

การติดเชื้อร่วมกันของ *Mannheimia haemolytica* และ *Mycoplasma ovipneumoniae* ในแพะ

พัชรี ทองคำคุณ * ตวงทอง ปัจฉิมะศิริ ทริกา จันทมนิโชติ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 025798908 โทรสาร 025798919 E-mail: patchareet@dld.go.th

บทคัดย่อ

ลูกแพะพันธุ์ Anglo-Nubian เพศเมีย อายุ 3 เดือน จากฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดลพบุรี แสดงอาการซึม ไม่กินอาหาร มีน้ำมูกขึ้น และตายหลังจากเริ่มแสดงอาการ 3 วัน จากการผ่าซากและสังเกตรอยโรคด้วยตาเปล่า พบว่าโพรงจมูกแดง ภายในมีน้ำมูกข้นสะสมอยู่ มีเลือดคั่งที่ปอด การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบปอดอักเสบแบบ lobar pneumonia โดยมีการสะสมของ edematous fluid ร่วมกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ใน alveolar septa ในบางบริเวณพบห่อหุ้มการสะสมของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด streaming leukocyte จำนวนมากใน alveolar septa ร่วมกับการตายและการลอกหลุดของ bronchiolar epithelial cell การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียพบเชื้อ *Mannheimia haemolytica* ที่ปอด หัวใจ ม้าม ไต สมอง และพบเชื้อ *Mycoplasma ovipneumoniae* ที่ปอด ซึ่งเมื่อทำการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry พบ *M. ovipneumoniae* antigen ใน alveolar macrophage เฉพาะในบริเวณที่มี edematous fluid สรุปว่าแพะตายจากการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *M. haemolytica* และ *M. ovipneumoniae*

คำสำคัญ: *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, แพะ

บทนำ

Mannheimia haemolytica (*M. haemolytica*) เป็นชื่อปัจจุบันของเชื้อ *Pasteurella haemolytica* กลุ่มที่ทำให้ผลลบกับการทดสอบการหมักน้ำตาล trehalose (Angen et al., 1999) เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อ *P. haemolytica* จำแนกได้เป็น 2 biotype ตามคุณสมบัติการใช้น้ำตาล arabinose หรือ trehalose คือ biotype A (*M. haemolytica*) หรือ biotype T (*P. trehalosi*) ตามลำดับ โดยที่เชื้อทั้งสองชนิดมีความสำคัญในการก่อโรค pasteurellosis ในโค กระบือ แพะ แกะ ชนิดแรกมักทำให้เกิดปอดบวม และการติดเชื้อในกระแสเลือดในลูกสัตว์ ส่วนชนิดหลังทำให้เกิดโรคในสัตว์โต (Gilmour and Angus, 1983) จากการศึกษาชนิดของเชื้อที่แยกได้จากแพะที่มีอาการปอดบวมแบบเฉียบพลันในประเทศนิวซีแลนด์ 11 สายพันธุ์ พบว่าเป็น *P. haemolytica* biotype A ทั้งหมด และเป็นชนิด A2 มากที่สุด (Midwinter et al., 1985) เช่นเดียวกับที่รายงานในประเทศแถบทวีปแอฟริกา (Ojo, 1977) โดยปกติเชื้อจะอยู่ที่ช่องจมูกของสัตว์ การเลี้ยงที่หนาแน่นและปัจจัยต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดความเครียดจะทำให้เชื้อเข้าสู่ปอด กระแสเลือด และสัตว์แสดงอาการป่วยได้ (Debey et al., 1992) สัตว์แสดงอาการค่อนข้างเฉียบพลัน มีไข้ ซึม ไม่กินอาหาร หายใจลำบาก ฝ่ซากพบว่าในช่องอกมีการคั่งของสิ่งคัดหลั่ง มีลักษณะคล้ายเจลาติน และไฟบริน เยื่อหุ้มปอดอักเสบมีไฟบรินปกคลุม ปอดมีเลือดคั่ง บวม น้ำ และแน่นแข็ง ลักษณะทาง จุลพยาธิวิทยาจะพบจุดเนื้อมตายล้อมรอบด้วยเซลล์ macrophage และ neutrophil

Mycoplasma ovipneumoniae (*M. ovipneumoniae*) แยกเชื้อได้ครั้งแรกในแกะโดย Mackey et al. (1963) และพบได้เรื่อยมาทั้งในแพะและแกะ (Radwan et al., 1985) เป็นสาเหตุของโรค atypical pneumonia ในลูกแกะ (Jones, 1983) แต่ก็สามารถแยกเชื้อได้จากแพะและสุภาพดี จึงจัดเป็นเชื้อทั่วไปในทางเดินหายใจส่วนต้นของแพะและแกะเช่นกัน (Brogden et al., 1988, Kusiluka et al., 2000) Mohan et al. (1992) ทำการทดลองในแพะและแกะเพื่อพิสูจน์การก่อโรคของเชื้อ *M. ovipneumoniae* ที่แยกได้จากแพะและแกะในประเทศซิมบับเว พบเพียงรอยโรคผนังของถุงลมขนาดตัวขึ้น โดยมีการแทรกตัวของเซลล์ neutrophil และ mononuclear ในบริเวณนั้น รวมทั้งที่บริเวณโดยรอบของ bronchioles โดยที่สัตว์ไม่แสดงอาการป่วยรุนแรงและตาย อย่างไรก็ตามพบว่าฝูงแพะและแกะเหล่านั้นยังคงมีการตายอยู่เป็นครั้งคราวจากโรคปอดบวม โดยที่พบไม่เชื่อก่อโรคชนิดอื่นนอกจากเชื้อ *M. ovipneumoniae* ขณะที่การศึกษาของ Niang et al. (1998) พบว่า *M. ovipneumoniae* สามารถสร้างแคปซูลได้ เช่นเดียวกับเชื้อ mycoplasma ที่ก่อโรคในคนและสัตว์ ทั้งนี้คุณสมบัติของแคปซูลคือ ทำให้เชื้อเกาะติดกับเซลล์เยื่อผนังทางเดินหายใจของโฮสต์ได้ดี จึงนับว่าแคปซูลเป็นปัจจัยหนึ่งของการก่อโรคของเชื้อ mycoplasma และยังพบว่าสายพันธุ์ของเชื้ออาจมีผลต่อการสร้างแคปซูล การหลบหลีกของเชื้อต่อระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งน่าจะมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการก่อโรคด้วย ดังนั้นการเพาะแยกเชื้อ *M. ovipneumoniae* ในสัตว์ป่วย จึงควรมีการตรวจสอบระหว่างรอยโรคภายในอวัยวะนั้นกับเชื้อว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่ เทคนิค immunoperoxidase นับเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ได้ (Hazirolu et al., 1996)

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะรายงาน อาการ ลักษณะทางพยาธิวิทยา รวมทั้งวิธีการตรวจและวินิจฉัยการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อ *M. haemolytica* และเชื้อ *M. ovipneumoniae* ในลูกแพะ เพื่อเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาการเกิดโรคในแพะ และเป็นรายงานการติดเชื้อ *M. ovipneumoniae* ในแพะครั้งแรกในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ประวัติสัตว์

ลูกแพะ พันธุ์แองโกล เพศเมีย อายุ 3 เดือน จากฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดลพบุรี แสดงอาการซึม มีน้ำมูก ไม่กินอาหาร และตายหลังจากแสดงอาการ 3 วัน จึงส่งซากแพะเพื่อทำการชันสูตรโรค

การตรวจทางพยาธิวิทยา

ตรวจดูรอยโรคภายนอกด้วยตาเปล่า (external examination) แล้วทำการผ่าซากเพื่อตรวจดูรอยโรคของอวัยวะภายใน (internal examination) ได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต และลำไส้ทุกส่วนรวมทั้งสมอง โดยเก็บชิ้นเนื้อดังกล่าวแช่ใน 10% neutral buffered formalin เพื่อนำมาผ่านกระบวนการมาตรฐานทางพยาธิวิทยา แล้วฝังชิ้นเนื้อใน paraffin นำไปตัดให้มีขนาดหนาประมาณ 5 ไมครอน เพื่อทำเป็นสไลด์เนื้อเยื่อ แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธีของ Luna (1968) จากนั้นนำสไลด์ไปตรวจหารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

นำตัวอย่างอวัยวะภายในที่ส่งมาจากกลุ่มพยาธิวิทยามาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 7% defibrinated sheep blood agar (SBA) และ MacConkey agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วตรวจหาโคโลนีที่สงสัยเป็นเชื้อก่อโรค และทำการพิสูจน์เชื้อโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี นอกจากนี้นำตัวอย่างปอดอีกส่วนหนึ่งมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ modified Hayflick's broth และ agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 48-72 ชั่วโมง เพื่อเพาะแยกเชื้อ mycoplasma จากนั้นตรวจหาโคโลนีที่สงสัยเพื่อนำมาพิสูจน์เชื้อโดยวิธี PCR

การตรวจหา DNA และการพิสูจน์เชื้อ *M. ovipneumoniae*

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปอดของแพะ และจากโคโลนีที่สงสัย ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kobayashi et al. (1996) วิธีการโดยย่อ คือ เชื้อ mycoplasma ที่เจริญดีแล้ว นำมาปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนเชื้อด้วย phosphate buffered saline (PBS) 2 ครั้ง แล้วละลายตะกอนเชื้อด้วย lysis solution ที่ประกอบด้วย 110 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 เก็บที่ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้เป็น DNA template

ส่วนตัวอย่างปอด ตัดตรงตำแหน่งที่มีรอยโรคขนาดประมาณ 1 กรัม ซอยให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยกรรไกร แล้วใส่ลงในถุงพลาสติก เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Hayflick's broth ประมาณ 10 mL เข้าเครื่อง stomacher (Smasher, AES Laboratory, France) ที่ระดับความเร็ว fast นาน 180 วินาที แยกเอาแต่ส่วนที่เป็นน้ำออกใส่หลอด

ปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 3-5 นาที เทส่วนใสใส่หลอดปั่นขนาด 1.5 mL ปั่นเก็บตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วย PBS 2 ครั้ง ทำการสกัด DNA ด้วย lysis solution เช่นเดียวกับข้างต้น และเก็บที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้เป็น DNA template

การทำ PCR ดัดแปลงจากวิธีการของ Besser et al. (2008) ดังนี้ เตรียม PCR master mix ปริมาณ ตัวอย่างละ 19 μL ที่ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl และ 0.1% Triton X-100), 2.5 mM MgCl_2 , 200 μM dNTP (each), primer LMF1: 5' TGA ACG GAA TAT GTT AGC TT 3' และ primer LMR1: 5' GAC TTC ATC CTG CAC TCT GT 3' อย่างละ 0.4 μM และ 0.5 U Taq polymerase แล้วใส่ DNA template ตัวอย่างละ 2.5 μL โดยมีเชื้อ *M. ovipneumoniae* ATCC 29419 และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมบวกและลบ ตามลำดับ นำเข้าเครื่อง Thermal cycler (Hybaid, Thermo electron, Germany) ตามโปรแกรม preheating 95°C นาน 10 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation 94°C นาน 30 วินาที, annealing 55°C นาน 30 วินาที, extension 72°C นาน 30 วินาที ต่อจากนั้นเป็น final extension 72°C นาน 5 นาที จนเสร็จ จึงตรวจหาแถบของ PCR product โดยการผ่านกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose gel ที่ 100 volt ประมาณ 30 นาที อ่านผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation (GelDoc -It, UVP, U.S.A)

การทำ immunohistochemistry (IHC)

นำบล็อกชิ้นเนื้อปอดของแพะที่ฝังใน paraffin ตัดให้มีความหนา 3 ไมครอน วางบนแผ่นสไลด์ชนิด positive charged นำไปอบที่ 60°C นาน 30 นาที จากนั้นนำสไลด์มาผ่านกระบวนการ deparaffin ตามมาตรฐานทางพยาธิวิทยาด้วย xylene และแอลกอฮอล์ แล้วล้างสไลด์ในน้ำกลั่น นาน 5 นาที หยอด 3% hydrogen peroxide ในเมทานอลให้ท่วมชิ้นเนื้อ ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อกำจัด endogenous peroxidase จึงล้างสไลด์ด้วย PBS นาน 5 นาที หยอด proteinase K ready to use (DAKOTM) ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เทออก จากนั้นหยอด 5% skim milk ป่มที่ 37°C นาน 20 นาที เทออก แล้วหยอด 10% horse serum ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เทออก ต่อไปหยอด rabbit anti-*M. ovipneumoniae* serum ที่ความเข้มข้น 1:2,000 ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ล้างสไลด์ด้วย PBS 3 ครั้ง ครึ่งละ 5 นาที หยอด EnVision และ System-HRP labeled polymer anti- rabbit IgG (DAKOTM) ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงล้างสไลด์ด้วย PBS 3 ครั้ง ตามด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง แล้วหยอด AEC/ H_2O_2 solution ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปย้อมทับด้วยสี hematoxylin นาน 10 วินาที ล้างด้วยน้ำก็อก ให้ไหลผ่านนาน 10 นาที ปิดทับด้วยแผ่น coverslip จากนั้นนำสไลด์ไปตรวจหาปฏิกิริยาการติดสีของแอนติเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

ผล

ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา

การตรวจดูด้วยตาเปล่า พบรอยโรค โพรงจุกแดง ภายในมีน้ำมูกข้นสะสมอยู่ ปอดเลือดคั่งและมีจุดเลือดออกที่ม้าม พบพยาธิขนาดเล็กสีแดง ยาวประมาณ 1 ซม จำนวนมาก ภายในกระเพาะและลำไส้ ส่วนการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบปอดอักเสบแบบ lobar pneumonia โดยมีการสะสมของ edematous fluid ร่วมกับการ

เพิ่มจำนวนของ เซลล์ใน alveolar septa (Fig. 1 & 2) ในบางบริเวณพบห่อล้อมการสะสมของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด streaming leukocyte จำนวนมาก ใน alveolar septa (Fig. 3 & 4) ร่วมกับการตายและการลอกหลุดของ bronchiolar epithelial cell (Fig. 5)

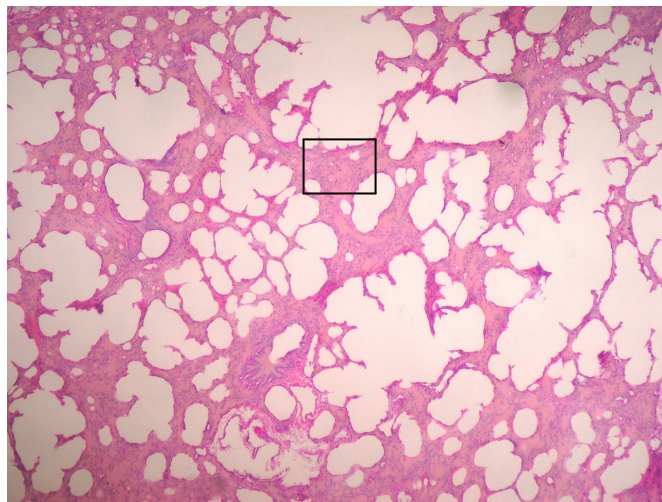


Fig. 1 Lung, generally the alveolar septa is moderately expanded by many alveolar cells and edema. (hematoxylin& eosin x 4)

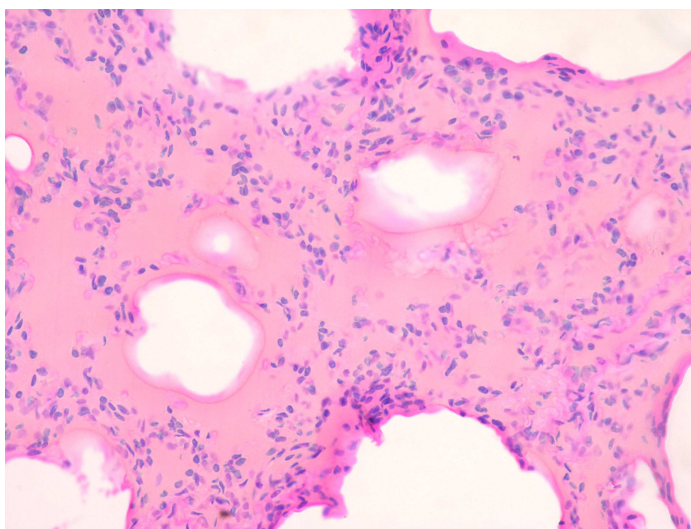


Fig. 2 High magnification of the area in a square in Fig. 1 (hematoxylin& eosin x 40)

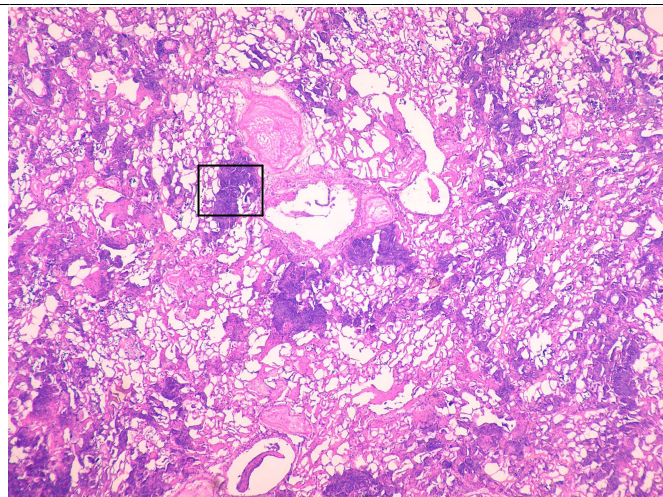


Fig. 3 Lung, multifocally the alveolar septa is moderately expanded by streaming leukocyte (hematoxylin & eosin x 4)

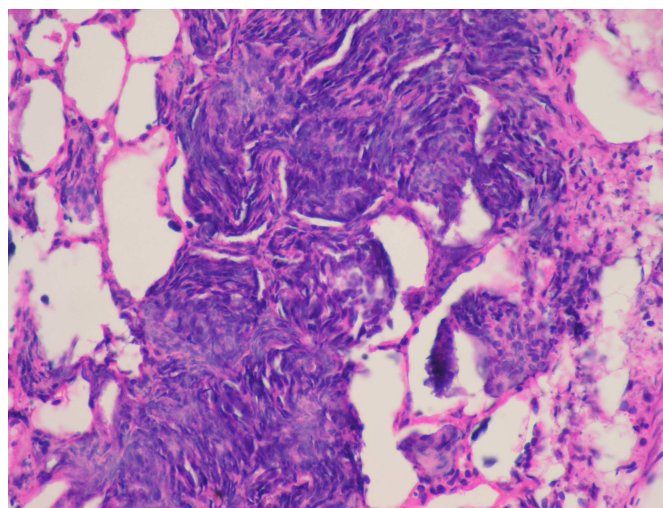


Fig. 4 High magnification of the area in a square in Fig. 3 (hematoxylin& eosin x 40)

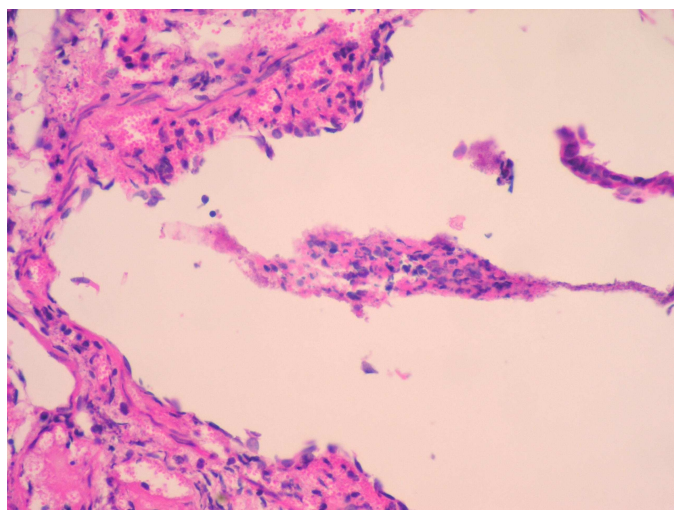


Fig. 5 Lung, epithelial cells debris in bronchioles (hematoxylin & eosin x 40)

ผลการตรวจทางแบคทีเรียวิทยาและการทดสอบด้วยวิธี PCR

พบเชื้อ *M. haemolytica* ที่ปอด ตับ หัวใจ ม้าม ไต สมอง และพบโคโรนาของเชื้อ mycoplasma บนอาหาร modified Hayflick's agar เมื่อทดสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะ พบแถบ PCR product ขนาด 361 bp แสดงว่าเป็นเชื้อ *M. ovipneumoniae* ทั้งจากเชื้อ และจากเนื้อเยื่อปอดโดยตรง (Fig. 6)

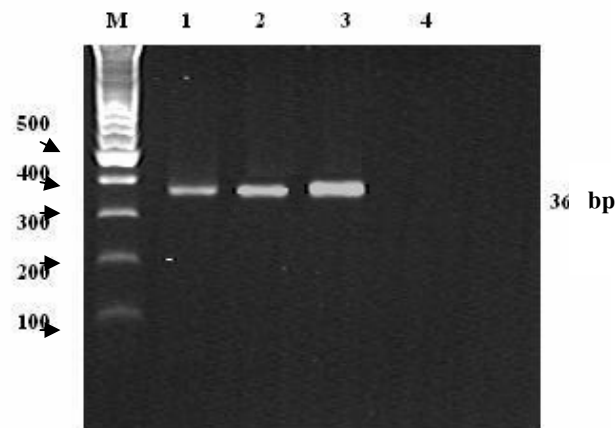


Fig. 6 Detection of 16S rRNA genes of *M. ovipneumoniae* isolated from goat and from lung sample by PCR showed the amplified fragment at 361 bp. Lane M, 100 bp ladder marker; Lane 1, DNA extracted from lung of goat; Lane 2, *M. ovipneumoniae* isolated from goat; Lane 3, *M. ovipneumoniae* ATCC 29419; Lane 4, distilled water (negative control).

ผลการทดสอบด้วยวิธี Immunohistochemistry

พบ *M. ovipneumoniae* antigen ใน alveolar macrophage เฉพาะในบริเวณที่มี edematous fluid ร่วมกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ใน alveolar septa (รูปที่ 7)

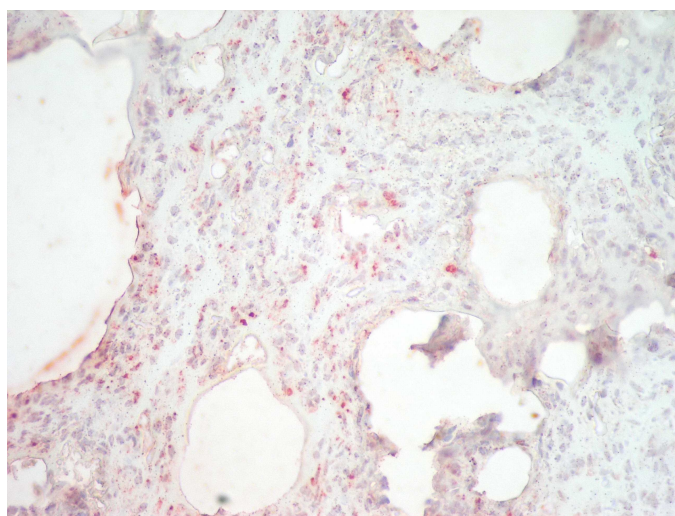


Fig. 7 Alveolar macrophages were strongly immunohistochemically positive for *M. ovipneumoniae* antigen. (IHC, hematoxylin x 40)

วิจารณ์

เชื้อ *M. haemolytica* พบได้ปกติทั่วไปในโพรงจมูกของ โค แพะ และแกะที่มีสุขภาพดี อย่างไรก็ตามเชื้อสามารถก่อให้เกิดโรค pasteurellosis ในสัตว์เหล่านี้ได้ ซึ่งมีรายงานเสมอในโค และแกะ (Gilmour, 1980) ส่วนรายงานการเกิดโรคในแพะมีค่อนข้างน้อย Hayashidani et al. (1988) รายงานการระบาดของโรค pasteurellosis จากฟาร์มแห่งหนึ่งในประเทศญี่ปุ่นในปี 1986 มีแพะตายทั้งสิ้น 9 ตัว ภายในเวลา 20 วัน ส่วน Debey et al. (1992) ศึกษาการก่อโรคของเชื้อ *P. haemolytica* A1 ในแพะ พบว่าช่องทางรับเชื้อมีผลต่อการติดเชื้อและแสดงอาการของสัตว์ โดยแพะที่ได้รับเชื้อทางหลอดลม (intratracheally) จำนวน 3 ตัว ในขณะที่แพะที่ได้รับเชื้อทางเส้นเลือดดำ (intravenously) เพียงตัวเดียวแสดงรอยโรคคล้ายกัน คือ ปอดมีจุดเลือดออกและบวมแน่นแข็ง ผลทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า ที่แขนงหลอดลมมีรอยโรค fibrinosuppurative หรือ necrotizing bronchopneumonia ในถุงลมเต็มไปด้วย serofibrinous fluid ปะปนด้วย leukocytes primary neutrophils และ macrophage เล็กน้อย มีการแทรกตัวของเซลล์ pneumocytes type II ที่ผนังถุงลม แพะที่ได้รับเชื้อทางเส้นเลือดจะมีรอยโรครุนแรงกว่า คือพบ pneumocytes type II hyperplasia และ severe fibrinous pleuritis อย่างไรก็ตามแพะที่ได้รับเชื้อทางเส้นเลือดจะพบเชื้ออยู่ในเลือดไม่นาน เนื่องจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสามารถกำจัดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว แพะที่ได้รับเชื้อช่องทางนี้บางตัวจึงไม่แสดงอาการ ส่วนแพะที่ได้รับเชื้อทางทอนซิลจะไม่พบรอยโรคใดๆ

สำหรับลูกแพะรายนี้พบรอยโรคปอดอักเสบแบบ lobar pneumonia โดยบางบริเวณมีหย่อมการสะสมของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด streaming leukocyte จำนวนมาก ใน alveolar septa ร่วมกับการตายและการลอกหลุดของ bronchiolar epithelial cell เป็นลักษณะของการติดเชื้อ *M. haemolytica* ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดโรคที่รายงานโดย Yener et al. (2009) ที่พบแอนติเจนของเชื้อ *M. haemolytica* ใน cytoplasm ของ streaming leukocyte และ bronchiolar epithelial cell เมื่อทำการย้อมด้วยวิธี IHC อีกด้วย ในขณะที่บางบริเวณ มีการสะสมของ edematous fluid ร่วมกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ใน alveolar septa ทั้งนี้จากการทดสอบด้วยแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. ovipneumoniae* โดยวิธี IHC พบแอนติเจนของเชื้ออยู่ใน phagocyte ในบริเวณดังกล่าว แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มจำนวนของเชื้อและก่อให้เกิดโรคขึ้น สอดคล้องกับ Haziroglu et al. (1996) ที่ใช้เทคนิค IHC ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *M. ovipneumoniae* ในเนื้อเยื่อปอดของแกะที่ตรึงด้วยฟอร์มาลินบนแผ่นสไลด์ พบว่ามีการติดสีภายใน alveolar macrophages และ syncytial macrophages ที่อยู่ใน bronchioles ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะรอยโรคที่เกิดจากเชื้อ mycoplasma และสัมพันธ์กับตำแหน่งรอยโรคในแกะ

จากการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย อาการและรอยโรคข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าลูกแพะรายนี้มีการติดเชื้อและแสดงอาการร่วมกันของเชื้อ *M. haemolytica* และ *M. ovipneumoniae* อย่างไรก็ตามไม่อาจบ่งชี้ได้แน่ชัดว่าเชื้อตัวใดเป็นสาเหตุปฐมภูมิ หรืออาจเป็นไปได้ว่า *M. ovipneumoniae* เป็นสาเหตุตั้งต้น เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างแคปซูล ซึ่งมีคุณสมบัติทำให้เชื้อเกาะติดกับเซลล์เยื่อผนังทางเดินหายใจของโฮสต์ได้ดี (Niang et al., 1998) ส่งผลต่อการทำงานของซีเลียและระบบป้องกันภายในทางเดินหายใจบกพร่อง ทำให้ง่ายต่อการติดเชื้อ

แบคทีเรียทูติเยนัม (Martin and Atiken, 2000) นอกจากนี้เชื้อยังลดความสามารถในการเก็บกินของเซลล์ macrophage ได้ (Niang et al. 1997) สายพันธุ์ของเชื่อน่าจะมีผลต่อการสร้างแคปซูล และการก่อโรค ดังนั้นจึงอาจพบการเกิดโรคจากเชื้อนี้เดี่ยว ๆ หรือพบร่วมกับการติดเชื้ออื่น ๆ ได้ แต่สาเหตุที่ทำให้ลูกแพะตายน่าจะเกิดจากการติดเชื้อแทรกซ้อนที่ทำให้มีอาการรุนแรงมากขึ้น

การติดเชื้อ *M. ovipneumoniae* พบในแพะแะทั่วโลก สามารถพบได้ทั้งจากสัตว์ปกติและสัตว์ป่วย แต่โดยมากจะแยกได้จากระบบทางเดินหายใจของสัตว์ป่วย (Leach et al., 1976) เป็นสาเหตุของ atypical pneumonia ซึ่งกลไกการเกิดโรคยังไม่แน่ชัด (Gilmour et al., 1979) Livingston and Gauer (1979) รายงานการเกิดโรคในลูกแพะพันธุ์ Spanish และพันธุ์ Angora ภายในฟาร์มของมหาวิทยาลัยที่รัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีแพะและแกะป่วยเป็นครั้งคราว ระหว่างปี 1976-1977 รวมทั้งสิ้น 4 ตัว อาการที่พบคือ ชูบผอม หายใจลำบาก จากการ autopsy พบในช่องอกมีน้ำและไฟบริน ปอดยึดติดกับซี่โครง การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียพบแต่เชื้อ *M. ovipneumoniae* ในแพะทุกตัว ในขณะที่ Goncalves et al. (2010) รายงานโรค Atypical non-progressive pneumonia ในแพะ โดยพบเชื้อ *M. ovipneumoniae*, *M. arginini* ร่วมกับเชื้อ *M. haemolytica* และ *P. multocida* อย่างไรก็ตามการทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดโรคของเชื้อ *M. ovipneumoniae* และ *M. arginini* โดย Goltz et al., (1986) แสดงให้เห็นว่า *M. ovipneumoniae* ก่อโรคปอดบวมและปอดอักเสบในแพะได้ ในขณะที่ *M. arginini* ไม่ก่อให้เกิดโรคใดๆ

ในประเทศไทยยังไม่เคยมีการรายงานโรคนี้มาก่อน อาจเป็นเพราะการเพาะแยกเชื้อทำได้ยาก ตลอดจนต้องทำการพิสูจน์หาความสัมพันธ์ของการพบเชื้อและรอยโรคในสัตว์ให้แน่ชัดด้วย ครั้นนี้จึงนับเป็นรายงานการเกิดโรคติดเชื้อ *M. ovipneumoniae* ในแพะครั้งแรกในประเทศไทย โดยพบร่วมกับการติดเชื้อ *M. haemolytica* เพื่อเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาและการเฝ้าระวังโรคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณณัฐธิดา รัตนพันธุ์ ที่ช่วยในการเพาะแยกเชื้อ คุณชยภัค สีนุ ที่ช่วยในการเตรียมแอนติซีรั่มต่อเชื้อ *M. ovipneumoniae* คุณรุ่งอรุณ ยอดรัก ที่ช่วยเตรียมตัวอย่างทาง immunohistochemistry ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา และกลุ่มพยาธิวิทยา ทุกท่าน ที่ช่วยงานด้านเทคนิคที่เป็นประโยชน์ต่อการรายงานโรคครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Angen, O., Mutters, R., Caugant, D.A., Olsen, J.E. and Bisgaard, M. 1999. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DND-DND hybridization and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. Nov., *Mannheimia glucosida* sp. Nov. *Mannheimia ruminalis* sp. Nov. and *Mannheimia varigena* sp. Nov. Int. J. of Syst. Bacteriol. 49: 67-86.

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1990. Current protocols in molecular biology. Vol. 1 Greene Publishing Associated and Wiley-Interscience, New York, p. 2.4.1-2.4.5.
- Besser, T.E., Cassirer, E.F., Potter, K.A., VanderSchalie, J., Fischer, A., Knowles, D.P., Herndon, D.R., Rurangirwa, F.R., Weiser, G.C. and Srikumaran, S. 2008. Association of *Mycoplasma ovipneumoniae* infection with population- limited respiratory disease in free-ranging Rocky mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*). J. Clin. Microbiol. 46(2): 423-430.
- Brogden, K.A., Rose, D., Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D. and Tully, J.G. 1988. Isolation and identification of mycoplasmas from the nasal cavity of sheep. Am. J. Vet. Res. 49: 1669-1672.
- Debey, B.M., Cutlip, R.C., Brogden, K.A. and Frank, G.H. 1992. A comparison of the intratracheal, intravenous and intratonsillar routes of inoculation of goats with *Pasteurella haemolytica*. Vet Res. Commun. 16: 247-251.
- Gilmour, J.S., Jones, G.E. and Rae, A.G. 1979. Experimental studies of chronic pneumonia of sheep. Comparative Immunology. Microbiol. Infect. Dis. 1: 285-293.
- Gilmour, N.J.L. (1980). *Pasteurella haemolytica* infections in sheep. Vet. Quarterly. 2: 191-198.
- Gilmour, N.J.L. and Angus, K.W. 1983. Pasteurellosis. In: Diseases of Sheep. Martin, W.B. (ed.) Blackwell Scientific Publication. Oxford, England. p. 3-8.
- Goltz, J.P., Rosendal, S., McCraw, B.M. and Ruhnke, H.L. 1986. Experimental studies on pathogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* for the respiratory tract of goats. Can. J. Vet. Res. 50: 59-67.
- Goncalves, R., Mariano, I., Nunez, A., Branco, S., Fairfoul, G. and Nicholas, R. 2010. Atypical non- progressive pneumonia in goats. Vet. J. 183: 219-221.
- Hayashidani, H., Honda, E., Nakamura, T., Mori, Y., Sawada, T. and Ogawa, M. 1988. Outbreak of pneumonia caused by *Pasteurella haemolytica* infection in shiba goats in Japan. Jpn. J. Vet. Sci. 50(4): 960-962.
- Haziroglu, R., Diker, K.S. Turkarslan, J. and Gulbahar, M.Y. 1996. Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Pasteurella haemolytica* antigens by an immunoperoxidase technique in pneumonic ovine lungs. Vet. Pathol. 33: 74-76.
- Jones, G.E. 1983. Mycoplasma of sheep and goats: A synopsis. Vet Rec. 113: 619-620.
- 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.
- Kusiluka, L.J.M., Ojeniyi, B., Friis, N.F., Kazwala, R.R. and Kokotovic, B. 2000. Mycoplasmas isolated from the respiratory tract of cattle and goats in Tanzania. Acta Vet. Scan. 41: 299-309.

- Leach, R.H., Cottew, G.S. and Andrews, B.E. 1976. Atypical mycoplasmas from sheep in Great Britain and Australia identified as *Mycoplasma ovipneumoniae*. Vet. Rec. 98: 377-379.
- Livingston, C.W.Jr. and Gauer, B.B. 1979. Isolation of *Mycoplasma ovipneumoniae* from Spanish and Angora goats. Am. J. Vet. Res. 40(3): 407-408.
- Luna, L. G. 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Arm Forces Institute of Pathology. 3rd ed. McGraw-Hill Inc. New York. p. 217
- Mackay, J.M.K., Nisbet, D.I. and Foggie, A. 1963. Isolation of pleuropneumonia like organism (genus *Mycoplasma*) from cases of sheep pulmonary adenomatosis. Vet. Rec. 75: 550-551.
- Martin, W.B. and Atiken, I.D. 2000. Mycoplasma respiratory infections. In: Diseases of sheep. Martin W.B., Atiken, I.D.(eds.) 3rd edition. Oxford Blackwell Science. p. 198-201.
- Midwinter, A.C., Clarke, J.K and Alley, M.R. 1986. *Pasteurella haemolytica* serotypes from pneumonic goat lungs. N.Z. Vet.J. 34: 35-36.
- Mohan, K., Obwolo, M. J. and Hill, F.W.G. 1992. *Mycoplasma ovipneumoniae* infection in Zimbabwean goats and sheep. J. Comp. Path. 107: 73-79.
- Niang, M., Rosenbusch, R.F., Andrews, J.J. and Kimberle, M.L. 1998. Demonstration of a capsule on *Mycoplasma ovipneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 59: 557-562.
- Niang, M., Rosenbusch, R.F., Lopez-Virella, J. and Kimberle, M.L. 1997. Expression of functions by normal sheep alveolar macrophages and their alteration by interaction with *Mycoplasma ovipneumoniae*. Vet. Microbiol. 58: 31-43.
- Ojo, M.O. 1977. Caprine pneumonia. Vet. Bull. 47: 573-578.
- Radwan, A.I., Al-Zeftawi, N.M., Al-Issa, M.A., Bekairi, S.I. and Al-Mukayel, A.A. 1985. Mycoplasmas isolated from goats and sheep with pleuropneumonia in Saudi Arabia. Trop. Anim. Hlth. Prod. 17: 233-238.
- Yener, Z., Iihan, F., Iihan, Z. and Sagiam, Y.S. 2009. Immunohistochemical detection of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* antigens in goats with natural pneumonia. Vet. Res. Commun. 33: 305-313.

Coincidence of *Mannheimia haemolytica* and *Mycoplasma ovipneumoniae* infections in a goat

Pacharee Thongkamkoon* Tuangthong Patchimasiri
Tharika Chantamaneechote

National Institute of Animal Health. Kaset klang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding person: Tel. 025798909 Fax. 025798919 email: patchareet@dld.go.th

Abstract

A three months old female, Anglo-Nubian kid from a farm in Lopburi province with history of depression, anorexia, nasal discharge died at day three after clinical manifestations. Macroscopic examination revealed that nostrils were reddish, filled with thick mucous discharge and the lung was congested. Histopathological examination revealed lobar pneumonia of the lung as the alveolar septa was moderately expanded by many alveolar cells and edematous fluid. Moderate expansion of the alveolar septa by the streaming leukocytes as well as necrosis and epithelial cell debris in bronchioles were also present. *Mannheimia haemolytica* was isolated from the lung, heart, spleen, kidney and brain of the kid, while *Mycoplasma ovipneumoniae* was isolated from the lung. The lung tissues taken for immunohistochemistry against antiserum of *M. ovipneumoniae* showed specific reaction to the antigen in the alveolar macrophages at the area of edema. It was concluded that the kid died by coincidence of *M. haemolytica* and *M. ovipneumoniae* infections.

Keywords: *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, goat