การสำรวจหาเชื้อ *Brachyspira* spp. จากไก่ในประเทศไทย ระหว่างปี 2551 – 2552

อภัสรา วรราช* สมหมาย ยุวพาณิชสัมพันธ์ วันทนีย์ เนรมิตมานสุข

ทำการเก็บตัวอย่างจากไก่ในพื้นที่รับผิดชอบของสำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยทั้ง 9 แห่ง ในปี 2551 – 2552 เพื่อตรวจหาเชื้อ *Brachyspira* spp. จำนวน 2,391 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างจากไก่ไข่ปลดระวาง 1,201 ตัวอย่าง ประกอบด้วยลำไส้ตันถึงลำไส้ส่วนปลาย (caeca) 465 ตัวอย่าง และสวอปจากก้นไก่ (cloacal swabs) 736 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างจากไก่พื้นเมือง 1,190 ตัวอย่าง ประกอบด้วย caeca 467 ตัวอย่าง และ cloacal swab 723 ตัวอย่าง ผลการเพาะแยกเชื้อพบ *Brachyspira* spp 6.27% (150/2,391) พบใน caeca มากกว่า cloacal swab คิดเป็น 11.59% (108/932) และ 2.88% (42/1459) ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อ *Brachyspira* spp. มาจำแนกชนิดด้วยวิธี PCR-based Restriction Fragment Length Polymorphism (*nox*-PCR-RFLP) และ PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. pilosicoli* เพื่อวินิจฉัยแยกออกจาก *B. alvinipulli* จำแนกได้เป็นเชื้อ *B. pilosicoli* 1.09% (26/2,391), *B. intermedia* 1.00% (24/2,391) และเชื้อ unidentified *Brachyspira* 4.18% (100/2,391) โดยพบเชื้อทั้ง 3 ชนิดในไก่พื้นเมืองมากกว่าไก่ปลดระวางทั้งใน caeca (17.13% ต่อ 6.02%) และ cloacal swab (4.43% ต่อ 1.36%) อัตราการพบ *B. intermedia*ใน caeca ของไก่พื้นเมืองมากกว่าไก่ปลดระวาง (3.00% ต่อ 0.43%) แต่พบ *B. pilosicoli* ใน caeca ของไก่ทั้งสองชนิดใกล้เคียงกัน (3.00% ต่อ 2.37% ตามลำดับ) จากการสำรวจครั้งนี้สรุปได้ว่าสภาวะการติดเชื้อ *Brachyspira* spp. ในไก่ในประเทศไทยค่อนข้างต่ำ

คำสำคัญ: *Brachyspira* spp. ไก่ ประเทศไทย

บทนำ

Brachyspira spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม spirochetes มีรูปร่างเป็นเกลียวหลวมๆ เจริญได้ดีในสภาพที่ไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) สามารถก่อโรคได้ในสัตว์หลายชนิด เช่น หนู สุนัข สุกร สัตว์ปีก รวมทั้งในมนุษย์ (Hampson and Stanton, 1997) ปัจจุบันเชื้อที่ก่อโรคในสุกรได้แก่ *B. hyodysenteriae* และ *B. pilosicoli* (Taylor and Alexander, 1971; Taylor *et al*., 1980; Duhamel, 2001) สำหรับ *B. pilosicoli* และ *B. aalborgi* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ (Hovind-Hougen *et al*., 1982; Mikosza *et al*., 2001) ส่วนเชื้อที่พบในสัตว์ปีกได้แก่ *B. pilosicoli, B. intermedia, B. alvinipulli, B. pulli, B. murdochii* และ *B. innocens* รวมทั้ง *B. hyodysenteria* (Feberwee *et al*., 2008) เชื้อ *B. murdochii, B. innocens* และ *B. pulli* เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค (Stephen and Hampson, 1999) แต่เชื้อที่ก่อโรคในไก่คือ *B. pilosicoli, B. intermedia* และ *B. alvinipulli* (Hampson and McLaren, 1999; Stanton *et al.,* 1998; Stephen and Hampson, 2001) และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรค Avian Intestinal Spirochaetosis (AIS) (Swayne and McLaren, 1997) ซึ่งติดต่อโดยการกินอาหารหรือน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป จากนั้นเชื้อจะเจริญเติบโตแบ่งตัวและเกาะที่ epithelial cell ของลำไส้ใหญ่ช่วงไส้ตัน ถึงลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (caeca) ทำให้ลำไส้สัตว์ที่ติดเชื้อไม่สามารถดูดซึมน้ำและอาหารเข้าสู่ร่างกายได้ จึงเกิดอาการถ่ายเหลว อุจจาระติดเปลือกไข่ เชื้อ *B. pilosicoli* ทำให้ผลผลิตไข่ลดลง 5-6% ส่วนเชื้อ *B. intermedia* ทำให้ผลผลิตไข่ลดลง 10-12% ไข่แดงซีด คุณภาพไข่ต่ำ น้ำหนักตัวลด อัตราการตายอาจเพิ่มจากปกติ 0.5 % เป็น 1-1.5 % ต่อเดือน (Burch, 2008)

โรค AIS พบตั้งแต่ปี 1980 ในประเทศเนเธอร์แลนด์และอังกฤษ (Davelaar *et al*., 1986 ; Dwars *et al*., 1989) ต่อมาพบที่ประเทศสหรัฐอเมริกาและออสเตรเลีย (McLaren *et al*., 1996(A); Stephens and Hampson, 1999; Trampel *et al*., 1994) ในออสเตรเลีย และประเทศในแถบยุโรป โรค AIS มักเกิดจากเชื้อ *B. intermedia* และ *B pilosicoli* (Bano *et al*., 2005 ; Burch *et al*., 2006 ; Dwars *et al*., 1993 ; Stephen and Hampson, 1999) ในขณะที่เชื้อ *B. pilosicoli* และ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ
กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
*ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 02-5798908 ถึง 14 โทรสาร 02-5798918 ถึง 19
e-mail: apasaraw@dld.go.th

B. alvinipulli พบในสหรัฐอเมริกา (Swayne *et al.*, 1995 ; Trampel *et al.*, 1994) ปัจจุบันโรค AIS ยังเป็นโรคที่รู้จักกันไม่มากนัก รวมทั้งในประเทศไทยด้วย เนื่องจากอาการของโรคไม่รุนแรงและสังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจน จึงเป็นโรคเรื้อรังที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างต่อเนื่อง

การเพาะแยกเชื้อ *Brachyspira* spp. ในห้องปฏิบัติการค่อนข้างยุ่งยากเนื่องจากต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษและต้องเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจนเป็นเวลาหลายวัน ส่วนการจำแนกชนิดของเชื้อ *Brachyspira* spp. ในปัจจุบันไม่นิยมใช้วิธีทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เนื่องจากเป็นเชื้อที่เพาะขึ้นยากและใช้เวลานาน ทำให้การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเกิดความคลาดเคลื่อน ไม่แน่นอน อาจเกิดความผิดพลาดในการจำแนกได้ ดังนั้นจึงมีการนำวิธีตรวจทางอณูชีววิทยา ซึ่งมีความรวดเร็วและแม่นยำมาใช้ เช่น multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), 16S ribosomal DNA (rDNA) sequences และ polymerase chain reaction (PCR)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการหาสภาวะการติดเชื้อ *Brachyspira* spp. ในไก่ ในประเทศไทย ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการประเมินความเสี่ยง การเกิดโรคในฟาร์มเกษตรกร และการควบคุมโรคได้ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่ปี 2551 – 2552 โดยเก็บตัวอย่างจากลำไส้ช่วงไส้ตันถึงลำไส้ใหญ่ ส่วนปลาย (caeca) จำนวน 932 ตัวอย่าง โดยเก็บจากไก่ไข่ปลดระวาง 465 ตัวอย่าง ไก่พื้นเมือง 467 ตัวอย่าง และเก็บสวอปจากก้นไก่ (cloacal swabs) จำนวน 1,459 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากไก่ไข่ปลดระวาง 736 ตัวอย่าง ไก่พื้นเมือง 723 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ในเขตสำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยทั้ง 9 แห่ง ในประเทศไทย รวมทั้งหมด 2,391 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างทั้งหมดได้ทำการเพาะเชื้อในท้องที่ทันที

การเพาะแยกเชื้อ

นำตัวอย่างลำไส้มาเปิดผ่าขูดเอาเฉพาะส่วนเยื่อเมือกของผนังลำไส้ เพาะลงบน BJ medium ซึ่งประกอบด้วย Trypticase soy agar (Oxoid, England) น้ำสกัดจากอุจจาระสุกร 5% เลือดแกะ 7% spectinomycin 400 µg/ml. colistin 25 µg/ml. vancomycin 25 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) บ่มเชื้อที่ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจนด้วย AnaeroGen (Oxoid, England) เป็นเวลา 5-7 วัน ย้อมดูลักษณะของตัวเชื้อด้วยสี Congo red ส่วนสวอปก้นไก่ทำการเพาะเชื้อโดยวิธีเดียวกัน

การจำแนกเชื้อด้วยวิธี PCR-based Restriction Fragment Length Pholymorphism (PCR-RFLP)

ดัดแปลงจากวิธีของ Townsend, *et.al.* (2005) เป็นการหายีน nicotinamide adenine dinucleotide reduced oxidase (*nox* gene) ที่มีแบบแผนจำเพาะต่อชนิดของเชื้อ *Brachyspira* spp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme Dpn II (NewEngland BioLabs, Germany) และ Bfm I (MBI Fermentas, Germany) หรือ Sfc I (NewEngland BioLabs, Germany) ซึ่งมี restriction sites ตำแหน่งเดียวกัน

เชื้อ *Brachyspira* spp. ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างนำไปทำให้บริสุทธิ์บน BJ medium นำเชื้อที่ได้ไปสกัด DNA โดยการละลายเชื้อในน้ำกลั่น 100 µl ต้มในน้ำเดือด 5 – 10 นาที นำไปปั่นที่ 12,000 rpm/นาที นาน 5 นาที ส่วนน้ำใสคือ template DNA จากนั้นนำ template DNA ปริมาณ 10 µl ไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) โดยใส่ *Bnox* primer (BnoxF TAG CYT GCG GTA TYG CWC TTT GG, BnoxR CTT CAG ACC AYC CAG TAG AAG CC) อย่างละ 0.4 µM ใน PCR master mix ที่ประกอบด้วย 0.25 unit ของ HotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN, USA) 200 µM ของ dNTP mix (Fermentas, Germany) และ 1.5 mM ของ $MgCl_2$ โดยมีปริมาตรทั้งหมด 100 µl นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (BIO-RAD, USA) โดยใช้โปรแกรม 95°C นาน 45 วินาที, 56°C นาน 45 วินาที และ 72°C นาน 1 นาที ทั้งหมด 35 รอบ จะได้ PCR product ขนาด 939 bp แล้วนำ PCR product ที่ได้มาทดสอบ *nox*-RFLP ด้วย restriction enzyme DpnII (NewEngland BioLabs, Germany) และ restriction enzyme Sfc I (NewEngland BioLabs, Germany) โดยใช้ PCR product 12.5 µl, 10x restriction buffer 2.5 µl , DpnII 3 unit หรือ Sfc I 1.5 unit และเติมน้ำกลั่นจนครบ 25 µl บ่มที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมงนำไปแยกโดย eletrophoresis (Cosmo BioCo.LTD, Korea) ใน 2% agarose gel เพื่อดูแบบแผนและขนาดของ restriction fragments โดยมีเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *B. hyodysenteriae* ATCC 31212, *B. pilosicoli* ATCC 51139, *B. innocens* ATCC 20796, *B. intermedia* strain HB60 และ *B. murdochii* strain 56-150^T เป็นตัวควบคุม

การยืนยันเชื้อ *B. pilosicoli* ด้วย PCR

เนื่องจากแบบแผนของ *nox*-RFLP ของเชื้อ *B. pilosicoli* และ *B. alvinipulli* โดยการตัดด้วย restriction enzyme ข้างต้น จะให้ผลที่เหมือนกัน (Townsend et al., 2005) ดังนั้นการจำแนกเชื้อออกจากกันทำได้โดยนำ DNA ของเชื้อมาทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. pilosicoli* (อภัสราและวันทนีย์, 2545) มีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำ template

DNA ใส่ใน PCR master mix ซึ่งประกอบด้วย 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 0.25 unit HotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN, USA) และ 0.5 µM ของแต่ละ primer (forward primer 5' CAT AAG TAG AGT AGA GGA AAG TTT TT-3' และ reverse primer 5' CTC GAC ATT ACT CGG TAG CAA CAG-3') นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (BIO-RAD, USA) โดยใช้โปรแกรม 96°C นาน 15 วินาที, 60°C นาน 15 วินาที และ 72°C นาน 30 วินาที ทั้งหมด 30 รอบ วิเคราะห์ PCR product ที่ 930 bp โดย eletrophoresis (Cosmo BioCo.LTD, Korea) ใน 1.5% agarose gel

ผล

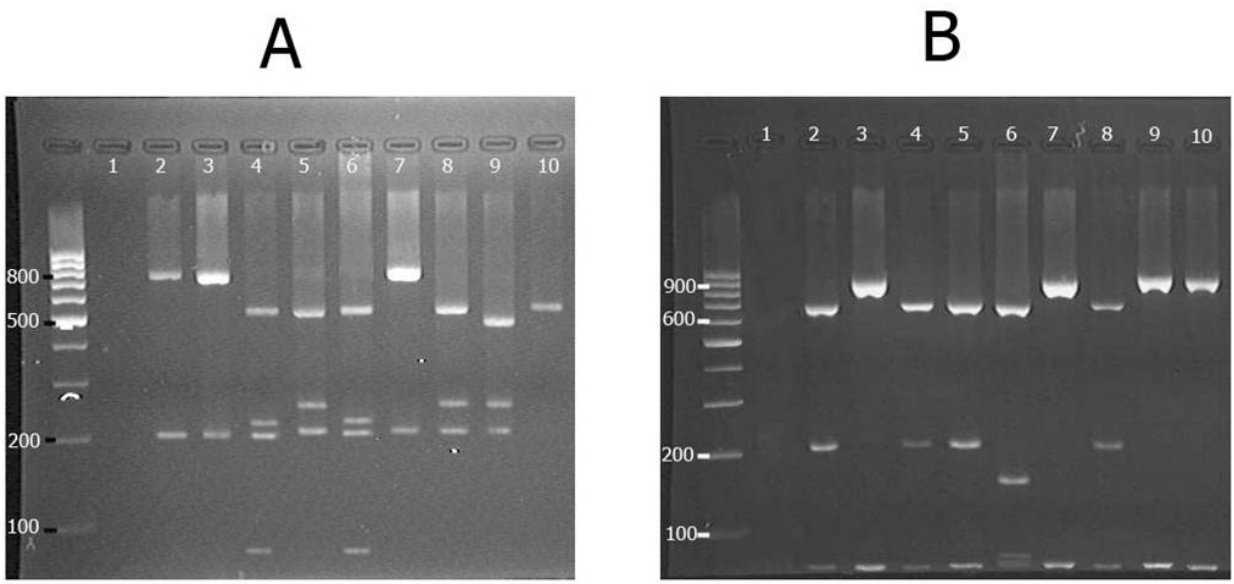
จากวิธีการเพาะเชื้อและการจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธี PCR-RFLP พบเชื้อ *Brachyspira* spp. 6.27% (150/2391) พบใน caeca มากกว่า cloacal swab คิดเป็น 11.59% (108/932) และ 2.88% (42/1459) ตามลำดับ จำแนกเป็นเชื้อ *B. pilosicoli* 1.09% (26/2,391), *B. intermedia* 1.00% (24/2,391) และเชื้อ unidentified *Brachyspira* 4.18% (100/2,391) โดยพบเชื้อ *Brachyspira* spp. ในไก่พื้นเมืองมากกว่าไก่ปลดระวางทั้งใน caeca (17.13% ต่อ 6.02%) และ cloacal swab (4.43% ต่อ 1.362%) แต่อัตราการพบ *B. pilosicoli* ในไก่ทั้งสองชนิดใกล้เคียงกัน (3.00% และ 2.37% ตามลำดับ) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการเพาะแยกเชื้อและจำแนกเชื้อ *Brachyspira* spp.จาก cloacal swabs และ caeca ในไก่ไข่ปลดระวาง และไก่พื้นเมือง

เชื้อ	จำนวนผลบวก (%)				รวม (n=2391)
	ไก่ไข่ปลดระวาง		ไก่พื้นเมือง		
	สวอป (n=736)	ลำไส้ (n=465)	สวอป (n=723)	ลำไส้ (n=467)	
B. pilosicoli	0 (0.0 %)	11 (2.37 %)	1 (0.14 %)	14 (3.00 %)	26 (1.09 %)
B. intermedia	4 (0.54 %)	2 (0.43 %)	4 (0.55 %)	14 (3.00 %)	24 (1.00 %)
unidentified *Brachyspira*	6 (0.82 %)	15 (3.23 %)	27 (3.73 %)	52 (11.13 %)	100 (4.18 %)
รวม	10 (1.36 %)	28 (6.02 %)	32 (4.43 %)	80 (17.13 %)	150 (6.27 %)

การทำ PCR-RFLP ที่ตัดด้วย restriction enzyme Dpn II และ Sfc I จะได้แบบแผนชิ้นส่วน DNA ของยีน nox ที่จำเพาะของเชื้อ *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *B. intermedia*, *B. murdochii* สำหรับเชื้อ unidentified *Brachyspira* คือเชื้อที่ไม่มีแบบแผนการตัดด้วย restriction enzyme Dpn II และ Sfc I ตรงกับเชื้อ *Brachyspira* spp. ชนิดใดๆ (Townsend, *et.al.*, 2005) (รูปที่ 1)

ขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่ได้จากการตัดด้วย restriction enzyme นี้ ได้จากการคาดการณ์ตาม restriction map จากยีน nox ของเชื้อ *Brachyspira* spp. ชนิดต่างๆ รวมทั้งมีการเปรียบเทียบผลกับการศึกษาของ (Townsed et.al., 2005) และ DNA Ladder ที่เป็น marker บน agarose gel ซึ่งเชื้อ *Brachyspira* spp. แต่ละชนิดจะมีขนาดของชิ้นส่วน DNA ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่1 PCR-RFLP ด้วย restriction enzyme Scf I (A) และ restriction enzyme Dpn II (B) Lane 1 negative control, Lane 2 *B. hyodysenteriae* ATCC 31212, Lane 3 *B. pilosicoli* ATCC 51139, Lane 4 *B. innocens* ATCC 20796, Lane 5 *B. intermedia* strain HB60, Lane 6 *B. murdochii* strain 56-150^{T}, Lane 7 *B. pilosicoli*, Lane 8 *B. intermedia*, Lane 9 Unidentified *Brachyspira* 1, Lane 10 Unidentified *Brachyspira* 2 (Lane 7 – 9 เป็นเชื้อที่เพาะแยกได้)

ตารางที่ 2 เชื้อ *Brachyspira* spp. สเตรนมาตรฐาน และเชื้อที่แยกได้จากท้องที่และขนาดของ DNA fragments ที่ตัดด้วย restriction enzyme Dpn II และ restriction enzyme Sfc I

Brachyspira species	Strain	producted restriction fragments (bp)	
		Sfc I	*Dpn* II
B. hyodysenteriae	ATCC31212	742, 197	684, 214, 41
B. innocens	ATCC20796	504, 211, 197, 27	684, 214, 41
B. intermedia	HB60, local isolates	504, 238, 197	684, 214, 41
B. murdochii	60-150T	504, 211, 197, 27	684, 157, 57, 41
B. pilosicoli	ATCC 51139, local isolates	742, 197	898, 41
Unidentified 1	local isolates	453, 238, 197,51	898, 41
Unidentified 2	local isolates	504, 238, 197	898, 41

วิจารณ์

จากการสำรวจตัวอย่างทั้งหมด 2,391 ตัวอย่าง ในพื้นที่รับผิดชอบของสำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยทั้ง 9 แห่ง พบเชื้อ *Brachyspira* spp. 6.27% (150/2,391) แยกเป็น *B. intermedia* 1.00% (24/2,391) และ *B. pilosicoli* 1.09% (26/2,391) ซึ่งทั้งสอง species นี้เป็นที่เชื้อก่อโรค AIS ที่พบเป็นประจำในฝูงไก่ไข่ในประเทศเนเธอร์แลนด์ รวมทั้งในประเทศอื่นๆ (Feberwee, 2008) จากการสำรวจครั้งนี้ไม่พบ *B. alvinipulli*, *B. pulli*, *B. murdochii*, *B. innocens* และ *B. hyodysenteriae* แต่มี *Brachyspira* ที่ไม่สามารถจำแนก species ได้อีก 100 isolates (4.18%) แบ่งเป็น unidentified 1 จำนวน 97 isolates และ unidentified 2 จำนวน 3 isolates (ตารางที่ 2) แสดงว่าเป็นเชื้อ *Brachyspira* ชนิดอื่นที่มีความแตกต่างกันกับเชื้อที่มีการจำแนกเอาไว้แล้ว (Townsed et.al., 2005) และโดยที่ระดับความแตกต่างอาจเป็น 2 แบบ คือ เป็นเชื้อต่าง species หรือ species เดียวกันแต่ต่างกันที่ genotype

จากตารางที่ 1 แม้ว่าพบเชื้อได้จากตัวอย่าง swabs จากไก่พื้นเมือง (4.43%, 32/723) มากกว่าตัวอย่าง swabs จากไก่ไข่ปลดระวาง (1.36%, 10/736) แต่ในไก่พื้นเมืองที่เจ้าของเลี้ยงเป็นไก่ชน เพื่อใช้ในกีฬาชนไก่พบเชื้อเพียง

ตัวอย่างเดียวจาก 127 ตัวอย่างของไก่ชนที่ศึกษา ทั้งนี้อาจเนื่องจากเจ้าของดูแลไก่เป็นอย่างดี ไก่ชนมีสุขภาพที่แข็งแรง ทั้งยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นประจำ จึงอาจทำให้เชื้อถูกทำลายไป

ส่วนการพบเชื้อ *Brachyspira* spp. จากตัวอย่างในไก่ไข่ปลดระวางซึ่งเลี้ยงในกรงตับ (3.16%, 38/1, 201) น้อยกว่าตัวอย่างจากไก่พื้นเมืองซึ่งเลี้ยงปล่อย (9.41%, 112/1,190) น่าจะเกิดจากไก่ที่เลี้ยงในกรงตับมีโอกาสสัมผัสเชื้อได้น้อยกว่าไก่ที่เลี้ยงปล่อย ซึ่งเชื้อจากไก่ไข่ปลด 38 isolates นั้น แยกเป็นเชื้อที่ก่อโรคได้คือ *B. pilosicoli* 0.92% (11/1,201) และ *B. intermedia* 0.50% (6/1,201) ส่วนเชื้อจากไก่พื้นเมือง 112 isolates แยกเป็นเชื้อที่ก่อโรคคือ *B. pilosicoli* 1.26 % (15/1, 190) และ *B. intermedia* 1.51% (18/1, 190) อัตราการพบเชื้อดังกล่าวในไก่ในประเทศไทยน้อยกว่าผลการสำรวจไก่ที่เลี้ยงปล่อยของ SAC Veterinary Centre ใน Edinburg ปี 2007 ที่พบเชื้อ *Brachyspira* 70% ของฝูง และ 54% เป็น pathogenic strains (Thomson *et al*., 2007) และจากการสำรวจไก่เลี้ยงกรงตับของ Bano *et al.* (2008) พบเชื้อ *Brachyspira* 72% ในฟาร์ม และ 35% เป็น pathogenic strains ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาพภูมิอากาศ และสิ่งแวดล้อมแตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเชื้อจากลำไส้โดยตรงกับการเพาะเชื้อจาก cloacal swabs พบว่าจากลำไส้ พบเชื้อ 11.59% (108/932) จาก cloacal swabs พบเชื้อ 2.88% (42/1,459) แสดงว่าการเพาะเชื้อจากลำไส้โดยตรงได้ผลมากกว่าจากการ swabs ดังนั้นในการชันสูตรโรคให้ได้ผลที่แน่นอนจึงควรใช้การเพาะเชื้อจากลำไส้ เนื่องจากเชื้อที่ปนออกมากับอุจจาระมีน้อยกว่าเชื้อที่เกาะอยู่ที่ผนังลำไส้ โอกาสการพบเชื้อจึงน้อยกว่า ลักษณะการพบเชื้อภายในฟาร์มก็มีความแตกต่างกันจาก 10-100% (McLaren *et al*., 1996 (B); Stephen and Hampson, 1999 ; Bano *et al*., 2008) จากการสำรวจครั้งนี้พบว่ามีฟาร์มจำนวนมากที่ไม่พบเชื้อ *Brachyspira* spp.เลย บางฟาร์มพบเชื้อเพียงตัวอย่างเดียวและบางฟาร์มพบทีละหลายตัวอย่างและหลาย species ปนกัน อย่างไรก็ตามไม่พบเชื้อ *Brachyspira* spp. หลาย species ปนในตัวอย่างเดียวกันซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Feberwee *et al*. (2008) พบ *Brachyspira* spp. หลาย species ปนกันในฝูงเดียวกันและในไก่ตัวเดียวกัน ในไก่พื้นเมืองที่เลี้ยงแบบปล่อยจะพบเชื้อมากกว่าไก่ที่เลี้ยงในกรงตับ เช่นเดียวกับรายงานของ Jansson *et al*. (2008) ที่พบว่าไก่ที่เลี้ยงปล่อยมีความเสี่ยงในการติดเชื้อมากกว่าการเลี้ยงแบบอื่นๆ

จากรายงานของ Dwars *et al*. (1989) พบว่าการเพาะแยกเชื้อจากไก่ป่วยด้วยอาการท้องเสียหรือผลผลิตลดลงจะได้เชื้อมากกว่าไก่ที่ไม่มีอาการป่วย แต่จากการสำรวจครั้งนี้ไม่พบไก่ที่แสดงอาการป่วย แม้ว่าจะเพาะแยกเชื้อได้ก็ตาม อาจเนื่องจากฟาร์มที่เก็บตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นฟาร์มชาวบ้านขนาดเล็ก การป่วยที่เป็นแบบเรื้อรังทำให้ไม่เห็นความสูญเสียที่เด่นชัดและไม่มีการจับตัวเลขของผลผลิต รวมทั้งไก่ที่ติดเชื้อเรื้อรังไม่รุนแรงเป็นเวลานานจะมีภูมิคุ้มกันของโรคอยู่แล้วจึงไม่แสดงอาการป่วยให้เห็น ไก่บางตัวจำนวนเชื้อที่มีอยู่อาจไม่มากพอที่จะทำให้ไก่แสดงอาการของโรคได้ แต่สัตว์เหล่านี้จะเป็นตัวแพร่กระจายเชื้อให้กับสัตว์ตัวอื่นๆ นอกจากนี้ตัวเชื้อ *B. pilosicoli* ยังเป็นเชื้อที่มีความสำคัญ สามารถติดต่อได้ในสัตว์หลายชนิด รวมทั้งมนุษย์ ทำให้เกิดโรค Human Intestinal Spirochaetosis (HIS) ซึ่งอาจเป็นปัญหาด้าน Zoonosis ในอนาคตจึงควรมีการเฝ้าระวังเชื้อนี้ในสัตว์เพื่อไม่ให้ติดต่อถึงคนด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ ผศ.นส.พ.ดร.นุวีร์ ประภัสระกูล หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *B. intermedia, B. murdochii* บริษัท ฮูเวฟาร์มา (ประเทศไทย) จำกัด ที่อนุเคราะห์เชื้อ *B. pilosicoli* เจ้าหน้าที่ปศุสัตว์จังหวัดทุกท่านที่ให้ความสะดวกขณะปฏิบัติราชการในพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง นางอุบลรัตน์ แทนกลาง นายชยภัค สีบู่ นายกำธร พรมโต และเจ้าหน้าที่ในห้องแบคทีเรียและเชื้อราทุกท่านที่ทำให้โครงการนี้สำเร็จได้ สพญ.ดร.พรเพ็ญ พัฒนโสภณ สพ.ญ.จิรา คงครอง สพ.ญ.พัชรี ทองคำคูณ และ น.สพ.วัชรชัย ณรงค์ศักดิ์ ที่ช่วยแก้ไขต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

อภัสรา วรราช และวันทนีย์ เนรมิตมานสุข 2545. การตรวจพบเชื้อ *Brachyspira pilosicoli* จาก caecum สุกรท้องเสีย. สัตวแพทยสาร. 53(1) : 25-33.

Bano, L., Merialdi, G., Bonilauri, P., Dall'Anese, G., Capello, K., Comin, D., Cattoli, V., Sanguinetti, V. and Agnoletti, F. 2005. Prevalence of intestinal spirochaetes in layer flocks in Treviso province, Northern Italy, *In* : Proceedings of the 3rd International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, University of Parma, Parma, Italy. p. 56-57.

Bano, L., Merialdi, G., Bonilauri, P., Dall'Anese, G., Capello, K., Comin, D., Cattoli, G., Sanguinetti, V., Hampson, D.J. and Agnoletti, F. 2008. Prevalence, disease associations and risk factors for colonization with intestinal spirochaetes

(*Brachyspira* spp.) in flocks of laying hens in north-eastern Italy. *Avian Pathol*. 37, 281-286.

Burch, D. G. S., Harding, C., Alvarez, R. and Valks, M. 2006. Treatment of a field case of avian intestinal spirochaetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* with tiamulin.*Avian Pathol*. 35, 211-216.

Burch,D. 2008. Good hygiene routine can lessen disease outbreaks. Poultry world, Academy, Module 16: Bachyspira.

Davelaar, F.G., Smit, H.F., Hovind-Hougen, K., Dwars, R. M. and van der Valak, C. 1986. Infectious typhlitis in chickens caused by spirochaetes. *Avian Pathol*. 15, 247-258.

Duhamel, G. E. 2001. Comparative pathology and pathogenesis of naturally acquired and experimentally induced colonic spirochetosis. *Anim Health Res. Rev.* 2, 3-17.

Dwars, R.M., Smit, H.F., Davelaar, F.G. and van Veer, W.T. 1989. Incidence of spirochaetal infections in cases of intestinal disorder in chickens. *Avian Pathol*. 18, 591-595.

Dwars, R.M., Davelaar, F.G. and Smit, H.F., 1993. Infection of broiler parent hens (*Gallus domesticus*) with avian intestinal spirochaetes: effects on egg production and chick quality. *Avian Pathol*. 22, 693-701.

Feberwee, A., Hampson, D. J., Phillips, N. D., La, T., van der Heijden, H. M. J. F., Wellenberg, G.J., Dwars, R.M. and Landman, W.J. (2008) Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and other Pathogenic Brachyspira species in chickens from Laying Flocks with Diasrhea or Reduced Production or both. *J. Clin. Microbiol*. 46 (2): 593-600.

Hampson, D. J. and Stanton, T. B. 1997. Intestinal Spirochaetes inDomestic Animals and Humans. *Wallingford, UK: CAB International*

Hampson, D. J. and Mc Laren, A. J. 1999. Experimental infection of laying hens with *Serpulina intermedia* causes reduced egg production and increased faecal water content. Avian Pathol. 28, 113-117.

Hovind-Hougen, K., Birch-Andersen, A., Henrik-Nielsen, R., Orholm,M., Pedersen, J. O., Teglbjaerg, P. S. and Thaysen, E. H. (1982) Intestinal Spirochaetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochaete *Brachyspira aalborgi* gen. nov. sp. nov. *J. Clin. Microbiol*. 16, 1127-1136.

Jansson, D. S., Fellstrom, C., Rasback, T., Vagsholm, I., Gunnarsson, A., Ingermaa, F. and Johansson, K.-E. 2008. Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from laying hens in different housing systems. *Vet. Microbiol*. 130: 348-362.

McLaren, A. J., Hampson, D. J. and Wylie, S. L. 1996 A. The prevalence of intestinal spirochaetes in poultry flocks in Western Australia. *Aust Vet J* 74, 319-321.

Mc Laren, A. J., Hampson, D. J. and Plant, S. J. 1996 B. The prevalence of intestinal spirochaetes in commercial poultry flocks in Western Australia. *Aust. Vet. J.* 74,31-33.

Mikosza, A. S. J., La T., Bastiaan de Boer, W. and Hampson, D. J. 2001. Comparative Prevalences of *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* as Etiologic Agents of Histologically Identified Intestinal Spirochetosis in Australia.*J. Clin. Microbiol.* Vol.39, p.347-350.

Stanton, T. B., Postic, D. and Jensen, N. S. 1998. *Serpulina alvinipulli* sp.nov., a new Serpulina species that is enteropathogenic for chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 48, 669-676.

Stephens, C. P. and Hampson, D. J. 1999. Prevalence and disease association of intestinal spirochaetes in chickens in eastern Australia. *Avian Pathol.* 28, 447-454.

Stephens, C. P. and Hampson, D. J. 2001. Intestinal spirochete infections of chickens: a review of disease associations, epidemiology and control. *Anim. Health Res. Rev.* 2, 83-91.

Stephens, C. P. and Hampson, D. J. 2002. Experimental infection of broiler breeder hens with The intestinal spirochaete *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* causes reduced egg production. *Avian Pathol.* 31, 169-175.

Swayne, D. E., Eaton, K. A., Stoutenburg, J., Trott,D.J., Hampson, D. J. and Jensen, N. S. 1995. Identification of a new intestinal spirochete with pathogenicity for chickens. *Infect. Immun.* 63, 430-436.

Swayne, D. E. and McLaren, A. J. 1997. Ch.10 Avian intestinal spirochaetes and avian intestinal spirochaetosis. In: Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans.Hampson, D.J. and Stanton,T.B. eds. *CAB International Wallingford, USA*. pp 267-300.

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

Taylor, D. J., Simmons, J. R. and Laird, H. M. 1980. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from Treponema hyodysenteriae. *Vet. Rec*. 106, 326-332.

Thomson, J .R., Murray, B. P., Henderson, L. E., Thacker,J. and Burch, D. G. S. 2007. *Brachyspira* species isolated from UK poultry samples. Abstract #39. In Proceeding of the fourth International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, 20-22 May, Prague, Czech Republicinvestigation of atypical isolates. *Anim. Health Res. Rev.* 2, 31-36.

Trampel, D. W., Jensen, N. S. and Hoffman, L. J. 1994. Cecal spirochetosis in commercial laying hens. *Avian Dis.* 38, 895-898.

Townsend, K. M., Ngan Giang,V., Stephens,C., Scott, P. T . and Trott, D. J. 2005. Application of Nox-restriction fragment length polymorphism for the differentiation of Brachyspira intestinal spirochetes isolated from pigs and poultry in Australia. *J. Vet. Diagn. Invest*. 17: 103-109.

A Survey of *Brachyspira* spp. in chicken in Thailand during 2008 – 2009

Apasara Worarat* Sommai Yuwapanichsampan Wantanee Neramitmansook

National Institute of animal Health, Department of Livestock Development, Kasetklang, Chatuchak, Bangkok 10900
* Corresponding author: Tel. 02-5798908 to 14 Fax. 02-5798918 to 19 e-mail: apasaraw@dld.go.th

Anaerobic intestinal spirochetes of the genus *Brachyspira* in chicken samples collected in the areas of Regional Bureaus of Animal Health and Sanitary 1-9 in Thailand were surveyed during 2008 – 2009. A total of 2,391 samples were collected from caeca and cloacal swabs. The 1,201 samples from spent hens raised in cages consisted of 736 cloacal swabs and 465 caeca and the 1,190 samples from native chickens raised in natural conditions consisted of 723 cloacal swabs and 467 caeca. The overall prevalence of *Brachyspira* spp. was 6.27% (150/2,391), in which caecal samples were found at a higher rate than the cloacal swabs, at 11.59 % (108/932) and 2.88% (42/1459), respectively. By using PCR-based Restriction Fragment Length Polymorphism (*nox*-PCR-RFLP) and *B. pilosicoli* species–specific PCR to differentiate from *B. alvinipulli*, the *Brachyspira* spp. isolates were identified as *B. pilosicoli* (1.09%, 26/2,391), *B. intermedia* (1.00%, 24/2,391) and unidentified *Brachyspira* (4.18%, 100/2,391). The prevalence of *Brachyspira* spp. was higher in native chickens than depleted chickens both in caeca (17.13% vs 6.02%) and cloacal swab (4.43% vs 1.36%), particularly *B. intermedia* in caeca (3.00% vs 0.43%). However, the prevalence of *B. pilosicoli* in caeca from both kinds of chickens was found to be similar (3.00% vs 2.37%). In conclusion, this study demonstrated that the prevalence of *Brachyspira* spp infection in chickens in Thailand was low.

Key words : *Brachyspira* spp., Chicken, Thailand