที่อ่านได้ระหว่างการเก็บตัวอย่างจากโรงเชือด

ตารางที่ 2 ข้อมูลแหล่งที่มาของเชื้อ *M. hyosynoviae* จำนวน 12 เชื้อ

ตารางที่ 3 ข้อมูลแหล่งที่มาของเชื้อ *M. hyorhinis* จำนวน 27 เชื้อ จากการเก็บตัวอย่างแบบ cross-sectional

ตารางที่ 4 ข้อมูลแหล่งที่มาของเชื้อ *M. hyorhinis* จำนวน 13 เชื้อ จากการเก็บตัวอย่างแบบต่อเนื่อง

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่มำการวิจัย และทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ปัญหาของปอดอักเสบจากเชื้อมัยโคพลาสมาเกิดจาก *Mycoplasma hyopneumoniae* เป็นปัญหาของระบบทางเดินหายใจที่สร้างความเสียหายมากที่สุดในฟาร์มสุกรเมื่อเทียบกับปัญหาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ เช่น *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, และ *Haemophilus parasuis* เป็นต้น การป้องกันโรคมัยโคพลาสมาในปัจจุบัน ทำได้โดยการฉีดวัคซีนป้องกันในสุกรขุนเป็นจำนวนมากถึง 65% ของสุกรขุนที่เลี้ยงทั้งหมด คิดเป็นมูลค่าราว 124.8 ล้านบาท (Market Information, 2007, AHPA) นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดในการรักษาและควบคุมโรคในฟาร์มที่มีการเลี้ยงอย่างหนาแน่น ในสหรัฐอเมริกาพบว่าเฉพาะค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้เพื่อควบคุมโรคปอดอักเสบจากเชื้อ *Mycoplasma hyopneumoniae* ในฟาร์มสุกรสูงมีมูลค่าสูงถึง 1,000 ล้าน ดอลล่าร์สหรัฐฯ ต่อปี โรคปอดอักเสบจากมัยโคพลาสมาก่อให้เกิดโรคทางเดินหายใจซ้ำซ้อนหรือโรคพี อาร์ ดี ซี (Porcine Respiratory Disease Complex, PRDC) ที่คงอยู่มานานและมีการระบาดอย่างต่อเนื่อง การสร้างมาตรการในการควบคุมและกำจัดเชื้อเป็นไปได้ยากมาก เนื่องจากมีการติดต่อได้หลายทางโดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดต่อทางการหายใจ และเชื้อมีความคงทนเมื่ออยู่ในเศษอินทรีย์ในฟาร์ม ปัจจุบันการเกิดโรค PRDC มีความรุนแรงมากขึ้นและบางครั้งการทำวัคซีนไม่ได้ผลดี เนื่องมาจากมีการแพร่กระจายของไวรัสชนิด Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ร่วมกัน การเกิดร่วมกันของ PRRS และมัยโคพลาสมานี้ทำให้เกิดความสูญเสียของฟาร์มสุกรในทุกขนาดฟาร์มมากขึ้น

ปัญหาจากมัยโคพลาสมาไม่ได้มีเพียงผลต่อระบบหายใจเท่านั้น ในหลายประเทศที่มีการเลี้ยงสุกรเชิงอุตสาหกรรม ได้แก่ เดนมาร์ก เบลเยี่ยม สหรัฐอเมริกา และไต้หวัน เป็นต้น มีการสำรวจพบมัยโคพลาสมาชนิดอื่นที่ก่อโรคและนำความเสียหายมาสู่ฟาร์มสุกร ได้แก่ *Mycoplasma hyosynoviae* และ *Mycoplasma hyorhinis* มัยโคพลาสมาชนิดอื่นๆ นี้ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาข้อบวมอักเสบในสุกรหย่านมถึงสุกรขุนและสุกรพันธุ์ โดยที่วัคซีนป้องกันมัยโคพลาสมาที่มีใช้ในปัจจุบัน ไม่ได้มีผลป้องกันเชื้อทั้งสองชนิดนี้

การเพาะแยกเชื้อมัยโคพลาสมาต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ ตลอดจนเครื่องมือและอุปกรณ์พิเศษ เนื่องจากมัยโคพลาสมา เป็นเชื้อขนาดเล็กที่ไม่มีผนังเซล ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะและสภาวะอากาศพิเศษในการเจริญเติบโต อีกทั้งเป็นเชื้อที่เจริญเติบโตช้า ทั้งๆที่เชื้อนี้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจแต่ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อนี้กลับมีไม่มากนัก อีกทั้งข้อมูลการติดเชื้อร่วมระหว่างมัยโคพลาสมาชนิดอื่นๆ เช่น *Mycoplasma hyosynoviae* และ *Mycoplasma hyorhinis* ยังไม่ปรากฏ ดังนั้นการจะลดปัญหาโรคในระบบทางเดินหายใจและกลุ่มอาการข้อบวมในสุกรแต่ละช่วงอายุ หรือการหาความสัมพันธ์ของอัตราการการเกิดโรคระบบทางเดินหายใจซ้ำซ้อนต่อระบบการเลี้ยง การให้ยาปฏิชีวนะ และโปรแกรมการทำวัคซีนได้ จำเป็นต้องมีการศึกษาอย่างลึกซึ้งถึงประสิทธิภาพของระบบการป้องกันละควบคุมโรคในฟาร์มในประเทศไทย ทั้งระบบอุตสาหกรรมการผลิตสุกรขนาดใหญ่ และระบบการเลี้ยงของเกษตรกรรายย่อยในประเทศไทย การวิเคราะห์ข้อมูลการเกิดโรค การจัดการทั้งหมด และการพิสูจน์ทางห้องปฏิบัติการทั้งหมดจะช่วยให้มีการพัฒนาอย่างยั่งยืนของการเลี้ยงสุกรในประเทศ และการสร้างมาตรการการป้องกันเชื้ออย่างเหมาะสมตามภูมิศาสตร์และแบบแผนการเลี้ยงของวิถีไทยอย่างแท้จริง

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาความชุกและความหลากหลายของเชื้อมัยโคพลาสมาในสุกรแต่ละช่วงอายุ และพยาธิสภาพที่เกิดจากการติดเชื้อในธรรมชาติ

2.2 เพื่อศึกษารูปแบบการดื้อยาของเชื้อมัยโคพลาสมาที่ได้จากสุกรที่อายุต่างกันต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด

2.3 เพื่อประเมินระบบการจัดการฟาร์มที่มีผลต่อการควบคุมและป้องกันโรคที่เกิดจากมัยโคพลาสมา

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์

การวิเคราะห์ประเมินมาตรการการควบคุมโรคที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน จะเป็นแนวทางในการวางมาตรการที่เหมาะสมอย่างแท้จริงของการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย ผู้ที่ได้ประโยชน์จากงานวิจัยคือกลุ่มเกษตรกรที่เลี้ยงสุกร อุตสาหกรรมการผลิตสุกร ซึ่งจากการวิเคราะห์ข้อมูลจะทำให้ทราบถึงสถานภาพของการติดเชื้อในฟาร์ม ประสิทธิภาพของยาที่ใช้อยู่ การเลือกใช้ยาอย่างเหมาะสม การจัดการที่มีอยู่เหมาะสมที่สุดหรือไม่ จะสามารถเพิ่มมูลค่าในการผลิตสุกรในระยะยาวได้

4. ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิด (conceptual Framework) ของโครงการวิจัย

การขยายตัวของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นไปอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะในเอเชียแปซิฟิกที่มีจำนวนสุกรส่งเข้าโรงเชือดต่อปีสูงถึง 55% ของสุกรทั่วโลก การเพิ่มขึ้นนี้ เพิ่มทั้งจำนวนสุกรและน้ำหนักก่อนส่งโรงฆ่า นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนฟาร์มรายย่อยลดลง ในขณะที่ฟาร์มขนาดใหญ่เพิ่มมากขึ้น และมีการเลี้ยงที่เป็นระบบอุตสาหกรรมมากขึ้น โดยสังเกตได้จากจำนวนสุกรที่ผลิตได้ในประเทศมาจากระบบฟาร์มในอุตสาหกรรมคิดเป็นสัดส่วนถึง 80% โดย 56% มาจากฟาร์มที่มีแม่สุกรเกิน 1000 แม่โดย 56% (Cameron, 2000)

ในระบบการเลี้ยงเชิงอุตสาหกรรม สุกรจะมีการแบ่งช่วงอายุเพื่อให้ง่ายต่อการจัดการและการให้อาหาร โดยลูกสุกรหย่านมที่อายุ 3-4 สัปดาห์ เข้าสู่ระยะอนุบาลจนอายุ 10 สัปดาห์ จึงเข้าสู่ระยะขุนที่อายุ 11 สัปดาห์ถึงขายส่งโรงเชือดที่อายุ 24-25 สัปดาห์ ในระยะขุนที่อายุ 13-14 สัปดาห์แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะสุกรเล็ก (อายุ 11-14 สัปดาห์) ระยะสุกรรุ่น (อายุ15-18 สัปดาห์) และระยะสุกรขุนใหญ่ (อายุ 19 สัปดาห์ขึ้นไป) ในแต่ละรุ่นจะมีการจัดการ อาหารและความเสี่ยงต่อโรคต่างกัน

โรคจากเชื้อแบคทีเรียที่พบเป็นปัญหาต่อทางเดินหายใจสุกร ได้แก่ Enzootic Pneumonia (*Mycoplasma hyopneumoniae*), Pasteurellosis (*Pasteurella multocida* Type A, D, B_2), Porcine Pleuropneumonia (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), Glassers Disease (*Haemophilus parasuis*), *Streptococcus* Meningitis (*Streptococcus suis* Type 2) (Cameron, 2000)

Mycoplasma hyopneumoniae เป็นเชื้อแบคทีเรีย ใน Class *Mollicutes* ที่มีขนาดเล็กที่สุด ไม่มีผนังเซลล์ มีลักษณะทั่วไปคล้ายแบคทีเรียแกรมบวก มักก่อปัญหาร่วมกับ PRRSV ทำให้เกิดปัญหาโรคทางเดินหายใจซ้ำซ้อน (Porcine Respiratory Disease Complex) สุกรที่ป่วยด้วย Enzootic Pneumonia จะมีอาการเรื้อรัง ไอ หายใจลำบาก การป่วยที่เกิดจากเชื้อก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเนื่องจากอัตราการแลกเนื้อและอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่ามาตรฐาน เนื่องจากปอดอักเสบจาก *Mycoplasma* เป็นโรคเรื้อรังแต่มีการแพร่กระจายได้ง่าย (Cameron, 2000; Maes et al., 2008; Ross and Karmon, 1970 และ Thacker et al., 1999) แม้มีการทำวัคซีนป้องกันโรคแก่ลูกสุกร แต่ยังพบว่าสุกรที่ทำวัคซีนมีการพบเชื้อที่ปอดไม่ต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้ทำวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญ (Guiterrez-Martin et al., 2006)

นอกจากปัญหาโรคทางเดินหายใจแล้ว ยังมีมัยโคพลาสม่าอื่นที่พบในสุกร ได้แก่ *Mycoplasma hyosynoviae* และ *Mycoplasma hyorhinis* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคข้ออักเสบในสุกร โดยมักพบในสุกรต่างอายุกัน คือ ก่อให้เกิดอาการ polyserositis and polyarthritis *M. hyorhinis* ในสุกรอายุน้อย ขณะที่พบ *M. hyosynoviae* ซึ่งทำให้เกิดข้ออักเสบในสุกรขุนอายุ 3 เดือนขึ้นไป (Hagedorn et al., 1999, Magnusson et al., 1998 และ Sokoloff, 1973) *M. hyosynoviae* เป็นเชื้อแบคทีเรีย ใน Class *Mollicutes* เช่นเดียวกับ *M. hyopneumoniae* แต่มีรายละเอียดบางประการที่แตกต่างกัน เช่น ลักษณะของโคโลนี แม้ว่าจะคล้ายกันกับมัยโคพลาสม่าอื่น แต่มีลักษณะพิเศษที่เกิด Film and Spot บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ลักษณะนี้จะทำให้มีรอบย่นเกิดขึ้นบริเวณรอบโคโลนี จากการทดลอง สุกรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ *M. hyosynoviae* สามารถตรวจพบเชื้อได้จากเลือด ทอนซิล ข้อต่อและอวัยวะภายในต่างๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง ม้าม ปอดและไต เป็นต้น ทำให้ทราบว่าเชื้อนี้มีภาวะ systemic infection ซึ่งต่างจาก *M. hyopneumoniae* ที่มักพบในทางเดินหายใจเท่านั้น (Kobayashi et al., 1996 และ Ross and Kermon, 1970) ในเดนมาร์ก *M. hyosynoviae* ได้รับการยอมรับว่าเป็นตัวการสำคัญในการก่อ acute and severe lameness ในสุกรรุ่น-ขุน ในขณะที่มีข้อมูลการศึกษาใหม่ที่สามารถเหนี่ยวนำให้สุกรอายุเพียง 6 สัปดาห์(สุกรอนุบาล) เกิดอาการขาเจ็บได้ จากการฉีดเชื้อเข้าทางจมูก (Lauritsen et al., 2008)

การใช้ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial medication) สำหรับการเลี้ยงสัตว์แบบอุตสาหกรรม ที่ต้องการผลผลิตออกสู่ตลาดตามเวลาที่กำหนด ในคุณภาพและจำนวนที่ตลาดต้องการ เป็นสิ่งที่มีความจำเป็น แม้ในบางประเทศจะมีการหยุดใช้ยาต้านจุลชีพ สำหรับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค (food animals) การควบคุมโรคที่ยังไม่แสดงอาการชัดเจนโดยใช้ยาต้านจุลชีพเป็นสิ่งที่ได้ปฏิบัติกันอยู่ทั่วไป โดยมักใช้ในรูปผสมอาหารเพื่อ

มุ่งเน้นประโยชน์ด้านการรักษา ดังเช่นในประเทศสหราชอาณาจักร องค์กร The British Pig Executive ได้มีการวางแผน Zoonoses Action Plan มีเป้าหมายเพื่อควบคุม *Salmonella* Typhimurium ซึ่งเป็นเชื้อที่แพร่สู่คนทางห่วงโซ่อาหารจากอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรได้ โดยการควบคุมโรคต่างๆในฟาร์มโดยการจัดการอย่างมีสุขอนามัย การดูแลด้านอาหาร การจัดการและการจัดการตามระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ ร่วมกับการใช้ยาอย่างชาญฉลาด(prudent use) ซึ่งมีผลทำให้สถานการณ์ของการดื้อยาไม่เพิ่มขึ้น และสามารถควบคุมโรคได้ (Burch, 2005 และ Phillips et al., 2004)

กรณีสำหรับเชื้อ *Mycoplasma* พบว่ามีการใช้ยาต้านจุลชีพหลากหลายกลุ่มเพื่อใช้แก้ปัญหาการติดเชื้อได้แก่ pleuromutilins (tiamulin และ valnemulin), tetracycline (chlortetracycline และ oxytetracycline), macrolides (tylosinและ tilmicosin) , lincosamides (lincomycin), fluoroquinolones (enrofloxacin) เป็นต้น โดยใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกันตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป ตามระยะเสี่ยงต่อการติดโรค (Burch, 2005; Mae et al., 2008; Phillips et al., 2004 และ Stipkovit et al., 2001)

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาผลของความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Mycoplasma* ในการศึกษาในปัจจุบัน พบรายงานการดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *Mycoplasma* ดังการศึกษาของ Vicca และคณะ (2004) ศึกษาความไวรับของ *Mycoplasma hyopneumoniae* จำนวน 21 เชื้อที่แยกได้จากภาคสนามระหว่างปี 2000-2002 ต่อยาต้านจุลชีพ พบว่า มีการดื้อต่อ lincosamides (lincomycin), flouoroquinolones (enrofloxacin), และ macrolides (tilmicocin และ tylosin) ในขณะที่ไม่พบการดื้อต่อ spectinomycin, oxytetracycline, doxyxycline, gentamicin, florfenicol และ tiamulin ส่วนการศึกษาความไวรับของ *Mycoplasma hyorhinis* พบการดื้อยาต่อ macrolides เช่นกัน (Kobayashi et al., 1996 และ Vicca et al., 2004)

5. **ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ** เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์
    5.1 เพื่อนำข้อมูลความชุกและการดื้อยาของมัยโคพลาสม่าจากสุกรต่างอายุกันมาใช้ในการวางแผนการใช้ยาควบคุมโรคติดเชื้อมัยโคพลาสม่าในฟาร์มอย่างเหมาะสม
    5.2 เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาถึงการประเมินปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อมัยโค พลาสม่าในฟาร์มสุกรต่อไป

6. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

การจัดอบรมและสัมมนา

ใช้สื่อวารสารเกี่ยวข้องกับการเลี้ยงสัตว์และวารสารวิชาการ

7. ระเบียบวิธีวิจัย

7.1 การคัดเลือกฟาร์มเป้าหมาย

7.2 การสำรวจและเพาะแยกเชื้อจากสุกรต่างอายุในฟาร์มที่แสดงอาการปอดบวมหรือข้ออักเสบและสุกรจากโรงเชือด

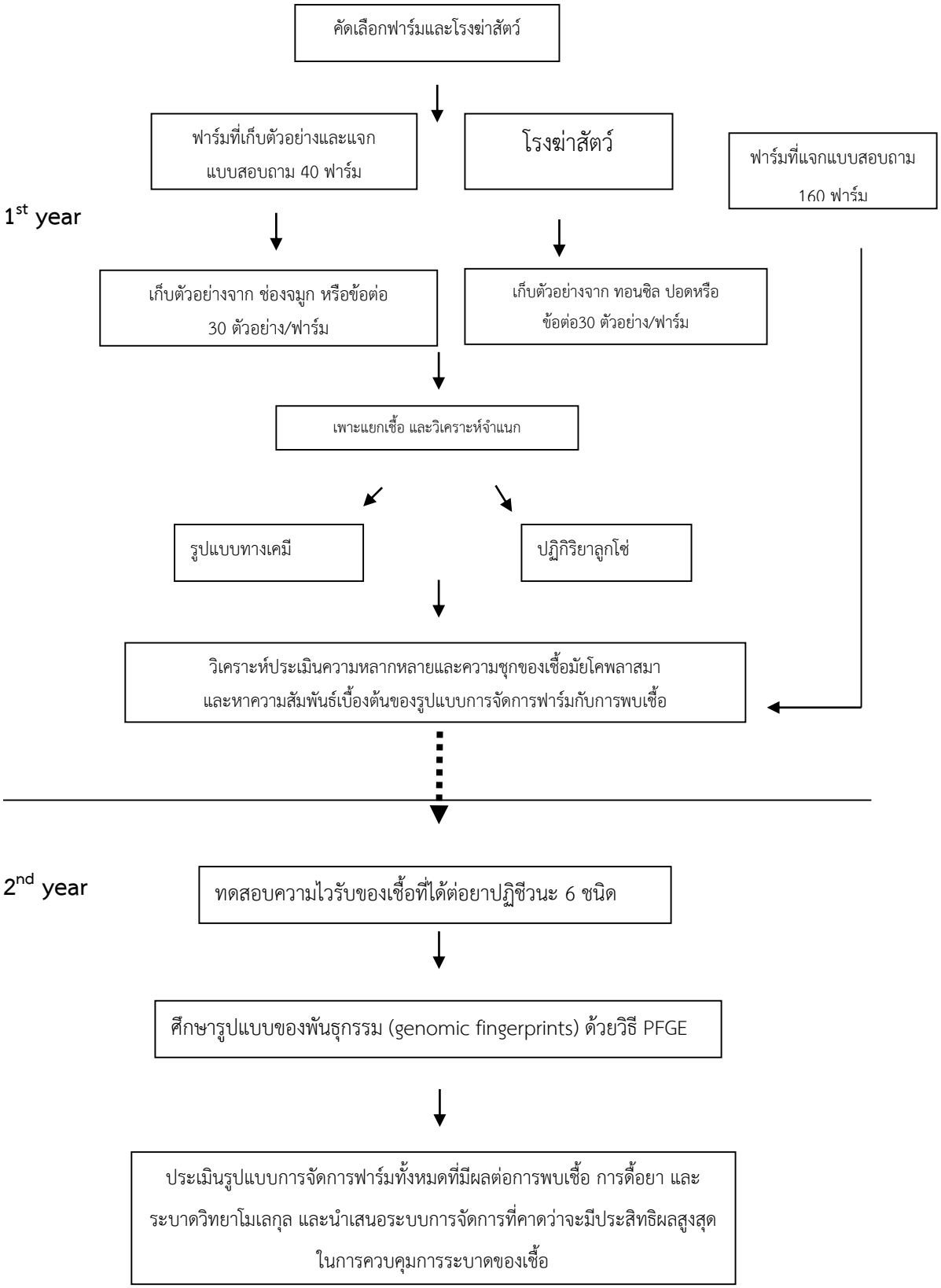
7.3 การทดสอบการดื้อยาของเชื้อจากสุกรในฟาร์ม โดยเปรียบเทียบ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) จากเชื้อที่แยกได้จากสุกรต่างอายุ และตรวจสอบรูปแบบทางพันธุกรรม

7.4 สรุปผล วิเคราะห์และเขียนรายงาน

8. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย งานแบคทีเรีย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โรงเชือดสุกร และฟาร์มสุกร

กรอบความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดเลือกฟาร์มเป้าหมาย

คัดเลือกฟาร์มสุกรที่มีสุกรขุนในระบบจำนวนทั้งสิ้น 9 ฟาร์มใน ปี 2553-2554 ที่มีที่ตั้งในเขตภาคเหนือ จำนวน 3 ฟาร์ม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 3 ฟาร์ม ภาคตะวันตก จำนวน 2 ฟาร์ม และภาคตะวันออกจำนวน 1 ฟาร์ม โดยมีเงื่อนไขว่าจะมีการจัดการพื้นฐาน ดังต่อไปนี้ เป็นฟาร์มมาตรฐานตามระเบียบของกรมปศุสัตว์ หรือมีสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรดูแล, มีการจัดการเป็นระบบ All-In-All-Out ในโรงเรือนเดียวกัน, มีการส่งสุกรเข้าโรงฆ่าไม่ต่ำกว่า 30 ตัวต่อครั้ง, สามารถติดต่อกับโรงฆ่าเพื่อเก็บตัวอย่างได้, มีประวัติเคยพบอาการปอดบวมหรือข้ออักเสบ และยินดีเข้าร่วมในโครงการวิจัยเจ้าของฟาร์ม

ก่อนการเก็บตัวอย่าง เจ้าของฟาร์มหรือผู้จัดการฟาร์มจะได้รับแบบสอบถามเพื่อเก็บข้อมูลที่ตั้ง ขนาดการจัดการฟาร์มและการป้องกันโรคในฟาร์มที่ใช้อยู่ในช่วงที่มีการเก็บตัวอย่างดังรายละเอียดในข้อมูลภาคผนวก

การคัดเลือกฟาร์มเป้าหมาย

ฟาร์มที่จะใช้เข้าร่วมในโครงการวิจัยจะต้องมีลักษณะดังนี้

1. เป็นฟาร์มที่เลี้ยงเชิงอุตสาหกรรม
2. มีแม่สุกรตั้งแต่ 1,000 แม่ขึ้นไป
3. มีการเลี้ยงทั้งพ่อแม่พันธุ์และสุกรขุน
4. ฟาร์มตั้งอยู่ในเขตที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่น
5. สามารถติดตามสุกรถึงโรงฆ่าได้ในจำนวนการฆ่าต่อครั้งไม่ต่ำกว่า 30 ตัว
6. การเดินทางจากฟาร์มหรือโรงฆ่าสามารถกลับได้ภายใน 24 ชั่งโมงหลังการเก็บตัวอย่าง โดยรถยนต์หรือเครื่องบิน
7. ได้รับการยินยอมจากเจ้าของฟาร์มให้เก็บตัวอย่างจากสุกรในฟาร์ม

2. การเก็บข้อมูล

ฟาร์มที่เลือกมีการผลิตหมูสาวทดแทนในฟาร์มเอง บันทึกลักษณะการเลี้ยงแบบสุกรขุนแบบอยู่บริเวณเดียวกับสุกรแม่ (one-site production system) หรือ มีการแยกคอกออกจากคอกสุกรแม่ (two-sites production system) มีมาตรการการควบคุมระบบความปลอดภัยที่ผ่านการรับรองจากกรมปศุสัตว์ มีการจำแนกลักษณะโรงเรือนเป็นแบบบรรยากาศธรรมชาติ หรือแบบใช้ระบบระเหยเพื่อลดความร้อน (evaporative cooling system) ฟาร์มที่คัดเลือกจะส่งสุกรขุนระยะท้ายสู่โรงฆ่าในบริเวณที่ใกล้เคียงกัน โดยมีน้ำหนักช่วงส่งขายอยู่ที่ 95-110 กิโลกรัม ระหว่างอายุ 21-25 สัปดาห์ สุกรในฟาร์มมีการจัดทำวัคซีนต่างๆ ได้แก่ ปากเท้าเปื่อย (foot-and-mouth disease virus;FMD), อหิวาสุกร (classical swine fever virus; CSFV), พิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's disease; ADV) และพาร์โวไวรัส (porcine parvovirus; PPV) ในช่วงอายุ 22 และ 30 สัปดาห์ นอกจากนี้บางฟาร์มยังทำวัคซีนในสุกรอื่นๆด้วย เช่น โรคไวรัสในกลุ่มอาการระบบทางเดินหายใจและระบบสืบพันธุ์ (porcine reproductive and respiratory virus; PRRSV), โรคที่เกิดจาก

เชื้อแบคทีเรียต่างๆ เช่น atrophic rhinitis, โรค mycoplasmosis และวัคซีนสำหรับ *Actinobacillosis pleuropneumoniae* บันทึกความแตกต่างของโปรแกรมวัคซีนที่ใช้ในแต่ละฟาร์ม เพื่อหาความสัมพันธ์ต่อการพอเชื้อ *Mycoplasma* spp.

3 การสำรวจและเพาะแยกเชื้อจากสุกรต่างอายุในฟาร์มที่แสดงอาการปอดบวมหรือข้ออักเสบและสุกรจากโรงเชือด

3.1 การเก็บตัวอย่าง แบ่งการเก็บตัวอย่างเป็นการเก็บจากสุกรมีชีวิตในฟาร์ม และเก็บจากอวัยวะของสุกรที่ตายทันที ณ โรงฆ่าสัตว์ เตรียมอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างดังนี้ แสดงข้อมูลจำนวนตัวอย่างในตารางที่ 1

ก. Nasal swab ใช้สำลีพันปลายไม้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบรรจุใน transport media (BHL) และสมุดจดบันทึกข้อมูลอาการทางคลินิก

ข. ปอดและทอนซิล ใช้ มีด ผ่าตัด กรรไกร ปากคีบเนื้อเยื่อ ถุงพลาสติก และสมุดจดบันทึกข้อมูลอาการทางคลินิก

ค. น้ำในข้อ ใช้หลอดฉีดยาขนาด 10 ซี.ซี. เข็มฉีดยาเบอร์ 18 ยาว 1.5 นิ้ว transport media (HAM) และตารางจดข้อมูลข้อบวม

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนและชนิดของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแยกตามฟาร์ม

ฟาร์ม	จำนวนตัวอย่าง	6-8 wks pigs	Slaughtered pigs		
		Nasal Swab	ปอด	ทอนซิล	น้ำในข้อ
A	90	30	30	30	0
B	129	30	32	30	37
C	105	30	30	30	15
D	108	30	26	26	26
E	112	30	30	30	22
F	122	30	31	31	30
G	118	30	31	29	28
H	120	30	30	30	30
I	120	30	30	30	30
รวม	1,024	270	270	266	218

3.2.1 สุกรระหว่างการเลี้ยง สุ่มตัวอย่าง 30 ตัวต่อรุ่น โดยใช่สำลีป้ายจมูก (nasal swabs) (3 ตัวอย่าง/ตัว) หรือเจาะน้ำในข้อต่อ (synovial fluid) จากสุกรป่วยที่มีอาการข้อบวม (1-2 มล./ตัว) เก็บตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับขนส่งชนิด mycoplasmal transport media

3.2.2 เก็บตัวอย่าง จากสุกรฟาร์มที่คัดเลือก ณ โรงฆ่าสัตว์ อวัยวะที่เก็บได้แก่ ปอด ทอนซิล และน้ำในข้อต่อจากข้อที่บวม เก็บตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับขนส่งชนิด mycoplasmal transport media โดยสุ่มจำนวน 30 ตัวอย่างต่อฟาร์ม ตัวอย่างในการจำแนกทั้งหมดไม่ต่ำกว่า 360 ตัวอย่าง

4. การเพาะแยกเชื้อ

เพาะแยกเชื้อมัยโคพลาสม่า 3 ชนิดจากตัวอย่างที่เก็บได้ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะดังต่อไปนี้

-Friis's หรือ BHL สำหรับ *Mycoplasma hyopneumoniae*

-Hayflick's+Arginine+Mucin(HAM) สำหรับ *Mycoplasma hyosynoviae*

-Hayflick's สำหรับ *Mycoplasma hyorhinis*

วิธีการเพาะแยกเชื้อมีขั้นตอนดังนี้

4.1 นำตัวอย่างที่เป็นอวัยวะ เช่น ปอด หรือ ทอนซิล กดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และป้ายเชื้อลงผิวหน้าของอาหาร ก่อนนำไปทำการตัดย่อย แช่ และผสมใน 10 ml ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว นำไปปั่นที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบน (supernatant) ออกใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียวเพื่อเตรียมไว้สำหรับขั้นตอนต่อไป

4.2 ตัวอย่างที่เป็น nasal swab แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมตามชนิดของเชื้อที่ต้องการแยก บ่มไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดแยกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ใส่หลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เตรียมไว้สำหรับขั้นตอนต่อไป

4.3 ตัวอย่างที่เป็นน้ำจากข้อต่อ หยด 2-3 หยดลงบน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและป้ายเชื้อบนพื้นผิวอาหาร และหยดตัวอย่างที่เหลือลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2 ml ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เตรียมไว้สำหรับขั้นตอนต่อไป

4.4 นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากขั้นที่ 4.1-4.3 มากรองผ่านแผ่นกรอง (membrane filter) ที่ขนาด 0.45 µm เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนออก

4.5 นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ผ่านกรองหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และทำการเจือจาง 3 ความเข้มข้น

4.6 นำจากเพาะเชื้อที่เขี่ยเชื้อลงแล้ว บ่มที่ 37°C ภายใต้สภาวะ CO_2 5% นาน 4 วัน ก่อนนำมาตรวจดู colony ที่ขึ้นด้วย กล้องส่องภาพสามมิติ (stereoscope) ถ้าพบโคโลนีของ mycoplasmas ทำการแยกเชื้อต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ครั้ง เมื่อผ่านการพิสูจน์เชื้อโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) แล้วจึงเก็บเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอีกครั้ง ที่อุณหภูมิ -80°C

4.7 นำสารละลาย จากข้อ 4.5 มาอบที่ 37°C นาน 4 วัน หรือจนอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสี หรือขุ่น นำไปพิสูจน์เชื้อโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) และ ทำการเพาะเชื้อต่ออีก 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อที่แข็งแรงก่อน เพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อเก็บเชื้อตามข้อ 4.6

4.8. เก็บรักษาเชื้อที่ได้เอาไว้ใช้ทดสอบ MICs ต่อไปในปีที่ 2

5. การทดสอบการดื้อยาของเชื้อจากสุกรในฟาร์ม โดยเปรียบเทียบ Minimum Inhibitory Concentration(MIC) จากเชื้อที่แยกได้จากสุกรต่างอายุ

5.1 การคัดเลือกเชื้อเพื่อทดสอบ เชื้อมัยโคพลาสมาที่นำมาทดสอบการดื้อยาจะพิจารณาคัดเลือกดังนี้

1. เชื้อที่ใช้เป็นเป็นเชื้อ อ้างอิง type strain ได้แก่ J, S16 และ BTS-7 สำหรับ *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* และ *M. hyorhinis* ตามลำดับ
2. เชื้อ *M. hyopneumoniae* จำนวน 26 เชื้อ (isolates) ที่แยกได้จากปอดสุกรขุนที่โรงฆ่า ของ 5 ใน 9 ฟาร์มที่เก็บตัวอย่างโดยนำเชื้อที่ยังมีชีวิตทั้งหมดมาทดสอบ
3. เชื้อ *M. hyosynoviae* จำนวน 13 isolates ที่แยกได้จากปอดและทอนซิลสุกรขุนที่โรงฆ่า ของ 2 ใน 9 ฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง โดยนำเชื้อที่ยังมีชีวิตทั้งหมดมาทดสอบ
4. เชื้อ *M. hyorhinis* จำนวน 170 isolates ที่แยกได้จาก nasal swab ปอด ทอนซิล น้ำและเยื่อหุ้มข้อของสุกรอนุบาลอายุระหว่าง 4-8 สัปดาห์ และจาก ปอดและทอนซิลของสุกรขุนที่โรงฆ่า ของทั้ง 9 ฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง โดยคัดเลือกให้กระจายทั่วถึงตามอวัยวะและฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง

5.2 การดำเนินการทดสอบการดื้อยาของเชื้อ

ทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของเชื้อมัยโคพลาสมาทั้งสามชนิด โดยวิธี broth micro-dilution method (Hannan, 2000) ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.006-12.5 µg/ml สำหรับ lincomycin, tiamulin, tylosin และ valnemulin ที่ความเข้มข้น 0.048-100 µg/ml สำหรับ doxycycline และ enrofloxacin อบที่ 37°C นาน 7 วันและอ่านผลโดยดูการเปลี่ยนแปลงสีของ media นำค่า breakpoint มาใช้ประเมินการดื้อยาของเชื้อ (Hannan, 2000)

ค่า MICs และการดื้อยา (%) ที่ได้ต่อชนิดของยาต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบนำมาหาความสัมพันธ์ ระหว่าง species อายุสุกร และฟาร์ม โดยใช้ chi-square ที่ $P<0.05$

6. **การทดสอบความหลากหลายของรูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อมัยคพลาสมาด้วยวิธี Pulsed- filed gel electrophoresis**

6.1 การเตรียมเซลล์บริสุทธิ์ และดีเอนเอ

เพาะเชื้อมัยโคพลาสมาใน media ที่เหมาะสมกับแต่ละ species จากนั้นทำการเก็บเชื้อโดยวิธี centrifugation ที่ 10,000 rpm นาน 50 นาที ที่ 4° C ล้าง cell pellet ที่ได้ 3 ครั้ง ด้วย 2 ml mycoplasma washing buffer (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100mM NaCl, pH7.2) และปั่นที่ 13,000 rpm นาน 5 นาที ในครั้งสุดท้ายเติม 0.85% NaCl 200 ml จากนั้นเติม 1.6% Low-mealting-point agarose ในปริมาตร 1:1 ก่อนหยอดลงในแม่พิมพ์ plug molds 80-100 µl ต่อ plug แช่เย็นที่ 4 ° C นาน 10 นาที ถอดพิมพ์ออกและแช่ก้อน plug ใน 2 ml lysis buffer (50mM EDTA, 1% N-lauroylsarcosine, 0.1 mg/ml Proteinase K, 10mM Tris-HCl, pH 8) ที่ 50° C ทิ้งไว้ข้ามคืน เปลี่ยน lysis buffer และแช่ทิ้งข้ามคืนอีกครั้ง จึงนำก้อน plug มาล้างด้วยน้ำกลั่น ที่ 50° C และล้างต่อด้วย TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.6) 2 ครั้ง เก็บไว้ที่ 4 ° C

นำ plug มาปรับสภาพใน 1X restriction enzyme buffer ที่ 37 ° C นาน 10 นาที ก่อนเติม restriction enzymes ขนาด 30 units ต่อ plug โดย restriction enzyme ที่ใช้ ได้แก่ *Sal*I, *Bss*HII และ *Bst*EII สำหรับ การย่อย DNA ของ *M. hyopneumoniae, M. hyosynoviae* และ *M. hyorhinis* ตามลำดับ นำเข้าตู้อบที่ 37 ° C นาน 5 ชั่วโมง

6.2 กระบวนการแยกดีเอนเอผ่านเจลบนสนามไฟฟ้า (**Gel electrophoresis)**

เตรียม 1.0% agarose gel ในสารละลาย 0.5XTBE buffer (44.5mMTris , 44.5mM bolic acid, 1mM EDTA, pH 8.0) เทลงใน PFGE tray ปล่อยให้ gel แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ใส่ดีเอนเอสัญลักษณ์ (DNA marker) ลงในช่องแรก โดยใช้ Lamda Ladder PFG marker ขนาด 50-1,000 kb สำหรับการทดสอบ *M. hyopneumoniae* และ *M. hyosynoviae* ใช้ CHEF DNA Size Standard ขนาด 8-48 kb สำหรับการทดสอบ *M. hyorhinis* ตัด plug ที่เตรียมไว้ ใส่ลงในช่องถัดไป เติม 0.5XTBE buffer และ 100mM thiourea ก่อนนำไป electrophoresis ที่ 14 °C, 4V/cm ภายใต้ CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis System (Bio-Rad, USA) โดยใช้เวลาสำหรับสลับทิษของประแสไฟฟ้า (switching times) 0.5-8.5 วินาที นาน 18 ชั่วโมง สำหรับ *M. hyopneumoniae*และ *M. hyosynoviae*และ 2.0-10.0 วินาที นาน 10 ชั่วโมง สำหรับ *M. hyorhinis*

นำเจลที่ผ่านกระบวนการ electrophoresis แล้วมาย้อมด้วย ethidium bromine ในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1 µg/ml นาน 30 นาที และถ่ายภาพภายใต้แสง ultraviolet ในเครื่องถ่ายภาพดีเอนเอ

7. การวิเคราะห์ผล

นำภาพ DNA fragment ที่ถ่ายได้มาวิเคราะห์ด้วย gel documentation system Bio-1 D++ software (Vilber-Lourmat, Germany)ตั้งค่าการจัดกลุ่ม (cluster) ของ PFGE pattern และสร้าง

dendrogramของ PFGE ที่ homology coefficient 1.0% ด้วย the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยถือว่า PFGE pattern จะเหมือนกัน ก็ต่อเมื่อมีค่าความเหมือนเป็น 100% (100% similarity) และ PFGE pattern จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเมื่อความเหมือนไม่น้อยกว่า 80% ตาม Dice similarity cut off นำข้อมูล PFGE ของแต่ละเชื้อที่นำมาศึกษาหาความสัมพันธ์กับ antibiogram (ลักษณะการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ) ฟาร์ม ที่ตั้งของฟาร์ม อายุสัตว์ และ อวัยวะที่แยกเชื้อนั้น มาวิเคราะห์เชิงพรรณนาร่วมกับ dendrogram ของ DNA fragment patterns ที่ได้

นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพรรณนา (%, SD.) และเปรียบเทียบผลการทดสอบด้วย ANOVA และ Chi-square ที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$

ผลการทดลอง

1. ข้อมูลแสดงสถานภาพในฟาร์ม

ก่อนการเก็บตัวอย่าง เจ้าของฟาร์มหรือผู้จัดการฟาร์มจะได้รับแบบสอบถามเพื่อให้ทราบข้อมูลที่ตั้ง ขนาด การจัดการฟาร์มและการป้องกันโรคในฟาร์มที่ใช้อยู่ในช่วงที่มีการเก็บตัวอย่าง ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของข้อมูลการจัดการและการใช้ยาจาก 9 ฟาร์ม ประกอบด้วยฟาร์มจากภาคตะวันออก 1 ฟาร์ม ภาคเหนือ 3 ฟาร์ม ภาคตะวันตก 2 ฟาร์ม และตะวันออกเฉียงเหนือ 3 ฟาร์ม ทุกฟาร์มมีจำนวนแม่สุกร มากกว่า 1,000 ตัว และมี 5 ฟาร์ม เป็นฟาร์มขนาดมากกว่า 3,000 แม่ ทุกฟาร์มใช้ระบบการผลิตสุกรขุนแบบเข้าพร้อมกันและส่งโรงฆ่าพร้อมกันทุกตัว มีการผลิตสุกรสาวทดแทนเพื่อเป็นแม่พันธุ์ในฟาร์มเอง จากประวัติการตรวจเชื้อไวรัสในฟาร์ม พบเชื้อไวรัส porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) ทุกฟาร์ม และพบฟาร์มที่มีประวัติการระบาดของไวรัส porcine circovirus (PCV) จำนวน 3 ฟาร์ม (**ตารางที่ 2**)

ทำการเก็บข้อมูลการให้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มตามชนิดของยา ปริมาณขนาดยา และรูปแบบการให้ยา เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเสี่ยง ดังแสดงใน**ตารางที่ 3** พบว่ามีเพียงฟาร์มเดียวที่ใช้ยาปฏิชีวนะเพียง 2 ระยะคือ ฟาร์ม B ที่ให้ยาเฉพาะในสุกรเล็ก และสุกรรุ่น และฟาร์ม E ให้ในระยะลูกสุกร สุกรเล็ก และแม่พันธุ์ ส่วนในฟาร์มอื่นๆมีโปรแกรมที่คล้ายกับให้ยาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันคือ“การให้ยาในเกือบทุกระยะยกเว้นระยะส่งขาย”

เก็บข้อมูลชนิดของยาที่ทำการสำรวจจำนวน 5 ชนิดได้แก่ tiamulin (100-150 ppm), tylosin 200-275 ppm), chlortetracycline (300-400 ppm), amoxicillin (200-300 ppm) และ sulfamethosazole (110 ppm) โดยแสดงขนาดและชนิดของยาแม่สุกรและสุกรทดแทนใน**ตารางที่ 3** ฟาร์ม D, F, G และ H ให้ยาในช่วงหลังคลอดหรือช่วงเลี้ยงลูกนานติดต่อกันเป็นเวลา 7-31 วัน แสดงวิธีการให้ยาปฏิชีวนะในช่วงลูกสุกร สุกรอนุบาล สุกรเล็ก สุกรรุ่น และสุกรขุน ฟาร์ม A และ B ไม่ผสมยาปฏิชีวนะลงในสูตรอาหารสำหรับลูกสกรและสุกรเล็ก ฟาร์ม F, G, H, และ I ผสมยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิดในอาหารให้แก่ลูกสุกรหลังคลอดจนถึงสุกรขุน ชนิดของยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่เลือกใช้คือ tiamulin ขนาด 100-150 ppm และ amoxicillin ขนาด 200-300 ppm มีเพียงฟาร์ม A ที่ เลือกใช้ยาร่วมกันระหว่าง tiamulin และ chlortetracycline และ ฟาร์ม D และ H เลือกใช้เพียง tylosin (จากรายงานการศึกษาของปีงบประมาณ 2554)

ตารางที่ 2 ข้อมูลการจัดการของฟาร์ม 9 ฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง

ฟาร์ม	ภูมิภาค	ขนาด (จ.น. แม่)	Sites (1 หรือ 2 sites)	AIAO ในสุกรขุน	แหล่งสุกรทดแทน	การทำวัคซีน MH	Bio-security	โรคอื่นที่พบ
A	ตะวันออก	4,100	2 sites แบบมีอนุบาล	1wk	ภายใน	2 ครั้ง	ปานกลาง	PRRS
B	ตะวันออกเฉียงเหนือ	1,000	1 site	>1wk	ภายใน	2 ครั้ง	ปานกลาง	PRRS
C	เหนือ	1,280	1 site	>1wk	ภายใน	2 ครั้ง	ดี	PRRS
D	เหนือ	3,000	1 site	1wk	ภายใน	ไม่ทำ	ปานกลาง	PRRS
E	เหนือ	3,000	2 sites แบบมีอนุบาล	1wk	ภายใน	1 ครั้ง	ปานกลาง	PRRS
F	ตะวันตก	1,200	1 site	>1wk	ภายใน	1 ครั้ง	ปานกลาง	PRRS&PCV2
G	ตะวันตก	1,300	2 sites แบบมีอนุบาล	1wk	ภายใน	1 ครั้ง	ปานกลาง	PRRS&PCV2
H	ตะวันออกเฉียงเหนือ	5,400	2 site แบบ wean to finish	1wk	ภายใน	1 ครั้ง	ดี	PRRS&PCV2
I	ตะวันออกเฉียงเหนือ	4,300	1 site	1wk	ภายใน	1 ครั้ง	ดี	PRRS

ตารางที่ 3 ข้อมูลการใช้ยาของฟาร์ม 9 ฟาร์มที่เก็บตัวอย่างระหว่างปี 2550-2554

ฟาร์ม	ยาต้านจุลชีพ[c] ที่ใช้ในอายุต่างๆ[b]			ช่วงเวลา
	สุกรพันธุ์	ลูกสุกร	สุกรขุน	
A	N	N	CTC	ก่อนปี 2552
	tia/CTC	tia/colis/enro	tia/amox	2552
B[a]	N	N	N	ก่อนปี 2552
	Flor	Tia	tia/amox/CTC/flor	2552-2554
C	N	N	N	ก่อนปี 2552
	tylo/tia	tylo	tylo/tia	2552
D	N	N	N	ก่อนปี 2552
	tylo/sulfa/tia	tia	tia	2552
E	N	N	N	ก่อนปี 2552
	tia	tia	-	2552
F[a]	tia/CTC	enro/tia/phos	tylo/sulfa/ CTC	ก่อนปี 2552
	tia/amox	enro/tia/amox/valo	tia/amox	2552-2554
G	tia/CTC	enro/tia/phos	tylo/sulfa/ CTC	ก่อนปี 2552
	tia/amox	enro/tia/amox/valo	tia/amox	2552
H	tylo/CTC	enro/tylo/phos	tylo/CTC	ก่อนปี 2552
	tylo/tia/amox	enro/tia/amox/hal	-	2552
I	N	N	N	ก่อนปี 2552
	tylo/CTC/amox	enro/tia/amox	tia/CTC/OTC/amox	2552

[a] ฟาร์ม B และ F มีการเก็บตัวอย่างแบบติดตามระยะยาว (longitudinal) 3 ครั้ง ระหว่าง 2552-2554

[b] สุกรพันธุ์ (สุกรสาวทดแทนและแม่สุกร); ลูกสุกร (อายุ 0-9 สัปดาห์); สุกรขุน (อายุ 10 สัปดาห์ถึงขาย)

[c] tia=tiamulin; amox=amoxicillin; enro=enrofloxacin; colis= colistin; tylo= tylosin; sulfa= sulfonamides; phos= phosphomycin; hal= halguinol; CTC=chlortetracycline; tylo=tylosin; enro=enrofloxacin; OTC=oxytetracycline; flor=florfenicol (chemical); valo=valocin (the second generation tylosin); N=ฟาร์มไม่ได้บันทึกไว้

2. ผลการทดสอบการดื้อยา

จากแบบสอบถามและการสัมภาษณ์ ได้แสดงข้อมูลการใช้ยาต้านจุลชีพของแต่ละฟาร์มทั้งในอดีต (ย้อนหลังถึงปี 2550) และปัจจุบันมีดัง**ตารางที่ 3** แต่ละฟาร์มมีการใช้ยาต้านจุลชีพมากกว่าหนึ่งชนิดตลอดวงจรการผลิต ยกเว้น ฟาร์ม E ที่ใช้เพียง tiamulin ผสมอาหารสำหรับสุกรพันธุ์ และลูกสุกรเท่านั้น และ ฟาร์ม A, B, C, D และ I ไม่ได้เก็บข้อมูลการใช้ยาไว้ก่อนปี 2552 เนื่องจากมีการปรับโปรแกรมยาไปตามปัญหาโรคที่เกิดในฟาร์มอยู่เสมอ แต่จากแบบสอบถามในปีที่ 1 การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตสุกร แต่ทั้งนี้จะปรับเปลี่ยนไปตามข้อมูลการระบาดของโรคในแต่ละปี และกลไกการตลาดของการค้าเวชภัณฑ์ จากการศึกษาในครั้งนี้ ฟาร์ม E และ D เป็นฟาร์มที่มีแนวโน้มการใช้ยาที่น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับฟาร์มอื่นๆ และฟาร์ม C มีการใช้ยาปฏิชีวนะในระดับปานกลางคือ มีการใช้ยาปฏิชีวนะไม่เกิน 2 ชนิดต่อช่วงอายุ และเป็นยาที่มีการใช้ในสัตว์เท่านั้น และฟาร์มทั้ง 3 อยู่ในเขตจังหวัดทางภาคเหนือทั้งสิ้น ในขณะที่ฟาร์มจากส่วนภาคอื่นๆ มีการใช้ยาปฏิชีวนะมากกว่า 2 ชนิด อีกทั้งเป็นยาที่มีการใช้ในวงกว้างในคนอีกด้วยเช่น amoxicillin, enrofloxacin และ sulfamethoxazole พบการใช้ยาในกลุ่มเดียวกันในช่วงอายุของสุกรหนึ่งได้แก่ การใช้ร่วมระหว่าง tiamulin และ valnemulin ในฟาร์ม F และ G กับ chlortetracycline กับ tetracycline ในฟาร์ม I พบการใช้ colistin และ haquinol ในฟาร์ม A และ H ตามลำดับ

จะพบว่ายาต้านจุลชีพทั้ง 6 ชนิด ที่ใช้ในการประเมินค่าความไวรับ มีการใช้อย่างกว้างขวางในฟาร์มที่สำรวจ ใน**ตารางที่ 4** แสดงภาพรวมค่าความไวรับของยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Mycoplasma* spp. ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทย โดยไม่แยกชนิดของเชื้อและพื้นที่ในการเก็บเชื้อ เชื้อมัยโคพลาสมาจำนวน 209 เชื้อ มีค่า MIC_{90} ต่อยา enrofloxacin และ tylosin ที่สูงกว่าค่ามาตรฐาน (break point) ดังนั้นควรต้องพิจารณาเฝ้าระวังการประเมินประสิทธิภาพการใช้ยาต้านจุลชีพทั้ง 2 ชนิดนี้ เมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์การดื้อยาพบว่า เชื้อมีความดื้อต่อ tylosin สูงสุด (40.2%) รองลงมาคือ enrofloxacin (38.3%) ในขณะที่น้อยกว่า 6% ของเชื้อที่ศึกษามีความดื้อต่อ doxycycline และ lincomycin แต่ไม่พบการดื้อยาต่อ tiamulin และ valnemulin เลย

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบค่าความไวรับในหน่วย minimal inhibitory concentration (MIC) และ สัดส่วนการดื้อยา (%) ของ *Mycoplasma* spp.[a] ที่แยกจากสุกรอนุบาลและสุกรขุน (N=209) ต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด

ยาต้านจุลชีพ	MIC (µg/ml)			การดื้อยา (%)	Breakpoint[b] (µg/ml)
	Range	MIC_{50}	MIC_{90}		
Doxycycline	<0.048-25	1.56	6.25	6/209 (2.9)	≥ 16
Enrofloxacin	<0.048-50	1.56	25	80/209 (38.3)	≥ 2
Lincomycin	<0.006- >12.5	0.78	3.12	11/209 (5.3)	> 8
Tiamulin	<0.006-1.56	0.19	0.78	0/209 (0)	≥ 16
Tylosin	<0.006- >12.5	3.12	12.5	84/209 (40.2)	≥ 4
Valnemulin	<0.006-0.048	<0.006	0.024	0/209 (0)	≥ 16

[a] *Mycoplasma* spp. ทดสอบในจำนวน 26, 13 และ 170 strains ของ *M. hyopneumoniae. M. hyosynoviae* และ *M. hyorhinis* ตามลำดับ

[b] Hannan, 2000.

เมื่อพิจารณาตามชนิดของเชื้อ *Mycoplsama* spp. แบ่งเป็น *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* และ *M. hyorhinis* และใช้เชื้อมาตรฐาน J, S-16, และ BTS-7 เป็นกลุ่มควบคุมการทดลอง แสดงใน**ตารางที่ 5** จากค่า MIC_{90} ของ *M. hyosynoviae* อยู่ในช่วงที่ดื้อ (resistance) ต่อ doxycycline และช่วงกลาง (intermediate) ต่อ enrofloxacin, lincomycin และ tiamulin ยังไม่พบเชื้อ *M. hyopneumoniae.* ที่ดื้อยาจากการทดสอบจากสารต้านจุลชีพที่นำมาทดสอบ ยกเว้นการดื้อต่อ enrofloxacin ที่แสดงค่า MIC_{90} เท่ากับ 3.12 µg/ml เชื้อ *M. hyorhinis* ดื้อต่อ enrofloxacin, และ tylosin ที่ระดับ 25 และ 12.5 µg/ml ตามลำดับ เชื้อมีการดื้อในระดับปานกลางต่อ lincomycin และ doxycycline แต่ก็พบเชื้อที่ดื้อต่อ lincomycin ที่ระดับ > 12.5 µg/ml ด้วย จากผลการทดลองเชื้อ *M. hyopneumoniae* มีระดับการดื้อต่อยาที่ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงความไวรับของ *M. hyosynoviae* และ *M. hyorhinis* อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบความไวรับจากช่วงความเข้มข้นได้นำไปสรุปเป็นเปอร์เซนต์การดื้อยาของเชื้อแต่ละชนิดใน**ตารางที่ 6** พบว่าเชื้อมัยโคพลาสมาต่างชนิดกัน มีค่า MICs ต่อ doxyxycline, enrofloxacin และ

tylosin ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) และไม่พบเชื้อที่มีการดื้อยาต่อ tiamulin และ valnemulin จากข้อมูลใน**ตารางที่ 3** ที่พบ *Mycoplasma* spp. ที่ดื้อต่อ enrofloxacin และ tylosin มากที่สุดนั้นเป็นผลจากการดื้อของเชื้อ *M. hyorhinis* (41.8-48.8%) และเชื้อ *M. hyopneumoniae* ต่อ enrofloxacin (34.6%) ในขณะที่พบการดื้อยาของเชื้อ *M. hyosynoviae* ต่อ doxycycline เป็นหลัก (46.2%) รองลงมาคือ tylosin (7.1%)

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบค่าความไวรับในหน่วย minimal inhibitory concentration (MIC) และสัดส่วนการดื้อยา (%) ของ *Mycoplasma* spp. ต่างชนิด ที่แยกจากสุกรอนุบาลและสุกรขุน ต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด

ยาต้านจุลชีพ	ชนิด	MIC (µg/ml)				Breakpoint[c]
		Range	MIC_{50}	MIC_{90}	Ref[b]	(µg/ml)
Doxycycline	MH	0.78-6.25	1.56	3.12	0.78	
	MHS	<0.048-25	25	25	0.78	≥ 16
	MHR	<0.048-12.5	1.56	6.25	0.78	
Enrofloxacin	MH	0.37-3.12	0.78	3.12	0.19	
	MHS	0.048-1.56	0.78	1.56	1.56	≥ 2
	MHR	<0.048-50	1.56	25	1.56	
Lincomycin	MH	0.097-0.78	0.19	0.39	0.39	
	MHS	0.097-3.12	0.78	3.12	0.39	≥ 8
	MHR	<0.006- >12.5	1.56	6.25	0.78	
Tiamulin	MH	0.024-0.19	0.097	0.097	0.097	
	MHS	<0.006-0.024	0.012	0.024	0.012	≥ 16
	MHR	<0.006-1.56	0.39	0.78	0.19	
Tylosin	MH	0.024-0.39	0.097	0.19	0.19	
	MHS	0.78-6.25	1.56	3.12	0.048	≥ 4
	MHR	<0.006- >12.5	3.12	12.5	0.19	
Valnemulin	MH	<0.006	<0.006	<0.006	<0.006	
	MHS	<0.006	<0.006	<0.006	<0.006	≥ 16
	MHR	<0.006-0.048	<0.006	0.024	<0.006	

[a] MH=*M. hyopneumoniae*; MHS=*M. hyosynoviae*; MHR=*M. hyorhinis* ที่จำนวน 26, 13, และ 170 เชื้อ ตามลำดับ

[b] Ref = Reference type strains: J, S-16, และ BTS-7 สำหรับ *M. hyopneumoniae, M. hyosynoviae*, และ *M. hyorhinis* ตามลำดับ [c] Hannan, 2000.

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การดื้อยา (%) ของ *Mycoplasma* spp. แต่ละชนิดต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด

ยาต้านจุลชีพ	ชนิด	ค่าความไวรับ (%)		*P*-Value
		ไวยา	ดื้อยา	
Doxycycline	MH	25/26 (96.2)	0/26 (0)	<0.001
	MHS	2/13 (15.4)	6/13 (46.2)	
	MHR	148/170 (87.1)	0/170 90)	
Enrofloxacin	MH	10/26 (38.5)	9/26 (34.6)	<0.001
	MHS	4/13 (30.8)	0/13 (0)	
	MHR	7/170 (4.1)	71/170 (41.8)	
Lincomycin	MH	26/26 (100)	0/26 (0)	0.436
	MHS	13/13 (100)	0/13 (0)	
	MHR	159/170 (93.5)	11/170 (6.5)	
Tiamulin	MH	26/26 (100)	0/26 (0)	-
	MHS	13/13 (100)	0/13 (0)	
	MHR	170/170 (100)	0/170 (0)	
Tylosin	MH	26/26 (100)	0/26 (0)	<0.001
	MHS	3/13 (23.1)	1/13 (7.1)	
	MHR	15/170 (8.8)	83/170 (48.8)	
Valnemulin	MH	26/26 (100)	0/26 (0)	-
	MHS	13/13 (100)	0/13 (0)	
	MHR	170/170 (100)	0/170 (0)	

[a] MH=*M. hyopneumoniae*; MHS=*M. hyosynoviae*; MHR=*M. hyorhinis* ที่จำนวน 26, 13, และ 170 เชื้อ ตามลำดับ

จาก**ตารางที่ 7** แสดงค่า MICs และการดื้อยาของเชื้อ *M. hyorhinis* ต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความแตกต่างระหว่างสุกรอนุบาลและสุกรขุนที่โรงฆ่า ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากแนวโน้มของการดื้อยาพบว่าในประชากรสุกรขุนมีโอกาสพบเชื้อ *M. hyorhinis* ดื้อยามากกว่ากลุ่มสุกรอนุบาล และมีความแตกต่างของค่า MIC_{90} ในระหว่างกลุ่มไม่เกิน 2 เท่า ดังนั้นในภาพรวม การพัฒนาการดื้อยาอาจไม่ได้เกิดจากระยะเวลาของการให้ยาปฏิชีวนะในวงจรการเลี้ยง หากแต่ต้องพิจารณาในแต่พื้นที่และโปรแกรมการให้ยาในแต่ละฟาร์มเป็นสำคัญ

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ของค่า MICs และเปอร์เซนต์การดื้อยาของเชื้อ *M. hyorhinis* ที่แยกได้จากสุกรอนุบาลและสุกรขุน

ยาต้านจุลชีพ	อายุ[a]	MIC (µg/ml)			การดื้อยา[b]	*P*-value
		Range	MIC_{50}	MIC_{90}	(%)	
Doxycycline	อนุบาล	<0.048-12.5	1.56	6.25	0/91 (0)	-
	ขุน	<0.048-12.5	1.56	3.12	0/91 (0)	
Enrofloxacin	อนุบาล	<0.048-50	1.56	25	37/91 (40.7)	0.749
	ขุน	<0.048-50	1.56	25	34/79 (43.0)	
Lincomycin	อนุบาล	<0.006->12.5	0.78	3.12	4/91 (4.4)	0.107
	ขุน	<0.006->12.5	1.56	6.25	7/79 (8.9)	
Tiamulin	อนุบาล	<0.006-1.56	0.39	0.78	0/91 (0)	-
	ขุน	<0.006-1.56	0.39	0.78	0/79 (0)	
Tylosin	อนุบาล	<0.006->12.5	3.12	12.5	39/91 (42.9)	0.306
	ขุน	<0.006->12.5	6.25	>12.5	44/79 (55.7)	
Valnemulin	อนุบาล	<0.006-0.024	<0.006	0.024	0/91 (0)	-
	ขุน	<0.006-0.048	<0.006	0.024	0/79 (0)	

[a] อนุบาล อายุ 6-8 สัปดาห์ (N=91); สุกรขุนที่โรงฆ่า (N=79)

[b] Hannan, 2000

ทำการเปรียบเทียบเปอร์เซนต์จากดื้อยาของเชื้อ *M. hyopneumoniae* ที่แยกได้จากสุกร 5 ฟาร์ม เชื้อ *M. hyosynoviae* ที่แยกได้จากสุกร 2 ฟาร์ม และเชื้อ *M. hyorhinis* ที่แยกได้จากสุกรทั้ง 9 ฟาร์ม แสดงใน**ตารางที่ 8** เชื้อ *M. hyopneumoniae* มีการดื้อต่อ enrofloxacin ที่ 12.5-75% ในฟาร์ม B, C, D และ Fซึ่งไม่พบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างฟาร์มทั้ง 4 แต่ในฟาร์ม E ที่มีการผสมยาเพียงชนิดเดียวคือ tiamulin (**ตารางที่ 2**) ปรากฏว่าไม่พบการดื้อของเชื้อต่อยาทั้ง 6 ชนิดที่ทำการทดสอบ ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าการเลี้ยงแบบที่มีการใช้ยา tiamulin ชนิดเดียว อาจไม่ส่งผลต่อการดื้อยาร่วม (multidrug resistance, MDR) ของเชื้อ *M. hyopneumoniae* ที่หมุนเวียนในฟาร์ม การทดลองนี้สามารถแยกเชื้อ *M. hyosynoviae* ได้จากฟาร์ม A และ B เท่านั้น ซึ่งก็พบการดื้อต่อ doxycycline เพียงชนิดเดียว (20-62.5%) เชื้อ *M. hyorhinis* ที่ได้จากในฟาร์ม E ไม่พบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพใดยกเว้นต่อ tylosin (87.5%) ระบบการใช้ยาปฏิชีวนะของฟาร์ม E ถือว่ามีผลต่อการพัฒนาการดื้อยาน้อยที่สุด และไม่พบ

ปัญหาการติดเชื้อ *M. hyorhinis* ซึ่งน่าจะใช้เป็นฟาร์มต้นแบบของระบบการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มสุกร รองลงมาคือฟาร์ม C ที่มีการใช้ tylosin สลับกับ tiamulin พบว่าเชื้อ *M. hyorhinis* ที่ได้จากฟาร์มนี้มีรูปแบบการดื้อที่คล้ายกับ ฟาร์ม E และพบการดื้อยาของ *M. hyopneumoniae* น้อยว่าฟาร์ม B, E และ F อย่างไรก็ตามหากพิจารณาถึงสภาวะการติดเชื้อร่วมกับสัดส่วนของเชื้อดื้อยา ฟาร์ม G ที่มีการใช้ยามากกว่า 3 ชนิดก็สามารถลดการติดเชื้อของ *Mycoplasma* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งมีรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ *M. hyorhinis* ที่คล้ายกับฟาร์ม E แต่ไม่ถูกนำมาพิจารณาเป็นฟาร์มต้นแบบ เนื่องจากมีต้นทุนการลงทุนที่สูงซึ่งเสียไปกับค่ายาปฏิชีวนะที่ใช้ในทุกช่วงอายุ นอกจากนี้ฟาร์ม F ซึ่งอยู่ในพื้นที่ภาคตะวันตกและมีการใช้ยาปฏิชีวนะในสูตรที่คล้ายกับฟาร์ม G กลับพบการกระจายของเชื้อที่มากกว่า และมีเชื้อที่มีความสามารถในการดื้อต่อยาหลายชนิดในระดับสูง ดังนั้นนอกจากสูตรของยาปฏิชีวนะแล้ว ควรคำนึงถึงความแตกต่างของปัจจัยด้านการควบคุมเชื้อภายในฟาร์มด้วยระบบสุขาภิบาลด้วย

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบความแตกต่างของเปอร์เซนต์การดื้อต่อยาของเชื้อ *Mycoplasma* spp. แต่ละชนิด ในฟาร์มที่ศึกษา 9 ฟาร์ม

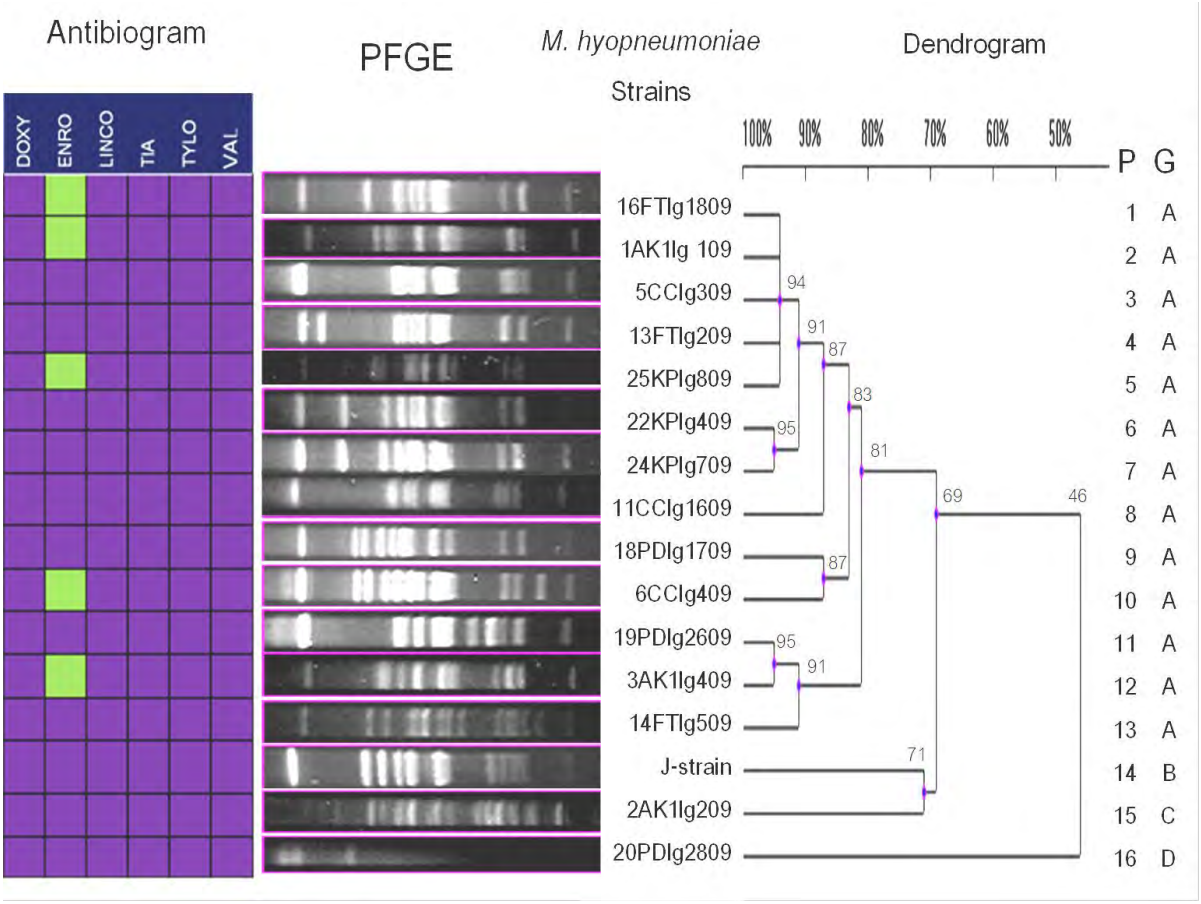
ชนิด	Doxycycline		Enrofloxacin		Lincomycin		Tiamulin		Tylosin		Valnemulin	
/ฟาร์ม	MIC_{90}	%R	MIC_{90}	%R	MIC_{90}	%R	MIC_{90}	%R	MIC_{90}	%R	MIC_{90}	%R
M. hyopneumoniae												
B	1.56	0	3.12	75	0.19	0	0.097	0	0.097	0	<0.006	0
C	3.12	0	3.12	12.5	0.39	0	0.097	0	0.097	0	<0.006	0
D	3.12	0	3.12	40	0.78	0	0.19	0	0.19	0	<0.006	0
E	6.25	0	1.56	0	0.19	0	0.097	0	0.19	0	<0.006	0
F	3.12	0	3.12	50	0.39	0	0.19	0	0.39	0	<0.006	0
M. hyosynoviae												
A	25	62.5	1.56	0	3.12	0	0.024	0	3.12	0	<0.006	0
B	25	20	1.56	0	3.12	0	0.024	0	6.25	20	<0.006	0
*M. hyorhinis**												
A	6.25	0	6.25	87.5	3.12	0	0.78	0	12.5	62.5	0.012	0
B	12.5	0	3.12	11.5	1.56	0	0.39	0	6.25	26.2	0.012	0
C	3.12	0	1.56	0	3.12	0	0.78	0	12.5	100	0.048	0
D	1.56	0	3.12	20	3.12	0	0.39	0	>12.5	100	0.024	0
E	3.12	0	1.56	0	6.25	0	0.78	0	12.5	87.5	0.024	0
F	3.12	0	50	80.3	>12.5	18	0.78	0	>12.5	42.6	0.024	0
G	1.56	0	1.56	0	3.12	0	0.39	0	12.5	66.7	0.012	0
H	3.12	0	12.5	100	3.12	0	0.39	0	12.5	80	0.024	0
I	6.25	0	12.5	25	6.25	0	0.78	0	>12.5	100	0.024	0

*$P<0.05$ สำหรับ MIC_{90}

3. ผลการศึกษาลายนิ้วมือดีเอนเอของเชื้อมัยโคพลาสมา

ข้อมูลจากแบบสอบถาม และขั้นตอนการเพาะเชื้อ สรุปเป็นข้อมูลของแต่ละเชื้อเพื่อใช้ทดสอบ PFGE ดัง**ตารางที่ 1** ถึง **ตารางที่ 4** ใน**ภาคผนวก** นำผลลายนิ้วมือดีเอนเอที่ได้มาวิเคราะห์การเปรียบเทียบในรูปแบบของพงศาวลี (dendrogram) ร่วมกับผลรูปแบบการดื้อยา (antibiogram) ของเชื้อมัยโคพลาสมา เพื่อหาความสอดคล้องระหว่างสายพันธุ์ รูปแบบการดื้อยา และแหล่งที่มา

เชื้อ *M. hyopneumoniae* จำนวน 15 เชื้อ มีรูปแบบการดื้อยา 2 แบบ แต่แบ่งกลุ่มตามรูปแบบของ PFGE ได้ 4 แบบ ที่ระดับความเหมือนที่ 0.8 ดัง**รูปภาพที่ 1** รูปแบบของ PFGE ประกอบด้วยกลุ่ม A, B, C และ D กลุ่ม A เป็นกลุ่มที่มีสมาชิกมากที่สุด และพบในสุกรทั้ง 5 ฟาร์มที่ให้ผลบวก และ กลุ่ม C และ D มีเพียงรูปแบบละ 1 เชื้อ พบในฟาร์ม B และ E ตามลำดับ เชื้อมาตรฐาน J อยู่ในกลุ่ม B ดังนั้น จากการศึกษานี้พบเชื้อ *M. hyopneumoniae* กลุ่ม A ระบาดในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคตะวันตก ของประเทศไทย และเป็นเชื้อสายพันธุ์หลักที่พบได้จากรอยโรคปอดอักเสบ อย่างไรก็ตามหากพิจารณารายละเอียดของรูปแบบภายในสมาชิกของกลุ่ม A ไม่พบเชื้อที่มี PFGE pattern เหมือนกัน 100% เลย ส่วนรูปแบบของ antibiogram ประกอบด้วย แบบที่ 1 ไม่มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพใดเลย และ แบบที่ 2 มีการดื้อต่อ enrofloxacin เท่านั้น เชื้อกลุ่ม A พบ antibiogram ทั้ง 2 แบบ ในฟาร์ม B, C, D และ F ในขณะที่รูปแบบ PFGE ในกลุ่มอื่นๆ ไม่พบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ดังนั้นจากลายพิมพ์ดีเอนเอที่ปรากฏ จึงไม่สอดคล้องกับรูปแบบการดื้อยา



รูปภาพที่ 1 แสดง dendrogram ของเชื้อ *M. hyopneumoniae* จำนวน 15 เชื้อ จาก 5 ฟาร์มที่ให้ผลบวก (B, C, D, E และ F) และ J-strain (เชื้อมาตรฐาน) เปรียบเทียบกับรูปแบบการดื้อยา (antibiogram)

สีเขียวหมายถึงพบการดื้อยาของเชื้อ

สีม่วงหมายถึงไม่พบการดื้อยาของเชื้อ

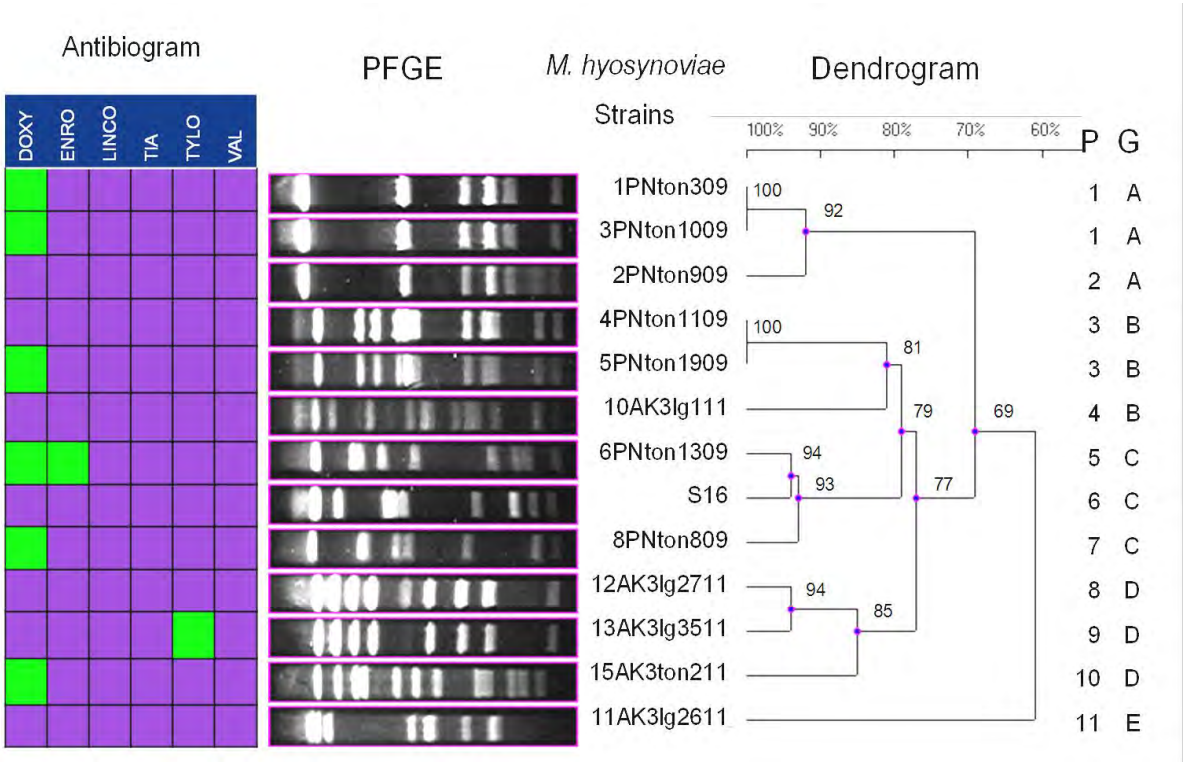
DOXY=doxycycline; ENRO=enrofloxacin; LINCO=lincomycin; TIA=tiamulin; TYLO=tylosin; VAL=valnemulin)

P หมายถึง รูปแบบ PFGE

G หมายถึง ผลการจัดกลุ่ม (similarity > 80%)

เชื้อ *M. hyosynoviae* จำนวน 12 เชื้อ จากฟาร์ม A จากภาคตะวันออก และฟาร์ม B จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบรูปแบบของลายนิ้วมือดีเอนเอทั้งสิ้น 5 แบบ ได้แก่ A-E โดยเชื้อมาตรฐาน S16 อยู่ในกลุ่ม C และพบรูปแบบการดื้อยา antibiogram ทั้งหมด 4 แบบ ดัง**รูปภาพที่ 2** รูปแบบของ PFGE กลุ่ม B พบว่ามีอยู่ในสุกรทั้ง 2 ฟาร์มที่สำรวจ แต่กลุ่มรูปแบบ PFGE กลุ่ม A และ C พบในฟาร์ม A เท่านั้น เช่นเดียวกับรูปแบบในกลุ่ม D และ E ที่ได้จากฟาร์ม B เท่านั้น เมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์ความเหมือนของรูปแบบลายนิ้วมือดีเอนเอ เชื้อในกลุ่ม A มีความใกล้เคียงกันเชิงอณูชีวโมเลกุลมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่ม B จากภาพรวม เชื้อ *M. hyosynoviae* มีความหลากหลายสูงในเชิงพันธุกรรม และมีการกระจายในพื้นที่ที่จำเพาะ ยกเว้นกลุ่ม B ที่

พบจากสุกรทั้ง 2 พื้นที่ที่สำรวจ ลักษณะของ antibiogram พบว่ามี 4 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 ไม่มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพใดเลย แบบที่ 2 มีการดื้อต่อ doxycycline แบบที่ 3 มีการดื้อต่อ tylosin และแบบที่ 4 มีการดื้อต่อทั้ง doxycycline และ enrofloxacin เมื่อพิจารณารูปแบบ PFGE ร่วมกับ antibiogram พบว่าเชื้อทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่ม E มีความสามารถในการดื้อต่อ doxycycline พบเชื้อในกลุ่ม C ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะร่วม 2 ชนิด คือ doxycycline และ enrofloxacin เชื้อจากฟาร์ม A มี antibiogramแบบที่ 1, 2, 4 ในขณะที่เชื้อจากฟาร์ม B พบมี antibiogram แบบที่ 1, 2, 3 ดังนั้นรูปแบบ PFGE ของเชื้อ *M. hyosynoviae* ไม่มีความสอดคล้องกันรูปแบบการดื้อยา และแต่พบความจำเพาะในด้านพื้นที่ที่ตรวจพบเช่นกัน



รูปภาพที่ 2 แสดง dendrogramของ *M. hyosynoviae* 12 เชื้อจาก 2 ฟาร์ม (A, B) และ S16 strain (เชื้อมาตรฐาน) เปรียบเทียบกับรูปแบบการดื้อยา (antibiogram)

สีเขียวหมายถึงพบการดื้อยาของเชื้อ

สีม่วงหมายถึงไม่พบการดื้อยาของเชื้อ

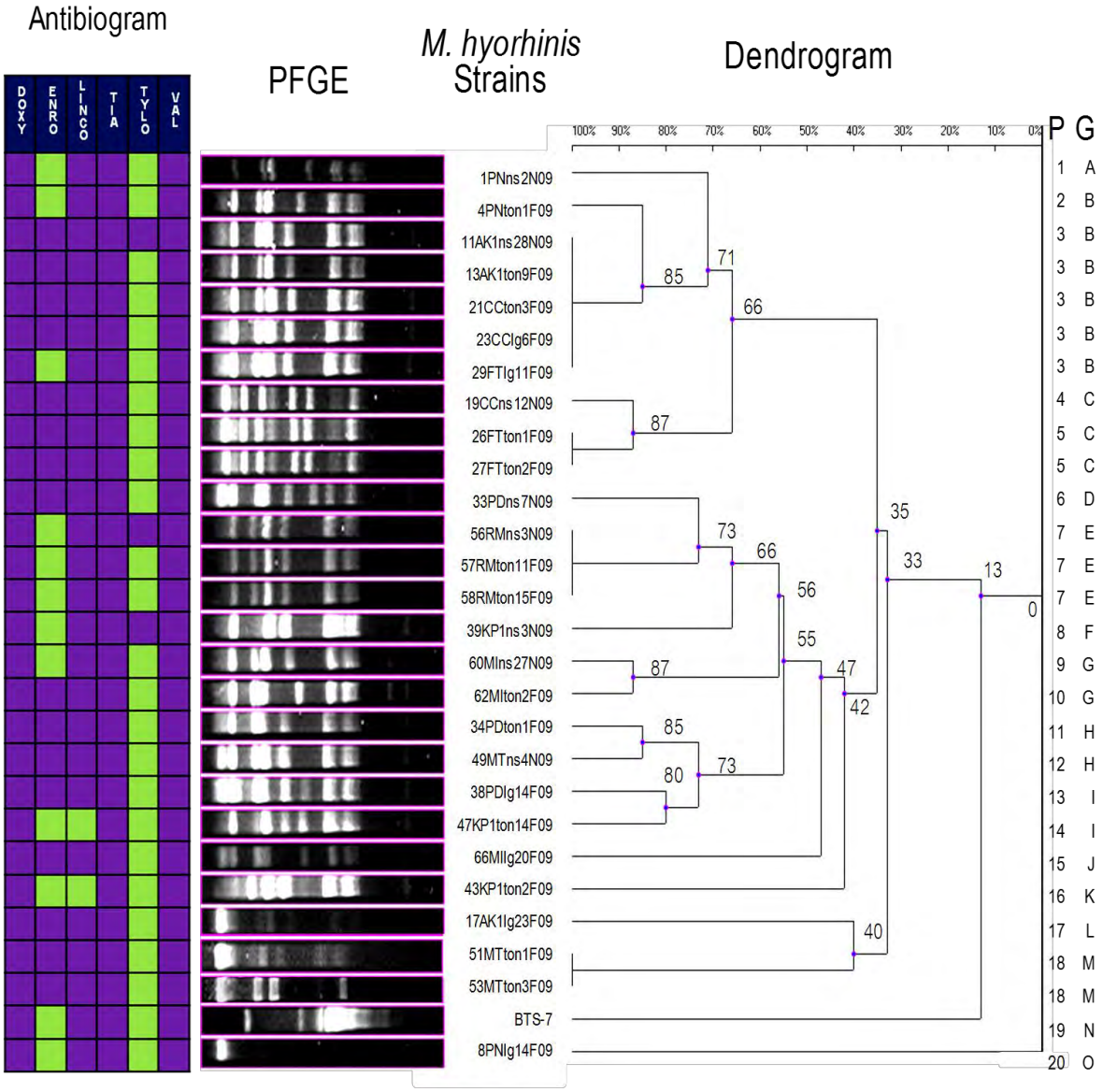
DOXY=doxycycline; ENRO=enrofloxacin; LINCO=lincomycin; TIA=tiamulin; TYLO=tylosin; VAL=valnemulin)

P หมายถึง รูปแบบ PFGE

G หมายถึง ผลการจัดกลุ่ม (similarity > 80%)

จากการศึกษาแบบ cross sectional เชื้อ *M. hyorhinis* จำนวน 20 เชื้อ **(ตารางที่ 3 ภาคผนวก)** ใช้เป็นตัวแทนที่แยกได้จาก 9 ฟาร์ม ที่พบรูปแบบของลายนิ้วมือดีเอนเอทั้งสิ้น 15 แบบ ได้แก่ A-0 โดยเชื้อมาตรฐาน BTS-7 อยู่ในกลุ่ม N และพบรูปแบบการดื้อยา antibiogram ทั้งหมด 5 แบบ คือ แบบที่ 1 ไม่มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพใดเลย แบบที่ 2 ดื้อต่อ enrofloxacinแบบที่ 3 ดื้อต่อ tylosin แบบที่ 4 ดื้อต่อ enrofloxacin และ tylosin และ แบบที่ 5 ดื้อต่อ enrofloxacin, lincomycin และ tylosin ดัง**รูปภาพที่ 3** เชื้อที่แยกได้จากในฟาร์ม H มีรูปแบบของ PFGE ที่จำเพาะที่สุด ซึ่งอยู่ในกลุ่ม E พบว่าเชื้อที่เลือกมาวิเคราะห์ทั้ง 3 เชื้อ มีความเหมือนกันถึง 100% แต่กลับแสดงรูปแบบการดื้อยาที่แตกต่างกัน รูปแบบ PFGE ในกลุ่ม B ก็มีความเหมือนกันสูงเช่นเดียวกัน แต่พบรูปแบบของเชื้อได้จาก 3 ฟาร์ม ได้แก่ B, C และ D ซึ่งก็ไม่สอดคล้องกับรูปแบบการดื้อยาเช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณาตามช่วงอายุ พบความหลากหลายของเชื้อที่ได้จากสุกรขุมมากกว่าสุกรอนุบาล เชื้อจากสุกรอนุบาลพบรูปแบบของ PFGE ทั้งสิ้น 8 กลุ่ม รูปแบบที่จำเพาะในช่วงอายุนี้คือ A, D และF เชื้อจากสุกรขุนพบทั้งสิ้น 11 รูปแบบที่จำเพาะในช่วงอายุนี้ คือ กลุ่ม I, J, K, L และ M และ O รูปแบบที่พบได้ทั้ง 2 ช่วงอายุ คือ B, C, E, G และ H ผู้วิจัยได้ทำการสำรวจด้วยการเก็บตัวอย่างแบบต่อเนื่อง (longtitudinal study) จากฟาร์ม B ที่มีรูปแบบของ PFGE ในกลุ่ม B และ L และฟาร์ม F ที่มีรูปแบบของ PFGE ในกลุ่ม F, I และ K **(ตารางที่ 4 ภาคผนวก)**

ในการเก็บตัวอย่างต่อเนื่อง เชื้อที่มี PFGE pattern เหมือนกัน 100% คือ pattern ที่ 8 ในกลุ่ม C ซึ่งเชื้อเหล่านี้แยกได้จากปอดของสุกรในฟาร์ม F จากการเก็บครั้งที่ 2 และ 3 (F2, F3) และ pattern 9 ในกลุ่ม D ซึ่งเชื้อเหล่านี้แยกได้จากปอดและทอนซิลของสุกรในการเก็บครั้งที่ 3 ของฟาร์ม B (B3) ลักษณะทางพันธุกรรมที่พบมี PFGE pattern 11 รูปแบบ ในกลุ่ม A, B, C, D, E และ F มีรูปแบบการดื้อยาทั้งสิ้น 5 แบบ คือ แบบที่ 1 ไม่มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพใดเลย แบบที่ 2 ดื้อต่อ enrofloxacin แบบที่ 3 ดื้อต่อ tylosinแบบที่ 4 ดื้อต่อ enrofloxacin และ tylosin และ แบบที่ 5 ดื้อต่อ enrofloxacin, lincomycin และ tylosin (**รูปภาพที่ 4**) เชื้อที่ได้จากสุกรในฟาร์ม B มีความหลายหลายสูงในรูปแบบลายนิ้วมือ DNA คือ พบถึง 5 รูปแบบ แต่เชื้อจากฟาร์ม F เพียงรูปแบบ C เพียงแบบเดียว ดังนั้นจากลักษณะการใช้ยาของฟาร์ม F เป็นแบบที่มีการใช้ร่วมของยาปฏิชีวนะมากกว่า 3 ชนิดขึ้นไป และใช้ทุกช่วงอายุ ไม่ได้ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุกรรมแต่พบความหลากหลายของรูปแบบการดื้อยาถึง 3 แบบ ซึ่ง 1 ในนั้นดื้อต่อยาปฏิชีวนะถึง 3 ชนิด ในทางกลับกันเชื้อที่ได้จากฟาร์ม B มีความหลายหลายสูง ทั้งที่ใช้ยาปฏิชีวนะเพียง 1 ชนิดในช่วงสุกรเล็กและอนุบาล ดังนั้นข้อมูลการสำรวจด้าน แหล่งรับซื้อลูกสุกร พ่อแม่พันธุ์ และลักษณะการสุขาภิบาลภายในฟาร์มอาจต้องนำมาพิจารณาเพื่อตอบความหลายหลายนี้ นอกจากนี้พบความเหมือนกันของเชื้อที่ได้จากต่างอวัยวะแตกต่างกันแต่พบในสุกรตัวเดียวกัน ข้อมูลนี้อาจแสดงถึงความแข็งแรงทางด้านพันธุกรรม (genetic fitness cost) ที่คงอยู่ในธรรมชาติของเชื้อ ซึ่งระบบการให้ยาที่แตกต่างและระยะเวลาการให้ยา อาจไม่ได้มีผลต่อความหลากหลายของสายพันธุ์



รูปภาพที่ 3 แสดง Dendrogramของ *M. hyorhinis* 27 strains จาก 9 ฟาร์ม โดยการเก็บตัวอย่างแบบ cross-sectional และ BTS-7 strain (เชื้อมาตรฐาน) เปรียบเทียบกับรูปแบบการดื้อยา (antibiogram)

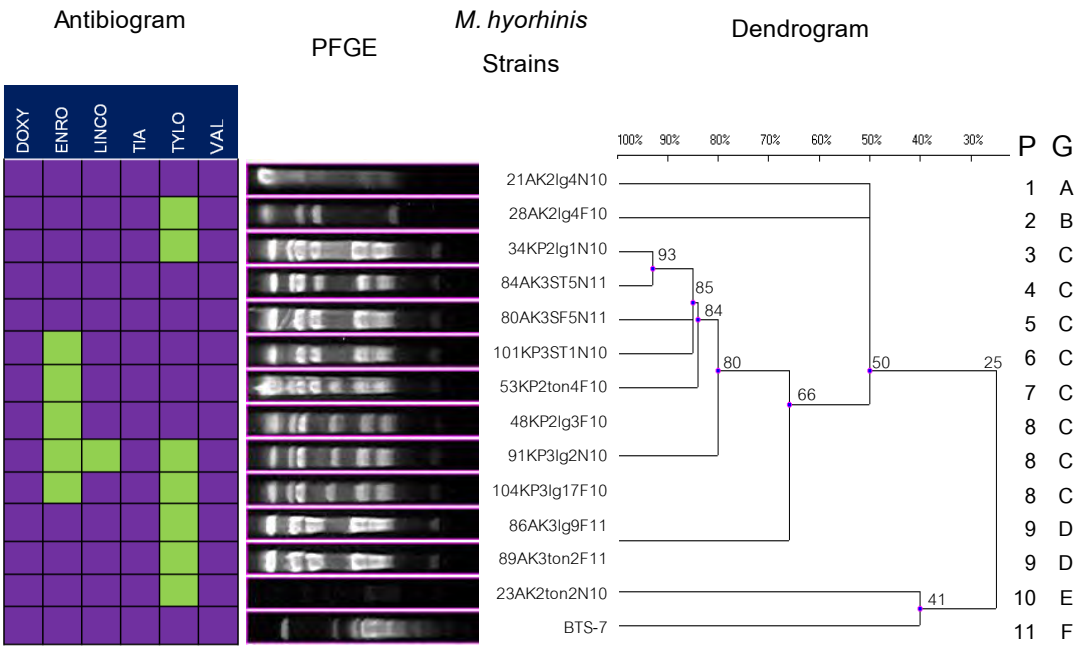
สีเขียวหมายถึงพบการดื้อยาของเชื้อ

สีม่วงหมายถึงไม่พบการดื้อยาของเชื้อ

DOXY=doxycycline; ENRO=enrofloxacin; LINCO=lincomycin; TIA=tiamulin; TYLO=tylosin; VAL=valnemulin)

P หมายถึง รูปแบบ PFGE

G หมายถึง ผลการจัดกลุ่ม (similarity > 80%)



รูปภาพที่ 4 แสดง Dendrogramของ *M. hyorhinis* 13 เชื้อจาก 2 ฟาร์ม (B และ F) โดยการเก็บตัวอย่างแบบ longitudinal และ BTS-7 strain (เชื้อมาตรฐาน) เปรียบเทียบกับรูปแบบการดื้อยา (antibiogram)

สีเขียวหมายถึงพบการดื้อยาของเชื้อ

สีม่วงหมายถึงไม่พบการดื้อยาของเชื้อ

DOXY=doxycycline; ENRO=enrofloxacin; LINCO=lincomycin; TIA=tiamulin; TYLO=tylosin; VAL=valnemulin)

P หมายถึง รูปแบบ PFGE

G หมายถึง ผลการจัดกลุ่ม (similarity > 80%)

สรุปการกระจายเชิงระบาดวิทยาโมเลกุลของเชื้อมัยโครพลาสมาทั้ง 3 ชนิดที่พบในฟาร์มที่สำรวจแสดงข้อมูลแยกตามความแตกต่างของพื้นที่ดัง**ตารางที่ 9**

ตารางที่ 9 แสดงการกระจายตัวของกลุ่มของมัยโคพลาสมาที่พบในแต่พื้นที่ในประเทศไทย

ชนิดเชื้อ*	เฉพาะพื้นที่	รูแปบบ PFGE ที่พบในแต่ละพื้นที่				
		ภาคเหนือ	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ภาคตะวันออก	ภาคตะวันตก	Type strain**
MH	เฉพาะ	-	C	ไม่มีเชื้อ	D	B
	ไม่เฉพาะ	A	A	ไม่มีเชื้อ	A	-
MHS	เฉพาะ	ไม่มีเชื้อ	D, E	A	ไม่มีเชื้อ	-
	ไม่เฉพาะ	ไม่มีเชื้อ	B	B, C	ไม่มีเชื้อ	C
MHR	เฉพาะ	C, D	E, L	A, O	F, K, M	N
	ไม่เฉพาะ	B, H, I	B, G, J	B	G, H, I, J	-

*MH=*M. hyopneumoniae*; MHS=*M. hyosynoviae*; MHR=*M. hyorhinis*

**J, S16 และ BTS-7 สำหรับเชื้อ *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae*และ *M. hyorhinis*ตามลำดับ

บทวิจารณ์

จากรายงานในปี 2554 ได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบวิธีการและขั้นตอนการตรวจ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือที่สุด โดยทั่วไปแล้วด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) ไม่ได้เป็นวิธีที่สามารถแยกผลบวกปลอมที่ได้จาก DNA ของเชื้อที่ตายแล้ว ในขณะที่การเพาะเชื้อจะสามารถตรวจได้เฉพาะเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น (Dussurget and Roulland-Dussoix, 1994) การตรวจจากเนื้อเยื่อปอดด้วยวิธี PCR โดยตรง (DP) เป็นวิธีที่ให้ความถูกต้องมากกว่า ดังนั้นจึงสามารถแนะนำให้ใช้ตรวจเพื่อคัดกรองพาหะและสัตว์อมโรคในฟาร์มได้อย่างถูกต้อง (Kurth et al., 2002) สำหรับการตรวจเชื้อ *M. hyosynoviae* ในทอนซิล พบเชื้อในทอลซิลซึ่งเป็นอวัยวะเก็บเชื้อตามหน้าที่ของต่อมน้ำเหลือง ไม่ได้แสดงสถานภาพการติดเชื้อในปัจจุบันเหมือนกับการพบเชื้อที่ปอด หรือ น้ำในข้อต่อ (Nielsen et al., 2005) โดยอาจพบว่าเชื้อจะไม่ปรากฏในส่วนดังกล่าวหลังจากที่ติดเชื้อได้ 3 สัปดาห์ หรืออยู่ในระยะเรื้อรังก็จะพบคงทนอยู่ในทอนซิลเท่านั้น ดังนั้นการพิจารณาควรร่วมกับอาการทางคลินิกหรือรอยโรคของสุกร (Hagedorn-Olsen et al., 1999a) การตรวจ *M. hyorhinis* จากน้ำในข้อต่อ และทอนซิล ด้วยวิธี DP และ culture prior to PCR (CPP) ตามลำดับ ให้ผลสอดคล้องกับอาการข้อบวม ส่วนการตรวจเชื้อ *M. hyorhinis* ที่ปอดสามารถใช้วิธีใดก็ได้ในการตรวจ

เชื้อ *M. hyopneumoniae* ที่เป็นสาเหตุสำคัญของภาวะปอดอักเสบเรื้อรัง แต่เชื้อ *M. hyorhinis* ก็เป็นสาเหตุร่วมที่สำคัญด้วย (Buddle and O'Hara, 2005; Kobisch and Frey, 2003; Sibila et al., 2004) ด้วยวิธีการจัดการแบบนำสุกรแม่ลงไปเลี้ยงกับสุกรสาว เพื่อให้เกิดจากสัมผัสกันโดยตรง (gilt acclimatization) ระบบนี้จะทำให้พบเชื้อ *M. hyopneumoniae* ในปอดของสุกรในโรงเชือดมากขึ้น การทำวัคซีนให้ผลในการลดการพบเชื้อ *M. hyopneumoniae* ได้ ในการเลี้ยงแบบอุตสาหกรรมของประเทศไทยเป็นระบบที่มีการเลี้ยงอย่างหนาแน่นและเป็นระบบที่ก่อให้เกิดความเครียดต่อสัตว์ ซึ่งทำให้เกิดการแทรกผ่านของเชื้อ *M. hyosynoviae* และ *M. hyorhinis* ที่ระบบทางเดินหายใจส่วนต้นเข้าสู่กระแสโลหิต นอกจากภาวะความเครียดที่กดภูมิคุ้มกันแล้วภาวะการติดเชื้อไวรัส PRRS ก็เป็นสาเหตุที่สำคัญในการกดภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน (Hagedorn-Olsen et al., 1999a; Magnusson et al., 1998; Ross and Karmon, 1970; Sokoloff, 1973).
นอกจากวัคซีนแล้ว การป้องกันการติดเชื้อมัยโคพลาสมายังจำเป็นต้องอาศัยยาปฏิชีวนะ (Maes et al., 2008) จากข้อมูลการสำรวจในครั้งนี้ โปรแกรมการให้ยามีความแตกต่างกันตามช่วงอายุของสุกร การให้ยาในแม่สุกรตั้งท้องและลูกสุกรอนุบาล มีผลต่อการลดลงของจำนวนสุกรที่ติดเชื้อมัยโคพลาสมาชนิด *M. hyorhinis* ที่พบในปอดและน้ำจากข้อต่อ แต่ไม่ได้ลดลงช่องจมูกและทอนซิล ดังนั้นจึงเป็นข้อยืนยันว่า การวางแผนควบคุมและป้องกันได้จากเชื้อจากอวัยวะเป้าหมายเท่านั้น ไม่ใช้แหล่งเก็บเชื้ออย่างทอนซิล หรือการปนเปื้อนจากช่องจมูก การให้ยาแก่สุกรในฟาร์มทุกช่วงอายุ ไม่ได้ช่วยลดจำนวนผลบวกของการตรวจ *M. hyopneumoniae* และ *M. hyorhinis* จากปอดได้ แต่การให้ยาจะช่วยลดการเป็นพาหะของ *M. hyosynoviae* ที่พบในทอนซิลของลูกสุกรดูดนม และสุกรขุน อย่างมีนัยสำคัญ ผลจากโปรแกรมการให้ยาสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการควบคุมเชื้อ

M. hyosynoviae ในฝูงพ่อแม่พันธุ์เพื่อลดการอักเสบของข้อต่อได้ (Hagedorn-Olsen et al., 1999a; Hagedorn-Olsen et al., 1999b)

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของเชื้อมัยโคพลาสมา ทั้งสามชนิด รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 209 เชื้อ ด้วยวิธี broth microdilution method ต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด และนำค่า breakpoint มาใช้ประเมินการดื้อยาของเชื้อ (Hannan, 2000) เชื้อ *M. hyopneumoniae* จำนวน 26 เชื้อ ที่แยกได้จากปอดสุกรขุน จาก 5 ใน 9 ฟาร์ม โดยนำเชื้อที่ยังมีชีวิตทั้งหมดมาทดสอบ เชื้อ *M. hyosynoviae* จำนวน 13 เชื้อ ที่แยกได้จากปอดและทอนซิลสุกรขุน จาก 2 ใน 9 ฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง โดยนำเชื้อที่ยังมีชีวิตทั้งหมดมาทดสอบ และเชื้อ *M. hyorhinis* จำนวน 170 เชื้อ ที่แยกได้จากช่องจมูก ปอด ทอนซิล และเยื่อหุ้มข้อ ของสุกรอนุบาลอายุระหว่าง 4-8 สัปดาห์ และจากปอดและทอนซิลของสุกรขุนที่โรงฆ่า ของทั้ง 9 ฟาร์ม ที่เก็บตัวอย่าง โดยคัดเลือกให้กระจายทั่วถึงตามอวัยวะและฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง เมื่อทำการทดสอบความไวรับของเชื้ออ้างอิง (type strain) พบว่าอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ และสามารถใช้ประเมินค่าความไวรับต่อไปได้

จากภาพรวม เชื้อมัยโคพลาสมา มีค่า MIC_{90} สูงต่อ tylosin (12.5 µg/l) และ enrofloxacin (25 µg/l) โดยไม่พบการดื้อยาต่อ tiamulin และ valnemulin แม้ว่าจากข้อมูลการใช้ยาในฟาร์ม มีการใช้ tiamulin ในฟาร์มทุกฟาร์มที่ทำการทดสอบเป็นเวลามากกว่า 3 ปี ในขณะที่ไม่มีประวัติการใช้ยา lincomycin ในฟาร์มที่พบเชื้อมัยโคพลาสมา แต่พบการดื้อต่อยาตัวนี้ การใช้ tylosin ส่งผลต่อการการเกิดการดื้อยาข้ามกลุ่ม (cross-resistance) กับ lincomycin, streptogramin B และ macrolides (MLSb) ชนิดอื่นๆ ซึ่งเกิดจากจากเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลิโอไทป์เดี่ยว (point mutation) บนโครโมโซม 23S rDNA (Kobayashi et al., 2005) มีรายงานอย่างต่อเนื่องในด้านของการดื้อต่อ tylosin ในระดับสูง ของเชื้อมัยโคพลาสมาที่แยกได้จากสุกร (Aarestrup and Friis, 1998; Kobayashi et al., 1996b) อย่างไรก็ตาม พบการดื้อต่อ lincomycin เพียง 5.3% ในขณะที่การดื้อต่อ tylosin สูงถึง 40% นั่นแสดงว่าภาวะการดื้อต่อยาแบบ MLSb ของเชื้อมัยโคพลาสมาอาจไม่ได้เกิดจากกลไกที่กล่าวมาเพียงอย่างเดียว แต่หากเกี่ยวข้องกับการขับออกของยาและการส่งผ่านสารพันธุกรรมร่วมด้วย (Bebear and Pereyre, 2005) การศึกษาในประเทศไทยเป็นรายงานเดียวที่พบเชื้อที่ดื้อต่อ enrofloxacin ซึ่งปกติกลไกการดื้อต่อยาต้องอาศัยการปรับเปลี่ยนทางพันธุกรรมที่ซับซ้อนกว่า ข้อมูลนี้เป็นข้อมูลที่สำคัญในการบังคับใช้กฎ ข้อห้ามการใช้ยาบางประเภทในสัตว์อย่างเข้มงวด ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของอุบัติการณ์ของเชื้อมันโคพลาสมาดื้อยา ที่มาจากสายพันธุ์จากสัตว์ ก่ออาการไข้ไม่ทราบสาเหตุในคนเลี้ยงและนักวิทยาศาสตร์ (Hoelzle et al., 2007; Hoelzle, 2007)

เมื่อแยกพิจารณาในแต่ละสปีชีส์ *M. hyorhinis* เป็นเชื้อที่มีแนวโน้มที่ดื้อต่อ doxycycline, tylosin และ enrofloxacin สูงที่สุด โดยทั่วไปเชื้อนี้เป็นสาเหตุร่วมของอาการปอดอักเสบในสุกรขุน และข้ออักเสบในสุกรอนุบาล แต่จากรอยโรคแล้วไม่สามารถวินิจฉัยถึงสาเหตุของเชื้อได้ทันที ถึงแม้ว่าจะพบเชื้อก็ไม่สามารถสรุปว่าเชื้อ *M. hyorhinis* เป็นสาเหตุหลัก ทำให้ยังคงเลือกใช้ยาปฏิชีวนะตามประสบการณ์ของสัตวแพทย์และสัตวบาลผู้ดูแลฟาร์มเป็นหลัก รายงานนี้จึงเป็นเพียงข้อสังเกตถึง ภาวะการดื้อยาของเชื้อที่อาจนำไปสู่แนวความคิด

ของการพักใช้ยาในกลุ่มดังกล่าวในอนาคต ในเชิงระบาดวิทยาโมเลกุล ยังไม่มีรายงานที่แสดงถึงความแตกต่างของสายพันธุ์ *M. hyorhinis* ต่อความสามารถในดื้อต่อยาที่เหนือกว่ามัยโคพลาสมาชนิดอื่น เมื่อเปรียบเทียบกับ *M. hyopneumoniae* และ *M. hyosynoviae* (Idowu et al., 2003; Kobayashi et al., 2005) แต่จากสมมติฐานเชิงความสัมพันธ์ของเชื้อและโฮสต์แล้ว เชื้อ *M. hyorhinis* เป็นเชื้อที่มีบทบาทเป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินหายใจ เจริญเติบโตเร็วกว่าเชื้อ *M. hyopneumonia* ทำให้มีความสามารถในการอยู่ในโฮสต์แบบ latent infection หรือ chronic infection ซึ่งจะไม่กระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างรุนแรง และยังคงหลงเหลือประชากรของเชื้อภายหลังการรักษา ซึ่งอาจเป็นการเพิ่มโอกาสในการปรับตัวให้อยู่ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะตลอดเวลาก็ได้ (Kobisch and Friis, 1996)

โดยทั่วไปข้อมูลการดื้อยาได้อธิบายจากภาวะการสัมผัสกับยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่อง จนทำให้เกิดการปรับตัวของเชื้อโรคในกลุ่มที่สามารถอยู่ได้ในบริเวณที่มียา (selective pressure) (Gerchman et al., 2011) ดังนั้นจึงต้องอาศัยข้อมูลระยะเวลา ขนาด และชนิดของยาปฏิชีวนะ ที่ใช้ในฟาร์มเพื่อช่วยในการอธิบาย อย่างไรก็ตามผู้วิจัยไม่พบว่าเชื้อที่ได้จากสุกรขุนซึ่งได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานกว่าสุกรอนุบาล จะมีความสามารถในการดื้อยาสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลนี้อาจแสดงให้เห็นถึงสายพันธุ์ประจำถิ่นของเชื้อมัยโคพลาสมาที่ระบาดของประเทศไทยมีพันธุกรรมที่ดื้อต่อยาเป็นพื้นฐานอยู่แล้ว โดยเฉพาะกับ tylosin และ enrofloxacin แต่ก็พบแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นในสุกรขุนสอดคล้องกับระบบการให้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มนั้น ส่วนค่า MIC_{90} ต่อ doxycycline ในสุกรขุนมีการปรับตัวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ได้จากสุกรอนุบาล ยังไม่สามารถอธิบายเชิงความสัมพันธ์ได้ เพราะไม่พบว่ามีฟาร์มใดใช้ doxycycline เลย นอกจากนี้ระดับการดื้อยาของเชื้อมัยโคพลาสมาไม่มีความสัมพันธ์กับช่วงอายุ และรูปแบบของการใช้ยาปฏิชีวนะในแต่ละฟาร์ม สมมติฐานได้ว่าเป็นเชื้อที่หมุนเวียนอยู่ในฟาร์มอยู่แล้ว และมีสุกรเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ โดยเฉพาะที่บริเวณทอนซิล (Hagedorn-Olsen et al., 1999b; Kobayashi et al., 1996a) ดังนั้นระบบการเลี้ยงแบบ all-in, all-out จึงน่าจะสนับสนุนการลดการถ่ายทอดเชื้อ และการพัฒนาการดื้อยาที่ต่อเนื่อง

การหาความหลายหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี PFGE เป็นวิธีหนึ่งที่มีประโยชน์ทางระบาดวิทยาโมเลกุล เพื่อแสดงข้อมูลการกระจายของเชื้อกับทางความแตกต่างทางกายภาพ เช่น ที่ตั้งของฟาร์ม, ช่วงอายุของสัตว์, และรูปแบบการใช้ยาปฏิชีวนะ จากผลความหลากหลายของเชื้อมัยโคพลาสมาทั้ง 3 ชนิดโดยใช้ตัวแทนจาก สปีชีส์ละ 2-3 เชื้อต่อกลุ่มประชาการ พบว่าในประเทศไทยมีความหลากหลายของเชื้อ *M. hyorhinis* มากที่สุด รองลงมาคือ *M. hyosynoviae* และ *M. hyodysenteriae* ตามลำดับ เชื้อ *M. hyorhinis* ก็มีรูปแบบของ antibiogram ที่หลากหลายเช่นเดียวกันแต่ไม่สอดคล้องกับลายนิ้วมือดีเอนเอที่ได้จาก PFGE ทั้งนี้เนื่องจากการตัดอีเอนเอด้วยเอนไซม์จำเพาะ อาจไม่ได้ตัดที่ตำแหน่งของการดื้อยาก็ได้ (Wang et al., 2011) หรือ ยีนที่ตอบสนองการดื้อยาอาจไม่ได้อยู่บนโครโมโซม แต่อยู่บนยีนเคลื่อนที่ (mobile genetic element) เช่น พลาสมิด หรือ ทรานโพซอน ก็เป็นได้ ด้วยเหตุผลนี้ จึงอาจนำไปใช้อธิบายคความไม่สอดคล้องของ antibiogram กับ PFGE pattern ของเชื้อ *M. hyosynoviae* และ *M. hyodysenteriae* ด้วยเช่นกัน

สำหรับเชื้อ *M. hyodysenteriae* เป็นเชื้อสาเหตุปฐมภูมิที่มีความสำคัญต่อการก่อโรคระบบทางเดินหายในสุกร และติดต่อทางอากาศ ควรต้องมีการเฝ้าระวังด้านการกระจายของเชื้อ จากการตรวจจากฟาร์มในประเทศไทยพบเชื้อทั้งสิ้น 4 สายพันธุ์ย่อย (intraspecies variation) สายพันธุ์ A เป็นสายพันธุ์ประจำถิ่นที่มีการระบาดทั่วประเทศ ยกเว้นภาคตะวันออก ส่วนสายพันธุ์ C และ D จำกัดอยู่ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตกตามลำดับ สำหรับเชื้อ *M. hyosynoviae* สายพันธุ์ B เป็นสายพันธุ์หลัก มีการกระจายทั่วไปในประเทศ นอกจากวิธี PFGE แล้ว วิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP) ที่บริเวณยีน P146 ก็เป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อลดขั้นตอนการปฏิบัติ และยังมีผลการทดลองที่สอดคล้องกับ PFGE ด้วย (Stakenborg et al., 2006)

สรุปผลการดำเนินการในภาพรวม

โครงการปี 2554-2555

จากการเก็บข้อมูลทั้งหมดตามรายละเอียดปรากฏในแบบสอบถาม ในเบื้องต้นได้ตัวอย่างสุกรจากฟาร์มและโรงฆ่าสัตว์ทั้งสิ้น 270 ตัว แยกได้จากตัวอย่าง 754 ตำแหน่ง ในปีแรกผู้วิจัยได้ทำการประมวลผลการทดสอบในแต่ละชนิดของเชื้อกับชนิดของตัวอย่างที่ส่งตรวจ โดยเปรียบเทียบกระบวนการของการตรวจทั้ง 2 แบบ ซึ่งพบว่าในกรณีที่ต้องการตรวจเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากปอดที่สงสัย วิธี DP ให้ความแม่นยำมากกว่า ในขณะที่วิธี CCP เหมาะสำหรับการตรวจเชื้อ *M. hyorhinis* และวิธี CCP เหมาะสำหรับการตรวจหาเชื้อมัยโคพลาสมาจากทอนซิล แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับการเพาะเชื้อจากน้ำในข้อต่อ ผลการเพาะเชื้อจากสุกรขุนระยะท้ายและสุกรในโรงฆ่าสัตว์พบเชื้อ *M. hyopneumoniae, M. hyosynoviae* และ *M. hyorhinis* ที่ความชุก 40.3, 12.3 และ 64.6 % ตามลำดับ ปัจจัยการจัดการมีผลต่อจำนวนมัยโคพลาสมา คือ การจัดการที่มีผลต่อการลดหรือเพิ่มการสัมผัสโดยตรงระหว่างแม่สุกรและลูกสุกร หรือระหว่างสุกรขุนด้วยกัน หรือในช่วงที่มีการปรับสภาพสุกรสาวด้วยการใช้แม่นางปลดมีโอกาศเป็นตัวแพร่เชื้อ *M. hyopneumoniae* สูงกว่าการใช้ PRRS วัคซีนในการปรับสภาพสุกรสาว แต่ในการจัดแบ่งสุกรขุนแบบเข้าหมดออกหมด (all in, all out) ยังไม่เพียงพอในการลดปริมาณมัยโคพลาสมาลงอย่างมีนัยสำคัญ โรคแทรกซ้อนจากไวรัสมีผลต่อจำนวน *M. hyopneumoniae* และ *M. hyorhinis* จากอวัยวะต่างๆอย่างมีนัยสำคัญ การทำวัคซีน *M. hyopneumoniae* แก่สุกรหย่านม มีผลต่อ *M. hyopneumoniae* แต่ไม่มีผลต่อเชื้อมัยโคพลาสมาชนิดอื่น ส่วนการให้ยาจะมีผลต่างกันไปตามอายุของสุกรและชนิดของมัยโคพลาสมาดังตารางข้างต้น จากการติดตามเก็บตัวอย่างแบบ longitudinal study จึงพบว่าจำนวนของมัยโคพลาสมามีการเปลี่ยนแปลงได้ในแต่ช่วงเวลาที่เก็บ

ด้านโปรแกรมการให้ยาปฏิชีวนะในระบบการผลิตของประเทศไทย ในแต่ละโปรแกรมการใช้ยาปฏิชีวนะไม่มีผลต่อการเร่งอัตราการดื้อยาที่จำเพาะ โดยเฉพาะเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสุกรขุน/สุกรอนุบาล และการศึกษาด้วยการเก็บตัวอย่างต่างช่วงเวลา การศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลแย้งที่สำคัญว่า การเลี้ยงสัตว์ปศุสัตว์อาจไม่ได้เป็นสาเหตุของเชื้อดื้อยาที่ส่งผลถึงผู้บริโภค แต่การดื้อยาบางชนิดเป็นการแสดงออกพื้นฐานของสายพันธุกรรมของเชื้อมัยโคพลาสม่าในช่วงเวลาปัจจุบัน (endemic strain) และสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทยมีความแข็งแรง (high fitness cost) มากพอที่จะคงอัตลักษณ์หรือแบบแผนการแสดงออกในช่วงเวลาที่ศึกษา ยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในห้องปฏิบัติการคือ tiamulin และ valnemulin รองลงมาคือ doxycycline และ lincomycin ส่วนเชื้อมัยโคพลาสมาดื้อต่อ enrofloxacin และ tylosin ในระดับสูง รูปแบบการดื้อยาไม่สัมพันธ์กับสูตรการให้ยาปฏิชีวนะเพื่อผสมอาหาร จากการศึกษานี้พบรูปแบบลายนิ้วมือดีเอนเอตั้งแต่ 4 รูปแบบขึ้นไป *M. hyopneumoniae* สายพันธุ์ A และ *M. hyosynoviae* สายพันธุ์ B เป็นสายพันธุ์หลักที่มีการระบาดในประเทศไทย ส่วน *M. hyorhinis* มีความหลายหลายสูงและไม่มีความจำเพาะในพื้นที่ที่สำรวจ และรูปแบบการดื้อยาไม่มีความสัมพันธ์กับรูปแบบการดื้อยา

เอกสารอ้างอิง

Aarestrup, F.M., Friis, N.F., 1998. Antimicrobial susceptibility testing of Mycoplasma hyosynoviae isolated from pigs during 1968 to 1971 and during 1995 and 1996. Vet Microbiol 61, 33-39.

Bebear, C.M., Pereyre, S., 2005. Mechanisms of drug resistance in Mycoplasma pneumoniae. Curr Drug Targets Infect Disord 5, 263-271.

Buddle, J.R., O'Hara, A.J., 2005. Enzootic pneumonia of pigs--a diagnostic dilemma. Australian Veterinary Journal 83, 134-139.

Dussurget, O., Roulland-Dussoix, D., 1994. Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera. Appl Environ Microbiol 60, 953-959.

Gerchman, I., Levisohn, S., Mikula, I., Manso-Silvan, L., Lysnyansky, I., 2011. Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of Mycoplasma gallisepticum strains isolated from poultry. Vet Res 42, 90.

Hagedorn-Olsen, T., Nielsen, N.C., Friis, N.F., 1999a. Induction of arthritis with Mycoplasma hyosynoviae in pigs: clinical response and re-isolation of the organism from body fluids and organs. Zentralbl Veterinarmed A 46, 317-325.

Hagedorn-Olsen, T., Nielsen, N.C., Friis, N.F., Nielsen, J., 1999b. Progression of Mycoplasma hyosynoviae infection in three pig herds. Development of tonsillar carrier state, arthritis and antibodies in serum and synovial fluid in pigs from birth to slaughter. Zentralbl Veterinarmed A 46, 555-564.

Hoelzle, K., Grimm, J., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Torgerson, P., Hamburger, A., Wittenbrink, M.M., Hoelzle, L.E., 2007. Use of recombinant antigens to detect antibodies against Mycoplasma suis, with correlation of serological results to hematological findings. Clin Vaccine Immunol 14, 1616-1622.

Hoelzle, L.E., 2007. [Significance of haemotrophic mycoplasmas in veterinary medicine with particular regard to the Mycoplasma suis infection in swine]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 120, 34-41.

Idowu, A.D., Celones, M.C., Salgado, A.E., Marquez, K.M., Pleibel, N., 2003. Characterization of gentamicin-resistant Mycoplasma hyorhinis. Biologicals 31, 175-179.

Kobayashi, H., Morozumi, T., Miyamoto, C., Shimizu, M., Yamada, S., Ohashi, S., Kubo, M., Kimura, K., Mitani, K., Ito, N., Yamamoto, K., 1996a. Mycoplasma hyorhinis infection

levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). J Vet Med Sci 58, 109-113.

Kobayashi, H., Nakajima, H., Shimizu, Y., Eguchi, M., Hata, E., Yamamoto, K., 2005. Macrolides and lincomycin susceptibility of Mycoplasma hyorhinis and variable mutation of domain II and V in 23S ribosomal RNA. J Vet Med Sci 67, 795-800.

Kobayashi, H., Sonmez, N., Morozumi, T., Mitani, K., Ito, N., Shiono, H., Yamamoto, K., 1996b. In vitro susceptibility of Mycoplasma hyosynoviae and M. hyorhinis to antimicrobial agents. J Vet Med Sci 58, 1107-1111.

Kobisch, M., Frey, J., 2003. Detection of Mycoplasma hyponeumoniae from clinical samples and air. Methods Mol Biol 216, 247-256.

Kobisch, M., Friis, N.F., 1996. Swine mycoplasmoses. Rev Sci Tech 15, 1569-1605.

Kurth, K.T., Hsu, T., Snook, E.R., Thacker, E.L., Thacker, B.J., Minion, F.C., 2002. Use of a Mycoplasma hyopneumoniae nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. J Vet Diagn Invest 14, 463-469.

Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. Control of Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs. Veterinary Microbiology 126, 297-309.

Magnusson, U., Wilkie, B., Mallard, B., Rosendal, S., Kennedy, B., 1998. Mycoplasma hyorhinis infection of pigs selectively bred for high and low immune response. Veterinary Immunology and Immunopathology 61, 83-96.

Nielsen, E.O., Lauritsen, K.T., Friis, N.F., Enoe, C., Hagedorn-Olsen, T., Jungersen, G., 2005. Use of a novel serum ELISA method and the tonsil-carrier state for evaluation of Mycoplasma hyosynoviae distributions in pig herds with or without clinical arthritis. Vet Microbiol 111, 41-50.

Ross, R., Karmon, J., 1970. Heterogeneity among strains of *Mycoplasma granularum* and identification of *Mycoplasma hyosynoviae*, sp.n. . Journal of Bacteriology 103, 707-713.

Sibila, M., Calsamiglia, M., Segales, J., Rosell, C., 2004. Association between Mycoplasma hyopneumoniae at different respiratory sites and presence of histopathological lung lesions. Vet Rec 155, 57-58.

Sokoloff, L., 1973. Animal model: arthritis due to Mycoplasma in rats and swine. American Journal of Patholgy 73, 261-264.

Stakenborg, T., Vicca, J., Maes, D., Peeters, J., de Kruif, A., Haesebrouck, F., Butaye, P., 2006. Comparison of molecular techniques for the typing of Mycoplasma hyopneumoniae isolates. J Microbiol Methods 66, 263-275.

Wang, X., Zhao, S., Harbottle, H., Tran, T., Blickenstaff, K., Abbott, J., Meng, J., 2011. Antimicrobial resistance and molecular subtyping of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from retail meats. J Food Prot 74, 616-621.

ตารางที่ 1 ข้อมูลแหล่งที่มาของเชื้อ *M. hyopneumoniae* จำนวน 15 เชื้อ พร้อมค่ารอยโรคปอด (%) ที่อ่านได้ระหว่างการเก็บตัวอย่างจากโรงเชือด

เชื้อ	ฟาร์ม	ปีที่เก็บตัวอย่าง	ที่ตั้งฟาร์ม, ภาค	อายุสุกร	รอยโรคปอด (%)
1AK1lg109	B	2552	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขุน	0
2AK1lg209	B	2552	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขุน	10
3AK1lg409	B	2552	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขุน	3
5CClg309	C	2552	เหนือ	ขุน	1
6CClg409	C	2552	เหนือ	ขุน	34
11CClg1609	C	2552	เหนือ	ขุน	16
13FTlg209	D	2552	เหนือ	ขุน	16
14FTlg509	D	2552	เหนือ	ขุน	1
16FTlg1809	D	2552	เหนือ	ขุน	17
18PDlg1709	E	2552	เหนือ	ขุน	4
19PDlg2609	E	2552	เหนือ	ขุน	7
20PDlg2809	E	2552	เหนือ	ขุน	6
22KP1lg409	F	2552	ตะวันตก	ขุน	8
24KP1lg709	F	2552	ตะวันตก	ขุน	0
25KP1lg809	F	2552	ตะวันตก	ขุน	6

ตารางที่ 2 ข้อมูลแหล่งที่มาของเชื้อ *M.hyosynoviae*จำนวน 12 เชื้อ

เชื้อ	ฟาร์ม	ปีที่เก็บตัวอย่าง	ที่ตั้งฟาร์ม	อายุสุกร	อวัยวะ
1PNton309	A	2552	ตะวันออก	ขุน	ทอนซิล
2PNton909	A	2552	ตะวันออก	ขุน	ทอนซิล
3PNton1009	A	2552	ตะวันออก	ขุน	ทอนซิล
4PNton1109	A	2552	ตะวันออก	ขุน	ทอนซิล
5PNton1909	A	2552	ตะวันออก	ขุน	ทอนซิล
6PNton1309	A	2552	ตะวันออก	ขุน	ทอนซิล
8PNton2309	A	2552	ตะวันออก	ขุน	ทอนซิล
10AK3lg111	B	2554	ตะวันตก	ขุน	ปอด
11AK3lg2611	B	2554	ตะวันตก	ขุน	ปอด
12AK3lg2711	B	2554	ตะวันตก	ขุน	ปอด
13AK3lg3511	B	2554	ตะวันตก	ขุน	ปอด
15AK3ton211	B	2554	ตะวันตก	ขุน	ทอนซิล

ตารางที่ 3 ข้อมูลแหล่งที่มาของเชื้อ *M.hyorhinis* จำนวน 27 เชื้อ จากการเก็บตัวอย่างแบบ cross-sectional

เชื้อ	ฟาร์ม	ปีที่เก็บตัวอย่าง	ที่ตั้งฟาร์ม	อายุสุกร	อวัยวะ
1PNns2N09	A	2552	ตะวันออก	อนุบาล	ช่องจมูก
4PNton1F09	A	2552	ตะวันออก	ขุน	ทอนซิล
8PNlg14F09	A	2552	ตะวันออก	ขุน	ปอด
11AK1ns28N09	B	2552	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อนุบาล	ช่องจมูก
13AK1ton9F09	B	2552	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขุน	ทอนซิล
17AK1lg23F09	B	2552	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขุน	ปอด
19CCns12N09	C	2552	เหนือ	อนุบาล	ช่องจมูก
21CCton3F09	C	2552	เหนือ	ขุน	ทอนซิล
23CClg6F09	C	2552	เหนือ	ขุน	ปอด
26FTton1F09	D	2552	เหนือ	ขุน	ทอนซิล
27FTton2F09	D	2552	เหนือ	ขุน	ทอนซิล
29FTlg11F09	D	2552	เหนือ	ขุน	ปอด
33PDns7N09	E	2552	เหนือ	อนุบาล	ช่องจมูก
34PDton1F09	E	2552	เหนือ	ขุน	ทอนซิล
38PDton14F09	E	2552	เหนือ	ขุน	ทอนซิล
39KP1ns3N09	F	2552	ตะวันตก	อนุบาล	ช่องจมูก
43KP1ton2F09	F	2552	ตะวันตก	ขุน	ทอนซิล
47KP1ton14F09	F	2552	ตะวันตก	ขุน	ทอนซิล
49MTns4N09	G	2552	ตะวันตก	อนุบาล	ช่องจมูก
51MTton1F09	G	2552	ตะวันตก	ขุน	ทอนซิล
53MTton3F09	G	2552	ตะวันตก	ขุน	ทอนซิล
56RMns3N09	H	2552	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อนุบาล	ช่องจมูก
57RMton11F09	H	2552	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขุน	ทอนซิล
58RMton15F09	H	2552	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขุน	ทอนซิล
60MIns27N09	I	2552	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อนุบาล	ช่องจมูก
62MIton2F09	I	2552	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขุน	ทอนซิล
66MIlg20F09	I	2552	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขุน	ปอด

ตารางที่ 4 ข้อมูลของเชื้อ *M.hyorhinis* จำนวน 13 เชื้อ จากการเก็บตัวอย่างแบบต่อเนื่อง

เชื้อ	ฟาร์ม	ปีที่เก็บตัวอย่าง	ที่ตั้งฟาร์ม	อายุสุกร	อวัยวะ
21AK2lg4N10	B2	2553	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อนุบาล	ปอด
23AK2ton1N10	B2	2553	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อนุบาล	ทอนซิล
28AK2lg4F10	B2	2553	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขุน	ปอด
34KP2lg1N10	F2	2553	ตะวันตก	อนุบาล	ปอด
48KP2lg3F10	F2	2553	ตะวันตก	ขุน	ปอด
53KP2ton4F10	F2	2553	ตะวันตก	ขุน	ทอนซิล
80AK3sf5N11	B3	2554	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อนุบาล	น้ำจากข้อต่อ
84AK3st5N11	B3	2554	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อนุบาล	น้ำจากข้อต่อ
86AK3lg9F11	B3	2554	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขุน	ปอด
89AK3ton2F11	B3	2554	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขุน	ทอนซิล
91KP3lg2N10	F3	2553	ตะวันตก	อนุบาล	ปอด
101KP3st1N10	F3	2553	ตะวันตก	อนุบาล	น้ำจากข้อต่อ
104KP3lg17F10	F3	2553	ตะวันตก	ขุน	ปอด

ตัวเลขที่ระบุหลังชื่อฟาร์ม คือ ครั้งที่เข้าไปเก็บตัวอย่าง