



วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.

KKU Veterinary Journal

ISSN 0858-2297



RESEARCH ARTICLE

Survey of *Arcobacter* species in stillborn, nursery, and sows from pig farms in Khon Kaen and Maha Sarakham provinces

Natthakorn Chaiyasaen¹, Kochakorn Direksin^{2*}, Suttisak Nopwinyoowong³

¹ PhD student in Interdisciplinary Veterinary Science Program, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kean, 40002, Thailand

² Division of Livestock Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kean, 40002, Thailand

³ Division of Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kean, 40002, Thailand

*Corresponding author E-mail: kochakrn@kku.ac.th

Received 25 August 2022, Revised 1 December 2022 Accepted 22 December 2022, Published 30 December 2022

Abstract

Objective: This study aimed to survey the presence of *Arcobacter* spp. in stillbirth piglets, vagina of sows, feces of nursery pigs, and feces of sows.

Materials and Methods: Bacterial culture, genus-specific PCR, and 23S rRNA gene sequencing identification of *Arcobacter* were performed from internal organs (n = 60, brain, heart, kidney, liver, and small intestine) of stillbirth piglets (n = 12), vaginal swabs of sows (n = 4), rectal swabs of nursery pigs (n = 35), and sow's feces (n = 51). Samples (n = 102) were collected from pig farms in Khon Kaen and Maha Sarakham provinces between December, 2021 and February, 2022.

Results: *Arcobacter* was found only in sow's fecal samples, i.e. *A. butzleri* (4/51, 7.8%) and *A. cryaerophilus* (1/51, 1.96%). Considering both PCR analysis and the nucleotide sequence of 23S rRNA, the prevalence of *Arcobacter* was approximately 5-6% of samples examined, or 10-12% of sows. *Arcobacter* was not found in nursery pigs, vagina, nor stillbirth piglets' tissues.

Conclusion: *Arcobacter* spp. was found in feces of healthy sows, confirming that pigs are reservoirs of *A. butzleri* and *A. cryaerophilus*, both of which are potentially contagious to humans. The findings of this study, however, do not prove that *Arcobacter* spp. causes reproductive diseases in pigs. Subsequent studies with larger samples are likely to improve the chances of detecting this infection.

Keywords: *Arcobacter*, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, 23S rRNA, fetus

สำรวจการปรากฏของเชื้อ *Arcobacter* species ในลูกสุกรตายคลอด สุกรอนุบาล และแม่สุกร จากฟาร์มในจังหวัดขอนแก่น และ มหาสารคาม

ณัฐกร ไชยแสน¹, กชกร ดิเรกศิลป์², สุทธิศักดิ์ นพวิญญวงค์³

¹ นักศึกษาปริญญาตรีบัณฑิต สาขาสัตวแพทยศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002 ประเทศไทย

² กลุ่มวิชาอายุรศาสตร์ปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002 ประเทศไทย

³ กลุ่มห้องปฏิบัติการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002 ประเทศไทย

*ผู้ประพันธ์บรรณกิจ อีเมล: kochakrn@kku.ac.thm

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อสำรวจการปรากฏของ *Arcobacter* spp. ของลูกสุกรตายคลอด ช่องคลอดของแม่สุกร อุจจาระของสุกรอนุบาล และอุจจาระของสุกรแม่พันธุ์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ เพาะเชื้อแบคทีเรีย ยืนยันระดับสกุล *Arcobacter* โดย genus-specific PCR และจำแนกสปีชีส์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 23S rRNA จากตัวอย่างจำนวนทั้งสิ้น 102 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วย ลูกสุกรตายคลอด (n = 12) อวัยวะภายใน (n = 60, สมอ, หัวใจ, ไต, ตับและลำไส้) ตัวอย่างป้ายเชื้อจากช่องคลอดของแม่สุกร (n = 4) ตัวอย่างป้ายอุจจาระของสุกรอนุบาล (n = 35) และตัวอย่างอุจจาระของแม่สุกร (n = 51) เก็บจากฟาร์มในจังหวัดขอนแก่น และ จังหวัดมหาสารคาม ในช่วงระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2563 ถึงเดือนธันวาคม 2564

ผลการศึกษา พบเชื้อในตัวอย่างอุจจาระของแม่สุกรเท่านั้น จำนวนสองสปีชีส์คือ *A. butzleri* (4/51, 7.8%) และ *A. cryaerophilus* (1/51, 1.96%) เมื่อคำนึงถึงผลการวิเคราะห์พีซีอาร์ระดับสกุลและลำดับ นิวคลีโอไทด์บน 23S rRNA พบความชุกของ *Arcobacter* ประมาณ 5-6% ของตัวอย่างที่ตรวจ หรือประมาณ 10-12% ของแม่สุกร ไม่พบเชื้อในช่องคลอดหรือจากตัวอย่างสุกรที่ตายในขณะคลอด ตลอดทั้งไม่พบเชื้อในสุกรอนุบาล

สรุป พบเชื้อ *Arcobacter* spp. ในอุจจาระของแม่สุกรที่มีสุขภาพปกติ และยืนยันได้ว่าสุกรเป็นแหล่งกักเก็บเชื้อ *A. butzleri* และ *A. cryaerophilus* และอาจติดต่อมาสู่มนุษย์ได้ อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในครั้งนี่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อ *Arcobacter* spp. ก่อโรครบบสืบพันธุ์ในสุกร การศึกษาครั้งต่อไปในกลุ่มตัวอย่างขนาดใหญ่ จึงน่าจะเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อนี้ได้

คำสำคัญ: *Arcobacter*, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, 23S rRNA, ตัวอย่างสุกร

บทนำ

เชื้อแบคทีเรียในสกุล (genus) *Arcobacter* ในครั้งแรกที่พบมีชื่อเรียกว่า aerotolerant *Campylobacters* (Ellis et al., 1977, 1978) ทั้งนี้เพราะนักวิจัยพบว่าเชื้อนี้มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันกับ *Campylobacter* species แต่ทนสภาวะที่มีออกซิเจน และเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า ต่อมา *Arcobacter* ได้ถูกจัดเข้าเป็นสกุลที่สองในตระกูล (family) *Campylobacteraceae* (Vandamme et al., 1991) แบคทีเรียในสกุล *Arcobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งโค้งคล้ายตะขอ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ในลักษณะหมุนเป็นเกลียว มีขนาดกว้าง 0.2-0.9 และยาว 0.5-3 ไมโครเมตร (μM) (Vandamme and De Ley, 1991) เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อย (micro-aerophilic, 3-10% Oxygen) ที่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) และ pH 6.8-8.0 แต่ไม่เจริญเติบโตที่ 40°C (Shah et al., 2011) แม้ว่าจะมีความใกล้เคียงกับ *Campylobacter* แต่เชื้อ *Arcobacter* มีลักษณะเมตาบอลิซึมเฉื่อย (metabolic inert) ทำให้การเพาะเชื้อ และจำแนกเชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical tests) เป็นไปได้ยาก และให้ผลไม่แน่นอน ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเชื้อ *Campylobacter* ที่ทำได้ง่ายกว่า (Verma et al., 2015) ดังนั้น ความชุกหรือการปรากฏของเชื้อนี้จึงอาจต่ำกว่าสภาพความเป็นจริงเป็นอย่างมาก นอกจากนี้แล้ว ณ ปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีมาตรฐานในการเพาะเชื้อแบคทีเรีย และการเพาะเชื้อรวมกระทั่งการจำแนกเชื้อ *Arcobacter* ใช้เวลานานเฉลี่ยประมาณ 4 ถึง 10 วัน (Mottola et al., 2016)

ในปี ค.ศ. 2002 *Arcobacter* ถูกจัดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ และติดต่อทางอาหาร (foodborne bacteria) โดยคณะกรรมการระหว่างประเทศว่าด้วยข้อกำหนดทางจุลชีววิทยาสำหรับอาหาร (International Commission on Microbiological Specifications for Foods; ICMSF) (Collado and Figueras, 2011) สปีชีส์ที่พบได้มากที่สุดคือ *A. butzleri* ซึ่งพบว่าเชื่อมโยงกับกรณีของโรคระบบทางเดินอาหารในมนุษย์ ทำให้มีอาการท้องเสียอย่างรุนแรงเนื่องจากภาวะลำไส้อักเสบ และบางรายอาจพบภาวะโลหิตเป็นพิษ (Ferreira et al., 2014; Webb et al., 2016) สปีชีส์ที่มักพบได้บ่อยว่าก่อโรคในมนุษย์ อาทิ เช่น *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* และ *A. skirrowii* (De Smet et al., 2011; Fernandez et al., 2015; Brückner et al., 2020) ปัจจุบัน *Arcobacter* นับได้ว่าเป็นเชื้อก่อโรคที่มีอาหาร และน้ำเป็นตัวนำเชื้อมาสู่มนุษย์ (Ramees et al., 2017) ดังนั้น การศึกษาส่วนใหญ่ จึงมุ่งไปที่การปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร และน้ำ สำหรับในประเทศไทย ยังไม่มีรายงานหรือข้อมูลการระบาดของเชื้อ *Arcobacter* spp. ใน

สุกรที่ยังมีชีวิต และลูกสุกรแท้งหรือตายคลอด มีเพียงการศึกษาจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ ไข่ไก่ และน้ำคลอง โดย Morita และคณะ ทำการศึกษาเชื้อ *Arcobacter* spp. จากตัวอย่างเนื้อไก่ที่วางจำหน่ายในร้านสะดวกซื้อ และตัวอย่างน้ำจากลำคลอง ด้วยเทคนิคที่ชื่ออาร์หรือปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *A. butzleri* เพียงสปีชีส์เดียวเท่านั้นในตัวอย่างเนื้อไก่ และน้ำคลอง (Morita et al., 2004) ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 Vindigni และคณะ (Vindigni et al., 2007) ทำการศึกษารูปแบบของเชื้อ *Arcobacter* spp. จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ และไข่ไก่จากร้านสะดวกซื้อ ด้วยเทคนิคการเพาะแยกเชื้อ และการทดสอบทางชีวเคมี พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *A. butzleri* ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ร้อยละ 21 (42/200) จำแนกผลบวกเป็นเนื้อไก่ เนื้อโค เนื้อสุกร และไข่ไก่ จำนวน 19, 14, 8 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ (Vindigni et al., 2007) อีกรายงานผลการศึกษาในตัวอย่างเนื้อไก่ โดยใช้เทคนิค rep-PCR และ Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) พบ *Arcobacter* spp. คิดเป็นร้อยละ 87.9 (29/33) (Phasipol et al., 2013) และการสำรวจแบคทีเรียปนเปื้อนในเนื้อไก่ เนื้อสุกร และปลาด้วยวิธีเพาะเชื้อพบ *A. butzleri* ในอัตราร้อยละ 74 ของตัวอย่าง (Bodhidatta et al., 2013) เห็นได้ว่าอาหารประเภทเนื้อจากปศุสัตว์มีการปนเปื้อนของ *Arcobacter* spp. ในอัตราที่สูง ดังนั้นจึงเป็นที่น่าติดตามศึกษาว่าปศุสัตว์เหล่านี้เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อนี้และติดต่อมาสู่มนุษย์จริงหรือไม่ และในทางกลับกัน เชื้อนี้ก่อโรคในปศุสัตว์ได้หรือไม่ ที่ผ่านมา ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการเกิดโรคจากเชื้อนี้ในปศุสัตว์

ในประเทศไทยเบลเยียม พบเชื้อ *Arcobacter* spp. ในสุกรโตเต็มวัยได้มากกว่าสุกรที่มีอายุน้อย (Van Driessche et al., 2004) โดยทั่วไปสุกรขุนที่ติดเชื้อส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการ แต่มีบางรายงานที่พบว่าสุกรที่ติดเชื้อมีอาการถ่ายเหลว กระเพาะอาหารและลำไส้เล็กอักเสบ และในสุกรที่ติดเชื้อบางตัว พบรอยโรคของการเกิดแผลในกระเพาะอาหารร่วมด้วย (Vandamme et al., 1992; Suarez et al., 1997) ทั้งนี้ ข้อมูลการก่อโรคในสุกรยังมีการศึกษาน้อยมากทั้งทั่วโลก และในประเทศไทย สมมุติฐานเกี่ยวกับกลไกการก่อโรคของเชื้อ *Arcobacter* spp. ในสุกรคือ เชื้ออาจเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง ได้แก่ ระบบทางเดินอาหาร การสัมผัสกับเชื้อโดยตรง และทางระบบสืบพันธุ์ เป็นต้น (On et al., 1995a; Wesley et al., 1996; De Oliveria et al., 1999; Ho et al., 2007) โดยเชื้อเข้าเกาะเซลล์เยื่อ (epithelial cells) สร้างสารพิษ (exotoxin) ทำลายเซลล์ และร่างกายตอบสนองต่อการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ ทำให้เกิดการสะสมของนิวโทรฟิล (Neutrophil) ในเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ (Wesley et al., 1996) ส่งผล

กระตุ้นการหลั่งสารตั้งต้นของการอักเสบ (proinflammatory cytokines) ชนิด Interleukin-8 และ Interleukin-10 ทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ (Collado and Figueras, 2011; Heimesaat et al., 2015b) และพบการตายของเนื้อเยื่อ (necrosis) (Wesley et al., 1996) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเมื่อเชื้อเข้าสู่เซลล์แล้วยังส่งผลต่อการแสดงออกของ Claudin-1, -5 และ -8 ทำให้บริเวณรอยเชื่อมระหว่างเซลล์ในลำไส้ที่เรียกว่าไทต์จังก์ชัน (Tight junction) เกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้มีการผ่านเข้า-ออกของสารหรือโมเลกุลขนาดใหญ่ในปริมาณมากกว่าปกติที่ช่องว่างระหว่างเซลล์ (Paracellular pathway) และก่อให้เกิดอาการท้องเสียตามมานั้นเอง (Bücker et al., 2009; Heimesaat et al., 2015a) นอกจากนี้การก่อโรควิถีบริเวณลำไส้แล้ว ยังพบว่าเชื้อ *Arcobacter* spp. มีความสัมพันธ์กับการเกิดปัญหาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ ทำให้เกิดการตายของตัวอ่อนที่อยู่ในท้อง และการแท้งลูกของแม่สุกร (Wesley et al., 1996; De Oliveira et al., 1997) โดยคาดว่า เชื้อ *Arcobacter* spp. บุกรุกเข้าทำลายเนื้อเยื่อของรก และเข้าสู่ตัวอ่อนสุกร (De Oliveira et al., 1997) โดยแพร่กระจายมาทางกระแสเลือด (Bacteremia) (Figueras et al., 2014; On et al., 1995) ทำให้พบเชื้อตามเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ของตัวอ่อนสุกร เช่น ในบริเวณเนื้อตายที่ปอด ไต และสมองของตัวอ่อนลูกสุกรที่ติดเชื้อ (Wesley et al., 1996) เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของตัวอ่อนสุกรในท้องหรือส่งผลให้แม่สุกรแท้งในช่วงปลาย (late-term abortion) หรือประมาณวันที่ 90-105 ของการตั้งท้อง (De Oliveria et al., 1999) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบเชื้อ *Arcobacter* spp. ได้จากท่อรังไข่ มดลูก และรกของแม่สุกรที่มีปัญหาด้านระบบสืบพันธุ์ ร่วมกับพบเชื้อนี้ได้ทั้งตัวและไตของตัวอ่อนสุกรที่แท้ง (De Oliveira et al., 1997; On et al., 2002) พบเชื้อในสารคัดหลั่งจากบริเวณหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศของสุกรเพศผู้ ของเหลวจากช่องคลอดของสุกรเพศเมีย ท่อรังไข่ รวมทั้งในมดลูกของแม่สุกรที่มีปัญหาด้านระบบสืบพันธุ์ ตัวอย่างรก ตัว และไตของตัวอ่อนสุกรที่แท้งหรือตายก่อนคลอด รวมไปถึงอวัยวะต่าง ๆ ของลูกสุกรที่ติดเชื้อแบบรุนแรง (Schroeder-Tucker et al., 1996; Wesley et al., 1996; De Oliveira et al., 1997; De Oliveria et al., 1999; On et al., 2002, 2003; Houf et al., 2009)

จากข้อมูลเบื้องต้นที่เกี่ยวข้องกับการค้นพบเชื้อ *Arcobacter* spp. เริ่มจากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มแท้งกับไม่แท้ง (case-control study) ซึ่งพบเชื้อนี้ในอวัยวะของตัวอ่อนโค และสุกรที่แท้งในอัตราที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม (Ellis et al., 1977, 1978) ในการศึกษาอื่นก็รายงานเช่นกันว่าพบเชื้อนี้ในอวัยวะของตัวอ่อนสุกรที่แท้งประมาณร้อยละ 40 ในขณะที่ไม่สามารถตรวจ

พบสาเหตุอื่นที่เกี่ยวข้องกับการแท้งได้ จึงคาดว่า *Arcobacter* spp. น่าจะเป็นหนึ่งในสาเหตุของระบบสืบพันธุ์ล้มเหลวในสุกร (On et al., 2002) อย่างไรก็ตามบทบาทของเชื้อนี้ในการก่อโรคระบบสืบพันธุ์ในโค และสุกรยังไม่มีความกระจ่างชัด ทั้งนี้เพราะสามารถพบเชื้อนี้ในรก และน้ำคร่ำของโค และสุกรสุขภาพปกติได้เช่นเดียวกัน (Ellis et al., 1977, 1978) มีอีกหนึ่งรายงานยืนยันว่าเชื้อนี้เกี่ยวข้องกับการแท้งในแกะ (Bath et al., 2013) แม้ว่าจุดเริ่มต้นของการค้นพบเชื้อมาจากสุกรและโค แต่ในปัจจุบันพบว่าข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อนี้ในสุกร เป็นข้อมูลที่ค่อนข้างเก่า และไม่ได้ทำการศึกษาต่อเนื่อง ทั้งนี้เพราะประเด็นหลักของเชื้อนี้คือการก่อโรคในมนุษย์นั่นเอง ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการปรากฏของ *Arcobacter* spp. ในลูกสุกรตายคลอดในตัวอย่างจากช่องคลอดของแม่สุกร ในสุกรอนุบาล และในสุกรแม่พันธุ์ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้ศึกษาเชิงลึกถึงการก่อโรคในสุกรต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การคำนวณจำนวนตัวอย่าง

เมื่อพิจารณาจากอัตราความชุกเท่ากับร้อยละ 12 ในการตรวจพบเชื้อ *Arcobacter* spp. ด้วยวิธีเพาะเชื้อแบบที่เรียกว่า อุจจาระของสุกร (Mohan et al., 2014) ทำให้ได้ขนาดตัวอย่างน้อยที่สุดคือ 40 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากการคำนวณโดยใช้ฟังก์ชันบนอินเตอร์เน็ต (Open-Source Epidemiologic Statistics for Public Health, 2013) ที่ระดับความความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้เท่ากับ 10% และระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

การเก็บตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่าง

ระเบียบปฏิบัติเกี่ยวกับสัตว์ที่ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยสัตว์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น (IA-CUC-KKU 53/2563) ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงระหว่าง เดือนกุมภาพันธ์ 2563 ถึงเดือนธันวาคม 2564 เก็บตัวอย่างลูกสุกรตายคลอด (stillborn) จาก 3 ฟาร์มในจังหวัดขอนแก่น รวม 12 ตัว โดยแต่ละตัวมาจากแม่สุกรต่างกัน พร้อมกับเก็บตัวอย่างป้ายเชื้อด้วยก้านสำลีของอาหารสำหรับนำส่งเชื้อ (Cary Blair transport medium) จากช่องคลอดของแม่สุกรที่มีสุขภาพปกติในช่วงประมาณ 1 สัปดาห์หลังคลอดจำนวน 4 ตัว เก็บตัวอย่างอุจจาระของสุกรอนุบาลจาก 9 ฟาร์มในจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดมหาสารคาม โดยการป้ายเชื้อ (rectal swab) จำนวน 35 ตัว และล้างเก็บตัวอย่างอุจจาระของแม่สุกรโดยตรงจากทวารจำนวน 51 ตัว จาก 9 ฟาร์มในจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดมหาสารคาม ทั้งนี้ตัวอย่างแต่ละชนิดมาจากสุกรคนละตัวหรือไม่มีความเกี่ยวข้อง

กันระหว่างลูกสุกรตายคลอด ตัวอย่างจากช่องคลอด และ ตัวอย่างอุจจาระของแม่สุกร บรรจุใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ และบรรจุในกล่องรักษาอุณหภูมิที่ 4 ถึง 8 องศาเซลเซียส (°C) ในขณะที่ขนย้ายมายังห้องปฏิบัติการ และเก็บตัวอย่างในตู้เย็นใน ขณะที่รอการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ทำการเปิดผ่าซากลูกสุกร ตายคลอดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อเพื่อแยกอวัยวะในแต่ละตัวของ สุกรตายคลอด ออกเป็น ปอด ตับ ไต ลำไส้เล็ก และสมอง (จำนวน รวม 60 ตัวอย่าง) ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ บรรจุลงในถุงพลาสติกปลอด เชื้อ ทำการบดเนื้อเยื่อโดยใช้ของแข็งกดจากด้านบนของถุง พลาสติกจนเนื้อเยื่อละเอียด เติมน้ำเกลือปลอดเชื้อ (sterile normal saline) ในอัตราส่วน 1:1

การเพาะเชื้อ Arcobacter

การเพาะแยกเชื้อดัดแปลงจากวิธีของ De Smet et al. (2011) อธิบายขั้นตอนไว้ในภาพที่ 1 (Figure 1) โดยผสมอย่าง อุจจาระปริมาณ 5 กรัม หรือเนื้อเยื่อปอด 5 มิลลิลิตร ในอาหาร

เลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Arcobacter Broth (Oxoid, CM0965, Eng- land) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ CCDA supplement (Oxoid, SR0155E, England) (AB-CCDA) ผสม ให้เข้ากัน หรือจุ่มก้านสำลีตัวอย่างที่ได้จากการป้ายเชื้อลงเขย่า ใน AB-CCDA ปริมาตร 3 mL จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48-72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงทำการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดเหลวที่ได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (µL) ลงบนกระดาษกรอง ที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร (µM) (G.E. Healthcare, Japan) ที่ แปะอยู่บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Tryptic Soy Agar (MERCK, Germany) ซึ่งเติมเลือดวัว 5% (TSBA) และเติมยา ปฏิชีวนะ CCDA supplement ตามสูตรของ Aspinall และคณะ (Aspinall et al., 1993) รอให้ของเหลวกรองผ่านลงไปยังผิวของ TSBA ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นกรองออกแล้วนำอาหาร เลี้ยงเชื้อไปปั่นเพาะเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic atmo- sphere) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48-72 ชั่วโมง โคโลนีที่คาดว่าจะ เป็น เชื้อ Arcobacter spp. มีขนาดเล็กมาก กลมมน มีสีใสหรือขาว

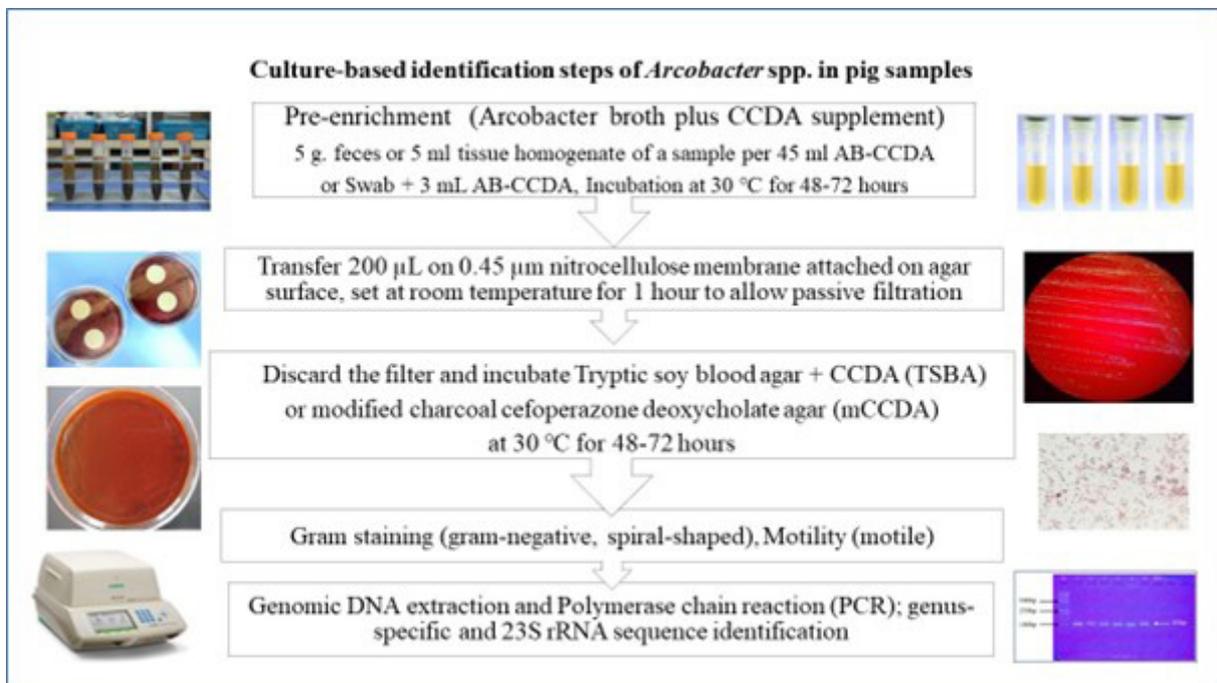


Figure 1. Brief culture-based diagnostic steps of Arcobacter spp. in pig samples in this study modified from (Aspinall et al., 1993; Benson, 2002; Quinn et al., 2004; de Smet et al., 2011; Patyal et al., 2011; Ramees et al., 2014a; Vicente-Martins et al., 2018).

ขุ่น ย้อมติดสีแกรมลบ (Fernandez et al., 2015) ทำการคัดแยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บเชื้อใน Brian heart infusion broth (HIMEDIA, India) ที่มี Glycerol 20% ไว้ที่ -20 °C เพื่อใช้สำหรับทดสอบในขั้นต่อไป

การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template preparation)

การเตรียมดีเอ็นเอโดยประยุกต์จากวิธีการของ Ramees และคณะ (Ramees et al., 2014) โดยทำการเขี่ยโคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อ *Arcobacter* spp. จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร (µL) แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 10 นาที เสร็จแล้วนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลานาน 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (Eppendorf™, Germany) ด้วยความเร็ว 14,725 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (BioDrop, UK) แล้วเก็บส่วนที่เหลือ ณ อุณหภูมิ -20 °C เพื่อการตรวจวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป

การระบุเชื้อ *Arcobacter* spp. ในระดับสกุลด้วยเทคนิค PCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ทำการเพิ่มปริมาณในเครื่อง Thermo cycles (ESCO, Swift™ MiniPro Thermal Cycler, Singapore) โดยใช้โปรแกรมที่มีความจำเพาะต่อ *Arcobacter* genus คือ Primer-FW-5'-GAGGATGACACATTCGGTGC-3' และ Primer-RV-5'-GGAGTTAGCCGGTGCT-TATTCATATA-3' และดำเนินเทคนิคพีซีอาร์ตามวิธีของ González และคณะ (González et al., 2014) ปรับปริมาณของสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 µL ซึ่งประกอบด้วย 1X Taq buffer (Thermo Fisher Scientific, USA), 1.5 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), 0.2 mM dNTPs (Thermo Fisher Scientific, USA), 1.25U of Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), 0.2 µM primers (Integrated DNA Technologies, Singapore) ดีเอ็นเอต้นแบบ 5 µL และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DNase-free H₂O (GIBCO™, Invitrogen, UK) ใช้โปรแกรมพีซีอาร์ดังต่อไปนี้ คือ ขั้นตอน (Pre-heat) ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวนทั้งสิ้น 35 รอบ ตั้งโปรแกรมในแต่ละรอบประกอบไปด้วย denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing ที่ 56 °C เป็นเวลา 30 วินาที, extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ final elongation ที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาย้อมสี MaestroSafe™ Nucleic Acid (Maestrogen, Taiwan) เพื่อตรวจสอบในไมโครสโคป (Vivantis, Malaysia) เข้มข้น 3% และทำ Electrophoresis ในสารละลาย 1xTAE buffer (400mM Tris-Acetate, 10mM EDTA, pH 8.3) (Invitrogen, UK) เพื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 85 bp

สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลบวกในระดับสกุล ทำการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์และวิธีที่เผยแพร่โดย Bastyns et al. (Bastyns et al., 1995) ใช้สารละลาย 50 µL ที่ประกอบด้วย 1X Taq buffer (Thermo Fisher Scientific, USA), 1.5 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), 0.2 mM dNTPs (Thermo Fisher Scientific, USA), 1.25U of Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), 0.2 µM primers (Integrated DNA Technologies, Singapore), DNase-free H₂O (GIBCO™, Invitrogen, UK) และดีเอ็นเอต้นแบบ 5 µL ใช้โปรแกรมพีซีอาร์ดังต่อไปนี้ คือ Pre-heat ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 35 รอบ แต่ละรอบประกอบไปด้วย denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 60 วินาที, annealing ที่ 55 °C เป็นเวลา 60 วินาที, extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 60 วินาที และ final elongation ที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที เสร็จแล้วนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาทำ Electrophoresis บนวุ้น อะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 3 ในสารละลาย 1xTAE buffer

การระบุสปีชีส์ของเชื้อ *Arcobacter* spp. ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บน 23S rRNA

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดประมาณ 3310 bp มาทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป GenepHlow™ PCR cleanup Kit (Geneaid Biotech Ltd.) และส่งผลผลิตพีซีอาร์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Barcode Taq Sequencing (U2Bio, Korea) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลใน GenBank database โดยใช้ Blast® program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อหาสปีชีส์ของตัวอย่างแบคทีเรีย

การวิเคราะห์ทางสถิติ ทำการเก็บบันทึกข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Microsoft Excel (Microsoft office software, 2016) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนาในรูปแบบร้อยละ และรายงานผลเป็นอัตราการตรวจพบเชื้อจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด โดยใช้สถิติแบบบรรยาย

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนาในรูปแบบร้อยละ และรายงานผลเป็นอัตราการตรวจพบเชื้อจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด โดยใช้สถิติแบบบรรยาย

ผลการศึกษา

จากภาพ A (Figure 2) แสดงให้เห็นโคโลนีบน TSBA ที่มีลักษณะคล้ายกับโคโลนีที่สันนิษฐานว่าเป็นเชื้อ *Arcobacter* spp. คือมีลักษณะกลมใส ผิวหน้าเรียบมันวาว มีขอบเรียบ และสูงคล้ายขนม มีขนาดที่เล็กมาก และเห็นได้ว่ามีเชื้อชนิดอื่นปนเปื้อนหรือขึ้นทับบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แม้จะมีการเติมยาต้านจุลชีพลงไปในการเลี้ยงเชื้อแล้วก็ตาม เมื่อทำการคัดเลือก และทำให้โคโลนีบริสุทธิ์ ดังแสดงในภาพ B (Figure 2) เชื้อที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (non-hemolysis) บน TSBA สำหรับภาพ C (Figure 2) เป็นภาพถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ (1,000 X) หลังจากย้อมสีแกรม (gram staining) แสดงให้เห็นลักษณะของแบคทีเรียในสกุล *Arcobacter* คือติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งโค้งงอ และมีขนาดเล็กมาก ผลจากการเพาะเชื้อแบคทีเรีย พบ 20 ตัวอย่างอุจจาระของแม่สุกรที่ให้โคโลนีที่คาดว่าน่าจะเป็น *Arcobacter* spp. แต่ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อของแต่ละอวัยวะของลูกสุกรตายคลอด หรือจากตัวอย่างป้ายเชื้อจากช่องคลอดของแม่สุกร รวมทั้งจากตัวอย่างอุจจาระของสุกรอนุบาล (Table 1)

เมื่อทำการจำแนกเชื้อที่ได้ด้วยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล ได้ผลพีซีอาร์ที่จำเพาะต่อสกุล *Arcobacter* จำนวน 6 ไอโซเลต (isolate) ซึ่งเป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างอุจจาระ

ของแม่สุกรทั้งหมดจำนวน 6 ตัว อัตราการตรวจพบเชื้อ *Arcobacter* spp. ในตัวอย่างอุจจาระของแม่สุกร คิดเป็นร้อยละ 15.7 และอัตราการตรวจพบเชื้อโดยรวมเท่ากับร้อยละ 7.9 ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด (Table 1) นำดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกต่อพีซีอาร์ที่จำเพาะต่อสกุลมาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์สากล พบให้ผลเป็นบวก จำนวน 5 ไอโซเลต เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเหล่านี้ เปรียบเทียบเชื้อที่มีการรายงานลำดับพันธุกรรมใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) ให้ผลเป็น *Arcobacter* spp. ทั้งหมดจำนวน 5 ไอโซเลต จำแนกเชื้อที่ได้ออกเป็น *A. butzleri* จำนวน 4 ไอโซเลต และ *A. cryaerophilus* จำนวน 1 ไอโซเลต (Table 2) สำหรับอีกหนึ่งไอโซเลตที่ให้ผลพีซีอาร์เป็นแบบจาง ๆ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 23S rRNA ตรงกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น เมื่อคิดเป็นความชุกภายหลังจากการยืนยันด้วยลำดับ นิวคลีโอไทด์บนยีน 23S rRNA แล้วจึงมีอัตราการตรวจพบ *Arcobacter* spp. ในแม่พันธุ์สุกรเท่ากับร้อยละ 9.8 (5/51) และจากตัวอย่างทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 4.9 (5/102) เมื่อพิจารณาเป็นรายฟาร์มพบว่าเป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากแม่สุกรจำนวน 2 ฟาร์ม คือไอโซเลต KK362, KK364, KK365 และ KK368 ซึ่งเพาะเชื้อได้ในตัวอย่างจากแม่สุกรที่อยู่ในฟาร์มเดียวกัน และ KK486 ในตัวอย่างที่มาจากฟาร์มอีกแห่ง (Table 2)

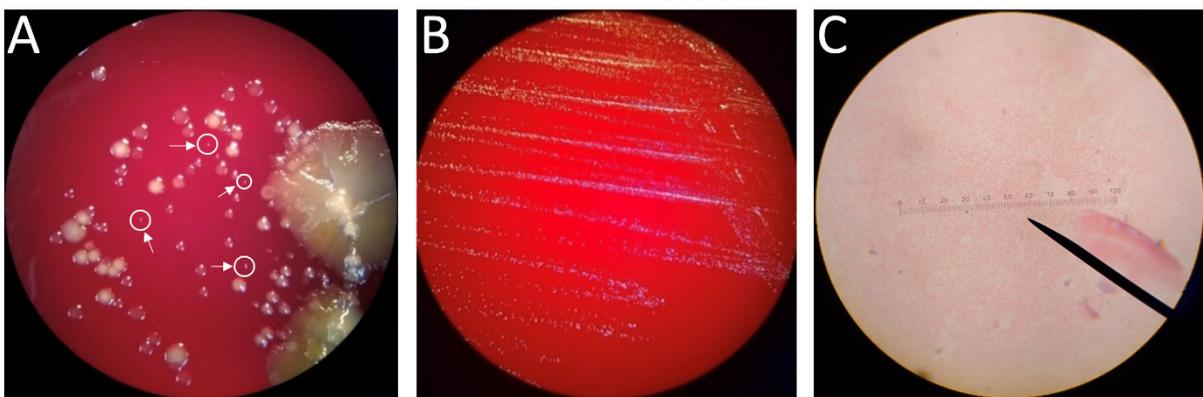


Figure 2. (A) Presumptive *Arcobacter* colonies on TSBA (in circles, arrowed), along-side with other microorganisms co-presented in the pig samples, regardless antimicrobial of drugs added to the media. (B) *Arcobacter* spp. pure colonies after a few subcultures on TSBA. (C) Gram staining of *Arcobacter* spp. under the light microscope (1,000X): curvy, rod-shaped, gram negative, and very small size.

Table 1. Results of *Arcobacter* spp. detection in pigs' samples

Pig sample	Samples analyzed (n)	n (%)			
		Genus PCR positive	23S rRNA sequence Identification	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>
Stillborn tissues	12 (60 organs)	0	0	0	0
Nursery's rectum	35	0	0	0	0
Sow's vagina	4	0	0	0	0
Sow's feces	51	6 (11.8)	5 (9.8)	4 (7.8)	1 (1.96)
Total	102	6 (5.9)	5 (4.9)	4 (3.9)	1 (0.98)

Table 2. *Arcobacter* spp. Identified from sow's feces by comparing to known sequences in the GenBank database

Order	Isolate No.	Species	Reference ID	Similarity (%)	Accession No.*
1	KK 362	<i>A. butzleri</i>	<i>Arcobacter butzleri</i> strain ED-1 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	OQ396385
2	KK 364	<i>A. butzleri</i>	<i>Arcobacter butzleri</i> strain ED-1 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	OQ396386
3	KK 365	<i>A. butzleri</i>	<i>Arcobacter butzleri</i> strain ED-1 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	OQ396387
4	KK 368	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Aliarcobacter cryaerophilus</i> strain G13RTA chromosome, complete genome	100	OQ396397
5	KK 486	<i>A. butzleri</i>	<i>Arcobacter butzleri</i> strain ED-1 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	100	OQ396394

วิจารณ์

เชื้อ *Arcobacter* spp. ในสุกรนับว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ มีการศึกษาเกี่ยวกับการก่อโรคค่อนข้างน้อย นอกจากนี้ยังไม่มีวิธีมาตรฐานในการเพาะเชื้อ *Arcobacter* ส่วนใหญ่นิยมดัดแปลงสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Campylobacter* เช่น modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA) (Kim et al., 2019) แต่จากการศึกษานี้พบว่า TSBA ให้ผลการเพาะเชื้อได้ดีกว่า และการสังเกตโคโลนีของ *Arcobacter* ได้ง่ายกว่า mCCDA จึงเลือกใช้ TSBA ในการศึกษาครั้งนี้ ถึงแม้จะเห็นว่าเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลสามารถจำแนกเชื้อได้ดีและมีความจำเพาะสูง แต่จำเป็นต้องมีตัวควบคุมเปรียบเทียบเพื่อศึกษาคุณสมบัติของเชื้อในขั้นต่อไป จึงมีความจำเป็นต้องเริ่มต้นเพาะจำแนกเชื้อที่มีชีวิต หลังจากได้เชื้อที่ระบุชนิดโดยผ่านเปรียบเทียบการยีนลำดับนิวคลีโอไทด์บน 23S rRNA จึงใช้ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกเป็นตัวควบคุมเทียบในการวิเคราะห์ในครั้งต่อไป

อย่างไรก็ตาม การเพาะแยกเชื้อ *Arcobacter* spp. ทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อเจริญเติบโตช้า และส่วนมากมีแบคทีเรียชนิดอื่นที่ปนมากับตัวอย่างเจริญเติบโตทับ โดยเฉพาะตัวอย่างอุจจาระ แม้ว่าการใช้วิธีการกรองบนกระดาษรูขนาด 45 µM เพื่อให้เฉพาะแบคทีเรียที่เค็ล่อนที่ได้และมีขนาดเล็กผ่านลงบนผิววุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น รวมทั้งการใส่ยาต้านจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งคู่แข่งของเชื้อ เช่น CCDA selective supplement ซึ่งประกอบไปด้วยยา Amphotericin B และ Cefoperazone ซึ่งยานี้อาจมีผลยับยั้งเชื้อ *Arcobacter* spp. ที่มีความไวต่อยาได้ด้วยเช่นกัน ดังนั้นอัตราการตรวจพบเชื้อโดยวิธีการเพาะเชื้อแบคทีเรีย จึงอาจมีความซุกต่ำกว่าความเป็นจริง

จากการศึกษาของ Yamauchi และคณะ (Yamauchi et al., 2020) พบว่าเมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างอุจจาระชุดเดียวกัน การเพาะเชื้อแบคทีเรียนี้ให้ผลบวกเพียงแค่ 4 ตัวอย่าง ในขณะที่ใช้เทคนิคอณูชีวโมเลกุลให้ผลบวกมากถึง 12 ตัวอย่าง

ในการทำงานเดียวกันนี้ การศึกษาเชื้อในน้ำนมโค พบความชุกของ *A. butzleri* เพียงร้อยละ 4.1 โดยวิธีเพาะเชื้อ แต่ให้ผลบวกมากถึงร้อยละ 31.2 เมื่อตรวจโดยเทคนิค Real-time PCR โดยตรงจากตัวอย่าง (Marta et al., 2020) ซึ่ง Real-time PCR มีความไวสูงกว่าพีซีอาร์ทั่วไป การจำแนกเชื้อ *Arcobacter* ด้วยลักษณะโคโลนีและการย้อมสีแกรม อาจมีข้อผิดพลาดค่อนข้างสูง เทคนิคพีซีอาร์ในระดับสกุลสามารถยืนยันผลจำนวน 6 ใน 20 โคโลนีที่เข้าข่ายเชื้อ *Arcobacter* spp. อย่างไรก็ตาม เทคนิคพีซีอาร์ก็มีข้อควรระวังเช่นเดียวกัน วิธีในการสกัดดีเอ็นเอต้นแบบโดยไม่ได้ใช้ชุดสำเร็จรูปอาจมีผลต่อความเสียหายของดีเอ็นเอในขณะที่เก็บรักษาถึงแม้จะมีการตรวจวัดปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบภายหลังจากการสกัดแล้วก็ตาม ซึ่งคุณภาพของดีเอ็นเอหรือสารยับยั้งปฏิกิริยาจากไขมันหรือโปรตีนที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาจเป็นผลให้การตรวจยืนยันเชื้อด้วยพีซีอาร์ให้ผลเป็นลบเทียม ถึงแม้เทคนิคพีซีอาร์จะมีความจำเพาะสูงมากก็ตาม

การศึกษานี้มีข้อจำกัดในการเข้าเก็บตัวอย่างในช่วงที่เกิดโรคระบาด และจำนวนสุกรในพื้นที่ได้รับผลกระทบจากโรคอหิวาต์แอฟริกา จึงทำให้ได้ตัวอย่างจำนวนค่อนข้างน้อยในแต่ละกลุ่ม ดังนั้นจึง เป็นการสำรวจการปรากฏของเชื้อในตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บเพื่อนำเสนอข้อมูลแบบบรรยาย ผลการศึกษาในครั้งนี้ พบเชื้อจำนวนสองสปีชีส์เท่านั้นคือ *A. butzleri* และ *A. cryaerophilus* โดยพบ *A. butzleri* มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sekhar et al. (2018) เมื่อคำนึงถึงผลพีซีอาร์ระดับสกุล และลำดับนิวคลีโอไทด์บน 23S rRNA พบความชุกของ *Arcobacter* ประมาณร้อยละ 5-6 ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด และคิดเป็นร้อยละ 10-12 ในแม่สุกร เมื่อคิดอัตราการตรวจพบเชื้อในตัวอย่างทั้งหมด เป็นผลให้มีอัตราการตรวจพบต่ำกว่าการศึกษาที่ผ่านมาที่ทำการตรวจหาเชื้อใช้ตัวอย่างอุจจาระของสุกรทั้งหมด โดยเริ่มจากการเพาะเชื้อแบคทีเรียเช่นกัน (Mohan et al., 2014) ผลของการศึกษาในครั้งนี้มีความชุกของเชื้อ *Arcobacter* ในอุจจาระของแม่สุกร ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Verma และคณะ ที่รายงานอัตราการตรวจพบเชื้อในอุจจาระของสุกรขุนประมาณร้อยละ 8 (Verma et al., 2015) การตรวจเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อให้ผลบวกค่อนข้างต่ำหรือไม่สามารถเพาะเชื้อได้เลย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตัวอย่างจากการป้ายช่องคลอดของแม่สุกร รวมทั้งตัวอย่างจากการป้ายอุจจาระจากทวารหนักของสุกรอนุบาล มีปริมาณเชื้อค่อนข้างน้อย ในขณะที่อุจจาระที่ได้จากแม่สุกรสามารถใช้ตัวอย่างในปริมาณมาก หรืออาจเป็นผลจากการที่สุกรอนุบาลส่วนใหญ่ได้รับยาต้านจุลชีพในอาหาร หรือในความเป็นจริงเชื้ออาจไม่ปรากฏในตัวอย่างเหล่านี้เลยก็ได้ รวมทั้งตัวอย่างลูกสุกรตายคลอด ก็ตรวจไม่พบเชื้อนี้เช่น

เดียวกัน แสดงว่าลูกสุกรเหล่านี้ไม่เกิดการติดเชื้อ *Arcobacter* spp. หรืออาจเนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาค่อนข้างน้อย เมื่อคำนึงถึงปริมาณเชื้อ การตรวจหาเชื้อในอวัยวะของลูกสุกรตายคลอดอาจมีโอกาสในการตรวจพบเชื้อได้มากกว่าการป้ายช่องคลอดของแม่สุกร ข้อสังเกตอีกประการหนึ่งคือเชื้อแบคทีเรียที่พบภายในลำไส้โดยทั่วไปมักพบได้ในช่องคลอดด้วยการที่ตรวจไม่พบอาจเป็นผลจากปริมาณเชื้อมีน้อยเกินไปในก้นลำไส้ หรือจำนวนตัวอย่างค่อนข้างน้อย แม้ว่าประวัติเริ่มต้นของการพบเชื้อในสุกรเกี่ยวข้องกับปัญหาาระบบสืบพันธุ์ ผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อ *Arcobacter* เป็นสาเหตุของโรกระบบสืบพันธุ์ในสุกร การศึกษาเพิ่มเติมด้วยจำนวนตัวอย่างขนาดใหญ่ขึ้น เก็บตัวอย่างจากตัวอ่อนที่เกิดการแท้ง และทำคู่ขนานกับเทคนิคทางด้านอณูชีวโมเลกุลโดยตรงจากตัวอย่าง จึงอาจให้คำตอบในกรณีนี้ได้

มีข้อสังเกตว่าแม่สุกรที่มีเชื้อนี้ในลำไส้มีสุขภาพปกติ ดังนั้น เชื้อนี้จึงไม่น่าก่อโรคในแม่สุกร หรืออาจเป็นเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมภายในฟาร์ม ทั้งนี้เพราะ *Arcobacter* spp. สามารถพบได้ในสัตว์หลายชนิด ในน้ำ และในสิ่งแวดล้อม (Chieffi et al., 2020) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาที่ยืนยันแล้วว่าแม่สุกรเกิดการติดเชื้อนี้ได้ โดยพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อนี้ในนม น้ำเหลืองของแม่สุกร และพบสายสัมพันธ์ทางด้านพันธุกรรมของเชื้อระหว่างแม่กับลูกสุกร ตลอดทั้งเสนอว่าเชื้อนี้ไม่ใช่แบคทีเรียที่พบได้ตามปกติในทางเดินลำไส้ (commensal bacteria) ของสุกร เพราะมีการขับเชื้อทางอุจจาระเป็นช่วง ๆ ทั้งปริมาณ และสปีชีส์แตกต่างกันไปในแม่สุกรตัวเดิม (Ho et al., 2006) นอกจากนี้แล้ว การวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันจากการทดสอบการก่อโรคโดยใช้หนูเป็นต้นแบบ (Murine model) ยืนยันว่าเชื้อ *Arcobacter* spp. โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. butzleri* เป็นเชื้อก่อโรค ไม่ใช่เชื้อแบคทีเรียที่พบได้ตามปกติในทางเดินลำไส้ (Gözl et al., 2016) การศึกษาที่ผ่านมาคาดว่าเชื้อ *Arcobacter* spp. มีความสัมพันธ์กับการเกิดปัญหาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ ทำให้เกิดการตายของตัวอ่อนที่อยู่ในท้อง และการแท้งลูกของแม่สุกร (Wesley et al., 1996; De Oliveira et al., 1997) โดยคาดว่าเชื้ออาศัยอยู่ในแม่สุกรสุขภาพดี อาจก่อโรค และแสดงอาการติดเชื้อได้เมื่อแม่สุกรเกิดความเครียดหรือมีภาวะพร่องภูมิคุ้มกัน ซึ่งส่งผลให้แม่พันธุ์แสดงอาการเกี่ยวกับปัญหาด้านระบบสืบพันธุ์ เช่น มีการกลับสัดก่อนกำหนด (early return to estrus) มีอัตราการผสมติดต่ำ แท้งลูก และ หากเกิดการติดเชื้อในระหว่างตั้งท้องทำให้มีอัตราการสุกรตายคลอดสูง เป็นต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้พบเพียงเชื้อในลำไส้ของแม่สุกร ซึ่งจำเป็นต้องทำการศึกษาเพื่อยืนยันการติดเชื้อ และพยาธิกำเนิดของเชื้อนี้ในการก่อโรคสุกรต่อไป

สรุป

พบเชื้อ *Arcobacter* spp. ในอุจจาระของแม่สุกรที่มีสุขภาพปกติ และยืนยันได้ว่าสุกรเป็นแหล่งกักเก็บเชื้อ *A. butzleri* และ *A. cryaerophilus* ซึ่งอาจติดต่อมาสู่มนุษย์ได้ อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อ *Arcobacter* spp. ก่อโรครบบสืบพันธุ์ในสุกร การศึกษาครั้งต่อไปในกลุ่มตัวอย่างขนาดใหญ่ จึงอาจเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อนี้ได้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับสนับสนุนงบประมาณโครงการจากกองทุนวิจัยบัณฑิตศึกษา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีงบประมาณ 2564

เอกสารอ้างอิง

Arguello E, Otto, CC, Mead, P, Babady, NE, 2015. Bacteremia caused by *Arcobacter butzleri* in an immunocompromised host. *J Clin Microbiol* 53. <https://doi.org/10.1128/JCM.03450-14>.

Aspinall ST, Wareing DRA, Hayward PG, Hutchinson DN, 1993. Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. *J Clin Pathol* 46, 829–831. <https://doi.org/10.1136/jcp.46.9.829>.

Bastyns, K, Cartuyvels, D, Chapelle, S, Vandamme, P, Goossens, H, De Wachter, R, 1995. A Variable 23S rDNA Region is a Useful Discriminating Target for Genus-Specific and Species-Specific PCR Amplification in *Arcobacter* Species. *Syst Appl Microbiol* 18, 353–356. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80427-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80427-3).

Bath GF, Leask R, Pettey KP, Coetzee DJ, 2013. Abortions in sheep associated with *Arcobacter skirrowii* infection. *J S Afr Vet Assoc* 84. <https://doi.org/10.4102/jsava.v84i1.952>.

Benson HJ, 2002. *Microbiological applications: laboratory manual in general microbiology*. 8th ed. Sepsis.

Bodhidatta L, Srijan A, Serichantalergs O, Bangtrakulnonth A, Wongstitwilairung B, McDaniel P, Mason CJ, 2013. Bacterial pathogens isolated from raw meat and poultry compared with pathogens isolated from children in the same area of rural Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 44, 259.

Brückner V, Fiebiger U, Ignatius R, Friesen J, Eisenblätter M, Höck M, Alter T, Bereswill S, Heimesaat MM, Gözl G, 2020. Characterization of *Arcobacter* strains isolated from human stool samples: Results from the prospective German prevalence study Arcopath. *Gut Pathog*. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0344-3>.

Bücker R, Troeger H, Kleer J, Fromm M, Schulzke J, 2009. *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. *J Infect Dis* 200, 756–764. <https://doi.org/10.1086/600868>.

Chieffi D, Fanelli F, Fusco V, 2020. *Arcobacter butzleri*: Up-to-date taxonomy, ecology, and pathogenicity of an emerging pathogen. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 19, 2071–2109. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12577>.

Collado L, Figueras MJ, 2011. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin Microbiol Rev* 24, 174–192. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-10>.

De Oliveira SJ, Baetz AL, Wesley IV, Harmon KM, 1997. Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Vet Microbiol* 57. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00106-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00106-5).

De Oliveria SJ, Wesley IV, Baetz AL, Harmon KM, Kader IITA, De Uzeda M, 1999. *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter butzleri* isolated from preputial fluid of boars and fattening pigs in Brazil. *J Vet Diagnostic Investig* 11. <https://doi.org/10.1177/104063879901100513>.

De Smet S, De Zutter L, Debruyne L, Vangroenweghe F, Vandamme P, Houf K, 2011. *Arcobacter* population dynamics in pigs on farrow-to-finish farms. *Appl Environ Microbiol* 77, 1732–1738. <https://doi.org/10.1128/AEM.02409-10>.

Ellis WA, Neill SD, O'Brien JJ, Ferguson HW, Hanna J, 1977. Isolation of Spirillum/Vibrio-like organisms from bovine fetuses. *Vet Rec* 100. <https://doi.org/10.1136/vr.100.21.451>.

Ellis WA, Neill SD, O'Brien JJ, Hanna J, 1978. Isolation of spirillum-like organisms from pig fetuses. *Vet Rec* 102. <https://doi.org/10.1136/vr.102.5.106-a>.

Fernandez H, Villanueva MP, Mansilla I, Gonzalez M, Latif F, 2015. *Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in human, animals and food sources, in southern Chile. *Brazilian J Microbiol* 46. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120140095>.

Figueras MJ, Levican A, Pujol I, Ballester F, Quilez MJR, Gomez-Bertomeu F, 2014. A severe case of persistent diarrhoea associated with *Arcobacter cryaerophilus* but attributed to *Campylobacter* spp. and a review of the clinical incidence of *Arcobacter* spp. *New Microbes New Infect* 2. <https://doi.org/10.1002/2052-2975.35>.

González I, Fernández-Tomé S, García T, Martín R, 2014. Genus-specific PCR assay for screening *Arcobacter* spp. in chicken meat. *J Sci Food Agric* 94. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6401>.

Gözl G, Alter T, Bereswill S, Heimesaat MM, 2016. The Immunopathogenic potential of *Arcobacter butzleri* – lessons from

- a meta-analysis of murine infection studies. *PLoS One* 11, e0159685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159685>.
- Heimesaat MM, Karadas G, Alutis M, Fischer A, Kühl AA, Breithaupt A, Göbel UB, Alter T, Bereswill S, Götz G, 2015a. Survey of small intestinal and systemic immune responses following murine *Arcobacter butzleri* infection. *Gut Pathog*. <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0075-z>.
- Heimesaat MM, Karadas G, Fischer A, Göbel UB, Alter T, Bereswill S, Götz G, 2015b. Toll-like receptor-4 dependent small intestinal immune responses following murine *Arcobacter butzleri* infection. *Eur J Microbiol Immunol* 5. <https://doi.org/10.1556/1886.2015.00042>.
- Ho HTK, Lipman LJA, Hendriks HGCM, Tooten PCJ, Ultee T, Gastra W, 2007. Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00230.x>.
- Ho TKH, Lipman LJA, Van Der Graaf-Van Bloois L, Van Bergen M, Gastra W, 2006. Potential routes of acquisition of *Arcobacter* species by piglets. *Vet Microbiol* 114, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.051>.
- Houf K, On SLW, Coenye T, Debruyne L, De Smet S, Vandamme P, 2009. *Arcobacter theirus* sp. nov., isolated from pigs and ducks. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2599–2604. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.006650-0>.
- Kim NH, Park SM, Kim HW, Cho TJ, Kim SH, Choi C, Rhee MS, 2019. Prevalence of pathogenic *Arcobacter* species in South Korea: Comparison of two protocols for isolating the bacteria from foods and examination of nine putative virulence genes. *Food Microbiol* 78, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.008>.
- Lane DJ, 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York, pp 115–175.
- Marta C, Giovanni N, Angela M, Loredana C, Elisabetta B, Laura D, Anna M, Angela DP, Gianfranco S, Antonio P, 2020. Large genetic diversity of *Arcobacter butzleri* isolated from raw milk in Southern Italy. *Food Microbiol* 89, 103403. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103403>.
- Mohan HV, Rathore RS, Dhama K, Ramees TP, Patya A, Bagalko PS, Wani MY, Bhilegaonk KN, Kumar A, 2014. Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and foods of animal origin in India based on cultural isolation, antibiogram, PCR and multiplex PCR detection. *Asian J Anim Vet Adv* 9, 452–466. <https://doi.org/10.3923/ajava.2014.452.466>.
- Morita Y, Maruyama S, Kabeya H, Boonmar S, Nimsuphan B, Nagai A, Kozawa K, Nakajima T, Mikami T, Kimura H, 2004. Isolation and phylogenetic analysis of *Arcobacter* spp. in ground chicken meat and environmental water in Japan and Thailand. *Microbiol Immunol* 48, 527–533. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03548.x>.
- On SLW, Harrington CS, Atabay HI, 2003. Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces. *J Appl Microbiol* 95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02100.x>.
- On SLW, Jensen TK, Bille-Hansen V, Jorsal SE, Vandamme P, 2002. Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark. *Vet Microbiol* 85, 159–167. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00503-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00503-X).
- On SLW, Stacey A, Smyth J, 1995. Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. *J Infect* 31, 225–227. [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(95\)80031-X](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(95)80031-X).
- Open-Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version 3.01, 2013. [Cited 2018 June 20]. Available from: https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm.
- Patyal A, Rathore RS, Mohan HV, Dhama K, Kumar A, 2011. Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and foods of animal origin including sea food from India. *Transbound Emerg Dis*. 58(5), 402–410. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01221.x>
- Phasipol P, Chokesajjawatee N, Luangtongkum T, 2013. Comparison of repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for genetic characterization of *Arcobacter* spp. *Thai J Vet Med* 43, 307–311.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR, 2004. *Clinical Veterinary Microbiology*. Spain: Grafos, S.A. Arte Sobre Papel.
- Ramees TP, Dhama K, Karthik K, Rathore RS, Kumar A, Saminathan M, Tiwari R, Malik YS, Singh RK, 2017. *Arcobacter*: An emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control - A comprehensive review. *Vet Q* 37, 136–161. <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1323355>.
- Ramees TP, Rathore RS, Bagalkot PS, Mohan HV, Kumar A, Dhama K, 2014. Detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* in clinical samples of humans and foods of animal origin by cultural and multiplex PCR based methods. *Asian J Anim Vet Adv* 9. <https://doi.org/10.3923/ajava.2014.243.252>.
- Schroeder-Tucker L, Wesley IV, Kiehlauch JA, Larson DJ, Thomas LA, Erickson GA, 1996. Phenotypic and ribosomal RNA characterization of *Arcobacter* species isolated from porcine aborted fetuses. *J Vet Diagnostic Investig* 8. <https://doi.org/10.1177/104063879600800208>.
- Soma Sekhar M, Tumati SR, Chinnam BK, Kothapalli VS, Sharif

- NM, 2018. Occurrence of *Arcobacter* species in animal faeces, foods of animal origin and humans in Andhra Pradesh, India. *Indian J Anim Res* 52, 1649–1653. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-3402>.
- Suarez DL, Wesley IV, Larson DJ, 1997. Detection of *Arcobacter* species in gastric samples from swine. *Vet Microbiol* 57, 325–336. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00107-7).
- Van Driessche E, Houf K, Vangroenweghe F, Nollet N, De Zutter L, Vandamme P, Van Hoof J, 2004. Occurrence and strain diversity of *Arcobacter* species isolated from healthy Belgian pigs. *Res Microbiol* 155, 662–666. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.011>.
- Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R, De Ley J, 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 41, 88–103. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-1-88>.
- Vandamme P, Vancanneyt M, Pot B, Mels L, Hoste B, Dewettinck D, Vlaes L, Van den Borre C, Higgins R, Hommez J, Kersters K, Butzler JP, Goossens H, 1992. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int J Syst Bacteriol* 42, 344–356. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-3-344>.
- Verma M, Joshi N, Rathore RS, Mohan HV, 2015. Detection of *Arcobacter* spp in poultry, pigs, their meat and environment samples by conventional and PCR assays. *Indian J Anim Sci* 85. <https://epubs.icar.org.in/index.php/IJAnS/article/view/51694/21849>.
- Vicente-Martins S, Oleastro M, Domingues FC, Ferreira S, 2018. *Arcobacter* spp. at retail food from Portugal: Prevalence, genotyping and antibiotics resistance. *Food Control*. 85, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.024>
- Vindigni SM, Srijan A, Wongstitwilairoong B, Marcus R, Meek J, Riley PL, Mason C, 2007. Prevalence of foodborne microorganisms in retail foods in Thailand. *Foodborne Pathog Dis* 4. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.0077>.
- Wesley I V, Baetz AL, Larson DJ, 1996. Infection of cesarean-derived colostrum-deprived 1-day-old piglets with *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii*. *Infect. Immun.* 64(6), 2295–2299. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.2295-2299.1996>.
- Yamauchi Y, Uehara Y, Boutin S, Yamamoto N, Kuwahara-arai K, Kirikae T, Hiramatsu K, Zimmermann S, 2020. Detection of *Arcobacter* species in human stool samples by culture and real-time PCR. *Juntendo Med J* 66, 431–438. <https://>