

การติดเชื้อ *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* ในลูกแพะ

พัชร ทอคำคุณ *

สมหมาย ยูวพานิชสัมพันธ์

นรี เกตุสิงห์

อิสระยศ สิริกนก

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 025798908 โทรสาร 025798919 email: patchareet@dld.go.th

บทคัดย่อ

โรค contagious agalactia เป็นโรคติดต่อสำคัญในแพะและสาเหตุเกิดจากเชื้อได้ 4 ชนิด คือ *Mycoplasma agalactiae* (*M. agalactiae*), *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capricolum* (*Mcc*), *Mycoplasma putrefaciens* (*M. putrefaciens*) และ *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) ทำให้เกิดอาการปอดบวม ข้ออักเสบ เต้านมอักเสบ ตลอดจนติดเชื้อทั่วร่างกายและแท้ง ได้เก็บตัวอย่างจากฟาร์มแพะนมแห่งหนึ่งในจังหวัดนครราชสีมา ในเดือนสิงหาคม พ.ศ.2554 พบลูกแพะพันธุ์ผสมชาแนนและทอกเคนเบิร์ก อายุประมาณ 1 เดือน มีอาการข้อบวม ขาเจ็บ กินอาหารได้น้อย เมื่อเจาะน้ำในข้อมาเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุ พืชฐานเชื้อและยืนยันโดยวิธี PCR และเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าเชื้อที่เพาะแยกได้เป็นเชื้อ *Mmc* หลังจากนั้น 1 เดือน ทีมสัตวแพทย์จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เข้าเยี่ยมฟาร์มเพื่อติดตามอาการลูกแพะและสถานการณ์การติดเชื้อในฝูง พบว่าลูกแพะขาพิการจากอาการข้อบวมเรื้อรัง ขาดอาหารและแคระแกร็น จึงนำแพะกลับมาทำการชันสูตรโรค พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างสวอปช่องจมูกและช่องหูแม่แพะ จำนวน 19 ตัว และแพะพ่อพันธุ์อีก 1 ตัว พบเชื้อ *Mmc* ที่ปอดลูกแพะ และที่สวอปหูแม่แพะ จำนวน 6 ตัว สรุปว่าลูกแพะป่วยเรื้อรังจากการติดเชื้อ *Mmc* ซึ่งแม้จะไม่ทำให้สัตว์ตาย แต่ก่อความสูญเสียทางเศรษฐกิจ เนื่องจากต้องคัดทิ้ง การพบเชื้อในแม่แพะที่ไม่แสดงอาการ (30%) ซึ่งให้เห็นว่ามีการติดเชื้ออยู่ภายในฝูง โดยแม่แพะอาจเป็นพาหะของโรค การเฝ้าระวังการเกิดโรคและการให้ความรู้แก่เกษตรกรในการรักษาพื้นที่หากมีแพะแสดงอาการ การลดโอกาสการแพร่กระจายเชื้อโดยใช้ยาฆ่าเชื้อที่เหมาะสม จะลดโอกาสการติดเชื้อระหว่างสัตว์และลดความสูญเสียจากการเกิดโรคได้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงวิธีการจัดการกับสัตว์ที่เป็นพาหะ การสำรวจและเฝ้าระวังโรคในฟาร์มแพะ เพื่อเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาในการวางแผนการควบคุมโรคที่เหมาะสมต่อไป รายงานนี้เป็นารพบเชื้อ *Mmc* ในแพะครั้งแรกในประเทศไทย

คำสำคัญ: Contagious agalactia, *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri*, แพะ

บทนำ

Contagious agalactia (CA) เป็นโรคติดต่อสำคัญของแพะและแกะที่อยู่ในบัญชีรายชื่อโรคขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ หรือ OIE สาเหตุหลักเกิดจากเชื้อ *Mycoplasma agalactiae* (*M. agalactiae*) อย่างไรก็ตามยังมีเชื้ออีก 3 ชนิดที่ก่อปัญหาคล้ายคลึงกันอย่างมาก ในที่สุดจึงมีข้อเสนอแนะว่า เชื้อทั้ง 4 ชนิดเป็นสาเหตุของโรค Contagious agalactia ซึ่งเชื้ออีก 3 ชนิด คือ *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*), *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) และ *Mycoplasma putrifaciens* (*M. putrifaciens*) (OIE, 2008) เชื้อ *M. agalactiae* เป็นที่รู้จักมานาน ก่อโรคได้ในแพะและแกะ มีการแยกเชื้อได้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1923 พบทั้งในยุโรป เอเชียตะวันตก สหรัฐอเมริกา และแอฟริกาตอนเหนือ (Cottew, 1979; Da Massa, 1983) แต่ในระยะหลังพบว่าอาการเหล่านี้เกิดจากเชื้อ *Mmc* ซึ่งสามารถพบในทุกภูมิภาคทั่วโลกเช่นกัน โดยก่อโรคในแพะมากกว่าแกะ (Da Massa et al., 1983) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสามารถก่อโรคในวัวได้เช่นกัน (OIE, 2008) อัตราการป่วยจากการติดเชื้อไม่สูงมาก เนื่องจากพบว่าสัตว์แสดงอาการป่วยเป็นครั้งคราวเท่านั้น แต่เชื้อสามารถคงอยู่ในร่างกายสัตว์ได้นาน ทำให้ค่อย ๆ แพร่กระจายไปในฝูงได้มากขึ้นในเวลาต่อมา เชื้อ *Mcc* พบในแถบทวีปอเมริกา แต่ความชุกของโรคค่อนข้างต่ำ พบการเกิดโรคในแพะมากกว่าแกะเช่นกัน (Bolske et al., 1988; Bergonier et al., 1997) ส่วนเชื้อ *M. putrifaciens* พบในภาคตะวันตกของประเทศฝรั่งเศส และมีรายงานว่าสาเหตุความสูญเสียอย่างมากในลูกแพะในประเทศสเปน (Rodriguez et al., 1994)

ลูกสัตว์และสัตว์ตัวอื่นในฝูงติดเชื้อได้จากการกินอาหาร น้ำ หรือนมที่ปนเปื้อนเชื้อที่มากับสิ่งขับถ่าย น้ำมูก น้ำตาของสัตว์ป่วยหรือสัตว์ร่วมโรคที่ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ หรือติดจากการหายใจเอาฝุ่นละอองที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไป อาการเด่นชัดอีกเสบอาจเกิดจากการได้รับเชื้อผ่านเข้าทางหัวนมจากการสัมผัส การรีดนมด้วยมือหรือด้วยเครื่องมือที่มีการรักษาความสะอาดไม่ดีพอ ลูกสัตว์ที่กินน้ำนมที่มีเชื้ออาจส่งผลให้ติดเชื้อในกระแสเลือด และแสดงอาการป่วยในระบบต่าง ๆ เช่น ข้อบวม ปอดบวม และเกิดการสูญเสียมากขึ้น ระยะฟักตัวของโรคตั้งแต่ 7 – 56 วัน สัตว์ที่ติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการหรือเรื้อรังจะสามารถแพร่เชื้อได้นานหลายเดือน ในแพะและแกะที่แสดงอาการจะมีไข้ เบื่ออาหาร ต่อมามีอาการเต้านมอักเสบ น้ำนมมีลักษณะสีเหลืองเขียว หรือสีเทาอมฟ้า นมจับตัวเป็นก้อนเล็ก ๆ ต่อมาน้ำนมจะจางและลดลงจนกระทั่งไม่มีน้ำนม เต้านมแฟบและฝ่อ ข้อขาบวมโดยเยื่อหุ้มรอบ ๆ ข้อนหนาตัวขึ้น และร้อน ซึ่งอาจเกิดเพียงข้างเดียวหรือหลายข้าง ทำให้เจ็บปวด ลูกและเดินลำบาก ในสัตว์ที่อาจแหว่งได้ นอกจากนี้บางครั้งยังพบว่าสัตว์อาจแสดงอาการในระบบทางเดินหายใจ เช่น การอักเสบในช่องอก หัวใจ และปอดบวม โดยเฉพาะจากเชื้อ *Mcc* และ *Mmc* รวมทั้งแสดงอาการทางประสาทได้เช่นกัน เนื่องจากเชื้อสามารถแพร่ไปสู่อวัยวะต่าง ๆ ทางกระแสเลือด

Mcc มีรายงานการระบาดครั้งแรกในประเทศไทย ในฟาร์มแพะแห่งหนึ่ง เมื่อปี พ.ศ. 2547 โดยแม่แพะมีอาการเต้านมอักเสบ ข้อบวม บางตัวแท้ง ลูกแพะได้รับเชื้อจากการกินนมแม่ เชื้อเข้าสู่กระแส

เลือดทำให้มีอาการปอดบวม อวัยวะภายในติดเชื้อและตาย (พัชรและชิต, 2547) แต่ยังไม่มียข้อมูลและรายงานการติดเชื้อ *M. agalactiae* และ *M. putrefaciens* ในประเทศไทย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะรายงานประวัติ อาการ วิธีการตรวจและวินิจฉัยการติดเชื้อ *Mmc* ในลูกแพะ ตลอดจนการติดตามสถานะโรคภายในฝูง เพื่อเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาของโรคในแพะ และเป็นรายงานการติดเชื้อและการพบเชื้อ *Mmc* ในแพะครั้งแรกในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ประวัติสัตว์

ฟาร์มแพะนมแห่งหนึ่ง ในเขตท้องที่อำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา มีแพะทั้งหมดประมาณ 60 ตัว พบลูกแพะพันธุ์ผสมชาแนลและทอกเกนเบิร์กอายุประมาณ 1 เดือน มีอาการซอบวม ขาเจ็บ และกินอาหารได้น้อย เจ้าของฟาร์มจึงแจ้งให้สัตวแพทย์มาทำการเก็บตัวอย่างน้ำในข้อ เพื่อเพาะแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุ หลังจากนั้นประมาณเดือนเศษ ในวันที่ 13 กันยายน พ.ศ.2554 ทีมสัตวแพทย์จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเข้าเยี่ยมฟาร์ม เพื่อติดตามสถานการณ์ และเก็บตัวอย่างสวอปช่องจมูก และช่องหูจากแพะพ่อพันธุ์จำนวน 1 ตัว และแม่แพะ จำนวน 19 ตัว เพื่อศึกษาอัตราการพบเชื้อในสัตว์ปกติ และนำลูกแพะตัวเดิมมาทำการผ่าซาก เนื่องจากขาข้างที่เคียบวมมีการผิครุปร่าง ทำให้ขาพิการ ส่งผลให้ลูกแพะอ่อนแอ ติดเชื้อง่าย และแคระแกร็น

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ตรวจสภาพร่างกายสัตว์ภายนอก เจาะเก็บเลือด หลังจากการทำเมตตามาด ทำการผ่าซากเพื่อตรวจดูรอยโรคของอวัยวะภายใน ได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต และลำไส้ทุกส่วนรวมทั้งสมอง เก็บชิ้นเนื้อดังกล่าวแช่ใน 10% neutral buffered formalin เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา และเก็บเนื้อเยื่อสดและเลือดส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ปรสิติวิทยา และแบคทีเรียวิทยา

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

เพาะเชื้อจากตัวอย่างน้ำในข้อ และอวัยวะต่าง ๆ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 7% defibrinated sheep blood agar (SBA) และ MacConkey agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วตรวจหาโคโลนีที่สงสัยเป็นเชื้อก่อโรค และทำการพิสูจน์เชื้อโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี นอกจากนี้นำตัวอย่าง น้ำในข้อ ปอด สวอปช่องจมูก และช่องหู มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Hayflick's broth และ agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี 5%CO₂ นาน 3-7 วัน เพื่อแยกเชื้อ Mycoplasma นำโคโลนีที่สงสัยมาเพิ่มจำนวนใน modified Hayflick's broth และทำการพิสูจน์เชื้อโดยวิธี PCR

การพิสูจน์ชนิดของเชื้อ Mycoplasma โดยวิธี PCR และเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ mycoplasma ที่เพิ่มจำนวนใน modified Hayflick's broth ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kobayashi et al. (1996) คือ นำเชื้อ mycoplasma ที่เจริญดีแล้ว ปั่นที่ความเร็วรอบ

12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนเชื้อด้วย phosphate buffered saline 2 ครั้ง แล้วละลายตะกอนเชื้อด้วย lysis solution ที่ประกอบด้วย 110 mM Tris-HCl, pH 8.9, 1.5 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 0.05% BSA, 0.1% Triton X-100, 0.45% Nonidet P-40, 0.45% Tween 20, Proteinase K 200 µg/mL และ 0.5% CHAPS ปริมาณ 200 µL นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้ DNA บริสุทธิ์ โดยวิธี phenol-chloroform extraction (Ausubel et al., 1990) ตกตะกอน DNA ด้วย ethanol แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 100 µL เก็บที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Ros Bascunana et al. (1994) และ Bashiruddin et al. (1994) เพื่อใช้ในการแยกพิสูจน์เชื้อในกลุ่ม *Mycoplasma mycoides* cluster และการหาลำดับเบสของเชื้อ

วิธีการของ Ros Bascunana et al. (1994) มีดังนี้ เตรียม PCR mixture ปริมาณตัวอย่างละ 16 µL ที่ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl และ 0.1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP (each), primer MMF: 5' CGA AAG CGG CTT ACT GGC TTG TT 3' และ primer MMR: 5' TTG AGA TTA GCT CCC CTT CAC AG 3' อย่างละ 0.5 µM และ 0.5 U Taq polymerase แล้วใส่ DNA template ตัวอย่างละ 4 µL รวมปริมาตร 20 µL ต่อ 1 ตัวอย่าง โดยมีเชื้อ *Mmc* PG3 และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมบวก (National Institute of Animal Health, Japan) และลบตามลำดับ นำเข้าเครื่อง Thermal cycler (Hybaid, Thermo electron, Germany) ตามโปรแกรม preheating 95°C นาน 15 นาที ตามด้วย 30 รอบของ denaturation 94°C นาน 30 วินาที, annealing 60°C นาน 1 นาที, extension 72°C นาน 1 นาที ต่อจากนั้นเป็น final extension 72°C นาน 5 นาที จนเสร็จ จึงตรวจหาแถบของ PCR product ขนาด 548 bp โดยการผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose gel ที่ 100 volt ประมาณ 30 นาที อ่านผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation (GelDoc -It, UVP, U.S.A) จากนั้นนำ PCR product ตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I (New England Biolabs®, U.S.A.) ตามวิธีการของผู้ผลิต แล้วตรวจหาแถบของ restriction fragment โดยการผ่านกระแสไฟฟ้าใน 2% agarose gel และอ่านผลตามวิธีการข้างต้น

สำหรับวิธีการของ Bashiruddin et al. (1994) มีดังนี้ เตรียม PCR mixture ตัวอย่างละ 21.5 µL ที่ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl และ 0.1% Triton X-100), 3 mM MgCl₂, 300 µM dNTP (each), primer MM450: 5' GTA TTT TCC TTT CTA ATT TG 3' และ primer MM451: 5' AAA TCA AAT TAA TAA GTT TG 3' อย่างละ 2 µM และ 1.5 U Taq polymerase แล้วใส่ DNA template ตัวอย่างละ 3.5 µL รวมปริมาตร 25 µL ต่อ 1 ตัวอย่าง ใช้ตัวควบคุมบวกและลบเช่นเดียวกับข้างต้น นำเข้าเครื่อง Thermal cycler ใช้โปรแกรม preheating 95°C นาน 15 นาที ตามด้วย denaturation 94°C นาน 30 วินาที, annealing 50°C นาน 1 นาที, extension 72°C นาน 1 นาที 30 รอบ ต่อด้วย final extension 72°C นาน 5 นาที เสร็จแล้วตรวจหาแถบของ PCR product ขนาด 574 bp โดยการผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose gel ตามวิธีการข้างต้น หลังจากนั้นนำ PCR product ตัดด้วยเอนไซม์ *Vsp*I (SibEnzyme®, U.S.A.) ตามวิธีการของผู้ผลิต แล้วตรวจหาแถบของ restriction fragment และอ่านผลตามวิธีการข้างต้นเช่นกัน

การหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene ของเชื้อ Mycoplasma

นำ DNA template ที่สกัดจากเชื้อ mycoplasma ที่แยกได้มาทำ PCR ด้วย 16S rRNA universal primers สำหรับเชื้อ mycoplasma จำนวน 2 คู่ ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Lauerman (1998) ได้แก่ primers fd1AF: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG 3' และ GP3R: 5' CGC TTG CAA CCT ATG TAT TAC 3' ได้ PCR product ขนาด 546 bp primers คู่ที่ 2 คือ GP3F: 5' AAG YAA CGR CTA ATG TGC 3' และ GP7R: 5' GCG CTC GTT GCR GGA CTT AAC 3' ได้ PCR product ขนาด 617 bp ดังนั้นเตรียม PCR mixture ปริมาณตัวอย่างละ 44 μ L ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl และ 0.1% Triton X-100), forward และ reverse primer อย่างละ 0.8 μ M และ 1 U Taq polymerase แล้วใส่ DNA template ตัวอย่างละ 6 μ L รวมปริมาตร 50 μ L ต่อ 1 ตัวอย่าง นำเข้าเครื่อง Thermal cycler ตั้งโปรแกรม preheating 95°C นาน 15 นาที ตามด้วย 30 รอบของ denaturation 94°C นาน 45 วินาที, annealing 55°C นาน 45 วินาที, extension 72°C นาน 45 วินาที ตามด้วย final extension 72°C นาน 5 นาที เสร็จแล้วนำ PCR product ทั้งหมดผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose gel ที่ 100 volt ประมาณ 30 นาที ตัดเจลตรงส่วนที่มี PCR product ภายใตแสง UV นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAquick gel extraction Kit (QIAGEN®, Germany) และทำ sequence reaction ด้วยสาร Big Dye terminator cycle kit version 3.1 (Applied Biosystems®, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต ทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้ (ZR DNA sequencing clean up kit (Zymo Research®, USA) จากนั้นละลายด้วย Hi Di formamide ปริมาตร 15 μ L และนำเข้าเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (ABI 3130 Genetic Analyzer) นำผลที่ได้มาจัดเรียงลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม Free internet download MEGA 5 (Tamura et al., 2011) ตรวจชนิดของเชื้อด้วยโปรแกรม BLAST ใน GenBank

ผล

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ลักษณะโดยทั่วไป อาการข้อบวมเมื่อตอนเริ่มป่วย มีลักษณะอักเสบ ร้อน แต่อ่อนนุ่ม มีน้ำอยู่ภายใน (Fig. 1) เปรียบเทียบกับ 1 เดือนถัดมา แพะชูปพอม ขาหน้าทั้งสองข้างบวมแข็ง และรูปทรงผิดปกติ (Fig. 2) ซึ่งเป็นผลที่ตามมาจากการบวมและเจ็บเรื้อรังที่ข้อเข่า และมีอาการท้องเสียร่วมด้วย



Figure 1 A goat kid showed a sign of joint swelling at knee joints of front limbs



Figure 2 Knee joints of both front limbs were chronic swelling and the feet were abnormally bended

ผลการผ่าซากพบรอยโรค จุดเลือดออกและจุดเนื้อมีตายที่ cortex ของไต ปั่นเนื้อมีตายที่ม้าม และพบก้อนหรือตุ่มขาวจำนวนมากกระจายอยู่บนเยื่อบุลำไส้เล็ก การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบสมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปอดอักเสบร่วมกับภาวะปอดแฟบ ไตและกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบและเสื่อมสภาพแบบ hyaline degeneration พบเชื้อบิดในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่

ผลการตรวจทางไวรัสวิทยา ไม่พบเชื้อ caprine arthritis encephalitis virus โดยวิธี RT-PCR

ผลการตรวจทางปรสิตวิทยา พบ coccidia จำนวนมาก (+4) จากลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ไม่พบปรสิตในเลือด

ผลการตรวจทางแบคทีเรียวิทยาและการทำ PCR

ไม่พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนบน SBA แต่พบโคโลนีของเชื้อ mycoplasma บนอาหาร modified Hayflick's agar จากตัวอย่างน้ำในข้อที่เจาะจากลูกแพะตั้งแต่การส่งตรวจครั้งแรก เมื่อทำการพิสูจน์แยกชนิดของเชื้อโดยวิธี PCR และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ผลคือ พบ PCR product ขนาด 548 bp จากการใส่ primer MMF และ MMR และพบ restriction fragment 2 แถบ มีขนาด 420 และ 128 bp (Fig. 3) แสดงว่าเชื้อ

อยู่ในกลุ่ม *Mycoplasma mycoides* cluster และมีโอกาสที่จะเป็นเชื้อในกลุ่มนี้ 3 ชนิด คือ *M. mycoides* subsp. *mycoides* small colony (MmmSC), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc) และ *Mmc* ในขณะที่พบ PCR product ขนาด 574 bp จากการใส่ primer MM450 และ MM451 และพบ restriction fragment 3 แถบ มีขนาด 230, 178 และ 153 bp (Fig. 4) ผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าเชื้อ *Mycoplasma* ที่แยกได้จากตัวอย่างเป็นเชื้อ *Mmc*

นอกจากนี้ผลการเพาะเชื้อและพิสูจน์เชื้อในลักษณะเดียวกันกับข้างต้น พบว่าลูกแพะมีการติดเชื้อ *Mmc* ในปอดอีกด้วย และยังพบเชื้อนี้ในตัวอย่างสวอปช่องหูของแม่แพะ 6 ตัวจากแพะทั้งหมด 20 ตัว แต่ไม่พบเชื้อในตัวอย่างสวอปช่องจมูก แสดงว่ามีอัตราการพบเชื้อในฝูงแพะถึง 30%

ผลการหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene ของเชื้อ *Mycoplasma*

ผลการจัดเรียงลำดับเบส (multi-alignment) ของ sequence reaction ที่ใช้ primers รวม 4 สาย ด้วยโปรแกรม MEGA 5 อ่านผลได้เป็น partial sequence ของ 16S rRNA gene ขนาด 1084 bp และเมื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อด้วยโปรแกรม BLAST ใน GenBank พบว่าเชื้อที่นำมาทดสอบคือ เชื้อ *Mmc* โดยมีลำดับเบสตรงกับเชื้อ *Mmc* PG3 accession no. U26037 จำนวน 1083/1084 หรือ 99% identities (Fig.5)

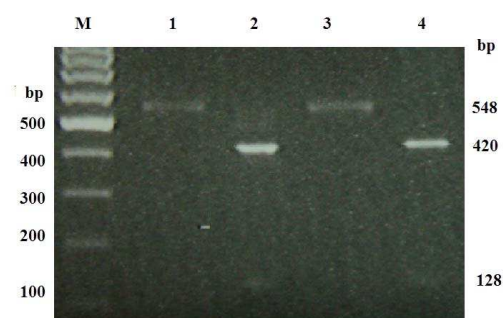


Figure 3 Detection of PCR product from the *Mycoplasma* isolates of synovial fluid and lung sample of a goat kid using MMF and MMR primers showed the amplified fragment at 548 bp and after cut by *Pst*I revealed the restriction fragments at 420 and 128 bp, Lane M, 100 bp ladder marker; Lane 1, *Mycoplasma* DNA isolated from synovial fluid; Lane 2, PCR product from lane 1 cut by *Pst*I; Lane 3, DNA extracted from *Mmc* PG 3; Lane 4, PCR product from lane 3 cut by *Pst*I

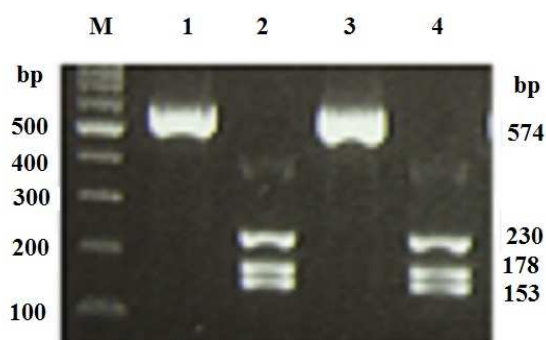


Figure 4 Detection of PCR product from the Mycoplasma isolates of synovial fluid and lung sample of a goat kid using MMF and MMR primers showed the amplified fragment at 574 bp and after cut by *VspI* revealed the restriction fragments at 230, 178 and 153 bp, Lane M, 100 bp ladder marker; Lane 1, Mycoplasma DNA isolated from synovial fluid; Lane 2, PCR product from lane 1 cut by *VspI*; Lane 3, DNA extracted from *Mmc* PG 3; Lane 4, PCR product from lane 3 cut by *VspI*

จากผลการตรวจข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า ลูกแพะตัวนี้ป่วยด้วยอาการข้ออักเสบจากการติดเชื้อ *Mmc* และติดเชื้อเรื้อรังที่ปอด อาการข้อบวมและขาเจ็บเรื้อรังทำให้แพะขาเสีย ลูก เดินไม่ถนัดและไม่สามารถกินอาหารได้เพียงพอ ประกอบกับการติดเชื้อบิดตามมา ส่งผลให้เกิดภาวะขาดอาหาร สุขภาพทรุดโทรม และเซลล์ในบางอวัยวะมีการเสื่อมสภาพ



Figure 5 Partial sequence of 16S rRNA of the mycoplasma isolate showed 99% identities (1083/1084) to 16S ribosomal RNA of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* PG3 accession no. 26037 using program BLAST in GenBank

วิจารณ์

เชื้อ *Mycoplasma mycoides* แบ่งเป็น 2 subspecies คือ subsp. *mycoides* และ subsp. *capri* ซึ่งเดิมมีเชื้อ *M. mycoides* subsp. *mycoides* biotype small colony (Mmm SC) และ *M. mycoides* subsp. *mycoides* biotype large colony (Mmm LC) อยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่จากการศึกษาของนักวิจัยหลายแห่งพบว่า เชื้อ Mmm LC และเชื้อ Mmc มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันมากกว่า เช่น 16S rRNA gene ของเชื้อสองชนิดนี้มีความเหมือนกันถึง 99.9% (Petersson et al., 1996) รวมทั้ง putative membrane protein gene มีความเหมือนกันถึง 99% (Thiaucourt et al., 2000) นอกจากนี้ลักษณะของโปรตีนและคุณสมบัติทางแอนติเจนของเชื้อทั้งสองชนิดก็มีความคล้ายกันมาก (Monnerat et al., 1999) ทำให้มีการจัดกลุ่ม (reclassification) เชื้อสองชนิดนี้ใหม่ โดยรวมให้เป็นเชื้อใน subsp. *capri* เหมือนกัน และใช้ชื่อ Mmc ร่วมกัน (Manso-Silvan et al., 2009; Shahram et al., 2010) แต่มีความแตกต่างกันเพียงระดับซีโรวาร์เท่านั้น

ดังนั้นในการพิสูจน์เชื้อที่เป็นสาเหตุของข้ออักเสบในลูกแพะครั้งนี้ จึงยังไม่สามารถแยกเชื้อในระดับซีโรวาร์ได้ เนื่องจากการพิสูจน์ในระดับนี้ต้องใช้แอนติซีรัมจำเพาะที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงของทั้งสองชนิดมาทดสอบโดยวิธี growth inhibition test หรือ metabolic inhibition test (Rosental, 1994) เนื่องจากคณะผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการผลิตแอนติซีรัมจากเชื้อ *Mmc* strain PG3 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก National Institute of Animal Health, Japan ในขณะที่เดียวกันยังไม่มีเชื้อ *Mmm* LC strain Y-goat ที่ต้องใช้ศึกษาเช่นกัน อย่างไรก็ตามการที่เชื้อจัดอยู่ใน subspecies เดียวกันแสดงถึงความใกล้ชิดอย่างมากของเชื้อตลอดจนเชื้อก่อให้เกิดกลุ่มอาการของโรคเดียวกัน จึงน่าจะยังไม่มี ความจำเป็นในการวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อในระดับซีโรวาร์ หากในอนาคตพบว่ามี ความจำเป็นเนื่องจากเชื้อได้สร้างความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะอย่างกว้างขวาง และสมควรที่จะมีการศึกษาถึงระดับสายพันธุ์ของเชื้อที่ก่อโรค เพื่อให้การวางแผนควบคุมและกำจัดโรคมีประสิทธิภาพและเหมาะสมนั้น คงจะได้มีการเตรียมการในลำดับต่อไป

ความสูญเสียจากโรค CA ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Mmc* (และ *Mmm* LC) มีให้เห็นในหลายประเทศ ก่อความสูญเสียในระดับที่แตกต่างกันไป เช่นฟาร์มแพะในประเทศอิตาลีมีอัตราการตายในลูกแพะ 14% และ 33% จากการระบาดในฟาร์มสองแห่ง ซึ่งในฟาร์มที่สองพบการแท้งในแม่แพะร่วมด้วย (Szeredi et al., 2003) ส่วนฟาร์มแพะขนาด 2000 แม่ ในประเทศเม็กซิโกมีการนำแม่แพะที่ติดเชื้อเข้ามาในฝูงเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิต ทำให้เกิดการระบาดของโรคนานถึง 6 เดือน โดยมีอัตราการตายสูงถึง 40% (Hernandez et al., 2006) ข้อมูลการระบาดของโรค CA ในประเทศฝรั่งเศสระหว่างปี 2003-2008 เกิดขึ้นในแพะถึง 268 ครั้ง โดยเกิดจากเชื้อ *Mmc* 42% (Chazel et al., 2010) ในประเทศไทยพบการระบาดของโรค CA ในฟาร์มแห่งหนึ่งเป็นครั้งแรก เมื่อปี พ.ศ. 2547 เกิดจากการติดเชื้อ *Mcc* ที่มากับแม่แพะนำเข้าจากต่างประเทศ (พัชรและจิต, 2547) ทำให้มีอัตราการป่วยและตาย 16% และ 7% ตามลำดับ โดยประวัติของฟาร์มไม่เคยมีการเกิดโรคเช่นนี้มาก่อน อาจเป็นไปได้ว่าการสูญเสียจะค่อนข้างมากในฟาร์มที่ไม่เคยเป็นโรคมามาก่อน หรืออาจเป็นเพราะความรุนแรงของเชื้อแตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ ข้อดีของการทราบสาเหตุได้เร็ว ทำให้กำจัดโรคได้หมดไปโดยไม่มีการแพร่เชื้อออกไปสู่ภายนอก แต่การเกิดโรคในครั้งนี้ พบว่ามีลูกแพะเพียงตัวเดียวที่แสดงอาการป่วย จากการซักประวัติพบว่าเคยมีลูกแพะแสดงอาการเช่นนี้มาแล้วในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา แต่อัตราการป่วยและตายไม่มากและเกิดขึ้นไม่บ่อยครั้ง จึงยังไม่เคยมีการส่งตัวอย่างไปตรวจที่ห้องปฏิบัติการมาก่อน ในครั้งนี้เนื่องจากมีเจ้าหน้าที่เข้าไปให้ความรู้แก่เกษตรกรในจังหวัดที่เป็นที่ตั้งของฟาร์ม จึงเป็นโอกาสให้เจ้าของฟาร์มขอรับการบริการจากห้องปฏิบัติการได้ จากประวัติข้างต้นเป็นไปได้ว่าฟาร์มแห่งนี้มีการติดเชื้อ *Mmc* มานานพอสมควรแล้ว โดยที่ไม่ทราบว่าเชื้อเริ่มต้นมาจากที่ใด การพบเชื้อในแม่แพะที่ไม่แสดงอาการถึง 30% แสดงให้เห็นว่ามีการกระจายของเชื้อไปในฝูงไม่น้อย และเป็นไปได้ว่าน่าจะมีเชื้อกระจายอยู่ในพื้นที่การเลี้ยงแพะในแถบนั้นด้วยหากมีการซื้อขายสัตว์กันระหว่างฟาร์มหรือมีการรับแพะมาจากแหล่งเดียวกัน เนื่องจากไม่ทราบว่าเชื้อเข้ามาในพื้นที่ตั้งแต่เมื่อไหร่ และกระจายไปอยู่ที่ใดบ้างในปัจจุบัน

เนื่องจากยังไม่มีหลักฐานมากพอว่าเชื้อ *Mmc* ที่พบนี้จะก่อความสูญเสียรุนแรงในอนาคตรหรือไม่ ดังนั้นการแนะนำให้คัดทิ้งแม่แพะที่เป็นพาหะของโรคอาจก่อภาระให้แก่เจ้าของฟาร์ม ข้อนแนะนำเบื้องต้นคือ ควรใช้ยาฆ่าเชื้อทำความสะอาดเครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ เพื่อทำลายเชื้อ ลดการปนเปื้อนและแพร่กระจายเชื้อไปสู่ตัวอื่นผ่านทางผู้เลี้ยง อุปกรณ์การรีดนม หรืออุปกรณ์ใด ๆ ที่ใช้ร่วมกัน ยาฆ่าเชื้อที่ใช้ได้ดี เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (คลอรีน 30 มิลลิกรัม ผสมน้ำ 1 แกลลอน) เป็นต้น หากพบสัตว์เริ่มแสดงอาการควรรีบส่งตัวอย่างเพื่อทำการวินิจฉัยก่อนที่จะทำการรักษา ส่วนยาที่ใช้รักษาเบื้องต้นคือ ไทโลซิน อิริโทรมัยซิน และไทอามูลิน แต่การรักษาจะไม่ได้ผลในกรณีเป็นโรคเรื้อรัง

ในประเทศสเปนมีมาตรการควบคุมการนำเข้าแพะที่อาจเป็นพาหะของโรคเข้าสู่ฟาร์มแพะและฝูงพ่อพันธุ์ที่ใช้รีดน้ำเชื้อ เนื่องจากจะมีโอกาสแพร่เชื้อไปสู่สัตว์ปกติและก่อความเสียหายภายในฟาร์ม โดยแพะที่นำเข้ามาจะต้องมาจากฟาร์มที่ไม่มีโรค CA แบบแสดงอาการมาแล้วอย่างน้อย 6 เดือน แต่จากการศึกษาพบว่ามาตรการนี้ไม่เพียงพอในการควบคุมโรค เพราะยังพบว่าแพะที่มาจากฟาร์มดังกล่าวบางตัวยังมีเชื้อ *mycoplasmas* อยู่ในช่องหู และส่งผลให้พบเชื้อในน้ำเชื้อตามมาได้ (De la Fe et al., 2010) จึงมีข้อเสนอแนะให้ตรวจหาเชื้อ *mycoplasmas* จากตัวอย่างสวอปช่องหู น้ำเชื้อ และน้ำนม ก่อนนำสัตว์เข้ามาในฝูง ซึ่งพบว่าสามารถลดอัตราการนำเข้าสัตว์ที่เป็นพาหะเข้ามาได้ดีขึ้น (Amores et al., 2011) ในประเทศไทยยังไม่มีมาตรการใด ๆ ในการควบคุมโรค CA เนื่องจากไม่เคยมีการสำรวจ และเฝ้าระวังโรคนี้นมาก่อน การพบโรคในครั้งนี้ นับเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ภาครัฐควรเข้ามาทำการสำรวจและติดตามสถานการณ์ของโรค ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงวิธีการจัดการกับสัตว์ที่เป็นพาหะ เช่นการกำจัดเชื้อโดยการให้ยาด้านจุลชีพในแพะที่พบเชื้อหรือการคัดทิ้ง รวมทั้งการเฝ้าระวังโรคในฟาร์มแพะ การประเมินความเสี่ยงของโรคหากปล่อยให้มีพาหะของโรคในฝูง เปรียบเทียบกับต้นทุนที่สูญเสียหากทำการคัดทิ้งแพะที่เป็นพาหะออกจากฝูง เพื่อเป็นแนวทางแก้สัตวแพทย์ เกษตรกร และผู้เกี่ยวข้องในการควบคุมโรคที่เหมาะสมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นสพ. ปฏิพร ฐาปนกุลศักดิ์ ที่ร่วมสอบสวนโรคและเก็บตัวอย่าง คุณณัฐริกา รัตนพันธุ์ และคุณชยภัค สีนุ่ ที่ช่วยในการเพาะแยกเชื้อ ทำ PCR และเตรียม sequence reaction ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ประจำกลุ่มไวรัสวิทยา พยาธิวิทยา และปรสิตวิทยาทุกท่าน ที่ทำการตรวจตัวอย่างเฉพาะทางและให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการรายงานโรคครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

พัชร ทอคำคุณ และชิต ศิริวรรณ. 2547. โรคภัยโคพลาสมาโมซิสในแพะนม. ประมวลบทความวิชาการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30. ระหว่างวันที่ 10-12 พฤศจิกายน 2547. หน้า 97.

- Amores, J., Gomez-Martin, A., Corrales, J.C., Sanchez, A. Contreras, A. and De la Fe, C. 2011. Presence of contagious agalactia causing mycoplasmas in Spanish goat artificial insemination centers. *Theriogenology*. 75: 1265-1270.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1990. Current protocols in molecular biology. Vol. 1. Greene Publishing Associated and Wiley-Interscience, New York, p. 2.4.1-2.4.5.
- Bashiruddin, J.B., Taylor, T.K. and Gould, A.R. 1994. A PCR-based test for the specific identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*. *SC. J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 428-434.
- Bergonier, D., Berthelet, X. and Poumarat, F. 1997. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 16: 848-873.
- Bolske, G., Msami, H., Humlesjo, N.E., Erno, H. and Johansson, L. 1988. *Mycoplasma capricoloum* in an outbreak of polyarthritis and pneumonia in goat. *Acta. Vet. Scand.* 29: 331-338.
- Chazel, M., Tardy, F., Le Grand, D., Calavas, D. and Poumarat, F. 2010. Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Vet. Res.* 6: 32.
- Cottew, G.S. 1979. Caprine-ovine Mycoplasmas. In: *The Mycoplasmas. II. Human and animal mycoplasma*, edited by J.G. Tully and R.F. Whitcomb. Academic Press, San Francisco, CA. p. 103-132.
- Da Massa, A.J. 1983. Recovery of *Mycoplasma agalactiae* from mastitic goat milk. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183: 548-549.
- Da Massa, A.J., Brooks, D.L. and Adler, H.E. 1983. Caprine mycoplasmosis: widespread infection in goats with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large-colony type). *Am. J. Vet. Res.* 44: 322-325.
- De la Fe, C., Gomez-Martin, A., Amores, J., Corrales, J.C., Sanchez, A., Poveda, J.B. and Contreras, A. 2010. Latent infection of a male goats with *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* at an artificial insemination centre. *Vet. J.* 186: 113-115.
- Hernandez, L., Lopez, J., St-Jacques, M., Ontiveros, L., Acosta, J. and Handel, K. 2006. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* associated with goat respiratory disease and high flock mortality. *Can. J. Vet.* 47: 366-369.
- Kobayashi, H., Munthali, G., Miyamoto, C., Morozumi, T., Mitani, K., Ito, N., Shiono, H. and Yamamoto, K. 1996. A simple preparation of mycoplasmal DNA template for PCR from biological samples using effective surfactants. *J. Vet. Med. Sci.* 58(5): 477-479.
- Lauerman, L.L. 1998. Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases. Library of Congress. U.S.A. 152 p.

- Manso-Silvan, L., Vilei, E.M., Sachse, K., Djordjevic, S.P., Thiaucourt, F. and Frey, J. 2009. *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:1353-1358.
- Monnerat, M.-P., Thiaucourt, F., Poveda, J.B. Nicolet, J. and Frey, J. 1999. Genetic and serological analysis of lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6(2): 224-230.
- OIE, 2008. Contagious agalactia. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. World Organization of Animal Health, Paris, France. p. 992-999.
- Pettersson, B., Leitner, T., Ronaghi, M., Bolske, G., Uhlen, M. and Johansson, K.E. 1996. Phylogeny of *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. J. Bacteriol. 178: 4131-4142.
- Rodriguez, J.L., Poveda, J.B., Gutierrez, C., Acosta, B. and Fernandez, A. 1994. Polyarthrititis in kids associated with *Mycoplasma putrifaciens*. Vet. Rec. 135: 406-407.
- Ros Bascunana, C., Mattsson, J.G., Bolske, G. and Johansson, K. 1994. Characterization of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma* sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR. J. Bacteriol. 176(9): 2577-2586.
- Rosental, S. 1994. Ovine and caprine mycoplasmas. In: Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis. Edited by H.W. Whitford, , R.F. Rosenbusch and L.H. Lauerman. Iowa State University press, Ames, U.S.A. p. 84-96.
- Shahram, M., Nicholas, R.A., Wood, A.P. and Kelly, D.P. 2010. Further evidence to justify reassignment of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* large colony type to *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri*. Syst. Appl. Microbiol. 33: 20-24.
- Szeredi, L., Tenk, M. and Dan, A. 2003. Infection of two goatherds with *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in Hungary, evidence of a possible fecal excretion. J. Vet. Med. B. 50(4): 172-177.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. 28(10): 2731-2739
- Thiaucourt, F., Lorenzon, S., David, A. and Breard, A. 2000. Phylogeny of *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. Vet. Microbiol. 72: 251-268.

***Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* infection in a goat kid**

Pacharee Thongkamkoon * Sommai Yuwapanichsampan

Naree Ketusing

Isarayos Sirikanoke

National Institute of Animal Health. Kaset klang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding person: Tel. 025798909 Fax. 025798919 email: patchareet@dld.go.th

Abstract

Contagious agalactia (CA), an important infectious disease in sheep and goat, is caused by four types of mycoplasma including *Mycoplasma agalactiae* (*M. agalactiae*), *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capricolum* (*Mcc*), *Mycoplasma putrifaciens* (*M. putrifaciens*) and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*). The clinical signs were pneumonia, joint swelling, mastitis, septicemia and abortion. Synovial fluid, from a one-month old Saanen and Toggenburg mix breed goat kid was collected and submitted to NIAH laboratory for diagnosis. Mycoplasma was isolated and identified as *Mmc* as revealed by detection of specific fragments from PCR products cut by certain restriction enzymes. One month later, laboratory staff visited the farm to follow up the case and monitor disease status. The kid's front limbs was malfunctioned due to persistent swollen joints and lameness resulting in malnutrition and retarded growth. It was brought to the NIAH Lab for definitive diagnosis. Nasal and auricular swabs were also collected from 19 female and 1 male goats. Finally, *Mmc* was isolated from the kid lung indicating chronic infection of *Mmc*. Result of auricular swab culture revealed 6 female goats positive indicating of *Mmc* carriers in female (30%). Although the disease did not cause the kid to death, the culled kid was reflected that *Mmc* was a potential cause of economic losses. Monitoring the disease status in goat farms, use of disinfectants to inactivate and reducing the spread of the organism including treating goats with antibiotic immediately after start showing clinical signs should be practiced. The study on management system and measure for healthy carrier animals, the disease surveillance in goat farms should be conducted to evaluate the disease distribution and to implement the adequate and effective control measures for CA in Thailand. This is the first report of *Mmc* infection in a goat in Thailand.

Keywords: Contagious agalactia, *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri*, goat