การศึกษาซีโรไทป์ของเชื้อโรคไข้หนังแดงที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทย

พรเพ็ญ พัฒนโสภณ[1] ทิพา ตันติเจริญยศ[1] ทาริกา ประมูลสินทรัพย์[2]

1 กลุ่มงานแบคทีเรีย สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์

2 งานสัตว์ทดลอง สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กองวิชาการ กรมปศุสัตว์

บทคัดย่อ

การศึกษาซีโรไทป์ของเชื้อ*Erysipelothrix rlusiopathiae* ที่เก็บรวบรวมจากซากสุกรที่ป่วย และตายด้วยโรคไข้หนังแดง ระหว่างปี 1982-1987 จำนวน 14 ตัวอย่าง และเชื้อที่เก็บจากต่อมทอนซิล ของสุกรสุขภาพดี ซึ่งนำมาฆ่าที่โรงงานฆ่าสัตว์ระหว่างปี 1980-1982 จำนวน 116 ตัวอย่าง โดยวิธี *Double agar gel diffusion precipitation* พบว่า เชื้อ ***Erysipelothrix rhusiopathae*** ที่แยกได้จากสุกรที่ป่วยตายด้วยโรคไข้หนังแดงเป็นซีโรไทป์ *1a* ทั้งหมด (100%) ในขณะที่ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากสุกรในโรงฆ่าสัตว์ ซีโรไทป์ 2, 6, 9, 5, *N* และ 11 พบมากที่สุดคือ 33.6, 12.9, 6.9, 5.2, 5.2 และ 4.3% ตามลำดับ ซีโรไทป์ *1a, 1b* และ 4 พบเท่ากัน. คือ 3.4% ส่วนที่เหลืออีก 10.5% เป็นซีโรไทป์ 8, 12, 21, 7, 10, 13, และ 16 สำหรับซีโรไทป์ 9 ซึ่งเคยมีรายงานการพบในปลา ในการศึกษาครั้งนี้พบถึง 6.9% และอีก 13 อย่างเชื้อ (11.2%) ไม่สามารถหาซีโรไทป์ได้จากแอนติซีรั่มมาตรฐานทั้ง 22 ซีโรไทป์ที่มีอยู่

ตลอดเวลา 30 ปี ที่ผ่านมามีผู้รายงานการศึกษาซีโรไทป์ของเชื้อ ***Erysipelothrix rhusiopathiae*** อยู่มากมาย นับตั้งแต่ *Heuner* (1958) เรื่อยมาจนถึงปัจจุบันเป็นที่เห็นพ้องต้องกันว่าสมควรจัดเรียงตามเลขอารบิค โดยคำแนะนำของ *Kucsera* (1972)และซีโรไทป์ย่อยใช้อักษรพิมพ์เล็ก เช่น *1a, 1b, 2a, 2b* จุดประสงค์เพื่อให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน และต่อเนื่องได้ไม่มีขีดจำกัด สำหรับซีโรไทป์ที่มีรายงานแล้วมีทั้งหมด 22 ซีโรไทป์ และ ซีโรไทป์ *N* ซึ่งหมายถึงไทป์ที่ไม่มีแอนติเจนนิซิตี้เฉพาะเจาะจง คือ แอนติ้ซีรั่มกระต่ายที่เกิดจากการฉีดเชื้อซีโรไทป์นี้ไม่สามารถทำปฏิกิริยาตกตะกอน *(precipitation)* ในอะก้าเจลกับสเตรนที่ทราบซีโรไทป์แล้วหรือแม้แต่กับสเตรนเดิมล่าสุด *Norrung* และคณะ (1987) รายงานการค้นพบซีโรไทป์ที่ 23 ในบ่อปฏิกูลจากคอกหมูและคอกวัว *Takahashi* และคณะ (1987) ได้จัดรวบรวมซีโรไทป์ที่ไม่รุนแรงและพบเสมอในต่อมทอนซิลสุกรที่สุขภาพแข็งแรงไว้เป็นพวกเดียวกันเรียกว่า ***Erysipelothrix tonsillarum sp. nov.*** สำหรับซีโรไทป์ที่พบในต่อมทอนซิลสุกรที่สุขภาพดีมีทั้งที่มีความรุนแรงมากในหนูทดลองและสุกรซึ่งทำให้เกิดผื่นแดงทั่วตัว ซึม เบื่ออาหาร กับซีโรไทป์ ที่ไม่มีความรุนแรงเพียงสามารถทำให้เกิดผื่นแดงในสุกรบริเวณที่ฉีดเชื้อเท่านั้น[11]

รายงานนี้ต่อเนื่องจากรายงานการสำรวจโรคไข้หนังแดงในสุกรทั่วประเทศระหว่างปี 1980-1982 โดยพัฒนโสภณ และคณะ (1984) ซึ่งในครั้งนั้นพบเชื้อ *E.rhu.* 2.93% จากตัวอย่างอุจจาระ 581 ตัวอย่าง และ 28.82% จากตัวอย่างต่อมทอนซิลสุกรที่มีสุขภาพดีจำนวน 687 ตัวอย่าง และจากการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อ ***E.rhu.*** จากซากสุกรป่วยตายที่ส่งมาชันสูตร ที่กองวิชาการ กรมปศุสัตว์ระหว่างปี 1982-1986 ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาซีโรไทป์ของเชื้อไข้หนังแดงที่ระบาดในประเทศไทย และความสัมพันธ์กับซีโรไทป์ที่แยกได้จากต่อมทอนซิลของสุกรที่สุขภาพดี เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุม ป้องกัน และการผลิตวัคซีนโรคไข้หนังแดงในโอกาสต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อ *E.rhu.* ที่นำมาศึกษาเก็บรวบรวมจากต่อมทอนซิลของสุกรปกติจากโรงงานฆ่าสัตว์ทั่วประเทศ และจากซากสุกรที่ป่วยตายด้วยโรคไข้หนัง-แดง ซึ่งถูกนำส่งกองวิชาการ กรมปศุสัตว์เพื่อวินิจฉัยและชันสูตร หลังจากแยกได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำมาทดสอบทางชีวเคมีตามวิธีของ *Wood* (1987) จากนั้นนำเชื้อ เก็บรักษาไว้ที่ 4 °C ในสภาพดูดแห้ง *(lyophilized)*

การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระต่าย แอนติเจนสำหรับฉีดกระต่ายเตรียมโดยประยุกต์วิธีของ *Wellmann* และคณะ (1983) และ *Wood* และคณะ (1987) โดยเพาะสเตรนมาตรฐานลงบน *trytose agar* บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีผ่านกล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกโคโลนีที่มีขอบเรียงสีฟ้าปนเทาเรียบเป็นเนื้อเดียวไม่มีตุ่มลาย เพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 10 ม.ล. บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง ผ่านเชื้อ 2-3 ครั้งเพื่อให้ได้เชื้อที่แข็งแรงจึงใช้เชื้อดังกล่าว 0.5 ม.ล. เพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 200 ม.ล. บ่มไว้ 24 ชั่วโมง ที่ 37°C ทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยย้อมด้วยสีแกรม และเพาะบน *tryptose agar* เพื่อดูรูปร่างโคโลนี (ในกรณีที่ทำแอนติเจนเชื้อตายก็เติม 0.5% ฟอร์มาลิน โดยปริมาตร ทิ้งไว้ข้ามคืนในอุณหภูมิห้อง)ปั่นแยกเชื้อด้วยเครื่อง *Centrifuge* 3000 *rpm.*30 นาทีล้าง 3 ครั้งด้วย *phosphate buffer saline (PBS)* จึงนำมาปรับความขุ่นด้วย *PBS* จนค่า *OD* เท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 600 *nanometer*

การเตรียมแอนติซีรั่มจากกระต่าย แอนติซีรั่มที่ใช้ทดสอบซีโรไทป์เตรียมจากกระต่ายโดยการฉีดด้วยแอนติเจนเตรียมจากสเตรนมาตรฐาน 22 ซีโรไทป์ รวมทั้งซีโรไทป์ *N* เชื้อ *E.rhu.* สายพันธุ์ที่ไม่สามารถตรวจซีโรไทป์ได้จากแอนติซีรั่มมาตรฐาน ก็ต้องนำมาทำแอนติเจนฉีดกระต่ายเช่นเดียวกัน ใช้แอนติเจนแต่ละสเตรนที่เตรียมไว้ฉีดกระต่ายหนัก 2.5-3 ก.ก. จำนวน 4 ตัว โดยฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ตามตารางที่ 1 หลังจากฉีดครั้งสุดท้ายได้ 8 วัน จึงทำการเก็บซีรั่ม เติม *Thimerosol* 0.01% แล้วเก็บแช่เข็งที่ -40°C ถึง -70 C

การสกัดแอนติเจนสำหรับทดสอบซีโรไทป์ นำเชื้อที่ต้องการทราบซีโรไทป์เพาะลงบน *tryptose agar* บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมงคัดเลือกเชื้อที่ได้มา 1 โคโลนี เพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 10 ม.ล. บ่ม 37°C 24 ชั่วโมง ใช้เชื้อดังกล่าว 0.5 ม.ล. เพาะลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 160 ม.ล. บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมงเติม 0.5% ฟอร์มาลินเพื่อฆ่าเชื้อแล้วบ่มต่ออีกข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง แยกเอาเชื้อออกมาโดยการปั่น 3,000 *rpm.* 30 นาที แล้วล้าง 3 ครั้ง ด้วย *PBS* ดูดน้ำล้างทิ้ง เติมน้ำกลั่น 5 ม.ล. แล้วนึ่งใน *autoclave* ที่ 121°C 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นลง แล้วปั่นด้วย *Centrifuge* แยกส่วนใสเก็บไว้ เติม *Thimerosol* 0.01% เก็บที่ 4 °C

การทดสอบหาซีโรไทป์ ใช้วิธี *double agar agel duffusion precipitation test* ใน *agarose* บนสไลด์มาตรฐานขนาด 25 × 75 ม.ม. หลอม 1% *agarose gel* ใน *PBS pH* 7.2 แล้วเติม 0.01% *thimerosol* เทลงบนสไลด์ 3 *ml* ต่อสไลด์ ทิ้งไว้ให้แข็งตัว เจาะหลุม 6 หลุมเรียงกันเป็นรูปหกเหลี่ยมไว้ใส่แอนติซีรั่มส่วนหลุมกลางใส่แอนติเจน ขนาดของหลุมเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ม.ม. และห่างกัน 4 ม.ม. หลังจากหยอด แอนติเจนที่ต้องการหาซีโรไทป์และแอนติซีรั่มมาตรฐานแล้วนำไปใส่ในกล่องที่มีสำลีชุ่มน้ำ หรือฟองน้ำชุ่มน้ำ เพื่อให้ความชุ่มชื้นเก็บในตู้ 37°C 24 ชั่วโมง อ่านผลครั้งแรก แล้วตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องข้ามคืน อ่านผลซ้ำอีก ถ้าแอนติเจนมีปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มหลุมไหนจะเกิด *precipitation line* เป็นทางสีขาว ระหว่างหลุมทั้งสองนั้น

Table 1. Rabbits immunizing program

Inactivated antigen (I/V)	Living antigen (I/V)
day 1 5 8 12	15 19 22 26 34
amount 1ml 2ml 3ml 4ml	1ml 2ml 3ml 4ml exsanguination

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาซีโรไทป์ของเชื้อ *E.rhu.* ที่แยกได้จากสุกรป่วยตาย 14 ตัวอย่างเชื้อระหว่างปี 1982-1986 ปรากฏว่าเป็นซีโรไทป์ *1a* ทั้งหมด ส่วนซีโรไทป์ของเชื้อ *E.rhu.* จากต่อมทอนซิลของสุกรปกติซึ่งเก็บจากโรงงานฆ่าสัตว์ระหว่างปี 1980-1982 จำนวน 116 ตัวอย่างเชื้อ ซีโรไทป์ที่พบมากที่สุดคือ ซีโรไทป์ 2(33.6%) รองลงมาตามลำดับคือ ซีโรไทป์ 6(12.9%) ซีโรไทป์ 9(6.9%) ซีโรไทป์ 5 และซีโรไทป์ *N* พบในอัตราเท่ากับ (5.2%) ซีโรไทป์ 11(4.3%) ซีโรไทป์ *1a, 1b* และซีโรไทป์ 4 พบในอัตราเท่ากัน (3.4%) ที่เหลืออีก 10.5% เป็นซีโรไทป์ 12, 21, 7, 10, 13 และ 16 ซีโรไทป์ที่ไม่พบคือ 3, 14, 15, 17, 18, 19, 20 และ 22 อีก 13 ตัวอย่างเชื้อไม่สามารถบอกซีโรไทป์จากแอนติซีรั่มที่มีอยู่ทั้งหมด 22 ไทป์ได้

Table 2 Reference strains of *E. rhusiopathiae* used in determination of serotypes of isolants from swine and serotypes of 116 isolants of *E. rhu.* isolated from tansils of apparently healthy pigs.

Serotype	Reference strain	No of strain	%
1a	ME7	4	3.4
1b	422/1	4	3.4
2a	R32	39	36.6
2b	NF-4		
3	Wittling	–	–
4	Heilbutt	4	3.4
5	Pecs 67	6	5.2
6	Vadkacsa	15	12.9
7	T 131	1	0.9
8	Goda	3	2.6
9	Kaparek	8	6.9
10	P	1	0.9
11	IV 12/8	5	4.3
12	M2	3	2.6
13	Pecs 18	1	0.9
14	Iszap 4	-	-
15	Pecs 3597	-	-
16	Tanzania	1	0.9
17	Rodsyge 545	-	-
18	Rodsyge 715	-	-
19	Rodsyge 2015	-	-
20	Rodsyge 2553	-	-
21	Bano 36	2	1.7
22	Bano 107	-	-
N	New/N5	6	5.2
NT		13	11.2

Type 1-21 and Type N were kindly supplied by Dr. V. Norrung

Type 22 kindly were supplied by Prof. Dr. de Diego

วิจารณ์

จากผลของการศึกษาซีโรไทป์ของเชื้อ *E.rhu.* จากซากสัตว์ป่วย และตายด้วยโรคไข้หนังแดง 14 ราย พบเป็นไทป์ *1a* ทั้งหมด เนื่องจากสัตว์ที่ตายและส่งมาชันสูตร ป่วยแบบโลหิตเป็นพิษทั้งสิ้นเพราะสัตว์ที่ป่วยแบบเรื้อรัง เจ้าของมักรักษาหรือส่งโรงฆ่าโดยไม่ผ่านห้องปฏิบัติการ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ *Kucsera* (1979) ที่ศึกษาการระบาดของโรคไข้หนังแดงทั่วโลกและพบว่าสุกรที่ป่วยแบบโลหิตเป็นพิษ 93.9% เป็นซีโรไทป์ *1a* พวกที่ป่วยแบบผื่นแดงตามตัวเป็นซีโรไทป์ *2a* ทั้งหมด และพวกที่ป่วยแบบเยื่อบุหัวใจอักเสบเป็นซีโรไทป์ *1a* และ *2a* ในอัตราใกล้เคียงกัน จากผลการตรวจซีโรไทป์ของเชื้อ *E.rhu.* จากต่อมทอนซิลของสุกรที่สุขภาพดี ซีโรไทป์ที่พบมากที่สุดคือซีโรไทป์ 2 (33.6%) รองลงไปคือ ซีโรไทป์ 6, ซีโรไทป์ 9, ซีโรไทป์ 5 และซีโรไทป์ *N* ตามลำดับ เปรียบเทียบกับรายงานของ *Kucsera* (1979) ซีโรไทป์ที่พบมากที่สุดคือซีโรไทป์ *2a* (46.3%) รองลงไปคือ ซีโรไทป์ *N* (26.8%) ซีโรไทป์ 11(10.7%) และซีโรไทป์ 6(4.7%) ตามลำดับ *Takahashi* (1987) พบซีโรไทป์ 7 ซีโรไทป์ 2 และ ซีโรไทป์ 6 ตามลำดับ ส่วนของ *Hashimoto* (1974) พบซีโรไทป์ *B* (ซีโรไทป์ 2) เท่ากับซีโรไทป์ *N* ซีโรไทป์ *L* (ซีโรไทป์ 5) และซีโรไทป์ *C* (ซีโรไทป์ 3) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าซีโรไทป์ที่พบติดอันดับสูงทั้ง 4 รายงานเป็นซีโรไทป์ 2 ซีโรไทป์ *N* และซีโรไทป์ 6 สำหรับ ซีโรไทป์ 2 นั้นเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าทำให้สุกรป่วยอย่างเรื้อรัง[2,3,8,11,13] ส่วนซีโรไทป์ 5, ซีโรไทป์ 6 และซีโรไทป์ *N* มีรายงานทำให้สุกรป่วยอย่างเรื้อรังเช่นกัน โดยส่วนใหญ่ทำให้ข้ออักเสบ และต่อมน้ำเหลืองอักเสบ[9,10] ซีโรไทป์ 9 มีรายงานพบในปลา [6] และไม่ค่อยพบในรายงานอื่น ๆ แต่การศึกษาครั้งนี้กลับพบสูงเป็นอันดับที่สาม (6.9%) อาจเป็นได้ที่อาหารสุกรมีส่วนผสมของปลาป่นอยู่ด้วย สำหรับซีโรไทป์นี้ไม่มีรายงานว่ามีความรุนแรงในสุกร

กิตติกรรมประกาศ

การทดลองนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเภททั่วไป ประจำปี 2528

คณะผู้รายงานขอขอบพระคุณ *Dr. V. Norrung* ชาวเดนมาร์ค *Dr. de Diego* ชาวอาร์เจนตินา ซึ่งได้กรุณาให้เชื้อมาตรฐานและผลงานวิจัย *Dr. Sawada* ชาวญี่ปุ่น ซึ่งกรุณาให้ผลงานวิจัย *Dr. Hashimoto* ชาวญี่ปุ่น ซึ่งกรุณาให้คำแนะนำบางประการและผลงานวิจัย อีกทั้งผู้ดูแลสัตว์ทดลองและกระต่ายทดลองซึ่งอุทิศชีวิตเพื่อการทดลอง และประโยชน์ต่อมวลสัตว์ทั้งหลาย

References

1. *Connell, R.; Langford, V. 1953. Studies of swine erysipelas. V. Presence of* ***Erysipelothrix rhusiopathiae*** *in apparently healthy pigs. Can. J. Comp. Med. 17 (11) : 448-453.*
2. *Hashimoto, K.; Yoshida, Y.; and Sugwara, H. 1974. Serotypes of Erysopelothrix insidiosa isolated from swine, fish, and birds in Japan. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 14 : 113-120.*
3. *Heuner, F. 1958. Uber serologische Utersuchungen an Rotlaufsummen. Arch. Exp. Vet. Med. 12 : 40.*
4. *Kucsera, G. 1972. Comparative study on special serotypes of* ***Erysipelothrix rhusiopathiae*** *strains isolated in Hungary and Abroad. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 22(3) : 251-261.*
5. *Kucsera, G. 1979. Serological typing of* ***Erysipelothrix rhusiopathiae*** *strains and the epizootiological significance of the typing. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 27 : 19-28.*
6. *Norrung, V.; Munch, B.; and Errebo Larsen, H. 1987. Occurrence, isolation and serotyping of* ***Erysipelothrix rhusiopathiae*** *in cattle and pig slurry. Acta Vet. Scand. 28(1) : 9-14.*
7. *Pathanasophon, P.; Pipitkul, S.; and Tanticharoenyos, T. 1984. A survey for the prevalence of swine erysipelas. J. Thai Vet. Med. Assoc. 35(2) : 71-177.*

8. Takahashi, T.; Sawada, T.; Takagi, M.; Seto, K.; Kanzadi, M.; and Marayama, T. 1984. Serotypes of ***Erysipelothrix rhusiopathiae*** strains isolated from slaughter pigs affected with chronic erysipelas. Jpn. J. Vet. Sci. 46 : 149-153.

9. Takahashi, T.; Sawada, T.; Seto, K.; Muramatsu, M.; Marayama, T.; and Kanzaki, M. 1985. Pathogenicity of ***Erysipelothrix rhusiopathiae*** strains of serovers 1a, 3, 5, 6, 8, 11, 21 and Type N isolated from slaughter pigs affected with chronic erysipelas. Jpn. J. Vet. Sci. 47(1) : 1-8.

10. Takahashi, T.; Sawada, T.; Muramatsu, M.; Tamura, Y.; Fujisawa, T.; and Benmo, Y.; 1987. Serotype, antimicrobial susceptibility and pathogenicity of ***Erysipelothrix rhusiopathiae*** isolated from tonsils of apparently healthy slaughter pigs. J. Clin. Microbiol. 25 : 536-539.

11. Takahashi, T.; Fujisawa, T.; Benno, Y.; Tamura, Y., Sawada, T.; Suzuki, S.; Muramatsu, M.; and Mitsuoka, T. 1987. ***Erysipelothrix tonsillarum sp. nov.***: A new species isolated from tonsils of apparently healthy pigs. Int. J. Syst. Bacteriol. 37(2):Notes a-c.

12. Wellmann, G.; Kucsera, G.; and Norrung, V. 1983. Comparative studies on different methods in typing strains of ***Erysipelothrix rhusiopathiae***. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt. Orig. A.254 : 42-63

13. Wood, R.L.; and Harrington, R. 1978. Serotypes of ***Erysipelothrix rhusiopathiae*** isolated from swine and from soil and manure of swine pens in the United States. Am. J.Vet. Res. 39: 1834-1840.

Serotypes of Erysipelothrix rhusiopathiae Isolated from Swine in Thailand

Pornpen Pathanasophon[1] Tipa Tanticharoenyos[1] Tarika Pramoolsinsap[2]

1. Bacterial Section, National Animal Health and Produc tion Institute, Veterinary Research Division, Department of Livestock Development
2. Experimental Animal Unit, National Animal Health and Production Institute, veterinary Research Division, Department of Livestock Development

ABSTRACT

*One hundred and thirty isolants of **Erysipelothrix rhusiopathiae** were serotyped by double agar-gel diffusion precipitation test. All 14 isolants recovered from swine erysipelas between 1982-1987 belonged to serotype 1a, of 116 isolants from tonsils of apparently healthy pigs collected from slaughter houses in various parts of Thailand between 1980-1982 were serotype 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 21 and N. Serotypes 2, 6, 9, 5, N and 11 were the most prevalent (33.6%, 12.9%, 6,9%, 5.2%, 5.2% and 4.3%.) respectively, 3.4% each of the isolants were serotype 1a, 1b and 4. The remaining 7 serotypes (10.5% of the isolants) were serotype 8, 12, 21, 7, 10, 13 and 16. Serotype 9 was found in a rather high frequency (6.9%) in this investigation. Thirteen isolants were non - typabled by antisera from 22 reference strains representing known serotypes of **Erysipelothrix rhusiopathiae***