

การใช้ biotinylated labelling probe เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ

Mycoplasma columborale ในนกพิราบ โดยวิวี*in situ* hybridization

พัชรี ทองคำคูณ* เจษฎา รัตนโณภาส

ณัฐริกา รัตนพันธุ์ วรรณญา ดั่งสอาด

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติกรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กทม.

*ผู้รับผิดชอบบทความ: โทร.02 5798909 โทรสาร 02 5798919 อีเมล: thongkamkoon@msn.com

บทคัดย่อ

Mycoplasma columborale เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ทั้งในนกพิราบสุขภาพดีและนกป่วยที่แสดงอาการในระบบทางเดินหายใจและเยื่อตาอักเสบ ฟาร์มนกพิราบแห่งหนึ่งในจังหวัดสมุทรปราการเลี้ยงนกจำนวน 150 ตัว พบว่าลูกนกพิราบอายุประมาณ 2 เดือน จำนวน 7 ตัว มีน้ำมูกสีเหลืองไหลออกจากช่องจมูก และถ่ายเหลวเป็นน้ำ ทำการผ่าซากนกพิราบ 2 ตัว ที่ตายหลังจากแสดงอาการได้เพียงหนึ่งวัน ลักษณะรอยโรคจากการดูด้วยตาเปล่าพบเยื่อหุ้มหัวใจหนา ไตขยายใหญ่ ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าไตมีการอักเสบแบบ granuloma (granulomatous nephritis) ม้ามพบเลือดคั่งอย่างรุนแรง พร้อมกับการเสื่อมและลดจำนวนลงของเซลล์เนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid depletion) เมื่อนำปอดมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษพบเชื้อ *Mycoplasma* spp. นำ 16S rRNA gene ของเชื้อที่เพาะแยกได้มาทำการหาลำดับเบส ผลสรุปยืนยันว่าเป็นเชื้อ *M. columborale* และเป็นการพบครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งมีการและรอยโรคแตกต่างจากที่เคยมีการรายงานมาก่อน ด้วยเหตุนี้จึงได้พัฒนา biotinylated labelling probe จาก RNA polymerase gene ของเชื้อ *M. columborale* ขึ้น เพื่อยืนยันว่ารอยโรคข้างต้นเกิดจากเชื้อนี้จริง จึงใช้เทคนิค *in situ* hybridization ผลการตรวจโดยใช้เทคนิคนี้ พบว่าการแพร่กระจายของเชื้อ *M. columborale* ไปกับเซลล์เม็ดเลือดขาว (phagocytic cells) ที่อยู่ในม้ามและไตของนกพิราบ โดยตำแหน่งของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อในม้ามจะอยู่ใกล้กับเส้นเลือด splenic artery บ่งชี้ว่าเชื้อสามารถแพร่กระจายและก่อให้เกิดภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ได้ ส่วนการแพร่กระจายของเชื้อ *M. columborale* ที่ไต ส่งผลให้ร่างกายเกิดการสร้าง fibrous tissue ขึ้นมาห่อหุ้ม ส่วนการติดเชื้อผ่านกระแสเลือด แสดงให้เห็นว่าในอนาคตอาจใช้เทคนิค PCR ตรวจหา DNA ของเชื้อจากเลือดนกพิราบที่ป่วยด้วยโรคนี้ได้ ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งจะช่วยให้รักษาได้ทันเวลาที่ ลดการแพร่กระจายของเชื้อและการสูญเสียทางเศรษฐกิจในฟาร์มนกพิราบได้

คำสำคัญ: *Mycoplasma columborale*, biotinylated labelling probe, *in situ* hybridization, นกพิราบ

บทนำ

ปัจจุบันการทำฟาร์มนกพิราบมีวัตถุประสงค์เพื่อการบริโภค ขยายพันธุ์ การกีฬา และเลี้ยงไว้ดูเล่น การเลี้ยงนกพิราบให้มีสุขภาพดีปราศจากโรคจึงเป็นหัวใจของความสำเร็จ ลูกนกที่ดีควรมีขนตาแจ่มใส ขนอ่อนและขนตามตัวหนา ขนปีกขึ้นดีและเรียงตัวปกติ สถานที่เลี้ยงนกพิราบควรโปร่ง สว่างได้รับแสงแดด ในเวลาเช้า ไม่ชื้นแฉะ สะอาด และไม่เลี้ยงจนแออัด ซึ่งจะทำให้นกไม่เสี่ยงต่อการติดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคในระบบทางเดินหายใจ ซึ่งมีหลายโรคที่พบได้ในนกพิราบ เช่น Ammonia toxicosis, Chlamydiosis, Mycoplasmosis, Pigeon pox, Pigeon herpesvirus, Parasitic rhinitis และ Trichomoniasis เป็นต้น (Doneley, 2008)

Mycoplasma เป็นเชื้อแบคทีเรีย จัดอยู่ใน Class Mollicutes ซึ่งหมายถึงมีผิวอ่อนนุ่ม เนื่องจากเชื้อไม่มีผนังเซลล์ พบเชื้อมูลนี้ครั้งแรกในโค เรียกว่า pleuropneumonia-like โดยก่อโรค contagious pleuropneumonia (Nascimento et al., 2005) ส่วน mycoplasma ในสัตว์ปีกพบครั้งแรกในไก่วง ปี 1926 โดยก่อโรคทางเดินหายใจอักเสบเรื้อรัง (chronic respiratory disease, CRD) และต่อมาพบในไก่ ปี 1936 (Charlton et al., 1996) ซึ่งภายหลังได้ชื่อว่า *Mycoplasma gallisepticum* (MG) (Yoder Jr., 1991) เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ คือ MG ที่ก่อโรค CRD รวมทั้ง *Mycoplasma synoviae* (MS) ทำให้เกิดข้ออักเสบ (Kleven, 1997) และ *M. meleagridis* ทำให้เกิดถุงลมอักเสบในไก่วง แต่ไม่ก่อโรคในไก่ (Yamamoto, 1991) ส่วนเชื้อ *M. columborale* และ *M. columbinum* พบได้ครั้งแรกจากตัวอย่างหลอดลม และ oropharynx ของนกพิราบสุขภาพดี โดย Shimizu et al. (1978) แต่ยังไม่มีการศึกษาการก่อโรคของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ ในขณะที่ Keymer et al. (1984) แยกเชื้อ *M. columbinum*, *M. columborale* และ *M. columbinasale* ได้จากนกพิราบแข่ง (*Columba livia*) ทั้งในนกปกติและนกที่ป่วยด้วยอาการของโรคทางเดินหายใจ ทำให้สงสัยว่าเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุของโรคได้ แต่ก็ยังไม่มีการพิสูจน์ยืนยันอย่างแน่ชัด อย่างไรก็ตามมีการทดลองในไก่ปลอดเชื้อ (specific pathogenic free) พบว่าเชื้อ *M. columborale* ทำให้เกิดโรคถุงลมอักเสบในไก่ได้ (Macowan et al., 1981) นอกจากนี้ Loria et al. (2005) รายงานการเกิดโรคในฟาร์มนกพิราบแห่งหนึ่ง จำนวน 320 ตัว มีอัตราการป่วยและตายประมาณ 10% และ 3% ตามลำดับ นกแสดงอาการตาอักเสบ รุนแรงหายใจลำบาก และยังพบนกป่วยมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งจากการเพาะแยกเชื้อ พบ *M. columborale* จากนกพิราบ 20 ตัว โดยที่นกตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยยาไทโลซินและอิริโทรมัยซิน จึงเป็นหลักฐานการก่อโรคของเชื้อนี้ในนกพิราบได้ในระดับหนึ่ง

รายงานนี้มีวัตถุประสงค์ยืนยันการติดเชื้อ *M. columborale* ในนกพิราบที่ป่วยและตายด้วยอาการของระบบทางเดินหายใจและทางเดินอาหาร โดยพัฒนา biotinylated labelling probe จาก RNA polymerase gene ของเชื้อ *M. columborale* ขึ้น เพื่อทำการตรวจติดตามและวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยา โดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization ตลอดจนเป็นการแสดงข้อมูลการเกิดโรค อาการ และรอยโรคที่พบ

เพื่อให้สัตวแพทย์ ผู้เลี้ยง ตลอดจนเจ้าของฟาร์มนกพิราบได้รับทราบและตระหนักว่า *M. columborale* เป็นเชื้อก่อโรคอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ควรมองข้าม ซึ่งห้องปฏิบัติการสามารถตรวจวินิจฉัย เพื่อทำการรักษาให้ทัน่วงที่ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

ประวัติสัตว์

ฟาร์มนกพิราบแห่งหนึ่งในจังหวัดสมุทรปราการ เลี้ยงนกจำนวน 150 ตัว ในกรงรวมขนาดใหญ่ ให้อาหารประเภทข้าวเปลือก ข้าวโพดและถั่วชนิดต่างๆ พบว่าลูกนกพิราบอายุประมาณ 2 เดือน จำนวน 7 ตัว แสดงอาการป่วยในระบบทางเดินหายใจ นกพิราบ 2 ตัวตายหลังจากที่เริ่มสังเกตเห็นอาการ จึงส่งซากนกมาที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเพื่อทำการชันสูตรโรค

การตรวจทางพยาธิวิทยาไวรัสวิทยาและปรสิตวิทยา

ตรวจดูรอยโรคภายนอกด้วยตาเปล่า (external examination) แล้วทำการผ่าซากเพื่อตรวจดูรอยโรคที่อวัยวะภายใน (internal examination) ได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต และลำไส้ทุกส่วนรวมทั้งสมอง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างแช่ใน 10% neutral buffered formalin แล้วนำมาผ่านกระบวนการมาตรฐานทางพยาธิวิทยา และฝังชิ้นเนื้อเยื่อในพาราฟิน จากนั้นตัดให้มีความหนาประมาณ 3 ไมครอน เพื่อทำเป็นสไลด์เนื้อเยื่อ จากนั้นย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธีของ Luna (1968) แล้วจึงนำสไลด์ไปตรวจหารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

นอกจากนี้ได้เก็บตัวอย่างอวัยวะต่างๆ ช่างต้น ส่งตรวจทาง 1) แบคทีเรียวิทยาเพื่อเพาะแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุ 2) ไวรัสวิทยาเพื่อแยกเชื้อไวรัสใช้หลอดนกและนิวคาสเซิล โดยวิธีฉีดไข่ไก่ฟัก และ 3) ปรสิตวิทยาเพื่อตรวจหาไข่พยาธิและ coccidian oocyst โดยวิธี flotation และ scraping

การทดสอบทางแบคทีเรียวิทยา

ทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค chlamydia และ mycoplasma โดยดำเนินการ 1) เพาะเชื้อจากตัวอย่างอวัยวะต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 7% defibrinated sheep blood agar (SBA) และ MacConkey agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วตรวจหาโคโลนีที่สงสัยเป็นเชื้อก่อโรค 2) สกัด DNA จากอวัยวะเพื่อตรวจหาเชื้อ *Chlamydia* spp. โดยวิธี PCR (Pudjiatmoko et al., 1997) 3) นำตัวอย่างปอดมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Frey broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 48-72 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาเชื้อ mycoplasma เลือกลำดับเบสของ 16S rRNA gene

การพิสูจน์เชื้อโดยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene

สกัด DNA (Kobayashi et al., 1996) จากเชื้อ mycoplasma ที่เพาะแยกได้จาก modified Frey agar วิธีการโดยย่อ คือ เชื้อ mycoplasma จำนวน 1 โคโลนี ลงใน modified Frey broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48-72 ชั่วโมง เมื่อเจริญดีแล้ว ให้นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบ นาน 10 นาที ล้างตะกอนเชื้อด้วย phosphate buffered saline (PBS) 2 ครั้ง แล้วละลายตะกอนเชื้อด้วย lysis solution (100 mM Tris-HCl, pH 8.9, 1.5 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 0.05% BSA, 0.1% Triton X-100, 0.45% Nonidet P-40, 0.45% Tween 20, Proteinase K 200 µg/ml และ 0.5% CHAPS) ปริมาณ 200 µl นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้ DNA บริสุทธิ์ โดยวิธี phenol-chloroform extraction (Ausubel et al., 1990) ตกตะกอน DNA ด้วย ethanol แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 100 µl จากนั้นเก็บที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้เป็น DNA template

นำ DNA template ข้างต้น มาทดสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ 16S rRNA universal primers สำหรับเชื้อ mycoplasma จำนวน 2 คู่ (Lauerman, 1998) คือ primers fd1AF: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG 3' และ GP3R: 5' CGC TTG CAA CCT ATG TAT TAC 3' จะได้ PCR product ขนาด 546 bp ส่วน primers คู่ที่ 2 คือ GP3F: 5' AAG YAA CGR CTA ATG TGC 3' และ GP7R: 5' GCG CTC GTT GCR GGA CTT AAC 3' จะได้ PCR product ขนาด 617 bp ดังนี้ เตรียม Go Taq[®] Green Master Mix (Promega, USA) ปริมาณตัวอย่างละ 25 µl เติม forward และ reverse primer อย่างละ 0.8 µM แล้วใส่ DNA template ตัวอย่างละ 6 µl และ DNase RNase-free water ให้มีปริมาตรรวม 50 µl ต่อ 1 ตัวอย่าง นำเข้าเครื่อง thermal cycler (Bio-Rad, USA) ตั้งโปรแกรมการทดสอบดังนี้ preheating ที่ 95°C นาน 15 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 94°C นาน 45 วินาที, annealing ที่ 55°C นาน 45 วินาที, extension ที่ 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 30 รอบ ตามด้วย final extension ที่ 72°C นาน 5 นาที เสร็จแล้วนำ PCR product ทั้งหมดผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose ที่ 100 volt นาน 30 นาที ตัดเจลตรงส่วนที่มี PCR product นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAquick gel extraction Kit (QIAGEN, Germany) จากนั้นนำมาทดสอบด้วยวิธี sequence reaction ด้วยสาร Big Dye terminator cycle kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต ทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้ ZR DNA sequencing clean up kit (Zymo Research, USA) จากนั้นละลายด้วย Hi Di formamide (Applied Biosystems, USA) ปริมาตร 15 µl และนำเข้าเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (ABI 3130 Genetic Analyzer, USA) นำผลที่ได้มาจัดเรียงลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม Free internet download MEGA 5 ตรวจชนิดของเชื้อด้วยโปรแกรม BLAST ใน GenBank

การพัฒนา biotinylated labelling probe

ทำการออกแบบ primers จาก RNA polymerase gene ของเชื้อ *M. columborale* strain 18303 (Accession number EU833964) ดังนี้ forward primer: 5'CCT GGT GGT CTT AAC CGT GAT 3'(nt55-nt75) และ reverse primer: 5'GAA CAG CTT GAC GTT GCA TGT 3' (nt526-nt505) นำมาทดสอบด้วยวิธี PCR ปริมาตร 25 µl โดยให้ nuclease-free water 15.15 µl, 50 ng DNA template 5 µl, 10 mM dNTPs mix 0.5 µl, 50 mM MgCl₂ 0.75 µl, 10x PCR buffer 2.5 µl, 10 pmol forward และ reverse primers อย่างละ 0.5 µl และ platinum Taq polymerase (Invitrogen, USA) 0.1 µl นำเข้าเครื่อง thermal cycler (Bio-Rad, USA) โดยใช้โปรแกรมดังนี้ initial denature 94°C 2 นาที ตามด้วย denaturation 94°C 30 วินาที annealing 58°C 30 วินาที และ extension 72°C 90 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension 72°C 5 นาที โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ ได้ PCR product ขนาด 472 bp และเตรียม probe โดยการทำให้ PCR reaction ดังนี้ 10 pmol forward และ reverse อย่างละ 1µl, 10x PCR labelling buffer 2 µl, biotin PCR labelling mix 2 µl, DNA template 5 µl, Taq polymerase (Jena Bioscience®, Germany) 0.5 µl และ nuclease-free water 8.5 µl นำเข้าเครื่อง thermal cycler ตามโปรแกรมเดิม ทำการวิเคราะห์ PCR product และ probe ด้วย 1% agarose gel electrophoresis แล้วจึงนำ biotinylated labelling probe ที่ได้มาใช้ตรวจด้วยวิธี *in situ* hybridization

In situ hybridization

นำบล็อกรพาราฟินที่ฝังชิ้นเนื้อของนกพิราบตัดให้มีขนาด 3 ไมครอน วางบน positive slide บ่มที่ 60°C นาน 30 นาที แล้วนำไปผ่านขั้นตอน deparaffinization ด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที rehydration ด้วย absolute ethanol 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตามด้วย 95% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และ Diethylpyrocarbonate (DEPC) water 5 นาที ต่อกันนั้นย่อยโปรตีนเพื่อเปิด epitopes บนสไลด์ด้วย proteinase K (ready to use) (DAKO™, Denmark) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย DEPC water 5 นาที แล้วแช่ใน 0.3% hydrogen peroxide ใน methanol นาน 20 นาที เพื่อกำจัด peroxidase แล้วล้างด้วย DEPC water 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นทำการ prehybridization ด้วย biotinylated probe (500 ng/slide) ใน hybridization buffer (Enzo®, USA), codenaturation ที่ 95°C นาน 10 นาที ในเครื่อง Hybridizer (DAKO™, Denmark) และ hybridized ที่ 42°C นาน 16 ชั่วโมง ทำการ detection slides โดยล้างด้วย 2x saline-sodium citrate buffer (SSC), 1x SSC และ 0.5x SSC ที่ 42°C อย่างละ 5 นาที ตามลำดับ แล้วล้าง slide ใน Tris buffered saline ที่มี 0.05% Tween 20 (TBST) 5 นาที แล้วบล็อกโปรตีนในเนื้อเยื่อด้วย 3% normal horse serum 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยด streptavidin-HRP solution (DAKO™, Denmark) บ่มนาน 15 นาที ล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นหยด biotin บ่มนาน 15 นาที ล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วหยด 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) 3-5 นาที

เพื่อให้เกิดสี จากนั้นล้างด้วยน้ำ และย้อมทับด้วยสี hematoxylin จากนั้นนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อเปรียบเทียบผลระหว่างตัวอย่างเดียวกันที่ไม่ได้ใส่ probe และตัวอย่างควบคุมลบที่เป็นเนื้อเยื่ออวัยวะของนกพิราบปกติ

ผล

ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยา

รอยโรคจากการสำรวจด้วยตาเปล่า พบว่านกพิราบทั้งสองตัวมีน้ำมูกสีเหลืองในช่องจมูก อุจจาระเหลวเป็นน้ำในลำไส้ใหญ่ นกพิราบ 1 ตัว ไตขยายใหญ่ และถุงหุ้มหัวใจหนาตัว (Fig. 1)

รอยโรคจากการสำรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบหยาบการอักเสบแบบ granuloma ที่ไต เลือดคั่งและ lymphoid depletion ที่ม้ามในนกพิราบทั้งสองตัว (Fig. 2)

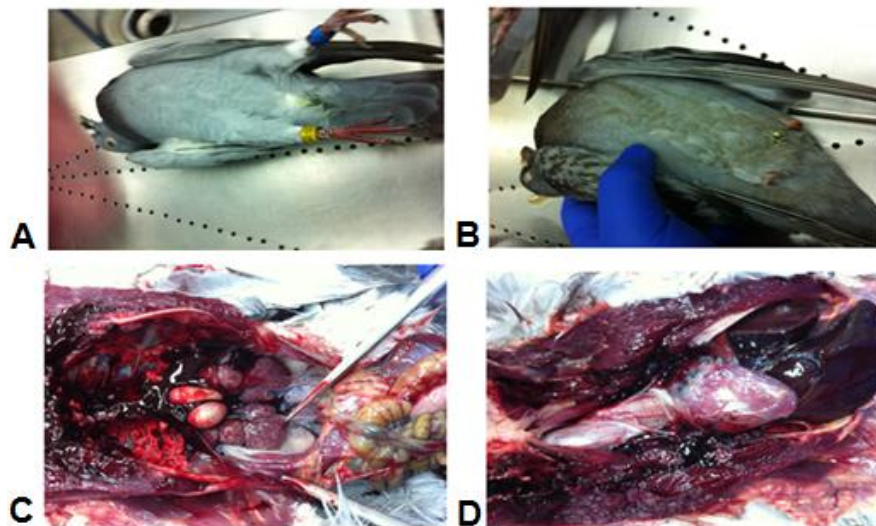


Figure 1. Necropsy findings of the affected pigeon: A, feather surrounding cloaca stained with watery feces; B, drops of mucous nasal discharge; C, enlarge kidneys; D, thickening of pericardium

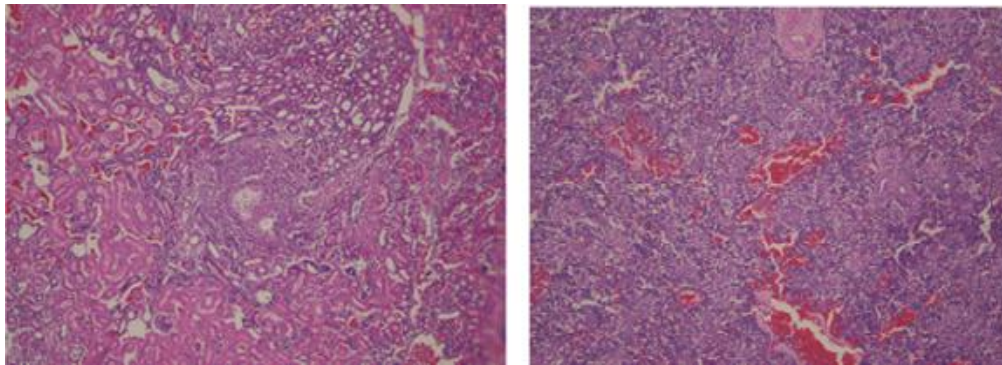


Figure 2. Histopathological examination showed focal granulomatous nephritis in kidneys (H&E 20x, left), severe congestion with lymphoid depletion in spleen (H&E 20x, right)

ผลการทดสอบทางไวรัสวิทยาและปรสิตวิทยา

การทดสอบทางไวรัสวิทยาไม่พบเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและไวรัสนิวคาสเซิล ส่วนการทดสอบทางปรสิตวิทยาพบปล้องของพยาธิตัวตืดในลำไส้เล็กพืราบหนึ่งตัว

ผลการทดสอบทางแบคทีเรียวิทยา

ไม่พบ DNA ของเชื้อ *Chlamydia* spp. โดยวิธี PCR รวมทั้งไม่พบเชื้อแบคทีเรียทั่วไปจากการเพาะบน SBA และ MacConkey agar แต่พบโคโลนีที่มีลักษณะรูปร่างคล้ายไข่ดาว (fried egg shape) ของเชื้อ *Mycoplasma* spp. บนอาหาร modified Frey agar (Fig. 3) จากตัวอย่างปอดของนกพืราบทั้งสองตัว จึงทำการพิสูจน์ชนิดของเชื้อโดยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene ต่อไป

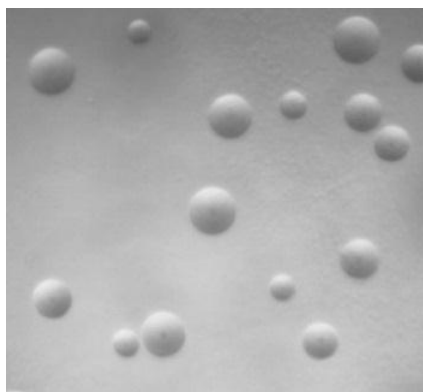


Figure 3. Growth of “fried egg” colonies, a typical colony of mycoplasma, on modified Frey agar

ผลการหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene ของเชื้อ mycoplasma

ผลการจัดเรียงลำดับเบส (multi-alignment) ของ sequence reaction ที่ใช้ primers รวม 4 สาย ด้วยโปรแกรม MEGA 5 อ่านผลได้เป็น partial sequence ของ 16S rRNA gene ขนาด 1,046 bp และเมื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อด้วยโปรแกรม BLAST ใน GenBank พบว่าเชื้อที่เพาะได้คือ *Mycoplasma columborale* เนื่องจากมีลำดับเบส 97% ของเชื้อที่แยกได้ตรงกับเชื้อ *M. columborale* strain 18303 (1,022/1,022) หรือ 100% identities ตามที่แสดงลำดับเบสใน Fig. 4

```

Query 25 AACGCTGGCTGTGTGCCTAATACATGCATGTCGAGCGGAGTTCTTTAGAACTTAGCGGC 84
Sbjct 3 AACGCTGGCTGTGTGCCTAATACATGCATGTCGAGCGGAGTTCTTTAGAACTTAGCGGC 62
Query 85 GAATGGGTGAGTAACACGTACTTAACGTGCCCTCTAGATTGGAATAACGCTGAGAAATTA 144
Sbjct 63 GAATGGGTGAGTAACACGTACTTAACGTGCCCTCTAGATTGGAATAACGCTGAGAAATTA 122
Query 145 GCGCTAATGCCGGATACCTTATTATTAACACATGTTGATAATATAAAGGAGCGTTTGCTT 204
Sbjct 123 GCGCTAATGCCGGATACCTTATTATTAACACATGTTGATAATATAAAGGAGCGTTTGCTT 182
Query 205 CACTAGAGGATCGGGGTGCGGAACATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCG 264
Sbjct 183 CACTAGAGGATCGGGGTGCGGAACATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCG 242
Query 265 ATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACTGAACCGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGCA 324
Sbjct 243 ATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACTGAACCGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGCA 302
Query 325 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGAGCGAAAGCTTGATGGAGCGAC 384
Sbjct 303 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGAGCGAAAGCTTGATGGAGCGAC 362
Query 385 ACAGCGTGCAGGATGACGGCCCTTCGGGTTGTAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAAAGCA 444
Sbjct 363 ACAGCGTGCAGGATGACGGCCCTTCGGGTTGTAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAAAGCA 422
Query 445 GTAGAGGAAATGCTATTGCCTTGACGGTACCTTGTGAGAAAGCAACGGCTAACTATGTGC 504
Sbjct 423 GTAGAGGAAATGCTATTGCCTTGACGGTACCTTGTGAGAAAGCAACGGCTAACTATGTGC 482
Query 505 CAGCAGCCGCGGTAAATACATAGGTTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGT 564
Sbjct 483 CAGCAGCCGCGGTAAATACATAGGTTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGT 542
Query 565 CTGTAGGTTGTTTGTAAAGTCTGGCGTCAAACTTGGGGCTCAACCCCAATCGCGTTGG 624
Sbjct 543 CTGTAGGTTGTTTGTAAAGTCTGGCGTCAAACTTGGGGCTCAACCCCAATCGCGTTGG 602
Query 625 ATACTGGCAACTAGAGTTATTAGAGGTTAATGGAATTCCTTGTGAAGCGGTGGAATGC 684
Sbjct 603 ATACTGGCAACTAGAGTTATTAGAGGTTAATGGAATTCCTTGTGAAGCGGTGGAATGC 662
Query 685 GTAGATATAAGGAAGAACACCAACATGGCGAAGGCAATTAAGTGGGAATACACTGACACT 744
Sbjct 663 GTAGATATAAGGAAGAACACCAACATGGCGAAGGCAATTAAGTGGGAATACACTGACACT 722
Query 745 GAGAGACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC 804
Sbjct 723 GAGAGACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC 782
Query 805 GATGATGATTAGCTGATGGACACCATCGGCGCAGCTAACGCATTAAATCATCCGCTGAG 864
Sbjct 783 GATGATGATTAGCTGATGGACACCATCGGCGCAGCTAACGCATTAAATCATCCGCTGAG 842
Query 865 TAGTATGCTCGCAAGAGTGAACTTAAAGGAATTGACGGGGATCCGCACAAGCGGTGGAG 924
Sbjct 843 TAGTATGCTCGCAAGAGTGAACTTAAAGGAATTGACGGGGATCCGCACAAGCGGTGGAG 902
Query 925 CATGTGGTTTAAATTTGAAGATACGGCTAGAACCTTACCCACTCTTGACATCTTCGCGAAA 984
Sbjct 903 CATGTGGTTTAAATTTGAAGATACGGCTAGAACCTTACCCACTCTTGACATCTTCGCGAAA 962
Query 985 GCTATAGAGATATAGTGGAGGTTAACGGAATGACAGATGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTC 1044
Sbjct 963 GCTATAGAGATATAGTGGAGGTTAACGGAATGACAGATGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTC 1022
Query 1045 GT 1046
Sbjct 1023 GT 1024

```

Figure 4. Partial sequence of 16S rRNA of mycoplasma isolate (Query) showed 100% identities (1022/1022) to 16S ribosomal RNA of *Mycoplasma columborale* strain 18303 accession number EU859977 (Subject) using program BLAST

ผลการออกแบบ primer และผลการผลิต biotinylated labelling probe

Primer ที่ออกแบบจาก RNA polymerase gene ของเชื้อ *M. columborale* strain 18303 (Accession number EU833964) สามารถใช้เพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อ *M. columborale* ที่เพาะแยกได้จากนกพิราบได้ พร้อมกันนั้นสามารถผลิต biotinylated labelling probe จาก DNA ของเชื้อ *M. columborale* ที่เพาะแยกได้จากนกพิราบได้เช่นเดียวกัน (Fig. 5)

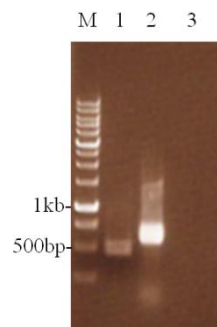


Figure 5. PCR amplification of RNA polymerase gene of *M. columborale* in 1% agarose: Lane M, 1 kb DNA ladder; Lane 1, PCR product size 472 bp; Lane 2, biotinylated PCR labelling probe; Lane 3, negative control

ผลการทดสอบด้วยวิธี *In situ* hybridization

จากการทดสอบด้วยวิธี *in situ* hybridization พบการติดสีน้ำตาลของปฏิกิริยา hybridization ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (phagocytic cells) ที่อวัยวะไตและม้าม แสดงถึงการแพร่กระจายของเชื้อ *M. columborale* ไปกับเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยตำแหน่งของเชื้อในม้ามอยู่ใกล้กับเส้นเลือด splenic artery (Fig. 6)

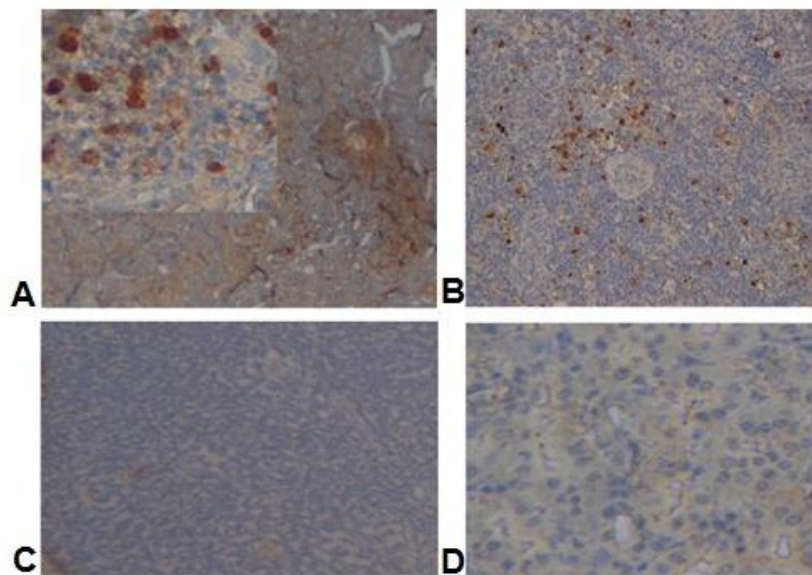


Figure 6. *In situ* hybridization results: A, *M. columborale* is localized in dark brown color. The enlarge picture (100x) demonstrates the agent is identified inside the infected cells causing granulomatous lesion in kidneys (20x); B, the pathogen in spleen mostly located nearby central artery (20x); C, negative control slide from normal pigeon (20x); D, positive slide without probe (20x)

วิจารณ์

จากผลการทดสอบทางไวรัสวิทยา และปรสิตวิทยา ไม่พบเชื้อไวรัสหรือปรสิตที่น่าจะเป็นสาเหตุของการตายครั้งนี้ในนกพิราบ และจากการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการตายของนกพิราบในฟาร์มรายนี้ ไม่พบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ยกเว้นการพบเชื้อ mycoplasma จากปอดของนกพิราบ 2 ตัว อย่างไรก็ตามการพิสูจน์เชื้อชนิดนี้ทางห้องปฏิบัติการโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำได้ถูกต้องและแม่นยำ เนื่องจากคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อไม่เด่นชัด หรือจำเพาะต่อสปีชีส์ของเชื้อ จำเป็นต้องใช้วิธีชีววิทยาโดยการทำปฏิกิริยาระหว่างเชื้อกับแอนติซีรัมที่จำเพาะ (Jordan, 1983) แต่เป็นข้อจำกัดของห้องปฏิบัติการที่ไม่มีแอนติซีรัมดังกล่าว การยืนยันเชื้อครั้งนี้จึงต้องใช้เทคนิคการหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene (Lauerman, 1998) และผลที่ได้เป็นเชื้อ *Mycoplasma columborale* ทำให้ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจากเชื้อนี้สามารถพบได้ในนกพิราบปกติ (Shimizu et al., 1978) แม้ว่า Keymer et al. (1984) จะเคยรายงานพบเชื้อนี้ในนกพิราบที่มีอาการในระบบทางเดินหายใจ แต่ผู้ศึกษามีได้ยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อกับอาการและรอยโรคในนกพิราบนั้น สำหรับอาการและรอยโรคที่พบในนกพิราบรายนี้คือ มีน้ำมูกสีเหลืองในช่องจมูก อุจจาระเหลวเป็นน้ำในลำไส้ใหญ่ ไตขยายใหญ่ และถุงหุ้มหัวใจหนาตัว ส่วนรอยโรคจากการสำรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบห่อหุ้มการอักเสบแบบ granuloma ที่ไต เลือดคั่งและ lymphoid depletion ที่ม้าม ซึ่งแตกต่างจากรายงานที่ผ่านมา กล่าวคือ เคยมีการศึกษาพบว่า *M. columborale* ทำให้เกิดรอยโรคถุงลมอักเสบในไก่ทอดลง (Macowan et al., 1981) อีกรายงานพบตาอักเสบรุนแรงและหายใจลำบากในนกพิราบ (Loria et al., 2005) จะเห็นว่าการรายงานที่ผ่านมา สัตว์ที่ติดเชื้อมีลักษณะอาการน้อยกว่าและแตกต่างจากการพบในครั้งนี้

การที่ยังไม่มีรายงานโรคติดเชื้อ *M. columborale* ที่ก่อให้เกิดภาวะดังกล่าวข้างต้นเช่นเดียวกับในนกพิราบฝูงนี้ ทำให้คณะผู้วิจัยต้องยืนยันรอยโรคที่พบโดยเทคนิค *in situ* hybridization เริ่มจากออกแบบ primer ของ RNA polymerase gene ของเชื้อ *M. columborale* ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี PCR พบว่าสามารถผลิต biotinylated labelling probe จาก DNA ของเชื้อนี้ที่แยกจากนกพิราบได้ นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่ง probe ที่มีขนาด 472 bp นี้มีความจำเพาะกับเชื้อ *M. columborale* เท่านั้น โดยที่พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อ *M. gallinaceum* เพียง 86% โดย program BLAST (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทั้งนี้ผลของ *in situ* hybridization ที่ม้ามและไต ชี้ให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อไปกับ phagocytic cells ซึ่งเป็นเซลล์หลักในการกำจัดเชื้อ และตำแหน่งของเชื้อในม้ามที่ระบุใกล้กับเส้นเลือด splenic artery บ่งถึงลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดภาวะ septicemia ได้ ซึ่งภาวะดังกล่าวอาจส่งผลให้เกิดการอักเสบทั่วร่างกายได้ (Klasing, 1991) นอกจากนี้ยังทำให้ทราบว่า รอยโรคที่พบที่ไตนั้นเกิดจากเซลล์มีการติดเชื้อ *M. columborale* ทำให้ร่างกายของนกพิราบสร้าง fibrous tissue ขึ้นมาห่อหุ้ม เพื่อไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าการติดเชื้อ *M. columborale* เป็นสาเหตุของโรคในนกพิราบรายนี้ ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ลงข้อมูลการจัดเรียงลำดับเบสของเชื้อนี้ไว้แล้ว ในฐานข้อมูลของ GenBank (*M.*

columborale strain 111021-57, accession no. KP698750) เพื่อเป็นประโยชน์ในการอ้างอิงต่อไป การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ อย่างไรก็ตามมีข้อมูลว่ายาต้านจุลชีพที่ให้ผลดีต่อการรักษาคือไทโลซินและอิริโทรมัยซิน (Loria et al., 2005)

นอกจากนี้กลไกการเกิดโรคที่สัมพันธ์กับลักษณะอาการที่แสดงออกจากการติดเชื้อ *M. columborale* นี้ ทำให้ทราบว่าเมื่อต้องการวินิจฉัยโรคชนิดนี้ในฝูงนกพิราบหรือตัวป่วย อาจทำได้โดยการใช้เทคนิค PCR กับตัวอย่างเลือดของตัวป่วย โดยไม่จำเป็นต้องทำการวินิจฉัยจากซาก หรือทำเมตตามาต ซึ่งก่อให้เกิดการรักษาที่ทันทั่วถึง ลดการแพร่กระจายของเชื้อภายในฟาร์มของนกพิราบ ทำให้ลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจในฟาร์มที่เลี้ยงนกพิราบเพื่อการแข่งขัน หรือบริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณตลวัฐส์ สี่ปู้ ที่ช่วยงานในห้องปฏิบัติการในการพิสูจน์เชื้อด้านชีวโมเลกุล และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มแบคทีเรียวิทยา และกลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้งานนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Charlton, B.R., Bermudez, A.J., Boulianne, M., Eckroade, R.J., Jeffrey, J.S., Newman, L.J., Sander, J.E. and Wakenell, P.S. 1996. In: Avian disease manual. Edited by B.R. Charlton. American Association of Avian Pathologists. Kennett Square, Pennsylvania, U.S.A. p. 115-125.
- Doneley, B. 2008. Pigeons: Respiratory disease. In: BSAVA Manual of raptors, pigeons and passerine birds. Edited by J. Chitly and M. Lierz. British Small Animal Veterinary Association, U.K. p. 320-327.
- Jordan, F.T.W. 1983. Recovery and identification of avian mycoplasmas. In: Methods in Mycoplasmaology. Vol. 2 Diagnostic mycoplasmaology. Edited by J.G. Tully and S. Razin. Academic Press, New York, U.S.A. p. 69-80.
- Keymer, I.F., Leach, R.H., Clarke, R.A., Bardsley, M.E. and McIntyre, R.R. 1984. Isolation of *Mycoplasma* spp. from racing pigeons (*Columba livia*). Avian Pathol. 13(1): 65-74.
- Klasing, C.K. 1991. Avian Inflammatory Response: Mediation by Macrophages. Poult. Sci. 70(5): 1176-1186.
- Kleven, S.H. 1997. *Mycoplasma synoviae* infection. In: Diseases of poultry. Edited by B.W. Calnek, H.J. Burnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. p. 220-228.

- Kobayashi, H., Munthali, G., Miyamoto, C., Morozumi, T., Mitani, K., Ito, N., Shiono, H. and Yamamoto, K. 1996. A simple preparation of mycoplasmal DNA template for PCR from biological samples using effective surfactants. J. Vet. Med. Sci. 58(5): 477-479.
- Lauerman, L.L. 1998. Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases. Library of Congress. U.S.A. 152 p.
- Loria, G.R., Tamburello, A., Liga, F., Lawes, J. and Nicholas, R. A. J. 2005. Isolation of mycoplasmas from pigeons suffering eye lesions and respiratory disease. Vet. Rec. 157: 664-665.
- Luna, L.G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Arm Forces Institute of Pathology. 3rd ed., McGraw-Hill Inc. New York, U.S.A. 217 p.
- Macowan, K.J., Jones, H.G., Randall, C.J. and Jordan, F.T. 1981. *Mycoplasma columborale* in a respiratory condition of pigeons and experimental sacculitis of chickens. Vet. Rec. 109: 562.
- Tmoko, P., Fukushi, H., Yamaguchi, T. and Hirai, K. 1997. Phylogenetic analysis of the genus Chlamydia based on 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 47(2): 425-431.
- Nascimento, E.R., Pereira, V.L.A., Nascimento, M.G.F. and Barreto, M.L. 2005. Avian Mycoplasmosis Update. Brazilian J. Poultry Sci. 7(1): 1-9.
- Shimizu, T., Erno, H. and Nagatomo, H. 1978. Isolation and characterization of *Mycoplasma columbinum* and *Mycoplasma columborale*, two new species from pigeons. Int. J. Syst. Bacteriol. 28(4): 538-546.
- Yamamoto, R. 1991. *Mycoplasma meleagridis* infection. In: Diseases of poultry. Edited by B.W. Calnek, H.J. Burnes, C.W. Beard and H.W. Yoder Jr. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. p. 212-223.
- Yoder Jr., H.W. 1991. Mycoplasmosis. In: Diseases of poultry. Edited by B.W. Calnek, H.J. Burnes, C.W. Beard and H.W. Yoder Jr. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. p. 196-198.

Application of biotinylated labelling probe for identification of *Mycoplasma columborale* infection in pigeon by *in situ* hybridization

Pacharee Thongkamkoon* Jadsada Ratthanophart

Natthika Ratanapan Warunya Duangsa-ad

National Institute of Animal Health, Kasetklang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok.

* Corresponding author: Tel. 02 5798909 Fax. 02 5798919 email: thongkamkoon@msn.com

Abstract

Mycoplasma columborale can be isolated from both healthy pigeons and clinically diseased pigeons with respiratory signs and conjunctivitis. Seven out of 150 pigeons aged 2 months old which raised in pigeon farm in Samutprakarn showed yellowish mucous nasal discharge and watery diarrhea. Post-mortem examination was performed in two pigeons which died after showing clinical signs for only one day. The macroscopic lesions were thickening of pericardium and kidneys enlargement. Histopathological findings were focal granulomatous nephritis and severe congestion with lymphoid depletion in spleen. *Mycoplasma* spp. was grown on its specific agar medium and confirmed as *M. columborale*, by sequencing of 16S rRNA gene, which was the first finding in Thailand. However, clinical signs and lesions found in pigeons were different from the previous reports elsewhere. Therefore, biotinylated labelling probe was developed from RNA polymerase gene of *M. columborale* and brought to localize the causative agent in tissue section and to confirm the histopathological lesions of the disease by *in situ* hybridization. The results of *in situ* hybridization demonstrated infiltration of *M. columborale* infected phagocytic cells in the spleen and kidneys of the pigeons. In addition, the pathogen mostly localized nearby central artery indicated that the distribution of this agent via blood vessels was the causing of septicemia. Lesion in kidneys indicated host response by production of fibrous tissue surrounding infected cells. Moreover, from this finding, we suggested that a diagnosis for this causative agent might be performed by PCR technique from blood sample of pigeons demonstrating clinical sign. This could facilitate the rapid treatment and decrease the economic losses from the disease in the future.

Keywords: *Mycoplasma columborale*, biotinylated labelling probe, *in situ* hybridization, pigeon