The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 22
Issue 3 *September, 1992*

Article 2

9-1-1992

การตรวจชีโรไทย์ของเชื้อ ทริโปนีมา ไฮโอดิสเซนเทอเรีย ที่แยกได้ จากสุกรป่วยด้วยโรคบิดมูกเลือดในเขตภาคกลาง

อินทิรา กระหม่อมทอง

วันทนีย์ ฉรมิตมานสุข

ทิฆา ตันติเจริญยศ

คัมภีร์ กอธีระกุล

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

กระหม่อมทอง, อินทิรา; ฉรมิตมานสุข, วันทนีย์; ตันติเจริญยศ, ทิฆา; and กอธีระกุล, คัมภีร์ (1992) "การตรวจชีโรไทย์ของเชื้อทริโปนีมา ไฮโอดิสเซนเทอเรีย ที่แยกได้ จากสุกรป่วยด้วยโรคบิดมูกเลือดในเขตภาคกลาง," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 22: Iss. 3, Article 2.
DOI: https://doi.org/10.56808/2985-1130.1597
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol22/iss3/2

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การตรวจซีโรไทป์ของเชื้อ *ทรีโปนีมา ไฮโอดิสเซนเทอเรีย* ที่แยกได้จากสุกรป่วยด้วยโรคบิดมูกเลือดในเขตภาคกลาง

อินทิรา กระหม่อมทอง *
วันทนีย์ ณรมิตมานสุข *
ทิพา ตันติเจริญยศ *
คัมภีร์ กอธีระกุล **

บทคัดย่อ

เชื้อ beta-hemolytic *Treponema hyodysenteriae* 60 สเตรน แยกได้จากอุจจาระของสุกรป่วยที่มีประวัติอาการท้องร่วง และบางครั้งถ่ายเป็นมูกเลือดจำนวน 550 ตัวอย่างในเขตภาคกลางของประเทศไทยคิดเป็นอัตราการติดเชื้อโรคบิดมูกเลือด (swine dysentery) 11% นำตัวอย่างเชื้อ 26 สเตรนจาก 60 สเตรนมาสกัดด้วย ฟีนอล-น้ำร้อนแล้วตรวจสอบกับแอนติซีรั่มจากกระต่ายที่ immunized ด้วยน้ำเชื้อดังกล่าว 7 ซีโรไทป์ และ *T. innocens* ด้วยปฏิกริยา precipitin ในวุ้น agarose ผลการตรวจพบว่า เชื้อ *T. hyodysenteriae* ที่แยกได้ทั้งหมดเป็นซีโรไทป์ 2

คำสำคัญ : ***ทรีโปนีมา ไฮโอดิสเซนเทอเรีย*** ซีโรไทป์ บิดมูกเลือด สุกร

---

* สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์

** บริษัทคาร์กิลล์ จำกัด

บทนำ

เชื้อทริโปนีมา ไฮโอดิสเซนเทอเรีย (Treponema hyodysenteriae) เป็นเชื้อแบคทีเรียสไปโรขีต ที่เป็นสาเหตุของโรคบิดมูกเลือดในสุกร (swine dysentery) ซึ่งเป็นโรคติดต่อรุนแรงในสุกรทุกอายุ ทำให้เกิดอาการถ่ายมูกเลือดจนถึงตายได้ (Harris 1974) ปัจจุบันได้มีการแบ่งประเภทของเชื้อสไปโรขีตที่พบในลำไส้ใหญ่ของสุกรจากคุณสมบัติการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) ใน blood agar เป็น 2 ประเภทคือ beta-hemolytic ทำให้เกิดบิดมูกเลือดเมื่อป้อนให้สุกรกิน ได้แก่ *T. hyodysenteriae* (Kinyon *et al*, 1977) และ weak beta-hemolytic ได้แก่ *T. innocens* ที่ไม่ทำให้เกิดโรคเมื่อป้อนให้สุกรกินและแยกเชื้อได้จากสุกรปกติ (Taylor and Alexander 1971)

T. hyodysenteriae มีส่วนประกอบที่เป็น LPS (lipopolysaccharides) ในเปลือกชั้นนอกของเซลล์ (envelope) เหมือนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป สามารถสร้าง endotoxin และมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนได้ Baum และ Joens (1979) ได้รายงานถึงสารสกัด LPS จากเปลือกนอกของเชื้อนี้ว่าเป็น serotype specific และเป็น common antigen ที่ต่างไปจาก LPS ซึ่งสกัดจาก *T. innocens* และแนะนำว่าการทดสอบ gel diffusion จะสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อสไปโรขีดสองชนิดนี้ได้ นอกจากนี้ยังได้รายงานซีโรไทป์ ของ beta-hemolytic *T. hyodysenteriae* 4 ซีโรไทป์ (ซีโรไทป์ 1, 2, 3 และ 4) ต่อมาในปี 1985 Mapother และ Joens ได้ตรวจพบซีโรไทป์ใหม่อีก 3 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์ 5, 6, และ 7

จุดประสงค์ของการรายงานครั้งนี้ เพื่อตรวจแยกซีโรไทป์ของเชื้อ *T. hyodysenteriae* ที่ได้จากสุกรป่วยด้วยโรคบิดมูกเลือด ซึ่งพบมากในเขตภาคกลางอันเป็นเขตที่มีอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรมากที่สุดของประเทศ รายงานนี้เป็นการตรวจแยกซีโรไทป์ครั้งแรกในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นของโรคบิดมูกเลือด ที่จะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคดังกล่าวให้ได้ผลดี สะดวก และรวดเร็ว ตลอดจนการผลิตวัคซีนเพื่อควบคุมโรคต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างเชื้อ

เชื้อ reference strains 8 ชนิด คือ เชื้อ beta-hemolytic *T. hyodysenteriae* ซีโรไทป์ 1 ถึง 7 ได้แก่ สเตรน G, B204, B169, A-1, B8044, B6933 และ Ack300/8 และ *T. innocens* สเตรน 1655 ซึ่งเป็น weak-hemolytic ได้รับจาก Dr.Lynn A. Joens *

เชื้อ beta-hemolytic *T. hyodysenteriae* 26 สเตรน คัดเลือกจาก 60 สเตรน (1-2 สเตรนต่อหนึ่งฟาร์ม) แยกจากอุจจาระสุกรป่วย จำนวน 550 ตัวอย่าง ที่มีประวัติอาการท้องร่วง บางครั้งเป็นมูกเลือด จากฟาร์มต่างๆ ในเขตจังหวัดภาคกลางได้แก่ จังหวัดราชบุรี นครปฐม อ่างทอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ลพบุรี กรุงเทพฯ สมุทรปราการ ระยอง ปราจีนบุรี จันทบุรี เพชรบุรี สุพรรณบุรี และสระบุรี เชื้อทั้งหมดเลี้ยงบน blood agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ประกอบด้วย 2 ชนิด ได้แก่ blood agar และ broth

blood agar เตรียมจาก Trypticase soy agar ผสมกับ 5% citrated bovine blood และ 5% น้ำสกัดจากอุจจาระสุกรปกติ ซึ่งเตรียมโดยผสมอุจจาระ 1 ส่วน ต่อ phosphate buffer saline 4 ส่วน กวนโดยใช้แท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิ 4 °C 48 ชั่วโมง จึงปั่นเก็บส่วนใสที่ -70 °C จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาผสมยา (μg/ml) spiramycin 25, rifampicin 12.5, vancomycin 6.25, colistin 6.25 และ spectinomycin 200 ตามวิธีของ Kunkle และ Kinyon (1988)

Broth คือ Trypticase soy broth (TSB) 6.3 ml ในหลอดแก้วยาว 150 mm เส้นผ่าศูนย์กลาง 15 mm เตรียมจากวิธีของ Lemcke และคณะ (1979) ขณะเตรียมเป่าด้วยก๊าซ deoxygenated N_2 ตลอดเวลา สำหรับการเตรียมในขวดใหญ่ใช้ TSB 200 ml ในขวดความจุขนาด 500 ml ต้ม TSB บนเตาให้เดือด 10 นาที จึงปิดด้วยจุกยาง แล้วใช้ลวดมัดให้แน่นอีกครั้งก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

---

* Faculty of Veterinary Medicine, University of Arizona, U.S.A.

การแยกเชื้อจากอุจจาระ

ป้ายอุจจาระสุกรป่วยลงบน blood agar เพาะในบรรยากาศก๊าซผสมของ N_2 80%, H_2 10% และ CO_2 10% ที่ 42 °C เป็นเวลา 7 วัน เปิดดูการเจริญเติบโตของเชื้อทุก 2 วัน แยกเชื้อสไปโรขีดที่มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเห็นเป็น zone ใสไว้ (beta-hemolysis) นำมาเลี้ยงใน broth ที่บรรจุหลอดแก้ว โดยเติม fetal calf serum 10% ขณะทำเป่าด้วยก๊าซ deoxygenated N_2 เมื่อปิดจุกยางแล้วจึงเติมอากาศ 1 ml โดยผ่านทางกระบอกฉีดยา เพื่อต้องการให้มีก๊าซ O_2 ประมาณ 1% ครั้นเชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ จึง propagate ใน TSB 200 ml (11% inoculum) แล้วนำเข้าตู้เพาะเชื้อที่ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง ทำให้ broth มีการหมุนเวียนตลอดเวลา ปั่นเก็บตะกอนเชื้อไว้ที่ -70 °C เพื่อทำการสกัด LPS ต่อไป (Baum and Joens 1979)

การเตรียม whole cell bacterins

whole cell bacterins ของเชื้อ *T. hyodysenteriae* 7 ซีโรไทป์ และ *T. innocens* เตรียมจาก broth culture 200 ml เพาะที่ 37 °C 48 ชั่วโมง harvest และล้างเชื้อ 1 ครั้งใน 0.01 phosphate-buffer saline (pH 7.2) จากนั้นผสมใน formalized phosphate-buffer saline (0.3% formalin) 10 ml inactivate ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C (Baum and Joens, 1979)

การผลิตแอนติซีรั่ม

การผลิตแอนติซีรั่มต่อเชื้อ reference สเตรนทั้ง 8 สเตรน ทำในกระต่ายน้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม โดยฉีด whole cell bacterins ที่มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^9/ml สเตรนละ 2 ตัว ตามวิธีของ Baum และ Joens (1979) เก็บซีรั่มในวันที่ 35 ของการฉีด กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 um เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

การสกัด LPS จากเชื้อ

ได้ทำการสกัด LPS จากเชื้อทุกสเตรนที่แยกได้ รวมทั้ง reference สเตรน ตามวิธีของ Baum และ Joens (1979) โดยใช้ ฟีนอล-น้ำร้อน ตะกอนขั้นสุดท้ายเป็นส่วน water-phase นำมาละลายในน้ำกลั่นซึ่งผ่านเครื่องกรอง nanopure 1 ml

การทดสอบ immunodiffusion

ได้ทำการทดสอบแอนติซีรั่มและแอนติเจน (LPS) ที่ผลิตได้โดยวิธี double immunodiffusion ในวุ้น agarose 1% ซึ่งมีส่วนผสมของ Tris-NaCl buffer* ขนาดหลุมที่ใช้ในการทดลอง 5 mm แต่ละหลุมห่างกัน 7 mm ปริมาณ LPS ที่ใช้คือ 25 μl ต่อหลุม อ่านปฏิกริยา precipitin ที่เกิดขึ้นในเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องในกล่องเก็บความชื้น โดยมีซีรั่มกระต่ายปกติเป็นตัวเปรียบเทียบในการทดสอบแต่ละชุด (Mapother and Joens, 1979)

ผลการทดลอง

สารสกัด LPS (water phase) จากเชื้อ *T. hyodysenteriae* reference สเตรน ทั้ง 8 สเตรน เมื่อนำมาทดสอบกับแอนติซีรั่มต่อ whole cell bacterins ของเชื้อดังกล่าว จะเกิด precipitin band ระหว่าง LPS จากเชื้อทั้ง 7 ซีโรไทป์กับhomologousแอนติซีรั่ม ภายหลังการอ่านผลในเวลา 6 ชั่วโมง ไม่พบปฏิกริยาข้ามกลุ่ม(cross-reaction)กับแอนติซีรั่มต่อ ซีโรไทป์อื่นๆ และ *T. innocens* เลย

ส่วนเชื้อ beta-hemolytic *T. hyodysenteriae* ซึ่งแยกได้จากอุจจาระสุกรป่วยด้วยโรคบิดมูกเลือด 60 ตัวอย่าง ในกลุ่มสุกรที่มีอาการท้องร่วง บางครั้งถ่ายเป็นมูกเลือดจำนวน 550 ตัวอย่างจากฟาร์มเลี้ยงสุกรในจังหวัดต่างๆ นั้น คิดเป็นอัตราการติดเชื้อโรคดังกล่าว 11% และเมื่อนำสารสกัด LPS จากเชื้อที่คัดเลือกมา 26 สเตรน จาก 60 สเตรน เพื่อทดสอบกับแอนติซีรั่มทั้ง 8 ไทป์ พบว่าทุกสเตรนทำปฏิกริยา precipitin เฉพาะกับ แอนติซีรั่มต่อซีโรไทป์ 2 เท่านั้น ผลการตรวจทั้งหมดแจกแจงในตารางที่ 1

---

* Biorad Laboratories, California, U.S.A.

ตารางที่ 1. ผลการแยกเชื้อและผลการตรวจซีโรไทป์ของเชื้อ *T. hyosysenteriae* ในสุกรที่มีอาการท้องร่วงหรือถ่ายเป็นมูกเลือดจากจังหวัดต่าง ๆ

จังหวัด	จำนวนตัวอย่างอุจจาระสุกร	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก	จำนวนที่ตรวจซีโรไทป์จากตัวอย่างที่ให้ผลบวก	ซีโรไทป์ของ *T.hyodysenteriae*
นครปฐม	173	29	12	2
ราชบุรี	136	16	7	2
ชลบุรี	46	-	-	-
สระบุรี	32	-	-	-
อ่างทอง	30	13	5	2
สมุทรปราการ	29	-	-	-
ฉะเชิงเทรา	24	-	-	-
ระยอง	20	-	-	-
เพชรบุรี	20	-	-	-
ปราจีนบุรี	18	-	-	-
จันทบุรี	10	-	-	-
สุพรรณบุรี	10	-	-	-
ลพบุรี	1	1	1	2
กรุงเทพฯ	1	1	1	2
จำนวนทั้งหมด	550	60	26	

วิจารณ์

การทดสอบ gel diffusion และอ่านผลในเวลา 6 ชั่วโมง ภายหลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้อ่าน precipitin band ได้ชัดเจน และเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกริยาข้ามกลุ่มกันระหว่างซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์ 5 ข้ามกลุ่มกับซีโรไทป์ 2, ซีโรไทป์ 6 ข้ามกลุ่มกับซีโรไทป์ 1, และซีโรไทป์ 7 ข้ามกลุ่มกับซีโรไทป์ 1 และ 2 ปฏิกริยาข้ามกลุ่มนี้จะปรากฏให้เห็นได้ภายหลัง 18 ชั่วโมง ซึ่งจำเป็นจะต้องทำ absorption ด้วยการเติม harvested cells ไปในซีรั่มกระต่ายที่ต้องการ absorb ปฏิกริยาภายหลังจากปั่น จึงจะเป็น homologous กัน ดังนั้น เพื่อหลีกเลี่ยงสาเหตุดังกล่าวจึงอ่านผลใน 6 ชั่วโมง (Mapother and Joens, 1985)

ผลการตรวจแยกซีโรไทป์ของเชื้อ *T. hyodysenteriae* ทั้ง 26 สเตรน โดยวิธี immunodiffusion พบว่าเป็นซีโรไทป์ 2 นั้น จะเห็นว่าตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลบวกมากที่สุด ได้มาจากจึงหวัดนครปฐมและราชบุรี ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรมาก แสดงถึงสภาวะโรคบิดมูกเลือดซึ่งมีมากกว่าที่อื่น การตวจพบเชื้อซีโรไทป์เดียวกันในจังหวัดต่าง ๆ อาจแสดงถึงแหล่งกำเนิดโรคเดียวกัน เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าเกษตรกรนิยมซื้อลูกสุกรจากจังหวัดดังกล่าวไปเลี้ยงในฟาร์มรอบนอก สุกรเหล่านี้บางตัวเป็นพาหะนำโรคไปแพร่ระบาด สาเหตุอีกประการหนึ่งคือ โรคอาจติดมาจากแม่พันธุ์ซึ่งฟาร์มเลี้ยงสุกรขนาดใหญ่ทั่วไปนิยมสั่งแม่พันธุ์จากต่างประเทศแถบสหรัฐอเมริกาและยุโรป Baum และ Joens (1979) ได้รายงานการตรวจพบเชื้อซีโรไทป์ 1 และ 2 ในสหรัฐอเมริกา Mapother และ Joens (1985) ได้พบซีโรไทป์ 5,6 ในสหรัฐอเมริกาเช่นกันรวมทั้งซีโรไทป์ 7 ในเนเธอร์แลนด์ อย่างไรก็ดีถ้ามีการสำรวจโรคบิดมูกเลือดมากขึ้น อาจตรวจพบซีโรไทป์อื่นๆ ได้ การรายงานครั้งนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นของโรคบิดมูกเลือดในประเทศไทย เพื่อนำผลที่ได้ไปพัฒนาวิธีการตรวจโรคทางซีรั่มวิทยา ที่สะดวก รวดเร็ว ตลอดจนถึงวิธีการควบคุมและป้องกันโรคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. R.A. Ralston ที่ปรึกษาโครงการ ATT ประจำสำนักงานปลัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ Dr. Shannon C. Whipp, แห่ง National Animal Disease Centre และ Dr. Lynn A. Joens แห่ง University of Arizona ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้การปรึกษาและแนะนำ ขอขอบคุณ น.สพ. สุวิทย์ ลิมาวงษ์ปราณี น.สพ.เกียรติศักดิ์ รัตนสมบัติ คุณอานุภาพ หมอแก้ว และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยให้งานครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Baum, D.H., and Joens, L.A. 1979. Serotypes of beta-hemolytic *Treponema hyodysenteriae.* Infect. Immun. 25 : 792-796.

Harris, D.L. 1974. Current status of research on swine dysentery. J. Am. Vet. Med. Assoc. 164 : 809-812.

Kinyon, J.M. and Harris, D.L. 1974. Growth of *Treponema hyodysenteriae* in liquid medium. Vet. Rec. 95 : 219-220.

Kinyon, J.M., Harris, D.L., and Glock, R.D. 1977. Enteropathogenicity of *Treponema hyodysenteriae.* Infect. Immun. 15 : 638-646.

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

Lemcke, R.M., Bew, J., Burrows, M.R., and Lysons, R.J. 1979. The growth of *Treponema hyodysenteriae* and other porcine intestinal spirochaetes in a liquid medium. Res. Vet. Sci. 26 : 315-319.

Mapother, M.E., and Joens, L.A. 1985. New serotypes of *Treponema hyodysenteriae.* J. Clin. Microbial. 22 : 161-164.

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

Serotypes of *Treponema hyodysenteriae* isolated from swine herds affected with swine dysentery in the central region

Indhira Kramontong *
Wantanee Neramitmansook *
Tipa Tanticharoenyos *
Khampee Kortheerakul **

Abstract

Twenty six isolates of pathogenic, beta-hemolytic *Treponema hyodysenteriae* were positively denoted from 60 isolates from fecal samples of 550 pigs suffering from diarrhea or mucohemorrhagic diarrhea in the central region of Thailand where 11% incidence of swine dysentery was indicated. Those isolates were extracted with hot-phenol water method and the water phases were serologically examined with rabbit antisera against whole-cell bacterins of 7 serotypes of *T. hyodysenteriae* and another strain of and *T. innocens.* Based on precipitin reaction in agarose gel, all isolates of *T. hyodysenteriae* were serotype 2.

Key words : *Treponema hyodysenteriae*, serotypes, swine dysentery.

---

* National Animal Health and Production Institute, Veterinary Research Division, Department of Livestock Development, Bangkok 10900, Thailand.

** Cargill Co. Ltd., Bangkok, Thailand.