

การตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium bovis* โดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization ในอวัยวะของกระบือ

ลัทธนา รามริน* นิตยา ศรีแก้วเขียว เรขา คณิตพันธ์ เจษฎา รัตโนภาส

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรควัวโรคนโคและกระบือ (bovine tuberculosis) สามารถพบการติดเชื้อได้ทั้งในปศุสัตว์ สัตว์ป่า และคน ในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรควัวโรคนโคและกระบืออย่างต่อเนื่อง อาการของโรคส่วนใหญ่เป็นแบบเรื้อรัง มักพบรอยโรคที่เป็นตุ่มหนองซึ่งมีลักษณะเฉพาะเรียกว่า tubercle ในปอด และต่อมน้ำเหลือง สำหรับการชันสูตรโรควัวโรคนโคและกระบือ ตามวิธีมาตรฐานคือการเพาะแยกเชื้อ แต่วิธีนี้ต้องใช้ระยะเวลานาน และก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิค *in situ* hybridization โดยใช้ DNA probe ที่จำเพาะมาตรวจหาเชื้อ *M. bovis* ในตัวอย่างอวัยวะของกระบือ

วิธีการ: เก็บตัวอย่างอวัยวะปอด และต่อมน้ำเหลืองของกระบือ จำนวน 28 ตัวอย่าง จากกระบือ 14 ตัว ที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจด้วยวิธี tuberculin skin test และ/หรือวิธี gamma-interferon test นำมาเพาะแยกเชื้อและตรวจยืนยันเชื้อด้วยวิธี PCR จากนั้นผลิต DNA probe โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับเชื้อ *M. bovis* ที่ตำแหน่งยีน IS6110 แล้วติดฉลากด้วย biotin จากนั้นทดสอบด้วยวิธี *in situ* hybridization โดยเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ และนำ DNA probe ไป hybridize กับเนื้อเยื่อบนสไลด์ ทำให้เกิดสีด้วย streptavidin peroxidase และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องสว่าง เปรียบเทียบกับวิธีเพาะแยกเชื้อ

ผล: วิธี *in situ* hybridization ให้ผลการทดสอบตรงกับวิธีเพาะแยกเชื้อทุกตัวอย่าง โดยให้ผลบวกร้อยละ 53.57 (15/28) และผลลบร้อยละ 46.43 (13/28) คำนวณค่าทางสถิติโดยใช้ chi-square ได้ค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง เท่ากับร้อยละ 100 พบมีการติดเชื้อแพร่กระจายในเซลล์ pulmonary alveolar macrophage ในปอด คิดเป็นร้อยละ 57.14 (8/14) และเซลล์ macrophage ในต่อมน้ำเหลือง คิดเป็นร้อยละ 50 (7/14)

สรุป: เทคนิค *in situ* hybridization ที่ใช้ DNA probe ที่พัฒนาขึ้น สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *M. bovis* จากอวัยวะของกระบือ เป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะ มีความปลอดภัยและสามารถตรวจยืนยันการติดเชื้อทางด้านพยาธิวิทยาได้

คำสำคัญ: *Mycobacterium bovis* เทคนิค *in situ* hybridization อวัยวะ กระบือ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

*ผู้รับผิดชอบบทความ: โทรศัพท์ 0-2579-8908-14 ต่อ 237 โทรสาร 0-2579-8919

Detection of *Mycobacterium bovis* using *in situ* hybridization Technique in Organs of Buffaloes

Luckana Ramrin* Nittaya Srikaewkhew Reka Kanitpun Jadsada Ratthanophart

Abstract

Backgrounds: *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) is a causative agent of bovine tuberculosis (bTB) that can infect livestock, wildlife and human. In Thailand, emergence of bTB has been continuously reported. The clinical signs of bTB infected hosts are mostly reported in a chronic form characterized by massive lesions called tubercles often find at lungs and lymph nodes. Bacteriological isolation is the gold standard test for bovine tuberculosis diagnosis, however; it is a time consuming and dangerous method. Here, we developed *in situ* hybridization technique coupled with *M. bovis* specific DNA probe to detect *M. bovis* in buffalo organs.

Methods: Twenty-eight samples of lungs and lymph nodes from 14 buffaloes showed positive and suspicious results by tuberculin skin test and/or gamma-interferon test were collected for detection of *M. bovis*. The samples were cultured and confirmed by conventional PCR. For *in situ* hybridization test, *M. bovis*-specific biotinylated DNA probes which specified to IS6110 gene were hybridized on the prepared tissue slides. Streptavidin peroxidase was added for colorimetric analysis. Light field microscope was used to detect a color development a positive reaction. Comparison of *in situ* hybridization test positive samples to the samples positive to bacteriological isolation test was performed.

Results: The results of *in situ* hybridization method correspond to the gold standard test results that 53.57% (15/28) and 46.43% (13/28) of the samples were positive and negative respectively. The sensitivity, specificity and accuracy of the tests were 100% after statistical calculation using a chi-square method. The percent of *M. bovis* infection were found in tissues derived from pulmonary alveolar macrophage cell in lungs and macrophage cell in lymph nodes as 57.14% (8/14) and 50% (7/14) respectively.

Conclusions: The *in situ* hybridization with *M. bovis* specific DNA probe developed in this study can be used to detect *M. bovis* infection in organs obtained from buffaloes. This method is specific, sensitive and safe, so it is enabled to use in pathology as confirmation test.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, *in situ* hybridization technique, organs, buffaloes

National Institute of Animal Health, Kasetklang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900

*Corresponding author: Tel. 02 5798908-14 Fax. 02 5798919 E-mail rukdeaw@gmail.com

บทนำ

Mycobacterium bovis (*M. bovis*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง ย้อมติดสี acid-fast ทำให้เกิดโรควัวโรในโคและกระบือ (bovine tuberculosis) พบได้ในปศุสัตว์สัตว์ป่า และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เป็นโรคที่มีการระบาดทั่วโลก โคและกระบือที่เป็นโรคมักพบการเกิดโรคแบบเรื้อรัง อาการทั่วไปที่พบได้ คือ ผอม มีไข้ ไอ หายใจลำบาก และกินอาหารลดลง ในระยะสุดท้ายสัตว์จะมีร่างกายซูบผอมมากและระบบหายใจล้มเหลว อาจพบต่อมน้ำเหลืองบวมโต (CFSPH, 2009) นอกจากนี้โรควัวโรในโคและกระบือยังเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน (OIE, 2015a) จึงจัดเป็นโรคสำคัญที่สร้างความสูญเสียทั้งระบบสาธารณสุขและเศรษฐกิจ (Cousins, 2001)

การตรวจวินิจฉัยโรควัวโรในโคและกระบือ ใช้วิธีเพาะแยกเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการชันสูตรโรค แต่การเพาะแยกเชื้อมีความเสี่ยงที่ผู้ปฏิบัติงานอาจติดเชื้อได้ นอกจากนี้การเพาะแยกเชื้อต้องใช้เวลานานอย่างน้อย 8 สัปดาห์ เนื่องจากเชื้อ *M. bovis* เป็นแบคทีเรียที่โตช้า (fastidious bacteria) และจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อ (OIE, 2015a, 2015b) การตรวจวินิจฉัยทางด้านพยาธิวิทยา เช่น การย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin (H&E stain) (สมมาตร, 2544) การตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry (IHC) (ดวงทอง, 2559) เป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ในการชันสูตรโรค โดยใช้สไลด์เนื้อเยื่อที่รักษาสภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลินในการทดสอบ ทำให้ลดความเสี่ยงจากการสัมผัสเชื้อของผู้ปฏิบัติงาน แต่ยังมีขีดจำกัดไม่สามารถตรวจจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้

ปัจจุบันงานด้านชีวโมเลกุล (molecular) นิยมใช้อย่างกว้างขวางในหลายสาขา วิธี *in situ* hybridization ใช้เทคนิคทางด้าน molecular pathology ในการชันสูตรโรค เป็นวิธีตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อบนสไลด์เนื้อเยื่อ และใช้ probe ที่มีความจำเพาะกับ DNA ของเชื้อ ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงหรือเอนไซม์ ซึ่ง DNA probe ที่ติดฉลากจะไป hybridize กับ DNA ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดสี เมื่อดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะสามารถเห็นการติดเชื่อแพร่กระจายภายในเซลล์ (Bishop, 2010) นอกจากนี้ Rodriguez-Nunez et al. (2012) ได้นำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ตรวจโรควัวโรจากตัวอย่างต่อมน้ำเหลืองของคน จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อในงานด้านปศุสัตว์

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค *in situ* hybridization ที่ใช้ DNA probe ติดฉลากด้วยเอนไซม์ biotin ที่ผลิตขึ้น มาตรวจหาเชื้อ *M. bovis* ในตัวอย่างอวัยวะของกระบือที่ตรึงด้วยน้ำยาฟอร์มาลินเปรียบเทียบกับวิธีเพาะแยกเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างทดสอบและตัวอย่างควบคุม

ตัวอย่างปอด และต่อมน้ำเหลืองของกระบือ จำนวน 28 ตัวอย่าง จากกระบือ 14 ตัว ในปี พ.ศ. 2559 ที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจด้วยวิธี tuberculin skin test (TST) ตามวิธีการทดสอบของ OIE (2015a) และ/หรือวิธี gamma-interferon test (IFN- γ) ตามวิธีของชุดทดสอบ BOVIGAM[®] *Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test kit for Cattle (Prionics AG, Schlieren-Zurich, Switzerland) ตรวจดูลักษณะรอยโรค เช่น การเกิดตุ่มหนอง แบ่งตัวอย่างแช่เย็นเพื่อเพาะแยกเชื้อ และเก็บในสารละลายนิวโทรลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10% สำหรับตรวจด้วยวิธี *in situ* hybridization โดยมีตัวอย่างควบคุมบวกเป็นตัวอย่างสัตว์ป่วยตายที่มีรอยโรคและให้ผลเพาะแยกเชื้อเป็นบวก และตัวอย่างควบคุมลบ เป็นตัวอย่างสัตว์ปกติที่ไม่มีรอยโรคและให้ผลเพาะแยกเชื้อเป็นลบ

การเพาะแยกเชื้อ

นำตัวอย่างประมาณ 5-10 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว nutrient broth ที่มี 0.004% ของ phenol red บดให้ละเอียดด้วยเครื่อง stomacher ตั้งทิ้งไว้จนเนื้อเยื่อตกตะกอน หลังจากนั้นนำส่วนของ supernatant มา 3 มิลลิลิตร เติมด้วย Hexa decylpyridinium chloride (HPC) ความเข้มข้น 0.15% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นนำบับที่ความเร็ว 1,650xg เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนของ sediment รวมกับส่วนของ supernatant ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมรวมกันแล้วใช้ sterile cotton swab ป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Herrold egg yolk medium (HEY) จำนวน 3 หลอด และอาหาร Lowenstein-Jensen medium (LJ) จำนวน 2 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 8 สัปดาห์ นำโคโลนีที่สงสัยมา subculture (Payeur et al., 1993) และตรวจยืนยันเชื้อด้วยวิธี PCR

การตรวจยืนยันเชื้อด้วยวิธี PCR

สกัด DNA จากโคลนที่ส่งสัยตามวิธีของชุดสกัด QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) ตรวจยืนยันเชื้อด้วยวิธี multiplex PCR (Del Portillo et al., 1996) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสดังนี้ ไพรเมอร์คู่ที่ 1 (5'-CGACGG-GTCTGACGGCCAACTCATC-3' และ 5'-CTTGCTCGGTG-GCCGGTTTTTCAGC-3') มี PCR product ขนาด 999 bp ไพรเมอร์คู่ที่ 2 (5'-ACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTC-3' และ 5'-TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCA-3') มี PCR product ขนาด 543 bp ปฏิกริยารวม จำนวน 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, forward และ reverse primers อย่างละ 1 µM, 0.5U taq polymerase (Takara, Japan) และ DNA template 3 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง My Cyclor™ Thermal cyclor (Bio-Rad, USA) ตามโปรแกรมดังนี้ initial denature 95 องศาเซลเซียส 8 นาที ตามด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 71 องศาเซลเซียส นาน 1.5 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แล้วนำ PCR product ผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose ที่ 100 volt นาน 25 นาที ย้อมเจลดด้วย SYBR Safe™ DNA gel stain (Invitrogen, USA) อ่านด้วยเครื่อง Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad, USA) เชื้อ *M. bovis* จะให้ PCR product ขนาด 543 bp และ 999 bp

การทดสอบด้วยวิธี *in situ* hybridization

ผลิต DNA probe โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับ DNA ของเชื้อ *M. bovis* ของโคกระบือ ที่ตำแหน่งยีน IS6110 ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสดังนี้ INS1 (5'-CGTGAG-GGCATCGAGGTGGC-3' และ INS2 (5'-GCGTAGGCGTGC-GTGACAAA-3') นำมาทดสอบด้วยวิธี PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร โดยใช้ nuclease-free water 11 ไมโครลิตร, 10x buffer 2.5 ไมโครลิตร, 200 µM dNTP, forward และ reverse primers อย่างละ 0.8 µM, 0.5U taq polymerase (Takara, Japan) และ DNA template 5 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง My Cyclor™ Thermal cyclor (Bio-Rad, USA) โดยใช้โปรแกรมดังนี้ initial denature 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ตามด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension

72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เสร็จแล้วนำ PCR product ผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose ที่ 100 volt นาน 25 นาที อ่านด้วยเครื่อง Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad, USA) จะได้ PCR product ขนาด 245 bp (Phom et al., 2016) ตัดเจลตรงตำแหน่งที่มี PCR product นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) จากนั้นติดฉลาก DNA กับเอนไซม์ biotin ซึ่งใช้ชุดสำเร็จรูป Biotin PCR Labeling Core Kit (Jena Bioscience, Germany) โดยมีการทำ PCR reaction ดังนี้ 10x PCR labeling buffer 2 ไมโครลิตร, biotin PCR labeling mix 2 ไมโครลิตร, forward และ reverse primer อย่างละ 0.4 µM, DNA template (PCR product) 5 ไมโครลิตร, 0.5U taq polymerase และ nuclease-free water 8.5 ไมโครลิตร ปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง My Cyclor™ Thermal cyclor (Bio-Rad, USA) ตามโปรแกรมเดิม ทำการวิเคราะห์ PCR product และ probe โดยผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1% agarose ที่ 100 volt นาน 20 นาที นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) วัดความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง BioSpectrometer (Eppendorf, Germany) แล้วจึงนำ biotinylated labeling probe ที่ได้มาใช้ในขั้นตอนต่อไป

เตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ โดยนำปอดและต่อมน้ำเหลืองที่แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10% มาตัดแต่ง (Trimming) เข้าสู่กระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อแล้วแทนที่ด้วยพาราฟิน (Tissue processing) ผึ่งเนื้อเยื่อในพาราฟิน (Tissue embedding) นำบล็อกพาราฟินที่ผึ่งเนื้อเยื่อของกระบือ ตัดด้วย microtome ให้ได้สไลด์เนื้อเยื่อมีขนาดหนา 2-6 ไมครอน วางบนสไลด์แก้วชนิดมีประจุบวก

ทดสอบด้วยวิธี *in situ* hybridization โดยนำสไลด์เนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปผ่านขั้นตอนการขจัดพาราฟินออก (deparaffinization) ด้วย xylene จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และขั้นตอนการคืนน้ำ (rehydration) ด้วย 100% ethanol จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตามด้วย 95% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น นาน 5 นาที ต่อจากนั้นย่อยโปรตีนเพื่อเปิด epitopes บนสไลด์ด้วย proteinase K (DAKO™, Denmark) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสไลด์แช่ใน 0.3% H₂O₂ ใน methanol นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อกำจัด peroxidase แล้วล้างสไลด์ด้วย

น้ำกลั่น จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้สไลด์แห้ง จากนั้นทำการ pre-hybridization ด้วย 100 ไมโครลิตร biotinylated probe (100 ng/slide) ใน hybridization buffer (Enzo®, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ในเครื่อง Hybridizer (DAKO™, Denmark) และ hybridization ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 21 ชั่วโมง จากนั้นทำการ post-hybridization โดยนำ coverslip ออกด้วย tris buffered saline ที่มี 0.05% Tween 20 (TBST) แล้วล้างด้วย 2x saline-sodium citrate buffer (SSC), 1x SSC ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และ 0.5x SSC ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ใน water bath ตามลำดับ บ่มสไลด์ใน TBST นาน 5 นาที จากนั้นบล็อกโปรตีนในเนื้อเยื่อด้วย 3% normal horse serum ใน TBST นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการ detection สไลด์ โดยหยดด้วย streptavidin-HRP (DAKO™, Denmark) ปริมาณ 3-4 หยด หรือให้ท่วมเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ล้างสไลด์ด้วย TBST จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นหยด biotin บ่มนาน 15 นาที ล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หยดด้วย streptavidin-HRP ให้ท่วมเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ล้างสไลด์ด้วย TBST จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วหยด DAB (3, 3'-diaminobenzidine) ปริมาณ 3-4 หยด บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เพื่อให้เกิดสี จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น นาน 1 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น อีก 3 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที เพื่อล้าง DAB ออก ย้อมทึบสไลด์ด้วยสี hematoxylin นาน 20 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วหยดด้วย glycerol ปิดทึบสไลด์ด้วย coverslip จากนั้นนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องสว่าง ตัวอย่างที่ให้ผลบวกเซลล์ pulmonary alveolar macrophage และเซลล์ macrophage ในปอดและต่อมน้ำเหลืองจะติดสีน้ำตาล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธี *in situ* hybridization กับวิธีมาตรฐานการเพาะแยกเชื้อ แล้วหาค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง ของวิธี *in situ* hybridization โดยวิธี chi-square และใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (Rodriguez-Nunez et al., 2012) โดยใช้โปรแกรม Win Episcope 2.0

ผลและวิจารณ์

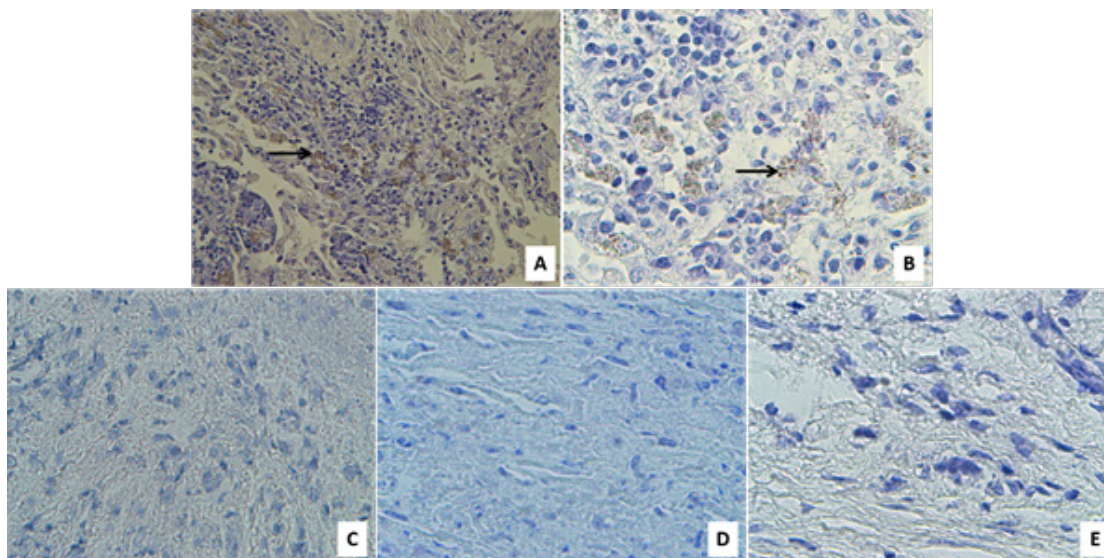
ผลการเพาะแยกเชื้อ

จากการเพาะแยกเชื้อปอด และต่อมน้ำเหลือง โดยยืนยันเชื้อด้วยวิธี PCR จำนวน 28 ตัวอย่าง พบเชื้อ *M. bovis* จำนวน 15 ตัวอย่าง จากปอด 8 ตัวอย่าง และต่อมน้ำเหลือง 7 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อ จำนวน 13 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบโดยวิธี *in situ* hybridization และวิธีเพาะแยกเชื้อ ของปอดและต่อมน้ำเหลือง ที่ให้ผลบวกและผลสงสัยต่อการตรวจด้วยวิธี tuberculin skin test (TST) และ/หรือวิธี gamma- interferon test (IFN- γ) จำนวน 28 ตัวอย่าง จากกระบือ 14 ตัว

ตัวที่	ตัวอย่าง	TST	IFN- γ	รอยโรค	<i>in situ</i> hybridization	การเพาะแยกเชื้อ
1	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	S	+	+	+	+
2	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	+	+	+	+	+
3	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	+	+	-	-	-
4	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	+	+	-	-	-
5	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	+	+	-	-	-
6	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	+	+	+	+	+
7	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	+	+	+	+	+
8	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	S	-	+	+	+
9	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	+	+	-	-	-
10	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	+	+	-	-	-
11	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	+	+	+	+	+
12	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	+	-	-	-	-
13	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	+	+	+	+	+
14	ปอด ต่อมน้ำเหลือง	-	+	+	+	+

หมายเหตุ: - = ผลลบ S = ผลสงสัย + = ผลบวก



รูปที่ 1 วิธี *in situ* hybridization A. ตัวอย่างควบคุมบวก (x40) B. ตัวอย่างที่ให้ผลบวก (x40) C. ตัวอย่างควบคุมลบ (x40) D. ตัวอย่างที่ให้ผลลบ (x40) E. ตัวอย่างควบคุมบวกที่ไม่ใช้ biotinylated labeling probe (x40)

ผลการทดสอบด้วยวิธี *in situ* hybridization

จากการอ่านสไลด์เนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องสว่าง จำนวน 28 ตัวอย่าง พบผลบวกคิดเป็นร้อยละ 53.57 (15/28) และผลลบร้อยละ 46.43 (13/28) เมื่อแยกเป็นรายอวัยวะ พบว่าที่ปอดและต่อมน้ำเหลืองให้ผลบวกร้อยละ 57.14 (8/14) และ 50 (7/14) ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ตัวอย่างที่ให้ผลบวก พบการติดเชื่อแพร่กระจายในเซลล์ pulmonary alveolar macrophage ในปอด และเซลล์ macrophage ในต่อมน้ำเหลือง โดยตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างที่ให้ผลบวก พบมีการติดสีน้ำตาลที่ตำแหน่งภายในเซลล์ pulmonary alveolar macrophage (ลูกศรชี้) ส่วนตัวอย่างควบคุมลบ ตัวอย่างที่ให้ผลลบ และตัวอย่างควบคุมบวกที่ไม่ใช้ biotinylated labeling probe แสดงดังรูปที่ 1 (A-E)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

การตรวจหาเชื้อ *M. bovis* จากตัวอย่างปอด และต่อมน้ำเหลืองของกระบือ จำนวน 28 ตัวอย่าง โดยวิธี *in situ* hybridization เปรียบเทียบกับวิธีเพาะแยกเชื้อ พบว่าให้ผลบวกทั้งสองวิธี จำนวน 15 ตัวอย่าง และให้ผลลบต่อการตรวจทั้งสองวิธี จำนวน 13 ตัวอย่าง โดยพบว่าไม่มีตัวอย่างที่ให้ผลแตกต่างกันของทั้งสองวิธี สามารถคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง เท่ากับร้อยละ 100

จากผลการตรวจหาเชื้อ *M. bovis* ด้วยเทคนิค *in situ* hybridization พบว่าให้ผลบวกร้อยละ 53.57 โดยพบเชื้อที่ปอดร้อยละ 57.14 และที่ต่อมน้ำเหลืองร้อยละ 50 ซึ่ง

สอดคล้องกับการศึกษาของอุดม และคณะ (2553) ที่กล่าวว่า จะพบรอยโรคและให้ผลบวกที่ปอดมากที่สุด ซึ่งบ่งชี้ว่าส่วนใหญ่ติดโรคในระบบทางเดินหายใจ การศึกษาครั้งนี้นำตัวอย่างปอดและต่อมน้ำเหลืองมาใช้ในการทดลอง เนื่องจากที่ตำแหน่งดังกล่าวเป็นบริเวณที่มักพบรอยโรค และตรวจพบเชื้อ (OIE, 2015a) จากผลการทดสอบพบว่าปอด และต่อมน้ำเหลืองที่มีรอยโรค สามารถตรวจพบเชื้อด้วยวิธี *in situ* hybridization และวิธีเพาะแยกเชื้อทุกตัวอย่าง ซึ่งเป็นการยืนยันว่ารอยโรคที่เห็นเป็นลักษณะตุ่มหนอง เกิดจากเชื้อ *M. bovis* เมื่อนำวิธี *in situ* hybridization มาเปรียบเทียบกับวิธีเพาะแยกเชื้อวิธี TST และวิธี IFN- γ พบว่าวิธี *in situ* hybridization ให้ผลการทดสอบตรงกับวิธีเพาะแยกเชื้อมากกว่าอีกสองวิธี โดยจะเห็นได้ว่ากระบือตัวที่ 8 ที่ตรวจด้วยวิธี IFN- γ ให้ผลลบ และวิธี TST ให้ผลสงสัย แต่ตรวจพบเชื้อ *M. bovis* ด้วยการเพาะแยกเชื้อและวิธี *in situ* hybridization ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเกิดผลลบเท็จ (false negative) ของวิธี IFN- γ เนื่องจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่ช้าทำให้ไม่สามารถตรวจพบ interferon ที่สร้างขึ้นได้ (CFSPH, 2009) ส่วนกระบือตัวที่ 14 พบว่าให้ผลลบด้วยวิธี TST แต่ให้ผลบวกต่อวิธี IFN- γ ส่วนวิธี *in situ* hybridization และวิธีเพาะแยกเชื้อให้ผลบวกที่ปอด แต่ให้ผลลบที่ต่อมน้ำเหลือง อาจเนื่องมาจากวิธี TST ไม่สามารถตรวจพบโรคในระยะแรกของการติดเชื้อ (early infection) หรือระยะเรื้อรัง (chronic stage) โดยทั่วไปเมื่อฉีดแอนติเจนเข้าไป สัตว์จะใช้เวลาประมาณ 3-6 สัปดาห์ ในการสร้างภูมิคุ้มกัน แต่อาจเป็นไปได้ที่จะมีการตอบสนองช้า ทำให้

ไม่สามารถตรวจพบได้ (OIE, 2015a) และจากการที่ตรวจพบเชื้อที่ปอด แต่ไม่พบที่ต่อมน้ำเหลือง อาจเนื่องมาจากการติดเชื้อส่วนใหญ่ของโรคในโคและกระบือเกิดจากการหายใจนำละอองเชื้อเข้าไป ซึ่งอวัยวะที่มักพบการติดเชื้อคือ ปอดและต่อมน้ำเหลือง แต่ถ้าสัตว์อยู่ในระยะเรื้อรังอาจทำให้ไม่สามารถพบการติดเชื้อที่ต่อมน้ำเหลือง (Dungworth, 1985) ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจด้วยวิธี TST ที่ให้ผลลบ แสดงให้เห็นว่ากระบือตัวที่ 14 เป็นโรคที่อยู่ในระยะเรื้อรัง ส่วนตัวอย่างอื่น ๆ ที่ให้ผลบวกต่อวิธี TST และวิธี IFN- γ แต่ให้ผลลบต่อวิธี *in situ* hybridization และวิธีเพาะแยกเชื้อ อาจเนื่องมาจากการเกิดผลบวกเท็จ (false positive) จากปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับเชื้อ *Mycobacterium* สายพันธุ์อื่นที่ไม่ก่อโรคที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม และสามารถจับกับ epitope ของเชื้อ *M. bovis* ได้ (Gormley et al., 2013; OIE, 2015a)

การพัฒนาวิธี *in situ* hybridization สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ DNA ของเชื้อที่ตำแหน่งยีน IS6110 โดยได้ดำเนินการ nucleotide blast search จากฐานข้อมูลใน Gene bank ไม่พบว่ายีนดังกล่าวมีร้อยละ similarity และ identity กับเชื้อแบคทีเรียที่พบในกระบือและทำให้เกิดลักษณะอาการที่เหมือนกับโรคในโคและกระบือ นอกจากนี้เทคนิค *in situ* hybridization จะให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำ การเลือกชนิดของสารที่ติดฉลากกับ probe ก็เป็นปัจจัยสำคัญ ซึ่งการศึกษานี้ใช้ biotin ในการติดฉลากกับ DNA probe โดยสามารถตรวจตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริงและผลลบจริงตรงกับวิธีเพาะแยกเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทุกตัวอย่าง ให้ค่าความไว และค่าความจำเพาะร้อยละ 100 และพบว่าผลการติดฉลากด้วย biotin จะอ่านผลได้ง่ายด้วยการดูการตกตะกอนของสี ซึ่งสามารถดูผลได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องสว่างที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป แตกต่างกับการใช้สารเรืองแสงติดฉลากกับ probe เพราะต้องอ่านด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ โดยการศึกษาของ Tantiwetrueangdet et al. (2007) ได้ศึกษาเทคนิค *in situ* hybridization ที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนซ์จากเนื้อเยื่อซึ่งฝังอยู่ในพาราฟิน พบว่ามักมีปัญหาในขั้นตอนการนับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เนื่องจากนิวเคลียสซ้อนกันและเนื้อเยื่ออาจเรืองแสงได้ด้วยตนเอง ทำให้ความแม่นยำลดลง

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าวิธี *in situ* hybridization สามารถตรวจจากตัวอย่างที่แช่ในฟอร์มาลิน ทำให้ลดการสัมผัสกับเชื้อและลดความเสี่ยงในการติดเชื้อของผู้ปฏิบัติงาน ใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 4 วัน และสามารถเห็นการแพร่กระจายของเชื้อในเซลล์ pulmonary alveolar macrophage

และเซลล์ macrophage ในปอดและต่อมน้ำเหลือง ในขณะที่วิธีเพาะแยกเชื้อมีข้อจำกัดหลายประการ และใช้เวลานาน ดังนั้นจึงสามารถนำเทคนิคนี้ มาใช้ในการชันสูตรโรคในโคและกระบือได้ อย่างไรก็ตาม วิธี *in situ* hybridization เป็นเทคนิคที่ต้องใช้คนในการวิเคราะห์เป็นส่วนใหญ่ ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ การทดสอบ และการอ่านผล ซึ่งถ้าผู้วิเคราะห์ไม่มีความชำนาญ อาจส่งผลต่อการทดสอบได้ และการศึกษาครั้งนี้มีตัวอย่างทดสอบค่อนข้างน้อย เนื่องจากการเก็บตัวอย่างในปี 2559 มีจำนวนกระบือที่ติดเชื้อไม่มาก และการจะนำกระบือไปผ่าชันสูตรซาก ต้องดำเนินการตรวจหลายวิธี และหลายครั้งจนกว่าจะแน่ใจว่าสามารถเข้าไปดำเนินการได้ และต้องให้เงินชดเชยที่สูง เพราะกระบือมีราคาค่อนข้างแพง ข้อจำกัดอีกกรณีหนึ่งเนื่องจากเป็นกระบือของเกษตรกร เมื่อมีผลการตรวจเบื้องต้นว่าให้ผลบวก เกษตรกรจะรีบขายกระบือทิ้ง งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจ ควรเพิ่มตัวอย่างทดสอบให้มากกว่านี้ เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการชันสูตรโรคต่อไป

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

วิธี *in situ* hybridization ที่พัฒนาการผลิต DNA probe ติดฉลากด้วย biotin ที่จำเพาะกับ DNA ของเชื้อ *M. bovis* จากตัวอย่างที่รักษาสภาพด้วยฟอร์มาลิน ซึ่งเก็บได้นานวิธีนี้จึงสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคในโคและกระบือได้มีความไว ความจำเพาะ ใช้เวลารวดเร็วและปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเพาะแยกเชื้อ ในอนาคตสามารถนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคอื่น ๆ ได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มพยาธิวิทยา กลุ่มภูมิคุ้มกันวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ลำปางกลางทุกท่านที่ช่วยให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ดวงทอง ปัจฉิมะศิริ. 2559. การชันสูตรโรคติดเชื้อในปศุสัตว์ จากเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน โดยวิธี Immunohistochemistry. โฮ สปีด เลเซอร์ปริ้นต์, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย, 69 หน้า.
- สมมาตร ศรีบำรุงสันติ. 2544. คู่มือปฏิบัติการเทคนิคทางเนื้อเยื่อ (Laboratory Manual in Histotechnology). ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 193 หน้า.

- อุดม เจือจันทร์, อรุณพรรณ ดุงสูงเนิน, บพิธ ปุยะติ และสิทธิกร อุทธรังษ์. 2553. โรคควั่นโรคในกระบือปลัก ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตอนล่างของประเทศไทย. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ 5(1): 11-20.
- Bishop, R. 2010. Applications of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in detecting genetic aberration of medical significance. *Bioscience Horizons*. 3(1): 85-95.
- Cousins, D.V. 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 20(1): 71-85.
- Del Portillo, P., Thomas, M.C., Martinez, E., Marañón, C., Valladares, B., Patarroyo, M. and Lopez, M. 1996. Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 34: 324-327.
- Dungworth, D.L. 1985. Respiratory. In K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer, eds. *Pathology of Domestic Animals*, 3rd ed. Academic Press, Florida, USA. pp. 493-505.
- Gormley, E., Doyle, M., Duignan, A., Good, M., More, S.J. and Clegg, T.A. 2013. Identification of risk factors associated with disclosure of false bovine tuberculosis reactor using the gamma-interferon (IFN γ) assay. *Vet. Res.* 44: 117.
- Payeur, J.B., Jarnagin, J.L., Marguardt, J.G., Schaper, L.A. and Martin, B.M. 1993. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. United state Department of Agriculture. Ames, Iowa. 141 p.
- Phom, L.L., Leishangthem, G.D., Narang, D., Filia, G., Gupta, K. and Singh, A. 2016. Molecular and immunohistochemical detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed tissues from animals with spontaneous bovine tuberculosis. *Indian J. Vet. Pathol.* 40(2): 116-121.
- Rodriguez-Nunez, J., Avelar, F.J., Marquez, F., Rivas-Santiago, B., Quinones, C. and Guerrero-Barrera, A.L. 2012. *Mycobacterium tuberculosis* complex detected by modified fluorescent *in situ* hybridization in lymph nodes of clinical samples. *J. Infect. Dev. Ctries.* 6(1): 58-66.
- Tantiwetrueangdet, A., Panvichian, R., Sornmayura, P., Pinpradap, K. and Leelaudomlapi, S. 2007. Fluorescence *In Situ* hybridization Method in Isolated Single Nuclei extracted from Paraffin-Embedded Hepatocellular Carcinoma Tissues. *J. Med. Assoc. Thai.* 90(2): 363-368.
- The Center for Food Security and Public Health (CFSPH). 2009. Bovine Tuberculosis. [Online]. Available: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf. [Accessed 8 May 2017].
- World Organization for Animal Health (OIE). 2015a. BOVINE TUBERCULOSIS. OIE Terrestrial Manual. [Online]. Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.06_BOVINE_TB.pdf. [Accessed 8 May 2017].
- World Organization for Animal Health (OIE). 2015b. Biosafety and biosecurity: Standard for managing biological risk in the veterinary laboratory and animal facilities. OIE Terrestrial Manual. [Online]. Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.04_BIOSAFETY_BIOSECURITY.pdf. [Accessed 8 May 2017].