

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mycoplasma gallisepticum (MG) เป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์ปีกที่เกี่ยวข้องกับโรคระบบหายใจแบบเรื้อรัง (chronic respiratory disease; CRD) ในไก่ สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกทั่วโลก (Wang et al., 2001) โดยเฉพาะปัญหาถุงลมอักเสบ ส่งผลให้เกิดการคัดซากทิ้งที่โรงงานแปรรูป นอกจากนี้ ยังส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนอาหารไม่ดี ผลผลิตไข่ลดลง ต้นทุนค่ายาสูงขึ้น และมีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นจากโปรแกรมการป้องกัน และควบคุมโรค รวมถึงค่าใช้จ่ายสำหรับการเฝ้าระวังทางซีรัมวิทยา การแยกเชื้อ และการพิสูจน์เชื้อ (Ley, 2003) ภายหลังจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ปีกทั่วโลก โดยเฉพาะการเลี้ยงสัตว์ปีกเป็นจำนวนมากในพื้นที่ขนาดเล็ก ร่วมกับการเลี้ยงไก่หลายอายุ ส่งผลให้มาตรการการใช้ระบบควบคุมโรคทางชีวภาพเป็นไปได้ยาก (Kleven, 1997) ความจริงแล้ว โรคมัยโคพลาสมา มีสาเหตุมาจากเชื้อมัยโคพลาสมา ก่อโรคหลายชนิด อย่างไรก็ตาม MG เป็นเชื้อที่มีความสำคัญที่สุด และเป็นโรคสำคัญที่ต้องมีการรายงานการระบาดตามข้อกำหนดของสำนักงานโรคระบาดระหว่างชาติ (OIE, 2008) ตามกฎหมายของยุโรป เชื้อ MG รวมอยู่ใน Council Directive ว่าด้วยสถานะสุขภาพสัตว์สำหรับการค้าขายสัตว์ปีกและไข่ปีก ระหว่างประเทศสมาชิก และการนำเข้าจากประเทศที่สาม (Council Directive, 90/539/EEC)

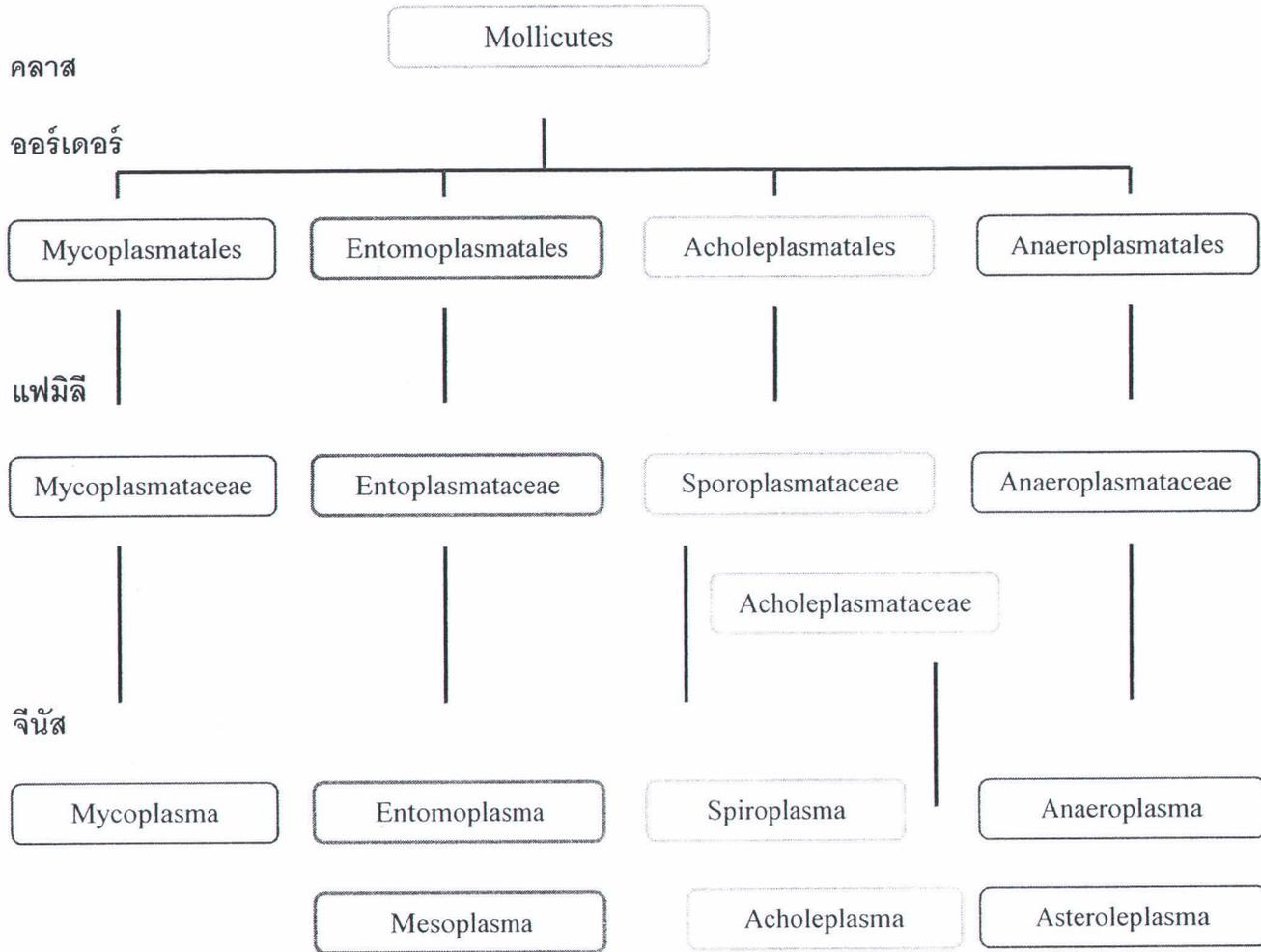
อาการทางคลินิกของโรค MG ได้แก่ หายใจมีเสียงดัง ไอ มีน้ำมูก และตาอักเสบ รวมถึงผลผลิตไข่ลดลง (Wanasawaeng et al., 2006) อย่างไรก็ตาม การพัฒนาของอาการจะค่อยเป็นค่อยไป การติดเชื้อ หรือการเกิดโรคอาจใช้เวลานานขึ้นจนเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ส่งผลให้ยากต่อการควบคุมการติดเชื้อด้วยการใช้ยาต้านจุลชีพ (Ley, 2003) นอกจากนี้ MG ยังเป็นเชื้อสำคัญที่เป็นสาเหตุในม่านของการติดเชื้อโรคแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะ *Escherichia coli* และ *Avibacterium paragallinarum*

หรือโรคติดเชื้อไวรัส เช่น นิวคาสเซิล และหลอดลมอักเสบติดต่อ และกล่องเสียงอักเสบติดต่อ เป็นต้น (Stipkovits, 2001) Ley (2003) ให้คำนิยามของ "โรคถุงลมอักเสบ (Airsacculitis)" ไว้ว่า เป็นลักษณะการอักเสบของถุงลมอย่างรุนแรงอันเป็นผลจากการติดเชื้อ MG หรือ *Mycoplasma synoviae* (MS) ร่วมกับการแทรกซ้อนของเชื้อไวรัสตามระบบหายใจ เช่น หลอดลมอักเสบ หรือนิวคาสเซิล และ *Escherichia coli*

2.1 ชีววิทยา และอนุกรมวิธานของเชื้อมัycoplasมา

เชื้อมัycoplasมาเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอตที่มีขนาดเล็กมาก ไม่มีผนังเซลล์ล้อมรอบโดยเยื่อหุ้มเซลล์ MG อยู่ในคลาส Mollicutes ออร์เดอร์ Mycoplasmatales แฟมิลี Mycoplasmataceae และจีนัส *Mycoplasma* (OIE, 2008) นอกจากนี้ แฟมิลียังถูกแบ่งย่อยลงไปโดยอาศัยถิ่นที่อยู่ ความต้องการสเตอรอล (sterol) สำหรับการเจริญเติบโต ขนาดจีโนม และความทนทานต่อออกซิเจน และจีนัสยังแบ่งย่อยลงไปอีกโดยอาศัยกลไกที่เชื้อใช้สำหรับการสร้างพลังงาน เช่น กลูโคส อาร์จินีน หรือการหมักยูเรีย ส่วนชนิดของมัycoplasมาจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางชีวเคมี และการทดสอบทางซีรัมวิทยา (Rosenbusch, 1994)

ในปัจจุบัน มีเชื้อมัycoplasมาประมาณ 25 ชนิดจากจีนัส *Mycoplasma*, *Acholeplasma* และ *Ureaplasma* ที่สามารถแยกเชื้อได้จากสัตว์ปีก (Whithear, 1996) เกณฑ์พื้นฐานสำหรับการรวมเอาจุลชีพชนิดนี้อยู่ในคลาส Mollicutes คือ การไม่มีผนังเซลล์ แต่มีเพียงผนังเยื่อหุ้มเซลล์ล้อมรอบ ลักษณะปราศจากผนังเซลล์ทำให้รูปร่างของโคไลนี้เป็นเหมือนไข่ดาว (fried egg) อันเป็นลักษณะจำเพาะของเชื้อเมื่อนำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และการไม่มีโครงสร้างของโปรตีนบริเวณผนังเซลล์ยังทำให้เชื้อมัycoplasมามีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ต่อโปรตีนดังกล่าว (Rosenbusch, 1994)



ภาพที่ 1. อนุกรมวิธานของเชื้อมััยโคพลาสมา ดัดแปลงจาก Rosenbusch (1994)

ตารางที่ 1. คุณสมบัติของเชื้อมัคโคพลาสมาในสัตว์ปีก (Kleven, 1994)

| Mycoplasma species | โฮสต์ตามปกติ | Glucose Fermentation | Arginine Hydrolysis | Phosphatase activity |
|-------------------------|---------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| <i>A. laidlavii</i> | หลายชนิด | + | - | + หรือ - |
| <i>M. anatis</i> | เปิด | + | - | - |
| <i>M. anseris</i> | ห่าน | - | + | - |
| <i>M. cloacale</i> | ไก่ทอง | - | + | - |
| <i>M. columbinasale</i> | นกพิราบ | - | + | + |
| <i>M. columbinum</i> | นกพิราบ | - | + | - |
| <i>M. columborale</i> | นกพิราบ | + | - | - |
| <i>M. gallinarum</i> | ไก่ | - | + | - |
| <i>M. gallinaceum</i> | ไก่ | + | - | - |
| <i>M. gallisepticum</i> | ไก่ และไก่ทอง | + | - | - |
| <i>M. gallopavonis</i> | ไก่ทอง | + | - | - |
| <i>M. glycyphilum</i> | ไก่ | + | - | + หรือ - |
| <i>M. iners</i> | ไก่ | - | + | - |
| <i>M. iowae</i> | ไก่ทอง | + | + | - |
| <i>M. lipofaciens</i> | ไก่ | + | + | - |
| <i>M. meleagridis</i> | ไก่ทอง | - | + | + |
| <i>M. pullorum</i> | ไก่ | + | - | - |
| <i>M. synoviae</i> | ไก่ และไก่ทอง | + | - | - |

โดยทั่วไปแล้ว เชื้อมัยโคพลาสมาที่มีขนาดจีโนมเล็ก ประมาณ 600,000 ถึง 1,350,000 คู่เบส เท่านั้น หรือคิดเป็นสัดส่วนเพียง 1 ใน 6 ของจีโนมของเชื้อ *Escherichia coli* และมี G+C content ที่ต่ำมาก 23-40 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ดังนั้น จึงมีเพียงส่วนหนึ่งของจีโนมทั้งหมดเท่านั้นที่จะมีการแสดงออกของข้อมูลทางพันธุกรรม เนื่องจาก เชื้อมัยโคพลาสมามีข้อจำกัดของศักยภาพทางพันธุกรรม ดังนั้น การเจริญเติบโตของเชื้อจึงจำเป็นต้องใช้พื้นผิวของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และโภชนาะที่มีความซับซ้อนกว่าเชื้ออื่นๆ (Rosenbusch, 1994) และเชื้อมัยโคพลาสมายังเป็นต้นแบบที่ดีสำหรับการศึกษารูปร่างของยีนส์ที่น้อยที่สุดที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต หลังจากเชื้อมัยโคพลาสมา 5 ชนิดแรกถูกนำมาศึกษาลำดับของสารพันธุกรรมแล้ว *Mycoplasma gallisepticum* สายพันธุ์ R_{low} ก็ถูกคัดเลือกเป็นเชื้อมัยโคพลาสมาในสัตว์ปีกชนิดแรกที่นำมาศึกษาลำดับของสารพันธุกรรมจนครบทั้งสาย ขนาดของจีโนมประกอบด้วย 996,422 คู่เบส โดยมีสัดส่วนของ G+C content เป็น 31 เปอร์เซ็นต์ (Papazisi et al., 2003)



ภาพที่ 2. แผนผังวงกลมแสดงจีโนมของเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* สายพันธุ์ R_{low} (Papazisi et al., 2003)

2.2 พยาธิชีววิทยาของเชื้อ MG

MG มักจะเพิ่มจำนวนตามระบบทางเดินหายใจของไก่ เชื้อ และสายพันธุ์ของ MG มีความหลากหลายของพยาธิกำเนิด ขึ้นกับคุณลักษณะทางจีโนไทป์ และฟีโนไทป์ วิธีการเพิ่มจำนวน จำนวนครั้งของการผ่านลงในโฮสต์ และวิธีการป้องกันเชื้อ และขนาดของเชื้อ เป็นต้น การใช้เชื้อที่ผ่านลงในไขฟัก มักจะมีความสามารถในการติดเชื้อได้ดีว่าเชื้อที่ผ่านลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Ley, 2003) ตามปกติถิ่นอาศัยของเชื้อมัคโคพลาสมา คือ ผิวเมมเบรนของระบบทางเดินหายใจ และ/หรือระบบทางเดินปัสสาวะ ตา และข้อต่อ เชื้อมัคโคพลาสมาส่วนใหญ่เป็นปรสิตบนพื้นผิว ไม่ค่อยลุกลามเข้าสู่เนื้อเยื่อ การเกาะติดของเชื้อมัคโคพลาสมากับเซลล์ของโฮสต์เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเจริญเติบโต และพยาธิกำเนิดของโรค MG เป็นเชื้อมัคโคพลาสมาชนิดหนึ่งที่เป็นเชื้อก่อโรคปฐมภูมิ สามารถเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อมัลติฟอลัน และเรื้อรังได้ตามตำแหน่งต่างๆของร่างกาย จนกระทั่งมีการติดเชื้อแทรกซ้อนอื่นๆติดตามมา (Levisohn and Kleven, 2000) การติดเชื้อ MG สามารถแพร่กระจายทางตั้งจากแม่สู่ลูก และทางขนานโดยการติดเชื้อทางตรงของไก่ที่มีความไวรับต่อโรคกับไก่ติดเชื้อที่เป็นพาหะของโรค หรือทางอากาศ และการสัมผัสโดยทางอ้อมโดยสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน (Stipkovits, 2001)

ปัจจัยความรุนแรงที่สัมพันธ์กับโรค MG ประการหนึ่งคือ "Cytadhesion" เป็นความสามารถในการปรับเปลี่ยนส่วนประกอบที่พื้นผิวเซลล์ของเชื้อ ซึ่งเป็นกลไกในการหลบหลีก และ/หรือปรับตัวของระบบภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแวดล้อม และเพิ่มความสามารถของโฮสต์ต่อการบุกรุกเซลล์ (Kleven, 1997; Papazisi et al., 2003) ขั้นตอน Cytadherence เข้ากับพื้นผิวเซลล์เยื่อเมือกของเนื้อเยื่อโฮสต์มีความจำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อ ลักษณะเด่นประการหนึ่งของ MG คือ การตอบสนองโดยการเพิ่มจำนวนของเซลล์น้ำเหลือง (lymphoproliferative) ในระบบทางเดินหายใจ (Gaunson et al., 2000) โดยพบว่า ความหนาของเยื่อเมือกหนาขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 1-2 สัปดาห์ภายหลังการติดเชื้อ MG แล้ว ลดลงอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง 2-3 สัปดาห์ภายหลังการติดเชื้อ ขณะเดียวกัน MG genome titer จะ

ลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 1-3 สัปดาห์ภายหลังการติดเชื้อ ดังนั้น การเพิ่มจำนวนของเชื้อ MG สูงที่สุด 2 สัปดาห์ภายหลังการติดเชื้อ แต่รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของความหนาเยื่อเมือกสูงที่สุดที่ 2 สัปดาห์ภายหลังการติดเชื้อ อย่างไรก็ตาม เชื้อ MG กลับลดการตอบสนองต่อปฏิกิริยาเหนี่ยวนำทางเคมี (chemotactic response) ซึ่งอาจเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโต และการรักษาเชื้อ MG ไว้ในร่างกายไก่ (Lam, 2004)

ชนไก่ที่มีการปนเปื้อนมีความเสี่ยงสูงที่สุดต่อการจัดการสิ่งแวดล้อมให้ปลอดจากเชื้อมัคโคพลาสมา โดยเฉพาะเมื่อเชื้อมีการแพร่กระจายอยู่ในฟาร์ม และมีการทำความสะอาดที่ไม่เพียงพอ ภายหลังการปลดไก่ที่มีการติดเชื้อรุ่นที่ผ่านมา เชื้อสามารถมีชีวิตเป็นเวลา 2 วันในวัสดุที่เป็นยาง เช่น รองเท้าบูท และผ้าฝ้าย เช่น เสื้อผ้า ดังนั้น การใช้อ่างจุ่มเท้า และการเปลี่ยนชุดที่ฟาร์มจัดไว้ให้ จึงมีความจำเป็นสำหรับการควบคุมโรค MG ระหว่างฟาร์ม ตำแหน่งที่เชื้อชอบมัคโคพลาสมาโปรดปรานเป็นพิเศษ ได้แก่ เยื่อจมูก มากกว่าผิวหนัง และหู จึงอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อจะสามารถหลุดรอดจากการล้าง และการผ่านสเปรย์ยาฆ่าเชื้อตามปกติ (Christinsen et al., 1994)

2.3 การวินิจฉัยโรค

2.3.1 การทดสอบทางซีรัมวิทยา (Serological Tests)

การตอบสนองของแอนติบอดี นิยมใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการวินิจฉัย และการศึกษาทางระบาดวิทยา เพื่อการประเมินความชุกของโรคติดเชื้อ (Noormohammadi et al., 2002) เทคนิคทางซีรัมวิทยาเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญที่สามารถตรวจสอบไก่ที่ติดเชื้อ MG ได้ตั้งแต่ช่วงแรกของการติดเชื้อ (Kempf et al., 1994) อย่างไรก็ตาม ไม่พบความสำคัญระหว่างระดับของแอนติบอดีในกระแสเลือด และการป้องกันโรคต่อ MG (Whithear, 1996) กรณียาฟาร์มที่ให้ผลบวกทางซีรัมวิทยา ร่วมกับประวัติฟาร์ม และการแสดงอาการทางคลินิกของ MG แล้ว ควรมีการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมเพื่อแยกเชื้อ และ/

หรือการจำแนกเชื้อด้วย (Ley, 2003) โดย Kleven (1994) แนะนำให้เก็บตัวอย่าง 10 เปอร์เซ็นต์ของฝูง หรืออย่างน้อย 300 ตัว ก่อนการให้ผลผลิตไข่ หลังจากนั้น เก็บตัวอย่าง 30 ตัวต่อฝูงสำหรับการทดสอบ ทุก 60-90 วัน และ Ley (2003) แนะนำให้มีการตรวจติดตามทางซีรัมวิทยาในฟาร์มไก่พันธุ์ตามช่วงเวลา ที่สั้นกว่านั้นเป็นทุก 2 สัปดาห์ เพื่อจะได้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ และป้องกันการถ่ายทอดเชื้อผ่าน ไข่

การทดสอบทางซีรัมวิทยาสำหรับเชื้อมัคโคพลาสมาที่นิยมใช้กัน ได้แก่ serum plate agglutination (SPA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ haemagglutination inhibition (HI) (Moscoso et al., 2004; OIE, 2008)

1.) Serum plate agglutination (SPA)

ช่วงทศวรรษที่ 1960 การทดสอบด้วยวิธี SPA ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาทดแทน Tube agglutination test สำหรับการตรวจติดตามระดับแอนติบอดีต่อ MG (Collet et al., 2005) เนื่องจาก SPA มีความ รวดเร็ว ราคาถูก และมีความไวในการทดสอบสูง ดังนั้น จึงนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการตรวจ คัดกรอง เพื่อการตรวจติดตามสุขภาพ และการวินิจฉัยโรคทางซีรัมวิทยา

ความไวในการทดสอบของ SPA สูงกว่า ELISA และ HI ในการตรวจสอบแอนติบอดีตั้งแต่ ระยะเวลาของการติดเชื้อ MG เป็นผลมาจากความสามารถของการทดสอบในการตรวจสอบแอนติบอดี ชนิด IgM ซึ่งเป็นอิมมูโนโกลบูลินกลุ่มแรกที่มีการตอบสนองภายหลังการติดเชื้อ (Kempf et al., 1994) ไก่ที่ติดเชื้อจะให้ผลเลือดต่อ SPA เป็นบวกได้ตั้งแต่ 7-10 วันภายหลังการติดเชื้อ (Kleven, 1994) หลังจากนั้น ปฏิกริยาจะบวกต่อเนื่องไปอีกประมาณ 2-3 เดือน และในฟาร์มอาจยาวนานไปถึงประมาณ 6 เดือน (Stipkovitz, 2001) อย่างไรก็ตาม แอนติเจนที่มาจากแหล่งที่แตกต่างกันอาจมีความไวรับ และ ความจำเพาะในการทดสอบแตกต่างกัน รวมถึงชุดการผลิตที่แตกต่างกันด้วย (Kleven, 1998) โดย SPA จะเป็นวิธีการตรวจสอบที่ดีในกรณีที่มีผลบวกมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่มีผลบวกต่ำกว่านั้น

แนะนำให้มีการทดสอบซ้ำในอีก 2 สัปดาห์ข้างหน้า หากจำนวนผลบวกเพิ่มขึ้น บ่งชี้ถึงการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน แต่หากจำนวนผลบวกไม่มีการเปลี่ยนแปลง หรือน้อยลง บ่งชี้ถึงการติดเชื้อช่วงท้าย หรือมีการติดเชื้อคนละสายพันธุ์ (Stipkovitz, 2001) นอกจากนั้น การเกิดผลบวกเทียมมักพบได้ในฟาร์มที่ติดเชื้อ MS เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้าม (Kempf et al., 1994) หรือไก่ที่เพิ่งได้รับวัคซีนสื่อน้ำมัน (Glisson et al., 1984) และวัคซีนที่เตรียมมาจากเซลล์เพาะเลี้ยง เช่น infectious bursal disease (IBD) (Ross et al., 1990) จากการทดลองให้ไก่ได้รับวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อตายสื่อน้ำมัน หลอดลมอักเสบติดต่อกัน และกล่องเสียงอักเสบติดต่อกัน พบว่าปฏิกิริยาต่อการทดสอบ SPA อย่างไม่จำเพาะจะเกิดขึ้นได้ในอัตราส่วน 10-30 เปอร์เซ็นต์ภายใน 4-6 สัปดาห์ (Stipkovitz, 2001)

การทดสอบ SPA ควรใช้ซีรัมที่สด และใหม่ เนื่องจากการใช้ซีรัมแช่แข็งอาจเกิดปัญหาตะกอนจากปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ อย่างไรก็ตาม กรณีที่ผลเลือดต่อ SPA เป็นบวก ควรมีการยืนยันด้วยเทคนิค HI และหรือวิธีการทดสอบทางซีรัมวิทยาอื่นๆ ที่เป็นที่ยอมรับ เช่น ELISA หรือการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีการเพาะเชื้อ หรือพีซีอาร์ (Kleven, 1998)

2.) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ปัจจุบันมีชุดทดสอบสำเร็จรูปที่อาศัยเทคนิค ELISA มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์ เช่น IDEXX (IDEXX Laboratories, Maine, USA), Synbiotics (Synbiotics Corporation, California, USA), MyGa-Tests (Diagnosticum, Budapest, Hungary) สำหรับการตรวจติดตามสุขภาพ และการวินิจฉัยทางซีรัมวิทยา โดยทั่วไปเทคนิค ELISA จะมีความไวน้อยกว่า SPA เล็กน้อย แต่มีความจำเพาะมากกว่า SPA (Kempf et al., 1994) วิธีการเก็บตัวอย่างไข่แดงแทนซีรัม เพื่อการตรวจสอบระดับแอนติบอดี เป็นวิธีการที่ง่าย ราคาไม่แพง และสามารถลดความเครียดของไก่ในระหว่างการเก็บตัวอย่าง ซึ่งอาจส่งผลทำให้ไข่สด หรือไข่แตกในช่องท้อง ซึ่งทำได้เพียงเก็บตัวอย่างไข่ไก่ที่คัดทิ้งส่งตัวอย่างเท่านั้น (Mohammed et al., 1985; Kempf et al., 1998)



3.) Haemagglutination inhibition (HI)

เทคนิค HI นิยมใช้สำหรับการยืนยันผลบวก ภายหลังจากการตรวจคัดกรองด้วย SPA หรือ ELISA และมีความจำเพาะที่สูงมาก (Ley, 2003) อย่างไรก็ตาม HI เป็นวิธีที่ใช้เวลานาน และน้ำยาเคมีไม่มีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ และความไวในการทดสอบน้อย (Kempf et al., 1994) ไก่ติดเชื้อจะยังไม่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค HI จนกระทั่งภายหลังจากการติดเชื้อไปแล้วอย่างน้อย 3 สัปดาห์ และระดับ HI titer ที่มากกว่า 1:40 ถึง 1:80 จึงถือว่าผลเลือดเป็นบวก แต่การแปลผลต้องอยู่บนพื้นฐานของการจัดการสุขภาพฝูงสัตว์ (Kleven, 1994) องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ กำหนดให้ฝูงที่มีผลเลือดเป็นบวกในสัดส่วนมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์จากการทดสอบด้วยเทคนิค HI หรือ ELISA จึงจะถือว่ามีการติดเชื้อ MG อย่างไรก็ตาม การวินิจฉัยสุดท้ายจำเป็นต้องมีการแยกเชื้อ หรือการตรวจดีเอ็นเอ (OIE, 2008)

1. การแยกเชื้อ และพิสูจน์เชื้อ MG (Isolation and Identification of MG)

วิธีการมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยโรค MG คือ การแยกเชื้อ และ/หรือการพิสูจน์เชื้อ (Ley, 2003) ซึ่งเป็นหลักฐานยืนยันการติดเชื้อ และยังสามารถนำตัวอย่างเชื้อในพื้นที่ดังกล่าวมาใช้สำหรับการศึกษา และการเปรียบเทียบคุณสมบัติทางพยาธิกำเนิด หรือความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Kempf et al., 1994) แต่เชื้อ MG เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตช้า และแยกเชื้อได้ยาก จำเป็นต้องใช้เวลาเพาะเชื้ออย่างน้อย 1 สัปดาห์ ปัญหาของการแยกเชื้อ MG คือ การเจริญเติบโตของเชื้อมัคโคพลาสมากลุ่ม Saprophyte ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MG บริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนต้น โดยเฉพาะในไก่อายุมาก (Garcia et al., 2005)

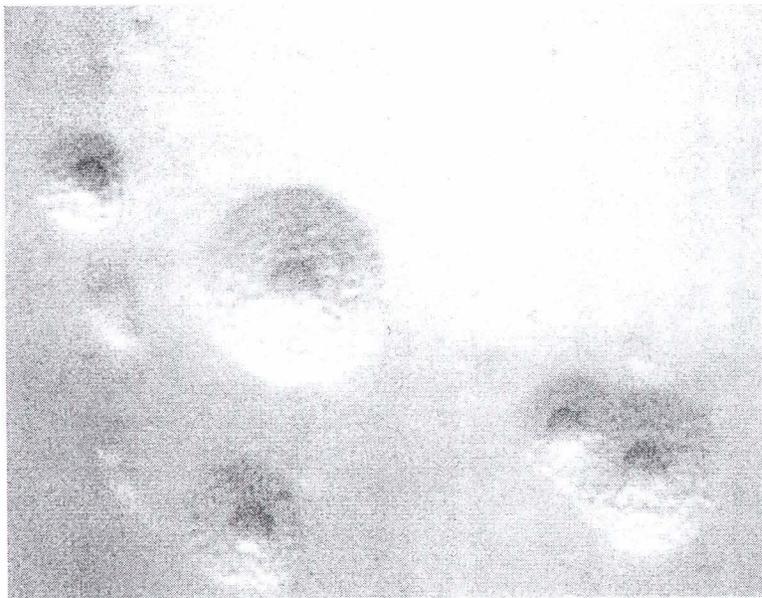
เชื้อมัคโคพลาสมาที่ก่อโรคในสัตว์ปีกสามารถแอบแฝงอยู่ในระบบทางเดินหายใจส่วนต้น หลอดลม หรือเพดานปากได้เป็นเวลานาน และเป็นตำแหน่งที่ดีสำหรับการเก็บตัวอย่างสำหรับการแยกเชื้อ อย่างไรก็ตามรอยโรคที่ถูกลบสามารถเป็นตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อได้ดีเช่นกัน (Kleven, 1994) นอกจากนี้ การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากถุงลม หลอดลม หรือเนื้อเยื่ออื่นๆ ที่สามารถสังเกตเห็นรอยโรค



ก็สามารถนำมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้โดยตรง (Kleven, 1998) สาเหตุที่หลอดลมเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการแยกเชื้อ เนื่องจาก ระบบทางเดินหายใจส่วนต้น เป็นทางเข้าของการติดเชื้อ MG โดยธรรมชาติ และหลอดลมยังเป็นตำแหน่งที่เชื้อ MG ชอบเป็นพิเศษ แม้ว่าอาการของโรคจะยังพบได้ตามส่วนอื่นๆของระบบหายใจ (Levisohn and Kleven, 2000) ในช่วงของการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (ไม่เกิน 60-90 วันภายหลังการติดเชื้อ) ปริมาณเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนต้น และอุบัติการณ์การติดเชื้อจะยังสูง ในกรณีนี้การเก็บตัวอย่างจากหลอดลม และช่องเปิดปากเพียง 5-10 ตัวอย่างก็เพียงพอ อย่างไรก็ตาม กรณีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง หรือการติดเชื้อมัคโคพลาสมาสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง ควรเก็บตัวอย่าง 30-100 ตัวอย่างสำหรับการแยกเชื้อให้ประสบความสำเร็จ (Kleven, 1998)

การแยกเชื้อ MG จำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโภชนะซับซ้อน และเสริมด้วยซีรั่มสุกร ความเข้มข้น 10-15 เปอร์เซ็นต์ และผ่านการทำให้หมดฤทธิ์ด้วยความร้อน (Ley, 2003) ตามปรกติภายหลังการใส่เชื้อลงใน Mycoplasma broth แล้ว เชื้อจะยังคงมีชีวิตอยู่ได้หลายวันที่อุณหภูมิห้อง อย่างไรก็ตาม ควรนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสให้เร็วที่สุดจนกระทั่งสีฟีนอลเรดเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลือง จึงย้ายมาใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่บ่มในโอบิดมิติดชิด เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ เชื้อมัคโคพลาสมาก่อโรคมักปรากฏให้เห็นโคโลนีได้ภายใน 4-5 วันภายหลังการบ่ม (Kleven, 1998) ลักษณะโคโลนีของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้ลดความเข้มแสงลง จะมีลักษณะรูปร่างคล้ายไขดาว โคโลนีกลมผิวเรียบมีขนาดเล็กมากเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-1 มิลลิเมตร ที่ศูนย์กลางจะแน่น และนูนสูงขึ้นมา (Ley, 2003) บางครั้งอาจพบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในพาสสาจ (passage) แรกๆ แต่แบคทีเรียจะเกิดการ Pigmentation และไม่สามารถพาสสาจต่อไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมัคโคพลาสมา (OIE, 2008) เชื้อ MG ติดสี Giemsa ได้ดี และติดสี Gram ลบเล็กน้อย (Ley, 2003) การจำแนกเชื้อควรใช้การทดสอบทางชีวเคมี เช่น คุณสมบัติการหมักกลูโคส Arginine hydrolysis และการทดสอบทางซีรั่มวิทยา เช่น Growth inhibition, indirect fluorescent antibody test หรือ indirect immunoperoxidase test เป็นต้น

(Stipkovitz, 2001) การนับจำนวนเชื้อมี 2 วิธีคือ วิธี Color changing unit (CCU) และ Colony-forming units (CFU) โดยวิธี CCU เหมาะสำหรับการนับจำนวนเชื้อจำนวนมากได้ง่ายกว่าวิธี CFU อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างจะต้องปลอดเชื้อ หรือจำเป็นต้องมีขั้นตอนเพิ่มเติมสำหรับการเพาะเชื้อบน Mycoplasma agar และ Blood agar เพื่อให้การสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีใน Mycoplasma broth เกิดจากเชื้อมัยโคพลาสมาเท่านั้น โดยไม่มีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อน (Christensen et al., 1994)



ภาพที่ 3. ลักษณะโคโลนีของเชื้อมัยโคพลาสมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย40X

2.3.2 การวินิจฉัยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

ลักษณะรอยโรคสำคัญทางจุลพยาธิวิทยาของไก่ที่ติดเชื้อ MG ได้แก่ lymphoproliferative response ในระบบทางเดินหายใจ พบภายหลังการเพิ่มจำนวนของเชื้อ MG สูงที่สุดประมาณ 1-2 สัปดาห์ภายหลังการติดเชื้อแล้ว ส่วนรอยโรคการหนาขึ้นของชั้นเยื่อบุเมือกจะสูงที่สุดที่ 2 สัปดาห์ภายหลังการติดเชื้อ และค่อยๆลดลง 2-3 สัปดาห์ต่อมา (Guanson et al., 2000)

2.3.3 การตรวจหากรดนิวคลีอิก (Nucleic Acid Recognition Methods)

การติดเชื้อ MG ระยะแรก หรือภาวะที่ก่ออยู่ในระยะพาหะของโรค การใช้เทคนิคทางซีรัมวิทยา และการแยกเชื้ออาจไม่ประสบความสำเร็จ การเลือกวิธีการทดสอบที่มีความไวสำหรับการตรวจสอบเชื้อ จะช่วยให้การวินิจฉัยโรคได้ดีขึ้น (Nascimento et al., 1991) ในระยะแรกของการพัฒนาเทคนิคทางด้าน อณูชีววิทยาสำหรับ MG โดยใช้โพรบ (probe) ชนิดต่างๆ พบว่าความไวในการทดสอบยังไม่เป็นที่น่าพอใจ แม้ว่าความจำเพาะจะสูงมากก็ตาม ปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ MG ที่ต่ำที่สุดประมาณ 1 นาโนกรัม เทียบเท่ากับปริมาณเชื้อ 10^5 - 10^6 cfu ในเวลาต่อมาปฏิกิริยาห่วงโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) ได้พัฒนาขึ้นมา และกลายเป็นเทคนิคมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบเชื้อ MG (Moscoso et al., 2004) เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ MG ได้จากตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อ ไม่เกิน 1 cfu ใน 100 ไมโครลิตรเท่านั้นเอง (Kempf et al., 1993) ปัจจุบัน PCR กลายเป็นวิธีการทดสอบที่เป็นประโยชน์มากสำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ MG เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว และความไวของการทดสอบสูงในการตรวจสอบกรดนิวคลีอิกของจุลชีพจากตัวอย่างสำลีป้ายเชื้อบริเวณ หลอดลม เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการแยกเชื้อที่ต้องใช้เวลานาน และจำเป็นต้องใช้ประสบการณ์มาก (Fan et al., 1995) นอกจากนี้ เทคนิคทางอณูชีววิทยายังมีความไวในการตรวจสอบเชื้อ MG จาก สิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าวิธีการแยกเชื้ออีกด้วย อย่างไรก็ตาม เชื้อมัคโคพลาสมาที่มีชีวิตเท่านั้นที่ควรให้ความสำคัญในการเป็นที่มาของการติดเชื้อ ดังนั้นนักวิจัยบางแห่งจึงแนะนำการสกัด และวิเคราะห์อาร์เอ็นเอโดยเทคนิค reverse-transcription PCR (RT-PCR) เนื่องจาก อาร์เอ็นเอมีระยะครึ่งชีวิตสั้น ดังนั้น การตรวจพบอาร์เอ็นเอของเชื้อมัคโคพลาสมา จึงบ่งชี้ว่าเซลล์ยังมีชีวิต (Marois et al., 2002) เทคนิค 2 ชนิดที่นิยมใช้บ่อยในสหรัฐอเมริกาคือ การตรวจสอบยีนเป้าหมายจาก 16S rRNA และการใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป IDEXX Flock Chek kit (Garcia et al., 2005) นอกจากนี้ ยังมีการพัฒนาเทคนิค

PCR ขึ้นใหม่ สำหรับการเพิ่มจำนวน และตรวจสอบยีนชนิดอื่นๆ เช่น *mgc2*, *mgc1* และ surface lipoprotein (LP) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2. ตำแหน่งของไพรเมอร์ในยีนเป้าหมาย และขนาดของเป้าหมาย

| นักวิจัย | ยีนเป้าหมาย | ตำแหน่งอ้างอิงตามลำดับสารพันธุกรรม จากฐานข้อมูล Gen Bank | ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ |
|--------------------------|-------------|---|-------------------|
| Lauerman (1995) | 16S rRNA | 1,249-1,434 | 183 |
| Hnatow et al. (1998) | Mgc2 | 637-937 | 236-302 |
| Keeler et al. (1996) | Mgc1 | 3,696-4,200 | 332 |
| Nascimento et al. (1998) | LP | 1-732 | 349 |

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค Real-time PCR สำหรับการตรวจสอบ และหาปริมาณเชื้อ MG โดยอาศัย 16S rRNA gene, *mga_0319* lipoprotein gene และ *mgc2* gene (Grodio et al., 2008)

การควบคุมคุณภาพการทดสอบโดยใช้ Host housekeeping gene เป็นวิธีการควบคุมคุณภาพการทดสอบที่มีความสำคัญเพื่อประเมินผลกระทบจากเทคนิคการเก็บตัวอย่างด้วยวิธีการป้ายเชื้อประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Grodio et al., 2008)

2.4 การจำแนกสายพันธุ์เชื้อ MG

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ MG ที่มีความรวดเร็วเป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับการศึกษาระบาดวิทยาของโรค และสอบสวนกลับไปต้นเหตุของการติดเชื้อ เพื่อออกแบบยุทธศาสตร์ในการควบคุมโรคที่เหมาะสม (Ley et al., 1997) เทคนิคทางอณูชีววิทยาหลายชนิดได้พัฒนาขึ้นเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ MG เช่น Southern blot analysis โดยใช้โพรบต่อ ribosomal RNA การวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อ

มัยโคพลาสมาโดยอาศัยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบโปรตีน (Ley, 2003) เทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) เทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) เทคนิค Dot blot assays (Kleven et al., 1990) รวมถึงการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีนส์ที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่ผิวเซลล์ และล่าสุด คือ การพัฒนาเทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) ที่มีประสิทธิภาพดีในการจำแนกสายพันธุ์ของ MG (Hong et al., 2005)

การพัฒนาเทคนิค PCR/RFLP เพื่อตรวจสอบยีนส์อนุรักษ์ (conserved gene) ของ 16s rRNA และ 16s/23s rRNA ของเชื้อมัยโคพลาสมา และจำแนกชนิดของเชื้อมัยโคพลาสมา มีข้อเสียคือ ใช้เวลานาน และยุ่งยากมาก (Fan et al., 1995) ส่วนเทคนิค AP-PCR (Arbitrary-primed PCR) หรือ RAPD จะง่ายกว่ามาก และรวดเร็ว แต่อำนวยต่อการให้บริการเป็นประจำ โดยสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ MG ได้อย่างรวดเร็ว และเป็นประโยชน์มากต่อการศึกษาเชิงระบาดวิทยา และการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ MG ในพื้นที่ (Kleven, 2003) การใช้เทคนิค RAPD ไม่จำเป็นต้องมีความเชี่ยวชาญเป็นพิเศษทางด้านชีวเคมี หรืออณูชีววิทยา (Fan et al., 1995) อย่างไรก็ตาม ข้อเสียของ RAPD คือ ความสามารถในการจำแนก (discriminatory power) ค่อนข้างต่ำในเชื้อที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ให้ผลไม่สม่ำเสมอ (low reproducibility) และไม่สามารถนำผลการตรวจมาใช้ในระบบฐานข้อมูล โดยอาศัยรูปแบบของ RAPD (Hong et al., 2005) นอกจากนั้น จำเป็นต้องใช้เชื้อที่มีความบริสุทธิ์สำหรับการวิเคราะห์ และเครื่องพีซีอาร์คนละเครื่องกันยังให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอไม่เหมือนกันอีกด้วย (Fan et al., 1995) ส่วนเทคนิค AFLP เป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อนมีความสามารถในการทดสอบให้ผลซ้ำได้ดี (high reproducibility) มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันได้สูงมาก และสามารถพัฒนาให้นำมาใช้ในระบบฐานข้อมูลโดยอาศัยรูปแบบของ AFLP ได้ดี เพื่อนำข้อมูลมาแลกเปลี่ยนกันระหว่างห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม ข้อเสียของ AFLP คือ จำเป็นต้องใช้เชื้อที่มีความ

บริสุทธิ์ และเวลาในการวิเคราะห์มากกว่า RAPD และยังจำเป็นต้องใช้เครื่อง DNA sequencer และซอฟต์แวร์สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลที่ยังมีราคาแพง (Hong et al., 2005)

ในประเทศไทย ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่นิยมใช้การทดสอบ MG ด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี SPA, ELISA และ HI อย่างไรก็ตาม แต่ละเทคนิคย่อมมีข้อจำกัดด้านความไว และความจำเพาะของวิธีการทดสอบ เช่น SPA เป็นวิธีที่ใช้สำหรับการทดสอบแบบคัดกรอง เพราะเป็นวิธีที่รวดเร็ว มีความไวในการทดสอบสูง และความจำเพาะต่ำ ในขณะที่เดียวกันก็มีราคาไม่แพง ELISA เป็นวิธีที่พิสูจน์แล้วว่ามีความไวในการทดสอบสูง และมีความจำเพาะมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี SPA และวิธี HI เป็นวิธีที่มีความจำเพาะมากกว่า แต่มีข้อเสียคือ ความไวในการทดสอบค่อนข้างต่ำ (Kleven, 1998) ในห้องประเทศไทย มีห้องปฏิบัติการเพียงไม่กี่แห่งที่มีความสามารถในการเพาะเลี้ยง และแยกเชื้อมัคโคพลาสมาได้ ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่นิยมใช้การวินิจฉัยการติดเชื้อ MG ด้วยวิธี SPA และ/หรือ ELISA ที่มีความสะดวก ไม่แพง และไม่ต้องเสียเวลาในการเตรียมเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยง วิธีการแยกเชื้อ หรือ พีซีอาร์ (Pakpinyo et al., 2006)