# การตรวจหาเชื้อ *มัยโคพลาสมา ไฮโอนิวโมนิอี* จากตัวอย่างปอดของสุกรในประเทศไทย โดยการเพาะเชื้อและพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction)

นางพัชรี ทองคำคูณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-808-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14 ธ.ค. 2545
I19010850

# DETECTION OF *MYCOPLASMA HYOPNUEMONIAE* FROM LUNG SAMPLES OF PIGS IN THAILAND BY CULTIVATION AND POLYMERASE CHAIN REACTION

Mrs Pacharee Thongkamkoon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology

Inter - Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-334-808-5

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การตรวจหาเชื้อ*มัยโคพลาสมา ไฮโอนิวโมนิอี* จากตัวอย่างปอดของสุกรในประเทศไทย โดยการเพาะเชื้อและพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction) |
| โดย | นางพัชรี ทองคำคูณ |
| ภาควิชา | สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. โสมทัด วงศ์สว่าง |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. มีนา สาริกะภูติ |

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

( ศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา กีระนันท์ )

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

( รองศาสตราจารย์ ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์ )

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตรจารย์ น.สพ. ดร.โสมทัต วงศ์สว่าง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตรจารย์ สพ.ญ. ดร.มีนา สาริกะภูติ)

.....กรรมการ

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อร่าม)

พัชรี ทองคำคูณ : การตรวจหาเชื้อ *มัยโคพลาสมา ไฮโอนิวโมนิอี* จากตัวอย่างปอดสุกรในประเทศไทย โดยการเพาะเชื้อและพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction) (DETECTION OF *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* FROM LUNG SAMPLES OF PIGS IN THAILAND BY CULTIVATION AND POLYMERASE CHAIN REACTION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ร.ศ. น.สพ. ดร. โสมทัต วงศ์สว่าง, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผ.ศ. สพ.ญ. ดร. มีนา สาริกะภูติ , 96 หน้า. ISBN 974-334-808-5

โรค Mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) เป็นโรคหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจการเลี้ยงสุกรมาก เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคคือ *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) ซึ่งมีการแพร่กระจายไปทั่วภูมิภาคของโลก ในประเทศไทยมีรายงานการสำรวจและการตรวจการติดเชื้อโรคนี้ไม่มากนัก เนื่องจากการเพาะและพิสูจน์เชื้อทำได้ยาก การตรวจการติดเชื้อมักใช้การตรวจหารอยโรคจากปอดซึ่งเป็นวิธีที่ไม่สามารถพิสูจน์การติดโรค MPS ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ทำให้ยังไม่มีรายงานอัตราการเกิดโรคในประเทศไทยที่สมบูรณ์นัก เพื่อที่จะสำรวจหาอัตราการเกิดโรค MPS ในประเทศไทยได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ ผู้วิจัยจึงได้ใช้วิธีการตรวจหารอยโรคที่ปอด, การเพาะเชื้อ และวิธีพีซีอาร์ มาใช้ในการตรวจและวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากตัวอย่างปอดสุกร 200 ตัวอย่าง จาก 12 ฟาร์มที่กระจายอยู่ 4 ภาคของประเทศ โดยเก็บตัวอย่างปอดจากสุกรเมื่อเข้าโรงฆ่า

จากตัวอย่างปอดทั้ง 200 ตัวอย่าง พบว่ามีปอดสุกร147 ตัวอย่างที่เป็นบวก ซึ่งเป็นผลจากการวินิจฉัยร่วมกันของการตรวจหารอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา การเพาะเชื้อ และวิธีพีซีอาร์ จึงสรุปได้ว่าอัตราการติดโรค MPS ในประเทศไทยมีร้อยละ 73.5 และจากการเปรียบเทียบผลการตรวจทั้งสามวิธีพบว่า การตรวจหารอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยามีความไว ร้อยละ 96.6 ความจำเพาะ ร้อยละ 5.7 การเพาะเชื้อมีความไว ร้อยละ 51 มีความจำเพาะ ร้อยละ 100 ส่วนวิธีพีซีอาร์มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 88.4 และ ร้อยละ 96.2 ตามลำดับ

การตรวจหารอยโรคและการเพาะเชื้อให้ผลได้ไม่ถูกต้องนัก วิธีพีซีอาร์น่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* อย่างไรก็ตามจากการวิจัยครั้งนี้พบว่าวิธีพีซีอาร์ที่ใช้อยู่นี้ยังมีความไวไม่มากพอที่จะตรวจการติดเชื้อที่มีปริมาณต่ำกว่า $10^4$ CFU/ml ได้ จึงควรได้มีการพัฒนาต่อไปในด้านความไวของการตรวจ เพื่อให้เป็นวิธีสามารถตรวจการติดเชื้อได้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

**ภาควิชา** สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ **ลายมือชื่อนิสิต**.....

**สาขาวิชา** จุลชีววิทยาทางการแพทย์ **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา**.....

**ปีการศึกษา** 2542 **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม**.....

## 4075233430 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* / CULTIVATION/ POLYMERASE CHAIN REACTION

PACHAREE THONGKAMKOON : DETECTION OF *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* FROM LUNG SAMPLES OF PIGS IN THAILAND BY CULTIVATION AND POLYMERASE CHAIN REACTION. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. DR. SOMATAT WONGSAWANG, THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. DR. MEENA SARIKAPUTI, 96 pp. ISBN 974-334-808-5

Mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) is one of the most economically important diseases of pigs. The causative agent is *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) and has been found in most pigs producing countries in the world. In Thailand, there were few reports about this disease because of its extremely fastidious growth. Even though gross and histopathological examination is normally practiced for diagnosis, it is not absolute indicator of MPS infection. In order to effectively estimate the infection rate of the MPS disease in Thailand, we used a combination of pathological examination, cultivation and polymerase chain reaction (PCR) technique to detect and diagnose *M. hyopneumoniae* infection in lung of slaughter pigs. Two-hundred-lung samples from 12 farms scattering in 4 parts of the country were selected and collected when pigs were sent to the slaughter house

Of 200 samples, 147 samples positive by a combination of results from pathological examination, isolation or PCR. Therefore, it can be conclude that the MPS infection rate in the study is 73.5% in Thailand. In addition, comparison of each method revealed that sensitivity and specificity for gross and histopathological examination were 96.6% and 5.7%, sensitivity and specificity for cultivation method were 51% and 100% and sensitivity and specificity for PCR technique were 88.4% and 96.2%, respectively.

Since the results of pathological examination and the cultivation were not usually reliable. Our results suggested that the PCR was a method of choice for detection of *M. hyopneumoniae*. However the sensitivity of PCR technique used in this study was not sufficiently sensitive to detect *M. hyopneumoniae* below $10^4$ CFU/ml. To efficiently detect *M. hyopneumoniae*, further study on PCR detection sensitivity needs to be developed.

**ภาควิชา** สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ **ลายมือชื่อนิสิต**.....

**สาขาวิชา** จุลชีววิทยาทางการแพทย์ **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา**.....

**ปีการศึกษา** 2542 **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม**.....

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตรจารย์ น.สพ. ดร. โสมทัต วงศ์สว่าง อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตรจารย์ สพ.ญ. ดร. มีนา สารกะภูติ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัยมาด้วยดีตลอด อีกทั้งยังเป็นผู้สละเวลาในการเก็บตัวอย่าง ที่นำมาทำการวิจัยครั้งนี้อย่างไม่เห็นแก่เหน็ดเหนื่อย ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ น.สพ. ดร. ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน ที่ให้คำแนะนำวิธีการคัดเลือกตัวอย่างและกรุณาเก็บส่งตัวอย่างตลอดการวิจัย ขอขอบพระคุณ สัตวแพทย์หญิงตวงทอง ปัจฉิมะศิริ นายสัตวแพทย์ 7 กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่กรุณาวิเคราะห์ตัวอย่างทางจุลพยาธิวิทยา ขอขอบพระคุณ Dr. Hideki Kobayashi National Institute of Animal Health , Japan ผู้ให้คำแนะนำวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการเพาะเชื้อและทำพีซีอาร์ รวมทั้งบริษัทไฟเซอร์อินเตอร์เนชันแนล จำกัด ซึ่งเป็นผู้ให้ทุน อุดหนุนวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ หัวหน้ากลุ่มงานแบคทีเรียและเชื้อรา ข้าราชการและเจ้าหน้าที่ในกลุ่มงานฯ ทุกท่าน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ ตลอดจนช่วยเหลือการทำงานจนงานสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ บิดามารดาพี่น้องทุกคนที่ให้โอกาสทางการศึกษาและช่วยดูแลครอบครัว จนทำให้สามารถทุ่มเทเวลาให้กับการเรียนและงานวิจัยได้เต็มที่ และขอขอบใจลูกชายหญิงทั้งสองคน ที่เป็นพลังใจให้แม่มีความตั้งใจที่จะบรรลุเป้าหมายในครั้งนี้

สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | จ |
| กิตติกรรมประกาศ | ฉ |
| สารบัญ | ช |
| สารบัญตาราง | ฌ |
| สารบัญภาพ | ญ |
| คำย่อ | ฏ |
| บทที่ | |
| 1. บทนำ | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 5 |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย | 5 |
| 1.4 วิธีดำเนินการวิจัย | 5 |
| 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 5 |
| 2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 6 |
| 2.1 อนุกรมวิธานของมัยโคพลาสมา | 6 |
| 2.2 มัยโคพลาสมาที่พบในสุกร | 8 |
| 2.3 พยาธิกำเนิด | 9 |
| 2.4 ระบาดวิทยา | 17 |
| 2.5 อาการ | 18 |
| 2.6 รอยโรคด้วยตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา | 18 |
| 2.7 การวินิจฉัยโรค | 20 |
| 3. วิธีดำเนินการวิจัย | 30 |
| 3.1 การคัดเลือกตัวอย่าง | 30 |
| 3.2 การเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ | 31 |
| 3.3 การเก็บตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการ | 31 |

หน้า

3.4 วิธีการเพาะเชื้อ..... 31
3.5 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี..... 32
3.6 การวินิจฉัยแยกชนิดมัยโคพลาสมาโดยวิธี Growth inhibition test..... 33
3.7 การทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์..... 33
3.8 การตัดดีเอ็นเอด้วย Restriction endonuclease..... 37
3.9 การแปลผล..... 37
4. ผลการวิจัย..... 39
4.1 ผลการเพาะเชื้อ..... 39
4.2 ผลการทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์..... 41
4.3 ผลการตรวจรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา..... 50
4.4 การวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae*..... 52
4.5 ความสัมพันธ์ของผลการตรวจโดยวิธีต่าง ๆ..... 54
4.6 ผลการประเมินวิธีการตรวจการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae*..... 56
5. วิจารณ์ ..... 58
6. สรุป..... 64
รายการอ้างอิง..... 65
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของมัยโคพลาสมา.. 78
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้สำหรับการเตรียมดีเอ็นเอและทำพีซีอาร์ ..... 82
ประวัติผู้เขียน..... 84

# สารบัญตาราง


| ตาราง | | หน้า |
|---|---|---|
| 2-1 | อนุกรมวิธานของ Class Mollicutes..... | 7 |
| 2-2 | ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเชื้อมัยโคพลาสมาจากตัวอย่าง..... | 25 |
| 3-1 | เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบความจำเพาะในการทำพีซีอาร์..... | 34 |
| 3-2 | เชื้อมัยโคพลาสมาที่นำมาทดสอบความจำเพาะในการทำพีซีอาร์..... | 35 |
| 3-3 | เกณฑ์การตัดสินการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae*..... | 38 |
| 4-1 | เชื้อมัยโคพลาสมาและแบคทีเรียที่เพาะได้จากตัวอย่างปอดสุกร..... | 39 |
| 4-2 | แสดงอัตราการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ในฟาร์มทั้ง 12 ฟาร์มจากการเพาะเชื้อ | 40 |
| 4-3 | เอ็นไซม์ต่างๆ ที่มีจุดตัดบน 16 S rRNA ของ *M. hyopneumoniae*..... | 45 |
| 4-4 | แสดงอัตราการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ในฟาร์มทั้ง 12 ฟาร์ม โดยใช้วิธีพีซีอาร์ | 49 |
| 4-5 | แสดงจำนวนปอดสุกรที่มีรอยโรค Mycoplasma- like lesions..... | 50 |
| 4-6 | ผลการติดเชื้อมัยโคพลาสมาจากการตรวจรอยโรคด้วยตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา..... | 51 |
| 4-7 | แสดงอัตราการติดเชื้อมัยโคพลาสมาในฟาร์มทั้ง 12 ฟาร์ม จากการตรวจรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา..... | 51 |
| 4-8 | รอยโรคตาเปล่าจากการติดเชื้อต่าง ๆ..... | 52 |
| 4-9 | สรุปผลการวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากตัวอย่างปอดสุกร..... | 53 |
| 4-10 | ผลการวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ในตัวอย่างปอดสุกรจากฟาร์ม 12 ฟาร์ม..... | 53 |
| 4-11 | ความสัมพันธ์ของการเกิดรอยโรคกับการเพาะเชื้อและวิธีพีซีอาร์..... | 54 |
| 4-12 | ความสัมพันธ์ของการพบรอยโรคกับการเพาะแยกเชื้อ *M. hyopneumoniae* และ *M. hyorhinis*..... | 55 |
| 4-13 | ความสัมพันธ์ของผลการทำพีซีอาร์กับการเพาะแยกเชื้อ *M. hyopneumoniae* และ *M. hyorhinis*..... | 55 |
| 4-14 | ความจำเพาะและความไวในการตรวจการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* โดยวิธีต่างๆ | 57 |

# สารบัญภาพ


| ภาพ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2-1 | ตำแหน่งของเชื้อ *M. hyopneumoniae* ภายในช่องทางเดินหายใจของสุกร.... | 11 |
| 2-2 | เส้นใยบางๆที่กระจายออกจากเชื้อ *M .hyopneumoniae* เพื่อยึดให้เชื้อติดกัน. | 11 |
| 4-1 ก | ผลการทดสอบความจำเพาะของ primers กับเชื้อ *M. hyopneumoniae* ..... | 41 |
| 4-1 ข | ผลการทดสอบความจำเพาะของ primers กับเชื้อมัยโคพลาสมาต่างๆ..... | 42 |
| 4-1 ค | ผลการทดสอบความจำเพาะของ primers กับเชื้อแบคทีเรียต่างๆ..... | 43 |
| 4-2 | ความไวของการตรวจตัวอย่างด้วยวิธีพีซีอาร์..... | 44 |
| 4-3 | แสดงจุดตัดของเอ็นไซม์ต่างๆบน 16S rRNA ของ *M. hyopneumoniae* ..... | 46 |
| 4-4 ก | แสดงชิ้นส่วนของ PCR product หลังจากตัดด้วย *EcoR* I..... | 47 |
| 4-4 ข | แสดงชิ้นส่วนของ PCR product หลังจากตัดด้วย *Hind* III..... | 48 |
| 4-4 ค | แสดงชิ้นส่วนของ PCR product หลังจากตัดด้วย *EcoR* I และ *Hind* III..... | 48 |

# คำย่อ

| | | |
|---|---|---|
| ชม | = | ชั่วโมง |
| ซม | = | เซนติเมตร |
| มม | = | มิลลิเมตร |
| มล | = | มิลลิลิตร |
| ATCC | = | American Type Culture Collection |
| bp | = | base pair |
| BSA | = | bovine serum albumin |
| $^{o}C$ | = | degree Celsius |
| $CaCl_2$ | = | calcium cholride |
| CCU | = | colour changing unit |
| CFU | = | colony forming unit |
| CHAPS | = | 3-[(3 cholamidopropyl)dimethyl-ammonio] -1- propanesulfonate |
| EP | = | Enzootic pneumonia |
| dATP | = | deoxyadenosine 5'- triphosphate |
| dCTP | = | deoxycutidine 5'- triphosphate |
| DDW | = | deionized distilled water |
| dGTP | = | deoxyguanosine 5'- triphosphate |
| DNA | = | deoxyribonucleic acid |
| dNTP | = | deoxynucleoside 5'- triphosphate |
| dTTP | = | deoxythymidine 5'- triphosphate |
| DW | = | distilled water |
| et al. | = | et allii |
| fg | = | femtogram |
| HCl | = | hydrochloric acid |
| IgG | = | Immunoglobulin G |
| IgM | = | Immunoglobulin M |

| | | |
|---|---|---|
| IU | = | International unit |
| KCl | = | potassium chloride |
| $KH_2PO_4$ | = | potassium dihydrogen phosphate |
| M | = | molar |
| $MgCl_2$ | = | magnesium chloride |
| $MgSO_4$ | = | magnesium sulphate |
| ml | = | milliter |
| mM | = | millimole |
| MPS | = | Mycoplasmal pneumonia of swine |
| NaCl | = | sodium chloride |
| $Na_2CO_3$ | = | sodium carbonate |
| $Na_2HPO_4$ | = | disodium hydrogen phosphate |
| NaOH | = | sodium hydroxide |
| pmol | = | picomole |
| rRNA | = | ribosomal ribonucleic acid |
| SPF | = | specific pathogenic free |
| TBE | = | Tris borate EDTA buffer |
| U | = | unit |
| µ | = | micron |
| µg | = | microgram |
| µl | = | microliter |
| UV | = | ultraviolet |
| % | = | percent |