บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานของมัยโคพลาสมา (Taxonomy of *Mycoplasma*)

มัยโคพลาสมาจัดอยู่ใน Class Mollicutes ใน Kingdom Prokaryotes (Subcommittee on the Taxonomy of Mycoplasmatales, 1967) คำว่า Mollicutes มีรากศัพท์มาจากคำ 2 คำ คือ Mollis หมายถึง อ่อนนุ่ม และ Cutis หมายถึง ผิว Mollicutes จึงหมายถึงผิวอ่อนนุ่มอันได้แก่ มัยโคพลาสมาซึ่งเป็น prokaryotes ที่ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall)

ใน Class Mollicutes เดิมมีสมาชิกเพียง Order เดียว คือ *Mycoplasmatales* (Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes, 1979 ; Freundt and Edward, 1979) มีคุณสมบัติ คือ ไม่มีผนังเซลล์ในทุกสภาวะของการเจริญเติบโต ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียชนิด L-phase ผิวชั้นนอกเป็นเพียงพลาสมาเมมเบรน, มีขนาดเล็ก และมีขนาดยีโนมเพียงประมาณ $5x10^8$ ดาลตัน ซึ่งมีขนาดเพียงครึ่งหนึ่งของแบคทีเรียที่เล็กที่สุด สามารถผ่านแผ่นกรองแบคทีเรียขนาด 200-450 นาโนเมตรได้, ลักษณะโคโลนีเป็นรูปไข่ดาว ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ, เซลล์มีรูปร่างกลม, ลูกแพร์, เป็นสายตรง และสายเกลียว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 0.3 - 0.8 ไมครอน จึงเป็น prokaryotes ประเภทมีชีวิตแบบอิสระที่มีขนาดเล็กที่สุด เพิ่มจำนวนได้เองโดยวิธีแบ่งตัว (binary fission) มัยโคพลาสมาส่วนใหญ่จะไม่ไวต่อยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (Freundt, 1983) Order *Mycoplasmatales* เดิมแบ่งออกเป็น 3 family คือ *Mycoplasmataceae*, *Acholeplasmataceae* และ *Spiroplasmataceae* โดยแบ่งตามคุณสมบัติความต้องการสารอาหาร, ลักษณะรูปร่าง, ขนาดของยีโนมและการสร้างเอ็นไซม์ Genus *Mycoplasma* อยู่ใน family แรก มีความต้องการ sterol ในการเจริญเติบโต และสร้างเอ็นไซม์ NADH oxidase ในไซโตพลาสซึม ดังแสดงในตารางที่ 2-1 ปัจจุบันถึงแม้จะมีการเสนอการจัดอนุกรมวิธานของ Mollicutes เพิ่มเติมขึ้น (Tully et al.,1993) อย่างไรก็ตาม Genus *Mycoplasma* ยังคงอยู่ใน order และ family เดิมและคงคุณสมบัติเช่นเดิม

ตารางที่ 2-1 อนุกรมวิธานของ Class Mollicutes

Class: Mollicutes

Order : *Mycoplasmatales*

Family I : *Mycoplasmataceae*

1. Sterol required for growth
2. Genome size approximately $5.0x10^8$ daltons
3. NADH oxidase localized in cytoplasm

Genus I : *Mycoplasma* (64 species current)

Do not hydrolyse urea

Genus II : *Ureaplasma* (1 specie with serotype)

Hydrolyse urea

Family II : *Acholeplasmataceae*

1. Sterol not required for growth
2. Genome size approximately $1.0x10^9$ daltons
3. NADH oxidase localized in membrane

Genus I : *Acholeplasma* (8 species current)

Family III : *Spiroplasmataceae*

1. Helical organisms during some phase of growth
2. Sterol required for growth
3. Genome size approximately $1.0x10^9$ daltons
4. NADH oxidase localized in cytoplasm

Genus I : *Spiroplasma* (3 species current)

Genera of uncertain taxonomic position

Thermoplasma (1 specie : apparently belongs to Archaebacteria)

Anaeroplasma (2 species)

จาก Freundt and Edward, 1979 : Principles of Mycoplasma Classification and Taxonomy in Method in Mycoplasmology vol. 1 p.10

Genus *Mycoplasma* แยกออกได้เป็นชนิดต่างๆ โดยอาศัยความแตกต่างของรูปร่าง, การเจริญเติบโต, คุณสมบัติทางชีวเคมี, ซีรั่มวิทยาและพันธุกรรม ในปัจจุบันมีการพบเชื้อมัยโคพลาสมาถึง 85 ชนิดทั้งในคนและสัตว์ต่างๆ เนื่องจากมัยโคพลาสมาชอบอาศัยอยู่ในบริเวณพื้นผิวเยื่อชุ่ม จึงทำให้พบเชื้อได้เสมอที่บริเวณเยื่อบุทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและล่าง, เยื่อบุทางเดินอวัยวะสืบพันธุ์, ต่อมน้ำนมและทางเดินอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งเยื่อบุทางเดินหายใจเป็นบริเวณที่พบเชื้อได้มากที่สุด เชื้อชนิดแรกที่ถูกค้นพบคือ *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Contagious bovine pleuropneumonia เชื้อ *M. mycoides subsp. mycoides* จึงถือเป็น type strain ของ Genus *Mycoplasma*

มัยโคพลาสมาค่อนข้างมีความจำเพาะต่อโฮสต์ (host specific) มีเพียงบางครั้งที่พบเชื้อต่างชนิดจากที่เคยพบในสัตว์นั้น เช่น Al-Aubaidi และ Fabricant (1971) เพาะเชื้อ *M. gallinarum* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบแต่ในสัตว์ปีกได้จากทางเดินหายใจของวัว ซึ่งถือว่าเป็นการพบที่ไม่ปกติ อาจเกิดขึ้นได้จากการเลี้ยงสัตว์สองชนิดไว้ใกล้ชิดกัน ทำให้มีการฟุ้งกระจายของเชื้อจากสัตว์ที่เป็นโฮสต์ปกติไปยังสัตว์อื่น หรือเกิดจากความบกพร่องของระบบป้องกันตนเองของโฮสต์ การถูกเหนี่ยวนำจากธรรมชาติหรือยา ก็อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อแบบที่ไม่ปกติเช่นนี้ได้ (Gourlay and Howard, 1982)

2.2 มัยโคพลาสมาที่พบในสุกร (Porcine mycoplasma)

เชื้อสองชนิดที่เป็นสาเหตุของปอดบวมในสุกร คือ *M. hyopneumoniae* และ *M. hyorhinis* ทำให้สุกรปอดบวมแบบเรื้อรังได้แต่ไม่รุนแรงนัก สัตว์จะแสดงอาการป่วยแต่ไม่ตาย เชื้อชนิดแรกจะมีความสำคัญและรุนแรงกว่า มีการแพร่กระจายไปยังทุกภูมิภาคของโลกที่เป็นเขตการเลี้ยงสุกร ในปี 1965 Goodwin และคณะ สามารถพิสูจน์ความเป็นเชื้อก่อโรคของ *M. hyopneumoniae* โดยการฉีดเชื้อ *M. hyopneumoniae* เข้าสุกรซึ่งได้จากการผ่าตัดทำคลอดลูกสุกรและไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคได้ ในปีเดียวกัน Mare และ Switzer ทำการพิสูจน์เช่นกันในลูกสุกรที่ไม่ได้รับนมน้ำเหลือง (colostrum) จากแม่ และ Hodges และคณะ ในปี 1969 ทำได้สำเร็จในลูกสุกรปลอดเชื้อ (gnotobiotic pigs) และทั้งสามคณะได้ผลตรงกัน คือสุกรแสดงรอยโรคของการติดเชื้อที่ปอดคลอนต่างๆ ที่สามารถตรวจพบได้ทั้งด้วยตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา (Whittlestone, 1979)

เชื้อ *M. hyorhinis* มักจะมีบทบาทในการเป็นเชื้อแทรกซ้อน (secondary invader) (Friis, 1975) แต่ในปี 1974 Gois และ Kuksa ทำการทดสอบให้สุกรปกติแสดงอาการของการติดเชื้อ *M. hyorhinis* ได้ สุกรป่วยจะมีอาการไอ โพรงจมูกอักเสบ, ปอดบวม รวมทั้งเกิดการอักเสบที่เยื่อหุ้มหัวใจและข้อขา รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาคล้ายกับรอยโรคที่เกิดจากเชื้อ *M. hyopneumoniae* (Whittlestone, 1979)

M. hyopneumoniae เป็นสาเหตุของโรค MPS พบเฉพาะในทางเดินหายใจของสุกร เช่น ปอด, หลอดลม, โพรงจมูก และทอนซิลเท่านั้น เป็นเชื้อที่เพาะขึ้นยากมาก ชอบบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ ร้อยละ 5 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-37°C ใช้พลังงานโดยการสลายน้ำตาลกลูโคส ลักษณะโคโลนีของเชื้อจะแตกต่างจากเชื้อมัยโคพลาสมาทั่วไป คือ ไม่มีลักษณะเป็นรูปไข่ดาว และมีขนาดเล็กประมาณ 0.5 มิลลิเมตรเมื่อโคโลนีอายุประมาณ 7-10 วัน นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อที่ถูกยับยั้งได้ด้วยเบนซิลเพนนิซิลลิน (เพนนิซิลลิน จี) ที่ความเข้มข้น 10-100 IU/ ml. บริเวณที่พบเชื้อได้มากที่สุดคือ ระหว่างซีเลียและผนังเมมเบรนของเซลล์บุผิวในแขนงหลอดลมขนาดต่างๆ (bronchioles and bronchi) เชื้อสามารถไปยับยั้งการโบกพัดของซีเลีย ทำให้ซีเลียสูญเสียการเรียงตัวที่ดี และหดสั้น จนเกิดการลอกหลุดของเซลล์บุผิวทางเดินหายใจในที่สุด

2.3 พยาธิกำเนิด (Pathogenesis)

พยาธิกำเนิดของโรคทางเดินหายใจจากเชื้อมัยโคพลาสมา เป็นกลไกที่เกิดขึ้นร่วมกันระหว่างคุณสมบัติของเชื้อ กับสภาวะและการตอบสนองของโฮสต์เมื่อตอนได้รับเชื้อ ดังนั้นจึงแบ่งการพิจารณาออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ปัจจัยจากเชื้อเอง และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับโฮสต์

2.3.1 ปัจจัยจากมัยโคพลาสมา (Mycoplasma factors)

ก. การเข้าสู่ผนังทางเดินหายใจของโฮสต์ (Exposure of respiratory epithelium)

เมื่อเชื้อมัยโคพลาสมาถูกถ่ายทอดจากสัตว์ตัวหนึ่งไปยังสัตว์ตัวอื่นๆ ไม่ว่าจะจากการสัมผัสโดยตรง หรือการหายใจเอาอากาศที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ก็ตาม เชื้อเองจะต้องสามารถแทรกตัวผ่านชั้นเยื่อเมือกลงไป จึงจะสัมผัสกับเซลล์บุผนังทางเดินหายใจได้ มัยโคพลาสมาบาง

ชนิด เช่น *M. pnuemoniae, M. pulmonis* และ *M. gallisepticum* มีคุณสมบัติเคลื่อนที่ได้ (Bredt, 1979) แต่มีเชื้อมัยโคพลาสมาก่อโรคอีกหลายชนิดที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้นจึงน่าจะเป็นปัจจัยอื่นมากกว่าคุณสมบัติการเคลื่อนที่ที่ทำให้เชื้อก่อโรคทุกชนิดสัมผัสถึงเซลล์บุผนังทางเดินหายใจได้ จากการทดลองใช้เม็ดพลาสติก (polystyrene) ขนาดต่างๆ ในการสังเกตการแทรกตัวเข้าสู่ชั้นเยื่อเมือกของลำไส้หนู พบว่า เม็ดพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.44 ไมครอน สามารถแทรกตัวได้ดีกว่าเม็ดพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.1 ไมครอน ซึ่งตรงกับเชื้อมัยโคพลาสมาที่มีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางเพียงประมาณ 0.3 ไมครอน ที่เป็นปัจจัยสำคัญให้สามารถแทรกตัวลงสู่ชั้นเยื่อเมือกของผนังทางเดินหายใจของโฮสต์ได้ (Gourlay and Howard, 1982)

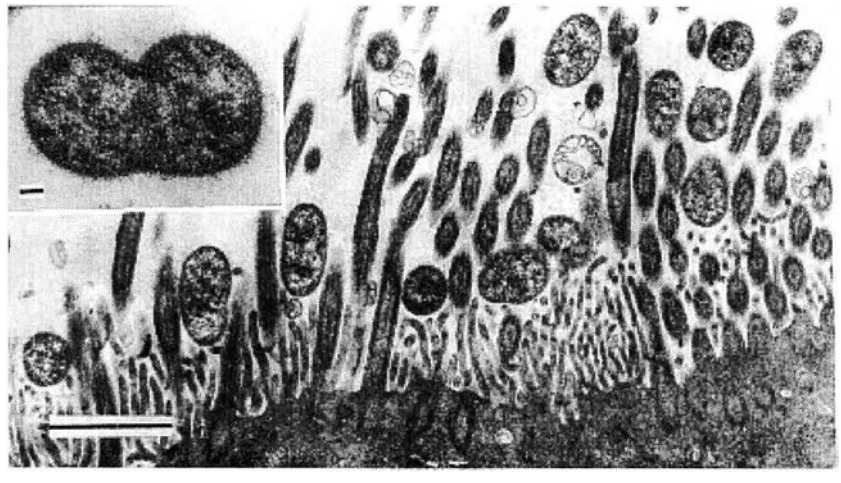
ข. การเกาะติด (Attachment)

เพื่อที่เชื้อจะได้ไม่ถูกกำจัดออกไปจากทางเดินหายใจ มัยโคพลาสมาจึงต้องมีความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์บุผนังทางเดินหายใจ ซึ่งได้แก่ ผนังหลอดลม และแขนงหลอดลมต่างๆ ความสามารถในการเกาะติดนี้พบได้ทั้งในเชื้อที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค ดังนั้นจึงไม่ใช่ข้อบ่งชี้ในการเป็นเชื้อก่อโรคของมัยโคพลาสมา แต่ถ้าหากเชื้อสูญเสียคุณสมบัตินี้ไป จะทำให้เชื้อที่มีความรุนแรงกลับกลายเป็นเชื้อที่ไม่ก่อความรุนแรงได้ (avirulent)

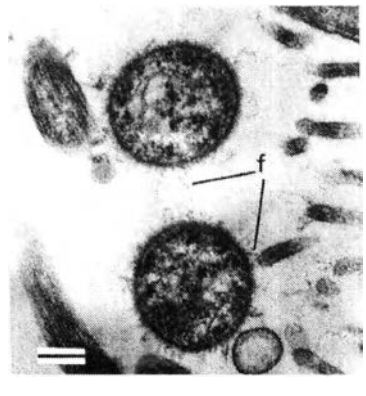
Tajima และ Yagihashi (1982) ได้ศึกษาถึงพฤติกรรมของ *M. hyopneumoniae* กับเซลล์บุผิวทางเดินหายใจของสุกรด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน พบว่า รอบนอกของเชื้อประกอบด้วยผนังเมมเบรน 3 ชั้น และมีส่วนที่เป็นปุยหลวมๆ อยู่ด้านนอกสุด เรียกว่า fuzzy layer ประกอบด้วย ขนสั้นๆ (bristle) ขนาดความยาวประมาณ 16 นาโนเมตร กระจายออกรอบทิศทางเช่นเดียวกับที่พบโดย Hovind-Hougen และ Friis (1991) และยังพบว่า เมื่อเชื้อเข้าสู่ทางเดินหายใจ *M. hyopneumoniae* จะไปอยู่ในตำแหน่งระหว่างซีเลียกับส่วนปลายของ microvilli ของเซลล์บุผิว (แสดงในภาพที่ 2-1) และมีบางส่วนที่อยู่อิสระในช่องทางเดินหายใจ (lumen) เมื่อตรวจดูด้วยกำลังขยายสูงขึ้น พบชั้นนอกสุดของเชื้อมีเส้นใยบางๆ กระจายออกรอบทิศทาง มีความยาวตั้งแต่ 5 นาโนเมตร จนถึง 250 นาโนเมตร ติดต่อกันระหว่างเซลล์ของมัยโคพลาสมากันเอง และติดกับส่วนของซีเลียและ microvilli ด้วยเช่นกัน (ภาพที่2-2) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโครงสร้างที่เป็นเส้นใยบางๆ นี้ ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อ เพื่อทำหน้าที่ในการเกาะยึดของเชื้อกับซีเลียและกับ microvilli ของเซลล์บุผิวทางเดินหายใจ รวมทั้งยึดติดระหว่างเชื้อด้วยกันเอง เพื่อไม่ให้

เชื้อถูกกำจัดออกไป แม้ว่าร่างกายจะใช้กลไกการขับไล่สิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่า mucociliary clearance mechanism ก็ตาม

ภาพที่ 2-1 ตำแหน่งของเชื้อ *M. hyopneumoniae* ภายในช่องทางเดินหายใจของสุกร เส้นทึบ = 1,000 นาโนเมตร, (ภาพเล็ก แสดงลักษณะของเชื้อระหว่างกำลังแบ่งตัว ; เส้นทึบ = 100 นาโนเมตร) จาก Tajima and Yagihashi ,1982 : Infection and Immunity. vol. 37 no.3



ภาพที่ 2-2 เส้นใยบางๆ ที่กระจายออกจากเชื้อ *M. hyopneumoniae* เพื่อยึดให้เชื้อติดกัน (เส้นทึบ = 200 นาโนเมตร) จาก Tajima and Yagihashi , 1982 : Infection and Immunity. vol. 37 no. 3



ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเกาะติดของมัยโคพลาสมาอีกมาก ทั้งนี้เนื่องจากเป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้เชื้อคงอยู่ในบริเวณนั้นได้นานจนก่อความรุนแรงให้กับโฮสต์ได้ มีการศึกษาที่แสดงว่า โปรตีนขนาดโมเลกุล 97 กิโลดาลตัน หรือเรียกว่า P97 ทำหน้าที่เป็น adhesin สำหรับ *M. hyopneumoniae* โดยมีตำแหน่งอยู่บริเวณผิวของ fuzzy layer (Zhang et al., 1995) เมื่อทำการใส่ gene *P97* เข้าไปใน *E. coli* พบว่า *E. coli* สามารถผลิตโปรตีน P97 ซึ่งมีคุณสมบัติติดกับซีเลียของเซลล์บุผิวทางเดินหายใจสุกรได้เช่นเดียวกับ *M. hyopneumoniae* (Hsu et al., 1997) ซึ่งเชื้อ *M. hyopneumoniae* จะสามารถติดกับเซลล์บุผิวที่มีซีเลียเท่านั้น เนื่องจากตรงบริเวณซีเลียมีส่วนประกอบ หรือโครงสร้างที่เป็น glycolipid 3 ชนิด คือ La, Lb และ Lc ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) กับโปรตีนของเชื้อ (Zielinski and Ross, 1993; Zhang et al., 1994) ได้มีการศึกษาการเกาะติดของเชื้อ *M. hyopneumoniae* กับเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ 3 ชนิด คือ human lung fibroblast, porcine lung fibroblast และ porcine kidney cell พบว่าเชื้อสามารถเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยงได้ แต่ความแตกต่างของสายพันธุ์ของเชื้อรวมทั้งชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยง จะมีผลต่อความสามารถในการเกาะติดนั้น เชื้อ *M. hyopneumoniae* เกาะติดกับเซลล์ human lung fibroblast ได้น้อยที่สุด ซึ่งอาจเป็นไปได้จากเกิดความไม่จำเพาะระหว่างโปรตีนของเชื้อกับตัวรับบนเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนั้น (Zielinski et al., 1990)

เมื่อเชื้อมัยโคพลาสมาสามารถคงทนและเพิ่มจำนวนอยู่บนเซลล์บุผิวทางเดินหายใจได้นาน ก็จะก่อให้เกิดความเสียหายแก่โฮสต์ขึ้น พยาธิสภาพในระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากมัยโคพลาสมาที่สำคัญ คือ การหยุดการโบกพัดของซีเลีย (ciliostasis) มัยโคพลาสมาในคนและวัวที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพนี้ได้ คือ *M. pneumoniae* (Collier, 1979) และ *M. dispar* ตามลำดับ การศึกษาของ Pijoan และคณะ (1972) พบว่า *M. hyopneumoniae* มีผลทำให้เกิด ciliostasis ในหลอดลมสุกรในหลอดทดลองได้น้อยกว่า *M. hyorhinis* แต่การศึกษาของ Debay และ Ross (1994) พบว่า *M. hyopneumoniae* ที่เพาะเลี้ยงแบบ in vivo จะมีคุณสมบัติทำให้เกิด ciliostasis ในหลอดลมสุกร และทำให้เกิดการลอกหลุดของซีเลียตามมาได้ ในขณะที่เชื้อที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติจะสูญเสียคุณสมบัตินี้ไป และยังพบอีกว่าถ้าไม่มีการเกาะติดหรือการที่ได้เข้าใกล้ชิดของเชื้อกับเซลล์บุผิวที่มีซีเลีย ก็จะไม่เกิด ciliostasis ซึ่งแสดงว่าการเกาะติดหรืออย่างน้อยการอยู่ชิดกันของเชื้อกับเซลล์บุผนังหลอดลม เป็นขั้นตอนที่จำเป็นที่จะเหนี่ยวนำให้เกิด ciliostasis ได้

ค. สารพิษหรือท็อกซิน (Toxin)

ความเสียหายที่มัยโคพลาสมาสร้างขึ้นแก่โฮสต์ อาจเกิดจากผลิตภัณฑ์ของเชื้อ เช่น สารพิษหรือท็อกซิน มัยโคพลาสมาบางชนิดสามารถสร้างโปรตีนที่เป็นสารพิษต่อประสาท (neurotoxin) เช่น *M. neurolyticum* เชื้อ *M. mycoides subsp. mycoides* สร้างสารพิษที่มีผลต่อวัว, ลูกไก่ฟัก ทำให้เกิดรอยโรคและเพิ่มระยะเวลาการอยู่ในกระแสเลือดของเชื้อให้ยาวนานขึ้นได้ *M. bovis* สร้าง heat stable polysaccharide toxin และมัยโคพลาสมาบางชนิดสร้าง hemolysin ส่วนเชื้อ *Acholeplasma axanthum, A. granularum, A. modicum, A. oculi* และ *A. laidlawii* สร้าง lipoglycans มีคุณสมบัติเป็นสารพิษได้เช่นกัน ดังนั้นถึงแม้เชื้อเหล่านี้จะเป็นเพียงเชื้อทุติยภูมิ แต่สารพิษจากเชื้ออาจก็จะก่อความรุนแรงได้เช่นกัน (Gourlay and Howard, 1982)

Geary และ Walezak (1983) นำเชื้อ *M. hyopneumoniae* ใส่ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง lung fibroblast ของสุกร และ MRC-5 ของคน พบว่า เชื้อทำให้เกิด cytopathic effect (CPE) ได้กับเซลล์ทั้งสองชนิด เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยแยกเมมเบรนของเชื้อกับไซโตพลาสซึมมาทำการทดลอง พบว่าในส่วนของเมมเบรนจะยังคงทำให้เกิด CPE ได้ ซึ่งสารพิษนี้น่าจะเป็นโปรตีน เพราะถูกทำลายได้ด้วยความร้อน 100°C 15 นาที และถูกย่อยได้ด้วยเอ็นไซม์ pronase โปรตีนนี้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนด้วย เนื่องจากแอนติซีรั่มของกระต่ายต่อเชื้อ *M. hyopneumoniae* (rabbit anti-MH serum) สามารถนำมาลบล้างหรือ neutralize cytopathic activity ได้

ง. แคปซูล (capsule)

ถึงแม้เชื้อมัยโคพลาสมาจะไม่มีผนังเซลล์หรือ precursor ของผนังเซลล์ ทำให้ดูเหมือนว่าเซลล์เมมเบรนคือส่วนนอกสุดที่สัมผัสกับสิ่งภายนอก อย่างไรก็ตามเชื้อมัยโคพลาสมาบางชนิดสามารถสร้างโครงสร้างภายนอกอื่นได้ (extramembranous material) ซึ่งองค์ประกอบนี้เป็นแคปซูลหรือไมโครแคปซูล บ่อยครั้งพบว่ามีบทบาทสำคัญในการก่อโรคของเชื้อ และเพิ่มความรุนแรงของเชื้อสายพันธุ์นั้นได้ (Gourlay and Howard, 1982)

Tajima และ Yagihashi (1982) ใช้การย้อม Rhutinium-red ย้อมเชื้อ *M. hyopneumoniae* สามารถพบชั้นหนาทึบที่ห่อหุ้มรอบนอกของเชื้อ และพบว่าแคปซูลนี้ช่วยทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมช่องว่างระหว่างเชื้อกับเซลล์ของโฮสต์ด้วย จากการเปรียบเทียบระหว่าง *M. hyopneumoniae* ที่เพาะเลี้ยงแบบ in vivo และ in vitro พบว่าแบบแรกเชื้อจะมี

แคปซูลหนากว่าแบบหลังถึงประมาณหนึ่งเท่า เมื่อนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงแบบ in vitro ไปฉีดกลับเข้าสุกร เชื้อจะเติบโตช้า, มีการเหนี่ยวนำให้สุกรแสดงอาการและเกิดรอยโรคได้ยาก แต่จากการศึกษาของ Zielinski และ Ross (1990) พบว่า เชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง human lung fibroblast ไม่พบแคปซูลที่หนาขึ้นกว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติเลย เหตุผลอาจเป็นเพราะเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ไม่เหมาะสม *M. hyopneumoniae* มีความเหมาะสมกับเซลล์ของสุกรซึ่งจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างภายนอก และเพิ่มความรุนแรงของเชื้อขึ้น ซึ่งอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่า การติดเชื้อในธรรมชาติของมัยโคพลาสมาจะมีความจำเพาะกับชนิดของโฮสต์ค่อนข้างมาก (specie specific)

จ. การเกิดแอนติเจนที่คล้ายกันกับเชื้อภายในโฮสต์ (Acquisition or synthesis of antigens in common with the host)

มัยโคพลาสมาบางชนิดเหนี่ยวนำให้โฮสต์สร้างแอนติเจนต่อตัวเองได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากการดูดซับเอาสิ่งต่างๆจากสิ่งแวดล้อมรอบๆเชื้อ หรือโดยการถูกกระตุ้นให้ร่างกายสังเคราะห์ขึ้น เช่นโปรตีนในซีรั่มที่เป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะถูกจับเข้ากับเซลล์ของมัยโคพลาสมาและไม่สามารถเอาออกในขั้นตอนการล้างได้ ทำให้มักเกิดปฏิกิริยาข้ามได้ระหว่างเชื้อต่างสายพันธุ์เมื่อนำมาทดสอบทางซีรั่มวิทยา เชื้อ *M. hyorhinis*, *M. mycoides subsp. mycoides*, *M. pneumoniae* สามารถเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นให้ร่างกายโฮสต์ตอบสนองต่อเซลล์บางเซลล์ของตนเอง และเกิดภาวะภูมิคุ้มกันตนเอง (autoantibody) ได้ (Wise et al., 1978; Gourlay and Howard, 1982) Baumgartner และ Nicolet (1984) พบว่าเชื้อ *M. hyopneumoniae* สามารถเหนี่ยวนำให้ glycoprotein บนผนังเมมเบรนของเซลล์เม็ดเลือดแดงสุกรแสดงความเป็นแอนติเจนต่อสุกรได้เช่นกัน โดยตรวจพบแอนติบอดีต่อแอนติเจนนี้ได้หลังจากทดลองให้สุกรติดเชื้อ *M. hyopneumoniae*

2.3.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับโฮสต์ (Host factors)

ก. พฤติกรรมระหว่างเชื้อกับแมคโครฟาจและนิวโตรฟิวล์ของโฮสต์ (Interaction of mycoplasmas with macrophages and polymorphonuclear nutrophils in animals)

แมคโครฟาจเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่พบมากที่สุดในเนื้อเยื่อปอดปกติ จากการศึกษา in vitro ในงานวิจัยหลายเรื่อง พบว่ามัยโคพลาสมาบางชนิดสามารถเกาะยึดบนผิว

ของแมคโครฟาจ สามารถมีชีวิตและเพิ่มจำนวนขึ้นตรงบริเวณนั้นได้ โดยไม่ถูกจับกินหรือถูกขบวนการทำลายใดๆ หากขาดความร่วมมือจากแอนติบอดีที่จำเพาะได้ เช่นเชื้อ *M. pulmonis* กับ peritoneal และ alveolar macrophage ของหนู (Davis et al., 1980) *M. pneumoniae* กับ alveolar และ peritoneal macrophage ของหนูตะเภา (Powell and Clyde, 1975) รวมทั้ง *M. bovis* และ *M. dispar* กับ alveolar macrophage ของวัว (Howard et al., 1976) อย่างไรก็ตามยังไม่มีผู้ใดรายงานว่าเชื้อ *M. hyopneumoniae* มีคุณสมบัติดังกล่าว

ข. การเกิดภาวะการกดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive activity)

ในธรรมชาติสัตว์จะได้รับเชื้อก่อโรคต่างๆอยู่เสมอทั้งจากดิน อากาศ อาหาร และน้ำ เชื้อเหล่านั้นอาจจะอาศัยและเจริญอยู่ได้บนพื้นผิวต่างๆของร่างกายได้ โดยที่สัตว์ยังคงมีสุขภาพแข็งแรง แต่ปัจจัยที่ทำให้สัตว์แสดงอาการของโรคอาจเกิดได้จากกลไกสามแบบ คือ สัตว์ได้รับเชื้อชนิดใหม่ที่มีความรุนแรงกว่าเดิม, หรือเชื้อเดิมที่มีอยู่เพิ่มจำนวนเรื่อยๆและมากขึ้นจนระบบป้องกันตนเองของเชื้อไม่สามารถต้านทานได้ หรือเกิดจากระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์สูญเสียประสิทธิภาพ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันอาจถูกกดให้มีประสิทธิภาพลดลงได้จากปัจจัยต่างๆ ทั้งความเครียด, โภชนาการ, ยา, อายุ และการติดเชื้อ ในสุกรที่ทำให้ติดเชื้อมัยโคพลาสมาพบเสมอว่าจะมีโอกาสติดเชื้อทุติยภูมิได้ง่าย (Oldham, 1987)

Caruso และ Ross (1990) ทำการศึกษาในสุกรเพื่อดูการทำงานของ alveolar macrophage เมื่อได้รับแบคทีเรียต่างๆ พบว่า แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย *M. hyopneumoniae* แล้วนั้น จะมีความสามารถในการเก็บกินเชื้อแบคทีเรียตัวต่อไปลดลง นั่นคือ เชื้อมัยโคพลาสมาที่ได้รับครั้งแรกไปกดหรือลดความสามารถในการทำงานของแมคโครฟาจได้ แสดงถึงภาวะภูมิคุ้มกันเฉพาะที่ของโฮสต์ที่ลดลงหลังจากติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จึงเชื่อว่ามัยโคพลาสมาเป็นปัจจัยชักนำ (predisposing cause) ของการเกิดนิวโมเนียจากเชื้อแบคทีเรียต่างๆ Ciprian และคณะ (1988) พบว่าสุกรที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จะเกิดการติดเชื้อ, แสดงอาการ และมีรอยโรคจากการติดเชื้อ *Pasteurella multocida* สูงขึ้น จากการทดลองของ Yagihashi และคณะ (1984) และ Ross (1989) พบว่าสุกรทดลองที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จะมีโอกาสติดเชื้อและเกิดรอยโรคจากการติดเชื้อ *Actinobacillus pleuropneumoniae* มากกว่าสุกรปกติ

ค. การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์อย่างไม่จำเพาะ (Nonspecific mitogenicity)

ผนังเมมเบรนของ *M. hyopneumoniae* สามารถกระตุ้นลิมโฟไซต์ที่อยู่ในกระแสเลือดและต่อมน้ำเหลืองที่ขั้วปอดได้ Messier และ Ross (1991) พบว่า ผนังเมมเบรนของ *M. hyopneumoniae* สามารถกระตุ้นลิมโฟไซต์อย่างไม่จำเพาะได้ปานกลาง และน่าจะเป็นไปได้ว่า mitogenicity อาจมีความสัมพันธ์ต่อกลไกการเกิดโรคได้ เนื่องจากการกระตุ้นเหล่านี้ทำให้เกิดการอักเสบในแขนงหลอดลมและปอด จากการสะสมของลิมโฟไซต์รอบๆเส้นเลือดกับท่อทางเดินหายใจขนาดต่างๆของสุกร

ง. การตอบสนองของภูมิคุ้มกันจำเพาะมีผลต่อพยาธิกำเนิด (Involvement of the specific immune response in pathogenesis)

เชื้อมัยโคพลาสมาที่สัตว์ได้รับเข้าไปสะสมและเพิ่มจำนวนในปอด จะเหนี่ยวนำให้โฮสต์มีการตอบสนองและเกิดการอักเสบขึ้น รวมถึงมีรอยโรคของการสะสมของลิมโฟไซต์รอบผนังเส้นเลือดและหลอดลมด้วย ในขณะเดียวกันจะเกิดการตอบสนองแบบจำเพาะโดยมีการผลิตอิมมูโนโกลบูลินที่จำเพาะกับเชื้อขึ้น (Fernald et al., 1972; Cassell et.al., 1974) Suter และคณะ (1985) พบว่าเมื่อทดลองให้สุกรได้รับเชื้อ *M. hyopneumoniae* ระบบภูมิคุ้มกันของสุกรจะมีการตอบสนอง และผลิตพลาสมาเซลล์ที่จำเพาะต่อเชื้อขึ้นจำนวนมาก และสะสมในปอดและต่อมน้ำเหลืองบริเวณรอบๆปอด โดยตรวจพบได้ตั้งแต่ประมาณ 2 สัปดาห์หลังจากได้รับเชื้อ ต่อจากนั้นจะเริ่มมีรอยโรคของ MPS เกิดขึ้น ทำให้เชื่อว่าภาวะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งของการเกิดพยาธิกำเนิดของโรค เมื่อทำการตัดไธมัสสุกรทดลองออก สัตว์จะมีการตอบสนองการติดเชื้อลดลง รอยโรคต่างๆ ที่เกิดที่ปอดก็ลดลง รวมทั้งแอนติบอดีที่จำเพาะก็ลดลงด้วยอย่างไรก็ตามการมีรอยโรคลดลงไม่เกิดผลดีแต่อย่างใด เพราะกลับทำให้จำนวนเชื้อเพิ่มมากขึ้นและกระจายตัวได้มากขึ้นกว่าสุกรปกติ จึงอาจกล่าวได้ว่ารอยโรคที่ปรากฏเป็นผลจากขั้นตอนหนึ่งของกลไกการกำจัดเชื้อนั่นเอง (Tajima et al., 1984)

จากปัจจัยดังกล่าวข้างต้น เมื่อเชื้อ *M. hyopneumoniae* เข้าสู่ร่างกายสุกรจะสะสมอยู่ในหลอดลมและปอด มีระยะฟักตัวประมาณ 10-16 วัน หรือมากกว่า โดยเชื้อจะเข้าไปเกาะติดอยู่ที่บริเวณระหว่างซีเลียกับส่วนปลายของ microvilli ของเซลล์บุผนังทางเดินหายใจ คือ หลอดลม, แขนงหลอดลมส่วนต้น แต่จะไม่พบในแขนงหลอดลมส่วนปลาย และถุงลม กลไก

การโบกพัดของซีเลีย (mucociliary movement) จะไม่สามารถชะล้างออกไปได้ ทำให้เชื้อมีการสะสมจำนวนเพิ่มขึ้น และเกิดภาวะ ciliosiasis ผลที่ตามมา คือซีเลียไม่สามารถโบกไล่สิ่งแปลกปลอมต่างๆที่เข้ามาในช่องทางเดินหายใจได้ ซีเลียมีการร่วงหลุดและถูกทำลาย เกิดการคั่งค้างของเชื้อโรคและเซลล์ที่ตายแล้ว ร่วมกับมีการแทรกตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวมาสะสมกันรอบ ๆ แขนงหลอดลม เกิดรอยโรคขึ้น ทำให้สุกรเกิดการระคายเคืองและแสดงอาการไอ

2.4 ระบาดวิทยาของโรค (Epidemiology)

ในพื้นที่การเลี้ยงสุกรทั่วโลกพบว่ามีสุกรป่วยและเกิดภาวะปอดบวมเรื้อรังมานานแล้ว ต่อมาจึงสามารถเพาะเชื้อที่เป็นสาเหตุได้ครั้งแรกในปี 1965 คือ *M. hyopneumoniae* แหล่งกักเก็บโรคและกระจายโรคที่สำคัญคือ สุกรที่เป็นพาหะในฟาร์มนั่นเอง โดยเฉพาะแม่สุกรจะเป็นตัวแพร่เชื้อไปยังลูกสุกรได้ในช่วงก่อนหย่านม และลูกสุกรเหล่านั้นจะแพร่กระจายเชื้อต่อไปยังสุกรรุ่นเดียวกันในช่วงที่เป็นสุกรเล็กและสุกรขุน ทำให้อัตราการติดเชื้อในฟาร์มค่อนข้างสูง (Ross, 1992) นอกจากนี้เชื้อยังสามารถฟุ้งกระจายไปยังฟาร์มข้างเคียงได้ Goodwin (1985) พบว่ามีการระบาดของโรคจากฟาร์มที่ติดเชื้อไปยังฟาร์มข้างเคียงที่ห่างจากกันน้อยกว่า 3.2 กิโลเมตรได้ เชื้อมัยโคพลาสมาสามารถแพร่กระจายและติดต่อไปยังสุกรได้ 3 วิธี คือ จากแม่สุกรที่เป็นพาหะไปยังลูกสุกรดูดนม, จากลูกสุกรไปสู่ลูกสุกรในช่วงอนุบาล และจากสุกรรุ่นไปสู่กันในช่วงสุกรขุน และพบว่าแม่สุกรอายุมากจะมีการแพร่เชื้อไปยังลูกสุกรได้น้อยลงกว่าแม่สุกรสาว สุกรครอกเดียวกันที่ได้รับเชื้อจากแม่ มักมีโอกาสติดเชื้อและแสดงอาการได้น้อยกว่า สุกรต่างครอกที่นำมาเลี้ยงรวมกันโดยเฉพาะถ้าเป็นสุกรต่างอายุ ซึ่งสุกรที่โตกว่าจะกระจายเชื้อไปยังสุกรเล็กได้ง่ายและทำให้แสดงอาการของโรครุนแรงกว่า การเลี้ยงสุกรแบบเข้าออกหมดที่เรียกว่า all - in / all - out จะช่วยลดอุบัติการของโรค MPS ลงได้ (Clark et al., 1991)

มีรายงานความชุกและอุบัติการของโรคเป็นจำนวนมากในหลายภูมิภาคของโลก และส่วนใหญ่จะมีการติดเชื้อค่อนข้างสูง การสำรวจในอเมริกาพบว่าฟาร์มสุกรทุกฟาร์มที่สำรวจมีการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* และเป็นสุกรที่ติดเชื้อสูงถึง ร้อยละ 75 (Bruce, 1997) Muirhead และ Hamberside (1980) พบว่าสุกรที่เข้าโรงฆ่าในประเทศอังกฤษจะมีรอยโรคของ MPS ที่ปอดสูงถึง ร้อยละ 70 ของสุกรทั้งหมด Goodwin (1982) พบว่าฟาร์มสุกรมีการติดเชื้อได้ตั้งแต่ ร้อยละ 10-90 ขึ้นกับระดับความรุนแรงของการติดเชื้อ Fernandez และคณะ (1990)

สำรวจในสเปนระหว่างปี 1988-1989 จากปอดสุกร 308 ตัวอย่างพบมีปอดที่ติดเชื้อ 157 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50.9) และที่ญี่ปุ่น (Yagihashi et al., 1993) สำรวจฟาร์มสุกรแห่งหนึ่งพบว่า จากสุกร 950 ตัว พบรอยโรคของ MPS ถึง 509 ตัว หรือคิดเป็น ร้อยละ 68.7 ส่วน Sheldrake และคณะ (1990) สำรวจการติดเชื้อในฟาร์มแห่งหนึ่งในประเทศออสเตรเลียในช่วงปี 1987-1988 พบว่าสุกรเริ่มมีการติดเชื้อในช่วงอายุที่มากกว่า 7 สัปดาห์จนถึง 20 สัปดาห์ Wallgren และคณะ (1993) ศึกษาอุบัติการของโรค MPS ในสุกรขุน 3 ชุดในประเทศสวีเดน พบว่าเมื่อนำเข้าสุกรในช่วงอายุประมาณ 10-14 สัปดาห์ สุกรมีการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* เฉลี่ยประมาณ ร้อยละ 8 และคงอยู่ในช่วงเดือนแรกของการเลี้ยง หลังจากนั้นสุกรมีการติดเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงเฉลี่ยประมาณ ร้อยละ 91 เมื่อเข้าโรงฆ่า สุกรที่มีติดเชื้อเร็วจะมีการเจริญเติบโตช้า ทำให้ระยะเวลาในการเลี้ยงจนถึงจับขายนานกว่าสุกรที่ไม่ติดเชื้อ

2.5 อาการ (Clinical signs)

สุกรที่ติดเชื้อมัยโคพลาสมาอาจจะไม่แสดงอาการได้เป็นเวลานาน แต่เมื่อมีความเครียดสูงจะทำให้เชื้อที่มีอยู่เพิ่มจำนวนขึ้น และสุกรเริ่มแสดงอาการขึ้นได้ สุกรที่ไม่เคยติดเชื้อถ้าได้รับเชื้อจำนวนมากจะแสดงอาการของโรคได้เช่นกัน โดยเชื้อมีระยะฟักตัวประมาณ 10-16 วันหรือมากกว่า อาการของสุกรคือ ไอ ซึ่งอาจอยู่ได้นานหลายสัปดาห์จนถึงเป็นเดือน ซึ่งพบอาการไอได้มากที่สุดในเล้าสุกรขุน ในสุกรที่ไม่มีการติดเชื้อแทรกซ้อนจะยังคงกินอาหารปกติ ไม่แสดงอาการอื่นนอกจากไอบ้างโดยเฉพาะในเวลาเช้า แต่ที่เป็นปัญหาคือสุกรเจริญเติบโตช้า หรือแกร็นทั้งที่ไม่มีอาการเจ็บป่วยหรืออ่อนแอ ในทางตรงกันข้ามสุกรที่ติดเชื้อแทรกซ้อนซึ่งมักเป็นปัญหาในช่วงอายุประมาณ 4 ถึง 6 เดือน เชื้อแทรกซ้อนส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินหายใจเช่นกัน สุกรจะแสดงอาการป่วยมากขึ้น มีไข้ ไม่กินอาหาร หายใจลำบาก ปอดบวม ทั้งอัตราการป่วยและอัตราการตายจะสูงขึ้น

2.6 รอยโรค (Gross and histopathological lesion)

2.6.1 รอยโรคตาเปล่า (Gross lesion)

เมื่อสุกรได้รับเชื้อ *M. hyopneumoniae* เชื้อจะเข้าไปสะสมในปอด และทำให้มีการแทรกตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์เข้ามารอบๆเส้นเลือดในปอดมากขึ้นอย่างช้าๆ ใช้เวลานานจึงจะเห็นรอยโรคด้วยตาเปล่า การสะสมของเซลล์ลิมโฟไซต์ทำให้เนื้อปอดแน่นแข็งขึ้น และไม่มีอากาศผ่าน ปอดเปลี่ยนเป็นสีเทาจนถึงม่วงจาง เริ่มจากปอดลอนหน้า (apical lobe) ไปยังลอนข้างหัวใจ (cardiac lobe) และไปยังลอนที่ติดกระบังลม (diaphragmatic lobe) ซึ่งตำแหน่งที่เกิดอยู่ที่ส่วนหน้าตอนล่าง (cranioventral) ของปอดทั้งหมด และมักเกิดขึ้นทั้งสองข้าง (bilateral) รอยโรคจะแบ่งแยกและมีขอบเขตชัดเจนจากปอดปกติ บริเวณหน้าตัด (cut surface) จะชุ่มด้วยเมือกขุ่นคล้ายหนอง ซึ่งเป็นลักษณะที่พบเสมอในสุกรที่ติดเชื้อมัยโคพลาสมา รอยโรคตาเปล่านี้เรียกว่า cranioventral pneumonia

2.6.2 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathological lesion)

ในระยะแรกจะมีการแทรกตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิวล์และลิมโฟไซต์ สะสมอยู่ไม่มากรอบๆ แขนงหลอดลมและถุงลม ในช่องหลอดลมมีเมือกสะสมอยู่ ในถุงลมมีของเหลวที่มีเซลล์แมคโครฟาจและพลาสมาเซลล์ปะปน ผนังถุงลมหนาตัวขึ้นเนื่องจากมีการบวมน้ำ ถ้าติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน จะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิวล์มากขึ้น

ระยะต่อมาลิมโฟไซต์จะเพิ่มมากขึ้นจนเกิดเป็นกลุ่มก้อนรอบๆ แขนงหลอดลม (lymphocytic nodule) ผนังหลอดลมเล็กจะถูกบีบและถุงลมจะแฟบ เมื่อถึงระยะท้ายที่เริ่มมีการหาย เซลล์ต่างๆ จะหายไปและมีอากาศกลับเข้ามาแทนที่ เนื้อปอดที่เสียไปบางส่วนถูกแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและมีร่องรอยแผลเป็น

Etheridge และคณะ (1979) ทดลองให้สุกรติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* แล้วศึกษาการเกิดรอยโรคของสุกร พบว่าสุกรทุกตัวจะเกิดรอยโรคตาเปล่าได้ตั้งแต่ 27-42 วัน หลังจากได้รับเชื้อ ส่วนในสุกรที่เลี้ยงร่วมกับสุกรติดเชื้อ พบว่า ร้อยละ 77 ของสุกรเหล่านั้นเกิดรอยโรคตาเปล่าให้เห็นตั้งแต่ประมาณ 28-71 วันหลังติดเชื้อ ส่วนที่เหลือพบแต่รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาเท่านั้น Sorensen และคณะ (1997) ทดลองทำให้สุกรติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* แล้วทำการผ่าซากเพื่อตรวจดูรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยาทุกๆ 7 วัน พบว่าสุกรที่ติดเชื้อประมาณ 14 วันและ 28 วัน จะพบมีรอยโรคเกือบทุกตัวคือ ประมาณ ร้อยละ 96 และ ร้อยละ 100 ตาม

ลำดับ สุกรที่ติดเชื้อ 57 วันเมื่อทำการผ่าซากตรวจพบรอยโรคเพียง ร้อยละ 71 ของสุกรที่ผ่าซาก โดยที่เริ่มมีการหายและมีร่องรอยแผลเป็นบ้าง ในขณะที่สุกรที่ติดเชื้อประมาณ 85 วันยังคงพบสุกรที่มีรอยโรคอยู่เพียง ร้อยละ 10 ซึ่งเป็นรอยโรคที่เกือบจะหายสนิททั้งสิ้น

ดังนั้นรอยโรคที่พบจากการติดเชื้อมัยโคพลาสมา คือ peribronchiolar lymphocytic infiltration และ hyperplastic lymphoid nodules อย่างไรก็ตามรอยโรคที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น ไม่ใช่รอยโรคจำเพาะของการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* เพียงอย่างเดียว สามารถพบรอยโรคเหล่านี้จากการติดเชื้อมัยโคพลาสมาและเชื้อก่อโรคชนิดอื่นได้เช่นกัน ทำให้ในการตรวจดูรอยโรคปอดสุกรที่พบ cranioventral pneumonia, peribronchiolar lymphocytic infiltration และ/หรือ hyperplastic lymphoid nodules จะรวมเรียกรอยโรคนี้ว่า Mycoplasma-like lesions

2.7 การวินิจฉัยโรค (Diagnosis)

การตรวจการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ในปัจจุบันทำได้หลายวิธี คือ การตรวจหาเชื้อและแอนติเจนโดยการเพาะเชื้อ, fluorescent antibody technique (FAT), immnohistochemistry (IHC), probe hybridization และ polymerase chain reaction (PCR) กับการตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธีทางซีรั่มวิทยา

2.7.1 การตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธีทางซีรั่มวิทยา

ก. Complement fixation test (CFT)

เป็นวิธีที่มีความไวและมีความจำเพาะพอสมควร ถึงแม้ว่าจะสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *M. flocculare* และ *M. hyorhinis* ได้ สามารถตรวจหาได้ทั้ง IgM และ IgG สุกรจะมีแอนติบอดีต่อ *M. hyopneumoniae* และตรวจได้จากวิธีนี้ตั้งแต่ 1-5 สัปดาห์หลังจากได้รับเชื้อ และอาจจะพบไตเตอร์อยู่ได้นานประมาณ 3-4 เดือน (Slavik and Switzer, 1972) ส่วนการศึกษาของ Lloyd และคณะ (1987) พบว่าสุกรที่เลี้ยงร่วมกับสุกรติดเชื้อจะพบไตเตอร์โดยวิธี CFT ตั้งแต่ สัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข. Indirect hemagglutination test (IHA)

เป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่ไม่ค่อยมีผู้นิยมใช้แพร่หลายนัก เนื่องจากเตรียมยาก และจะต้องใช้ความชำนาญ วิธีนี้จะตรวจพบแอนติบอดีได้ตั้งแต่ประมาณสัปดาห์ที่ 2-5 หลังการติดเชื้อ และตรวจพบไตเตอร์ได้นานถึง 60 สัปดาห์หลังจากติดเชื้อ (Holmgren, 1974)

ค. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

เริ่มมีการพัฒนาวิธีการนี้สำหรับตรวจการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ครั้งแรกโดย Bruggmann และคณะ (1977) เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถตรวจพบแอนติบอดีไตเตอร์ได้ตั้งแต่ 2 สัปดาห์หลังติดเชื้อ และยังคงตรวจพบไตเตอร์ได้นานประมาณ 60 สัปดาห์หลังติดเชื้อ เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด แต่สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *M. flocculare* และ *M. hyorhinis* ได้เช่นกัน นับแต่นั้นมาก็มีผู้พัฒนาเทคนิคอีไลซ่าให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นเรื่อย ๆ (Nicolet et al.,1980; Armstrong et al., 1983; Beriter et al., 1990; Feld et al., 1992; Sorensen et al., 1992; Sheldrake and Romalis,1992; Le Potier et al.,1994)

2.7.2 การตรวจหาเชื้อหรือแอนติเจน

ก. Fluorescent antibody technique (FAT)

เป็นการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อจากตัวอย่างปอดสด สามารถตรวจพบได้ดีในช่วงสัปดาห์ที่ 4 ถึง 6 ของการติดเชื้อ และตรวจได้ลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 จนถึง 12 หลังการติดเชื้อ นอกจากตัวอย่างที่นำมาตรวจจะต้องมีความสด เพราะเซลล์บุผนังหลอดลมจะลอกหลุดและเน่าเสีย (autolysis) ง่าย ตำแหน่งที่นำมาใช้ตรวจที่มีแขนงหลอดลมส่วนต้น สามารถตรวจพบแอนติเจนได้ดีกว่าตัวอย่างที่เป็นส่วนปลายหรือถุงลม เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่มีการสะสมของเชื้อมากกว่า ในระยะท้ายของโรคเชื้อจะลดลง วิธีนี้จึงมักตรวจไม่ได้ในระยะท้ายของการติดเชื้อ (Amanfu et al., 1984) Schuller และคณะ (1976) ใช้วิธี direct FAT ในการวินิจฉัยแยกชนิดโคโลนีของเชื้อมัยโคพลาสมาที่อยู่บนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยพบว่าเมื่อนำวุ้นที่มีโคโลนีของเชื้อมัยโคพลาสมาไปตากแห้งในอุณหภูมิห้องประมาณ 12-14 ชม. จะสามารถป้องการการหลุดออกของโคโลนีจากวุ้นในขั้นตอนการล้างได้ดีกว่าการตรึงด้วยแอลกอฮอล์หรืออาซีโตน ซึ่งการตากแห้งนี้ไม่ทำให้ความเป็นแอนติเจนของเชื้อ (antigenicity) เปลี่ยนแปลงด้วย

ข. Immunohistochemistry (IHC)

เนื่องจากการตรวจด้วยวิธี FAT มักเกิดปัญหาได้จากการนำส่งตัวอย่างล่าช้าและไม่สามารถเก็บอวัยวะไว้ทำการตรวจได้นาน รวมทั้งต้องมีกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ในการตรวจ จึงไม่สะดวกสำหรับบางห้องปฏิบัติการ วิธี IHC มีความคล้ายคลึงกันแต่สามารถตรวจกับอวัยวะที่ทำตรึงด้วยฟอร์มาลินแล้วได้ และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะช่วยแก้ปัญหาต่างๆนี้ได้ Doster และ Lin (1988) พัฒนาวิธีการ indirect immunoperoxidase ในการตรวจการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากตัวอย่างปอดที่ตรึงด้วยฟอร์มาลิน พบว่าให้ผลดีไม่แตกต่างจากวิธี FAT อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังให้ผลไม่ดีสำหรับสุกรที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังและในระยะท้ายเช่นเดียวกับวิธี FAT เช่นกัน

ค. Probe hybridization

การพัฒนาวิธีการใช้ probe ในการตรวจการติดเชื้อมัยโคพลาสมา เพื่อขจัดปัญหาที่เกิดจากความยากลำบากในการวินิจฉัยโรคโดยการเพาะเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญ และมีห้องปฏิบัติการเพียงไม่กี่แห่งที่สามารถทำได้ ส่วนวิธีทางซีรั่มวิทยาก็ยังคงมีปัญหาจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับมัยโคพลาสมาชนิดอื่น (Young and Ross, 1987) Johansson และคณะ (1992) ได้สร้าง oligonucleotide probe ที่มีลำดับเบสคู่สมกับตำแหน่ง variable region บน 16S rRNA ของเชื้อ *M. hyopneumoniae* ขึ้น และพบว่า Mhp6/30 probe มีความจำเพาะกับเชื้อ *M. hyopneumoniae* เท่านั้น ซึ่งการใช้ probe ที่จำเพาะต่อ rRNA มีข้อดี คือ rRNA เป็นโมเลกุลที่มีปริมาณมากในหนึ่งเซลล์ (high copy number about 10^4 molecule /cell) จึงน่าจะทำให้วิธีการตรวจมีความไวสูง และการใช้ตำแหน่งที่เป็น variable ก็ทำให้มีความจำเพาะสูงด้วย Futo และคณะ (1992) พัฒนาการตรวจ *M. hyopneumoniae* โดยการสร้าง oligodeoxynucleotide probe ที่มีลำดับเบสคู่สมกับตำแหน่งบน 16S rRNA ของ *M. hyopneumoniae* เช่นกัน พบว่า probe MHP1 มีความจำเพาะต่อ *M. hyopneumoniae* เท่านั้น จากการติดฉลากด้วย γ-^{32}P จะสามารถตรวจการติดเชื้อที่มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^3 CCU. ขึ้นไปได้ นอกจากนี้ยังได้ใช้ probe ทดสอบกับตัวอย่างสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อ โดยใช้ตัวอย่างที่เป็นปอดและน้ำล้างปอด (bronchoalveolar lavage fluid) พบว่าสามารถตรวจได้เช่นกัน และยังได้ทดลองเปลี่ยนจากการติดฉลากด้วยสารกัมมันภาพรังสีเป็นการใช้สาร chemiluminescent แทนได้ แต่จะมีความไวลดลงจากการใช้ γ-^{32}P ประมาณ 10 เท่า

ง. Polymerase chain reaction (PCR)

เทคนิคพีซีอาร์ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย โดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะในหลอดทดลองที่มี primers ที่จำเพาะเป็นตัวกำหนดการสร้าง ชิ้นส่วนที่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นในสิ่งตรวจแสดงถึงการมีอยู่ของเชื้อแบคทีเรียนั้น จึงเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อที่มีความรวดเร็ว, แม่นยำ และมีความไวสูง Harasawa และคณะ (1991) ได้พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของ *M. hyopneumoniae* โดยออกแบบ primers ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่ง repeated sequence ของ *M. hyopneumoniae* ยีโนมที่โคลนอยู่ในพลาสมิด PUC 118 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะ (PCR product) มีขนาด 520 bp. ซึ่งให้ผลถูกต้องเมื่อทดสอบกับเชื้อ *M. hyopneumoniae* VPP 11 (ATCC 25617) และ *M. hyopneumoniae* J strain (ATCC 25934) และไม่เกิด product กับเชื้อมัยโคพลาสมาอื่น อย่างไรก็ตาม Harasawa ไม่ได้ทดสอบ primers คู่นี้กับตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ และไม่ได้ทดลองกับตัวอย่างที่เป็นสิ่งส่งตรวจของสุกร

Stemke และคณะ (1994) ออกแบบ primers จากตำแหน่งที่จำเพาะบน 16S rRNA ของ *M. hyopneumoniae* พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. hyopneumoniae* โดยให้ product ที่มีขนาด 200 bp. และไม่เกิด product กับเชื้อมัยโคพลาสมาและแบคทีเรียชนิดอื่น และเมื่อทำการทดสอบกับเชื้อมัยโคพลาสมาที่เพาะได้จากตัวอย่างในธรรมชาติ ก็สามารถตรวจแยกเชื้อ *M. hyopneumoniae* ได้อย่างถูกต้อง แต่ในการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ทำการทดสอบใช้ primers ตรวจหาดีเอ็นเอของ *M. hyopneumoniae* จากสิ่งส่งตรวจ

Mattsson และคณะ (1995) ได้ออกแบบ primers ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งบน 16S rRNA ของ *M. hyopneumoniae* เช่นกัน พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. hyopneumoniae* โดยให้ product ขนาด 649 bp. และไม่เกิด product กับมัยโคพลาสมาและแบคทีเรียชนิดอื่น สามารถตรวจจากตัวอย่างน้ำล้างปอดและเนื้อเยื่อปอดได้ และยังตรวจจากตัวอย่างสวอปจมูกได้เช่นกัน

Blanchard และคณะ (1996) ได้ออกแบบ primers จาก nucleotide sequence ของ *M. hyopneumoniae* I141 probe ซึ่งเป็น multidrug resistant protein homologue และให้ product ขนาด 1561 bp. สามารถนำมาทดสอบตัวอย่างจากสุกรทดลองที่ทำให้ติดเชื้อ

M. hyopneumoniae จากการใช้ตัวอย่างน้ำล้างปอดได้ (tracheobronchiolar wash) และวิธีนี้สามารถตรวจสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอบริสุทธิ์ปริมาณ 500 fg. ขึ้นไป และจากเชื้อที่ปั่นแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ $2.5x10^3$ - $2.5x10^5$ organisms การตรวจตัวอย่างน้ำล้างปอดที่เตรียมจากการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA isolation) จะให้ผลไม่แตกต่างจากการเตรียมดีเอ็นเออย่างหยาบ (crude extract sample)

Stemke (1997) ปรับปรุงวิธีการตรวจการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากตัวอย่างปอดสุกรโดยวิธีพีซีอาร์ จากเดิม (Stemke et al., 1994) ที่มีความไวต่ำ คือสามารถตรวจตัวอย่างที่มีเชื้ออยู่ประมาณ 10^3-10^5 organisms เป็นเพียง 30-1000 organisms โดยการทำ nested PCR ซึ่ง primers ชุดแรกจะเป็น universal primers ที่จำเพาะต่อ 16S rRNA ของมัยโคพลาสมา และ primers ชุดที่สองจะมีความจำเพาะต่อ *M. hyopneumoniae* โดยวิธีนี้สามารถตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *M. hyopneumoniae* จากตัวอย่างปอดที่มองดูปกติได้ อย่างไรก็ตามต้องระวังการปนเปื้อนของเชื้อจากตัวอย่างหนึ่งไปยังตัวอย่างอื่นๆ ซึ่งอาจจะทำให้เกิดผลบวกปลอมได้

จ. การเพาะเชื้อ (Cultivation)

การนำตัวอย่างปอดที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* มาเพาะให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากความต้องการสารอาหารของเชื้อมีความละเอียดอ่อน และเชื้อยังมีความไวต่อสารยับยั้งการเจริญเติบโตในธรรมชาติสูง ดังนั้นในการเพาะเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากตัวอย่างในธรรมชาติจะประสบผลสำเร็จหรือไม่ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ทั้งจากตัวโฮสต์, เชื้อ, เทคนิค,และคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ (Ross and Whittlestone, 1983; Tully, 1983) ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเชื้อมัยโคพลาสมาจากตัวอย่าง

Host factors	Cultural factors
- Antibiotics or other drugs in tissue or fluids - Presence of enzymes or other inhibitors in ground tissues -Low levels of organisms in tissues selected - Antibody in host tissues or fluids	- Poor quality of growth medium due to batch variability -Poor choice of culture medium, supplements, pH, atmospheric conditions, and temperature - Inhibitory activity of thallium acetate or antibiotics in medium - Mycoplasma strains sensitivity to growth medium components, such as yeast extract or serum (more frequently observed with fresh isolates) - Competing microbial flora, including other mycoplasmas - Latent mycoplasmas that may occur in culture procedures employed (animal host, cell cultures, serum, chicken embryo, etc.) for primary isolation

จาก Tully, 1983 : General cultivation techniques for mycoplasmas and spiroplasmas in Method in Mycoplasmology vol. 1 p.100

การเก็บตัวอย่างนำส่งห้องปฏิบัติการเป็นขั้นตอนสำคัญที่ต้องระมัดระวัง เนื่องจากมัยโคพลาสมาไม่มีผนังเซลล์ จะมีความไวต่อการถูกทำให้แห้ง, การเปลี่ยนแปลงสมดุลย์ของความเข้มข้น และการสะสมของสารเมตาบอไลต์จะทำให้เชื้อตายได้ง่าย การรักษาอุณหภูมิของตัวอย่างจะช่วยให้เชื้อมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น ตัวอย่างปอดที่สด เช่นเก็บจากการผ่าซากสุกรป่วยหรือเก็บจากสุกรที่เพิ่งป่วยตายจะสามารถเก็บตัวอย่างในอุณหภูมิต่างๆได้โดยที่มัยโคพลาสมาจะยังคงมีชีวิตอยู่ กล่าวคือ เก็บที่อุณหภูมิ -30°C จะรักษาเชื้อได้นาน 20 เดือน, ที่อุณหภูมิ -25°C

ได้นาน 3 เดือน, 4°C ได้นาน 4 วัน, 20°C นาน 1 วัน, 37°C นาน 4 ชม. และที่ 42.5°C จะรักษาเชื้อไว้ได้นานเพียง 2 ชม. เท่านั้น (Whittlestone, 1979; Ross, 1990 b)

วิธีการเพาะเชื้อที่นำเอาอวัยวะมาบดก่อนเพาะเชื้อจะมีข้อดีคือ ทำให้มีโอกาสได้เชื้อจากตัวอย่างมากขึ้น แต่ในขณะเดียวกันก็เป็นการเพิ่มสารยับยั้งการเจริญของเชื้อให้มากขึ้นเช่นกัน วิธีการลดสารที่อาจยับยั้งการเจริญของเชื้อ ที่อาจอยู่ในอวัยวะหรือเลือดคือ ใช้วิธีการตัดย่อยอวัยวะเป็นชิ้นเล็กๆ แทนการบด จะทำให้สารจำพวก lysolecithin หรือ lectins ในเนื้อเยื่อออกมาได้น้อยลง การล้างอวัยวะด้วยน้ำเกลือก่อนตัดย่อยเนื้อเยื่อจะช่วยลดปริมาณสารบางอย่าง เช่น hemolysin, ยาปฏิชีวนะ และแอนติบอดีในซีรั่มที่อาจยับยั้งการเจริญของมัยโคพลาสมาได้ ตัวอย่างที่เป็นของเหลว เช่น เลือด น้ำในข้อ เมือก และเสมหะ อาจมีเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ จะต้องใช้สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรืออาจมีเอ็นไซม์บางชนิดที่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ ดังนั้นตัวอย่างเหล่านี้จะต้องรีบนำมาเพาะเชื้อโดยเร็ว จะช่วยลดความเสี่ยงในการสูญเสียเชื้อมัยโคพลาสมา นอกจากนี้เซลล์อื่นๆ ที่ปะปนอยู่ในตัวอย่างอาจจะมีผลต่อการเกิดเมตาบอไลต์ขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลง pH, หรือมีการใช้และสูญเสียส่วนประกอบของอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของมัยโคพลาสมาได้เช่นกัน การต่อเชื้อในระยะเวลาที่กำหนดจะช่วยลดปัญหานี้ได้ (Clyde and McCormack, 1983)

ในเนื้อเยื่อของคนและสัตว์จะมีสารยับยั้งการเจริญของมัยโคพลาสมา เช่น lysolecithin ดังนั้นในการเพาะเชื้อจากตัวอย่างเหล่านี้จะต้องทำการเจือจางตัวอย่างลง รวมทั้งแอนติบอดี และยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในเนื้อเยื่อก็มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของมัยโคพลาสมาเช่นกัน โดยยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์เป็น mycoplastatic ซึ่งจะไม่สามารถฆ่าเชื้อให้ตาย การเจือจางตัวอย่างในขณะเพาะเชื้อเพื่อให้ยาปฏิชีวนะมีความเข้มข้นลดลงไปกว่าระดับที่จะยับยั้งเชื้อได้ จะทำให้มัยโคพลาสมาเพิ่มจำนวนขึ้นมาใหม่ได้ โดยทั่วไปการเจือจางตัวอย่างในการเพาะเชื้อลงอย่างน้อย 1: 1000 จะช่วยลดสารยับยั้งต่างๆ ดังกล่าวได้ ในตัวอย่างที่มีการอักเสบและมีเนื้อตายควรจะเจือจางตัวอย่างลงไปอีก แต่ก็จะทำให้ปริมาณเชื้อลดลงไปมากด้วยเช่นกัน (Taylor-Robinson and Chen, 1983)

เชื้อมัยโคพลาสมาอื่น ๆ เป็นตัวแย่งการเจริญของเชื้อ *M. hyopneumoniae* ได้ เนื่องจาก *M. hyopneumoniae* เป็นเชื้อที่เจริญเติบโตช้าเมื่อเทียบกับเชื้อตัวอื่น โดยเฉพาะเชื้อ

M. hyorhinis ซึ่งสามารถอาศัยอยู่ในทางเดินหายใจของสุกรได้ เป็นเชื้อที่เพาะขึ้นง่ายและรวดเร็ว จะแย่งสารอาหารรวมทั้งทำให้เพิ่มภาวะเป็นกรดอย่างรวดเร็ว มีผลทำให้ *M. hyopneumoniae* ตายได้ง่าย การเจริญของมัยโคพลาสมาอื่นจะลดโอกาสการพบเชื้อ *M. hyopneumoniae* ลงไป การทำ serial dilution ในการเพาะเชื้อเป็นวิธีที่ช่วยลดปริมาณมัยโคพลาสมาชนิดอื่นได้เช่นกัน Furlong และ Turner (1975) ทำการเพาะเชื้อจากตัวอย่างปอดสุกรที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* พบว่าสามารถเพาะ *M. hyopneumoniae* ได้เพียงตัวอย่างเดียวจากทั้งหมด 5 ตัวอย่าง โดยที่ 4 ตัวอย่างที่เหลือนั้นเพาะได้แต่เพียงเชื้อ *M. hyorhinis* นับว่าเชื้อ *M. hyorhinis* เป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เพาะเชื้อ *M. hyopneumoniae* ไม่สำเร็จ

การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อและการทำให้ปราศจากเชื้อในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญอย่างยิ่ง ควรทดสอบการปนเปื้อนทุกครั้ง และทดสอบความสามารถในการขึ้นของเชื้อมัยโคพลาสมาในอาหารที่เตรียมแต่ละครั้งด้วย โดยเชื้อที่นำมาทดสอบควรจะเป็นเชื้อที่ผ่านการต่อเชื้อมาไม่มากนัก (minimum passage on artificial media) ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สำคัญ คือ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เนื่องจากคุณภาพของสารสกัดยีสต์นี้มีความสำคัญมากต่อการขึ้นของเชื้อ นอกจากนี้ซีรั่มที่ใช้ก็มีความสำคัญและต้องทดสอบคุณภาพด้วยเช่นกัน (Tully and Ross, 1983) เมื่อเพาะเชื้อมัยโคพลาสมาจากตัวอย่างได้แล้ว หลังจากนั้นจะต้องทำให้เชื้อบริสุทธิ์ และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและซีรั่มวิทยาเพื่อวินิจฉัยแยกเชื้อมัยโคพลาสมาต่อไป ซึ่งจะทำการทดสอบ การหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose fermentation) การใช้อาร์จีนีน (arginine hydrolysis), การผลิตเอ็นไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase test) และการเกิด film และ spot

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการพิสูจน์เชื้อ *M. hyopneumoniae* มีดังนี้

1. การทดสอบน้ำตาลกลูโคส

การทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสจะสังเกตได้จากการที่ pH ในอาหารลดลง เนื่องจากเกิดกรดที่ได้จากหมักน้ำตาล (Aluotto et al., 1970) อาหารเลี้ยงเชื้อ modified Friis broth จะถูกเติมกลูโคสให้มีความเข้มข้น 1% pHในอาหารประมาณ 7.6 แล้วนำเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์เพาะลงไป บ่มที่ 37°C 3-5 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี (Rasin and Cirillo, 1983) เนื่องจาก

การใช้ phenol red เป็น indicator เมื่อเป็นกรดจะเป็นสีเหลือง *M. hyopneumoniae* จะให้ผลบวกกับการทดสอบ

2. การสลายอาร์จีนีน

เชื้อมัยโคพลาสมาบางตัวสามารถใช้อาร์จีนีนได้เนื่องจากผลิตเอ็นไซม์ 3 ชนิด คือ arginine deiminase, ornithine carbamylase และ carbamate kinase สลายอาร์จีนีน จนได้ผลิตภัณฑ์ เป็นแอมโมเนียกับคาร์บอนไดออกไซด์และพลังงาน (Schimke and Barile,1963) การทดสอบสามารถทำในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ใช้ modified Friis broth ที่มี 0.2% arginine hydrochloride ใส่เชื้อที่จะทดสอบ บ่มที่ 37°C นาน 3-5 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี เชื้อที่มีการใช้อาร์จีนีนจะเปลี่ยนเป็นสีแดงชมพู เนื่องจากเกิดแอมโมเนีย (Barile, 1983) ทำให้มีความเป็นด่างเพิ่มขึ้นในอาหาร เชื้อ *M. hyopneumoniae* จะให้ผลลบ

3. การผลิตเอ็นไซม์ฟอสฟาเตส

เชื้อมัยโคพลาสมาบางชนิดสามารถผลิตเอ็นไซม์ฟอสฟาเตสได้ ซึ่งทดสอบได้ตามวิธีของ Aluotto และคณะ (1970) โดยการหยดเชื้อมัยโคพลาสมาที่จะทดสอบให้ไหลเป็นทางยาวลงบนวุ้นอาหาร modified Friis agar ที่มี phenolphthalein diphosphate 0.01% นำไปบ่มที่ 37°C นาน 7 วัน ถ้าเชื้อผลิตเอ็นไซม์ฟอสฟาเตสจะสามารถไฮโดรไลซ์ phenolphthalein diphosphate ที่อยู่ในอาหารให้เป็น phenolphthalein อิสระ ซึ่งจะเกิดเป็นสีชมพูกับสารละลายด่างได้ (Bradbury, 1983) ทดสอบการเกิด phenolphthalein อิสระโดยการหยด 5 M NaOH ลงในจานอาหารที่มีเชื้อขึ้นนั้น ประมาณ 30 วินาที ในจานที่เชื้อผลิตเอ็นไซม์ฟอสฟาเตสจะมีชมพูเกิดขึ้น เชื้อ *M. hyopneumoniae* จะให้ผลลบกับการทดสอบ

4. การเกิด film และ spot

เมื่อทำการเพาะเชื้อมัยโคพลาสมาบางชนิดบนวุ้นอาหาร จะสังเกตเห็นแผ่นฟิล์มบางๆ เกิดขึ้นบนวุ้นอาหาร แผ่นฟิล์มนี้ประกอบด้วย cholesterol และ phospholipids และบางครั้งจะพบมีจุดดำๆ ที่เกิดจากการสะสมของแคลเซียมและแมกนีเซียมของกรดไขมันที่ได้จากการสลายไขมันโดยมัยโคพลาสมา การเกิดปรากฏการณ์ทั้งสองอย่างนี้จะขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะด้วย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 10% ไข่แดงเป็นส่วนผสมจะเกิดปรากฏการณ์นี้ได้ดีที่สุด (Freundt, 1983) เชื้อ *M. hyopneumoniae* ไม่เกิดทั้ง film และ spot

5. การวินิจฉัยแยกชนิดมัยโคพลาสมาโดยวิธี Growth inhibition test

การทดสอบ growth inhibition เป็นวิธีที่ใช้แยกชนิดของเชื้อมัยโคพลาสมาที่นิยมใช้มาก เนื่องจากมีความจำเพาะ, วิธีการทำง่าย, สะดวก และประหยัด วิธีการคือเพาะเชื้อมัยโคพลาสมาที่ต้องการทราบชนิดลงบนวุ้นอาหาร โดยการเกลี่ยเชื้อตัวอย่างความเข้มข้น 10^5 CFU. / ml. ปริมาณ 0.1 มล.ให้ทั่วทั้งเพลท ทิ้งไว้ให้แห้ง นำแผ่นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ที่มีแอนติซีรั่มของเชื้อ *M. hyopneumoniae* อยู่ (หยดแอนติซีรั่ม 0.025 มล. ต่อกระดาษกรอง 1 แผ่น ทิ้งให้แห้ง) วางบนเพลทนั้น นำไปบ่มที่ 37°C นาน 3-5 วัน สังเกตการขึ้นของเชื้อรอบๆแผ่นกระดาษกรอง ถ้าตัวอย่างเป็นเชื้อ *M. hyopneumoniae* บริเวณรอบๆ แผ่นกระดาษกรองจะไม่มีเชื้อขึ้น เนื่องจากแอนติบอดีต่อเชื้อ *M. hyopneumoniae* ที่อยู่บนแผ่นกระดาษกรองจะกระจายออกและยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Clyde, 1983)