

รายงานสัตว์ป่วย: การติดเชื้อร่วมกันของ Jaagsiekte sheep retrovirus และ *Mycoplasma ovipneumoniae* ในแกะ

พัชรี ทองคำคุณ *

สนทนา มิมะพันธุ์

ทริกา จันทมนิโชติ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 025798908 โทรสาร 025798919 email: patchareet@dld.go.th

บทคัดย่อ

แกะพันธุ์ Katahdin เพศผู้ อายุ 1 ปี 6 เดือน แสดงอาการซึม น้ำมูกไหลมีเลือดปน ไม่กินอาหาร ไม่ตอบสนองต่อการรักษาและตายในเวลา 2 สัปดาห์หลังจากเริ่มแสดงอาการ จากการผ่าซากและสังเกตรอยโรคด้วยตาเปล่า พบปอดขยายใหญ่ เนื้อปอดแข็งมีสีเทา และพบตุ่มเนื้องอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-3 เซนติเมตร ขอบเขตชัดเจนกระจายอยู่ทั่วบริเวณเนื้อปอด การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบการเพิ่มจำนวนและเจริญเป็นเนื้องอกของกลุ่มเซลล์ pneumocytes type 2 ในถุงลม มีลักษณะเป็น cuboidal หรือ columnar cells แทนที่เซลล์ปกติของถุงลม โดยพบการเจริญยื่นเข้าไปในช่องว่างของถุงลม มีลักษณะคล้ายนิ้วมือ (papilliform growth) นอกจากนี้ยังพบเซลล์อักเสบ neutrophils และ macrophageแทรกซึมเข้ามาเป็นหย่อมในถุงลม ร่วมกับพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์บุผิวของหลอดลมย่อยโดยมีกลุ่มของเซลล์อักเสบที่ตายแล้วสะสมอยู่ในช่องว่าง การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียพบเชื้อ *Mycoplasma ovipneumoniae* ที่ปอด รวมทั้งตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) และ *M. ovipneumoniae* จากเนื้อเยื่อปอดโดยวิธี polymerase chain reaction นอกจากนี้ทำการทดสอบด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. ovipneumoniae* พบผลบวกโดยการติดสีน้ำตาลที่เยื่อบุผิวชั้นบนติดกับ cilia และที่กลุ่มเซลล์อักเสบในช่องว่างของหลอดลมย่อย จากรอยโรคที่สัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อและหรือดีเอ็นเอของเชื้อ JSRV และ *M. ovipneumoniae* ทำให้สรุปได้ว่าแกะตายจากการติดเชื้อร่วมกันของ Jaagsiekte sheep retrovirus และ *M. ovipneumoniae* นับเป็นรายงานการติดเชื้อ *M. ovipneumoniae* ในแกะครั้งแรกในประเทศไทย

คำสำคัญ: Jaagsiekte sheep retrovirus, *Mycoplasma ovipneumoniae*, แกะ

บทนำ

Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) เป็นเชื้อใน family *Retroviridae* subfamily *Orthoretrovirinae* และ genus *Betaretrovirus* ที่เป็นสาเหตุของโรค ovine pulmonary adenocarcinoma (OPA) ซึ่งเป็นโรคติดต่อในแกะ เชื้อจะเข้าสู่เซลล์ pneumocytes type 2 และ Clara ที่ส่วนท้ายของปอด และทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและขยายเป็นเนื้องอกกระจายอยู่ภายในปอด (Palmarini and Fan, 2001) โรคนี้พบเกือบทั่วโลก ยกเว้นประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ (Sharp and De Martini, 2003) ส่วนประเทศไอร์แลนด์ได้ทำการกำจัดและปลอดจากโรคแล้ว (Kycko et al., 2008) ปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่จะเพิ่มจำนวนเชื้อในหลอดทดลองได้ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคจะไม่ใช้วิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส แต่จะใช้เทคนิคการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา และ PCR เป็นหลัก โดยสามารถตรวจหา RNA และ DNA ของไวรัสได้จากตัวอย่างน้ำในปอด ก้อนเนื้องอก เซลล์เม็ดเลือดขาว หรือจากต่อมน้ำเหลืองที่ติดเชื้อ อย่างไรก็ตามพบว่าสัตว์ไม่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเมื่อติดเชื้อ ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจการติดเชื้อโดยวิธีทางซีรัมวิทยาได้ (OIE, 2008)

Mycoplasma ovipneumoniae (*M. ovipneumoniae*) แยกเชื้อได้ครั้งแรกในแกะโดย Mackey et al. (1963) และพบได้เรื่อยมาทั้งในแพะและแกะ เป็นสาเหตุของโรค atypical pneumonia ในลูกสัตว์ (Jones, 1983; Jones et al., 1986) แต่ก็สามารถแยกเชื้อได้จากแพะและแกะสุขภาพดี จึงจัดเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในทางเดินหายใจส่วนต้นของแพะและแกะเช่นกัน (Brogden et al., 1988) มีการทดลองหลายงานวิจัยที่เหนี่ยวนำให้แกะแสดงอาการเมื่อได้รับเชื้อนี้ แต่ก็ให้ผลไม่แน่นอน (Buddle et al., 1984; Ionas and Mew, 1985) Mohan et al. (1992) ทำการทดลองในแพะและแกะเพื่อพิสูจน์การก่อโรคของเชื้อ *M. ovipneumoniae* ที่แยกได้จากแพะและแกะในประเทศซิมบับเว พบเพียงรอยโรคที่ผนังของถุงลมที่หนาขึ้น โดยมีการแทรกตัวของเซลล์อักเสบ neutrophils และ mononuclear ในบริเวณนั้น รวมทั้งที่บริเวณโดยรอบของ bronchioles โดยที่สัตว์ไม่แสดงอาการป่วยรุนแรงและตาย อย่างไรก็ตามพบว่าฝูงแพะและแกะเหล่านั้นยังคงมีการตายอยู่เป็นครั้งคราวจาก pneumonia โดยไม่พบเชื้อก่อโรคชนิดอื่นนอกจากเชื้อ *M. ovipneumoniae* ขณะที่การศึกษาของ Niang et al. (1998) พบว่า *M. ovipneumoniae* สามารถสร้างแคปซูลได้ เช่นเดียวกับเชื้อ mycoplasma ชนิดอื่นที่ก่อโรคในคนและสัตว์ เช่น *M. pneumoniae*, *M. dispar*, *M. pulmonis*, *M. hyopneumoniae* และ *M. gallisepticum* โดยที่คุณสมบัติของแคปซูลคือ ทำให้เชื้อสามารถเกาะติดกับเซลล์เยื่อผนังช่องทางเดินหายใจของโฮสต์ได้ดี จึงนับได้ว่าแคปซูลเป็นปัจจัยหนึ่งของการก่อโรคของเชื้อ mycoplasma และยังพบว่าสายพันธุ์ของเชื้ออาจมีผลต่อการสร้างแคปซูล ส่วนการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของเชือน่าจะมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการก่อโรคด้วย ดังนั้นการเพาะแยกเชื้อ *M. ovipneumoniae* ในสัตว์ป่วย จึงควรมีการตรวจสอบระหว่างรอยโรคกับเชื้อว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่ เทคนิค immunoperoxidase นับเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ได้ (Hazirolu et al., 1996) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรายงาน อาการ ลักษณะทางพยาธิวิทยา รวมทั้งวิธีการตรวจและวินิจัยการติดเชือร่วมกันระหว่าง Jaagsiekte sheep retrovirus และ *M. ovipneumoniae* ในแกะ เพื่อเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาของการเกิดโรคในแกะ และเป็นรายงานการติดเชื้อ *M. ovipneumoniae* ในแกะครั้งแรกในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ประวัติสัตว์

แกะพันธุ์ Katahdin เพศผู้ อายุ 1 ปี 6 เดือน จากฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดราชบุรี แสดงอาการซึม น้ำมูกไหล มีเลือดปน ไม่กินอาหาร แต่ไม่มีไข้ เจ้าของให้ยาต้านจุลชีพ ยาแก้แพ้ และยาบำรุง แต่การรักษาไม่ประสบผล แกะตายหลังจากแสดงอาการประมาณ 2 สัปดาห์ จึงส่งซากแกะเพื่อทำการชันสูตรโรค

การตรวจทางพยาธิวิทยา

ตรวจดูรอยโรคภายนอกด้วยตาเปล่า (external examination) แล้วทำการผ่าซากเพื่อตรวจดูรอยโรคของอวัยวะภายใน (internal examination) ได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต และลำไส้ทุกส่วนรวมทั้งสมอง โดยเก็บชิ้นเนื้อดังกล่าว

ใน 10% neutral buffered formalin เพื่อนำมาผ่านกระบวนการมาตรฐานทางพยาธิวิทยา แล้วฝังชิ้นเนื้อใน paraffin นำไปตัดให้มีความหนาประมาณ 5 ไมครอน เพื่อทำเป็นสไลด์เนื้อเยื่อ แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธีของ Luna (1968) จากนั้นนำสไลด์ไปตรวจหารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

นำตัวอย่างอวัยวะภายในที่ส่งมาจากกลุ่มพยาธิวิทยามาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 7% defibrinated sheep blood agar (SBA) และ MacConkey agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วตรวจหาโคโลนีที่สงสัยเป็นเชื้อก่อโรค 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*

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปอดของแกะ 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 ตัดตรงตำแหน่งที่มีรอยโรคขนาดน้ำหนักประมาณ 1 กรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกร แล้วใส่ลงในถุงพลาสติก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ modified Hayflick's broth ประมาณ 10 mL นำเข้าเครื่อง stomacher (Smasher, AES Laboratory, France) ที่ระดับความเร็ว fast นาน 180 วินาที แยกเอาแต่ส่วนที่เป็นน้ำ ออกใส่หลอด 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 ปริมาณตัวอย่างละ 19 µL ที่ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl และ 0.1% Triton X-100), 2.5 mM MgCl₂, 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)

การตรวจหา DNA ของ JSRV โดยวิธี seminested PCR

ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปอดที่สกัดตามวิธีการข้างต้น นำมาทำ PCR ตามที่ดัดแปลงจากวิธีของ Palmarini et al. (2000) ดังนี้ เตรียม PCR master mix (Qiagen, Germany) ปริมาณตัวอย่างละ 20 µL ประกอบด้วย 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl และ 0.1% Triton X-100), Q- solution 5 µL, 2.5 mM MgCl₂,

200 μ M dNTP (each), forward primer (JSRV-1: 5' TGG GAG CTC TTT GGC AAA AGC C 3') และ reverse primer (JSRV-3: 5' CAC CGG ATT TTT ACA CAA TCA CCG G 3') อย่างละ 0.9 μ M และ 1.25 U Hotstar Taq polymerase และน้ำกลั่น 4.75 μ L แล้วใส่ DNA template ตัวอย่างละ 5 μ L นำเข้าเครื่อง Thermal cycler (Hybaid, Thermo electron, Germany) ตามโปรแกรม preheating 95°C นาน 15 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation 94°C นาน 1 นาที, annealing 57°C นาน 1 นาที, extension 72°C นาน 1 นาที ต่อจากนั้นเป็น final extension 72°C นาน 5 นาที จนเสร็จ

นำ PCR product ตัวอย่างละ 0.5 μ L มาใส่ใน PCR master mix ที่มีส่วนผสมครบเช่นเดิม ยกเว้นไม่ใส่ Q-solution และเพิ่มปริมาณน้ำกลั่นเป็น 14.25 μ L นอกจากนี้ให้เปลี่ยน reverse primer จาก JSRV-3 เป็น JSRV-6 (5' TGA TAT TTC TGT GAA GCA GTG CC 3') นำเข้าเครื่อง Thermal cycler (Hybaid, Thermo electron, Germany) ตามโปรแกรม preheating 95°C นาน 15 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation 94°C นาน 1 นาที, annealing 59°C นาน 1 นาที, extension 72°C นาน 1 นาที ตามด้วย final extension 72°C นาน 5 นาที เสร็จแล้ว จึงตรวจหาแถบของ PCR product เช่นเดียวกัน

การทำ immunohistochemistry

นำบล็อกชิ้นเนื้อปอดของแกะที่ฝังใน 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 บ่มที่ 37°C นาน 20 นาที เทออก แล้วตามด้วย 10% horse serum ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เทออก แล้วจึงหยอด rabbit anti-*M. ovipneumoniae* serum ที่ความเข้มข้น 1:2,000 ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ล้างสไลด์ด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 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/H₂O₂ solution ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ล้างด้วยน้ำก๊อก ให้ไหลผ่านนาน 10 นาที ปิดทับด้วยแผ่น coverslip จากนั้นนำสไลด์ไปตรวจหาปฏิกิริยาการติดสีของแอนติเจน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

ผล

ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา

จากการผ่าซากและสังเกตรอยโรคด้วยตาเปล่า (macroscopic examination) พบปอดมีขนาดขยายใหญ่ เนื้อปอดแข็งและมีสีเทา นอกจากนี้ยังพบตุ่มเนื้อออกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-3 เซนติเมตร ขอบเขตชัดเจน กระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อปอด ปอดบวม น้ำคั่งข้างมากพร้อมทั้งพบจุดเนื้อตายหลายแห่ง นอกจากนี้ยังพบสิ่งค้ำหลังมีลักษณะเป็นเมือกมีฟองอากาศปนที่บริเวณหลอดลม

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (microscopic examination) พบการเพิ่มจำนวนและเจริญเป็นเนื้ออกของกลุ่มเซลล์ pneumocytes type 2 ในถุงลม มีลักษณะเป็น cuboidal หรือ columnar cells แทนที่เซลล์ปกติของถุงลม โดยพบการเจริญยื่นเข้าไปในช่องว่างของถุงลมมีลักษณะคล้ายนิ้วมือ (papilliform growth) นอกจากนี้ยังพบเซลล์อักเสบชนิด neutrophils และเซลล์ macrophage แทรกซึมเข้ามาเป็นหย่อมในถุงลม ร่วมกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์บุผิวของหลอดลมย่อยโดยมีกลุ่มของเซลล์อักเสบที่ตายแล้วสะสมอยู่ในช่องว่าง (Fig. 1)

ผลการทำ Immunohistochemistry

การตรวจด้วยเทคนิค immunohistochemistry (IHC) โดยใช้แอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเชื้อ *Mycoplasma ovipneumoniae* พบผลบวกโดยการติดสีน้ำตาลที่เยื่อบุผิวชั้นบนติดกับ cilia และที่กลุ่มเซลล์อักเสบในช่องว่างของหลอดลมย่อย (Fig. 2)

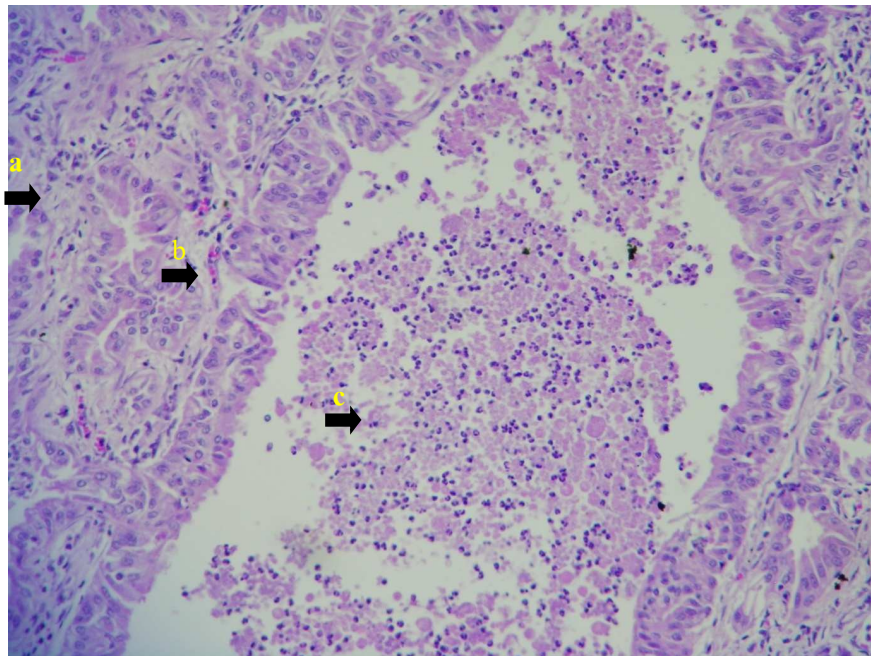


Fig. 1 แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อปอด โดยพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้ออก pneumocytes ชนิดที่2 (a) พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์บุผิวของหลอดลมย่อย (b) โดยมีกลุ่มของเซลล์อักเสบที่ตายแล้วสะสมอยู่ในช่องว่าง (c) H&E 20x

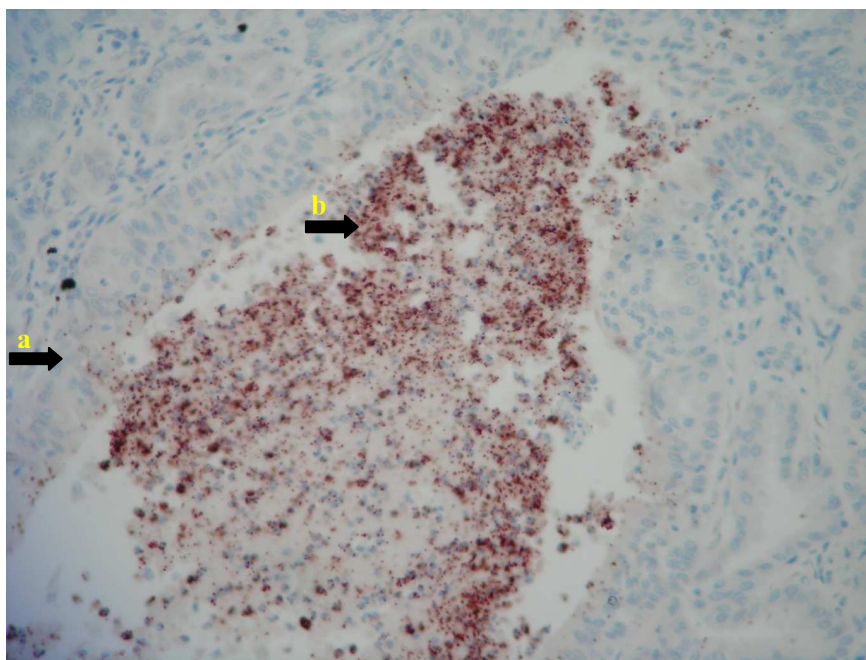


Fig. 2 แสดงผลการตรวจด้วยเทคนิค immunohistochemistry พบผลบวกโดยการติดสีน้ำตาลเป็นแกรนูลในเซลล์เยื่อบุผิวของหลอดลมย่อย (a) และในกลุ่มเซลล์อักเสบบริเวณช่องว่างของหลอดลมย่อย (b) IHC method, 20x

ผลการตรวจทางแบคทีเรียวิทยาและการทำ PCR

จากการเพาะแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SBA และ MacConkey agar ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ส่วนการเพาะแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ modified Hayflick's agar พบโคโลนีของเชื้อ mycoplasma และจากการทดสอบด้วยวิธี PCR จากโคโลนีของเชื้อ mycoplasma และจากการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อในเนื้อเยื่อปอดโดยตรง โดยใช้ primer ที่จำเพาะ พบแถบ PCR product ขนาด 361 basepairs พิสูจน์ได้ว่าเป็นเชื้อ *M. ovipneumoniae* ทั้งจากโคโลนีของเชื้อ ดังแสดงใน Fig. 3

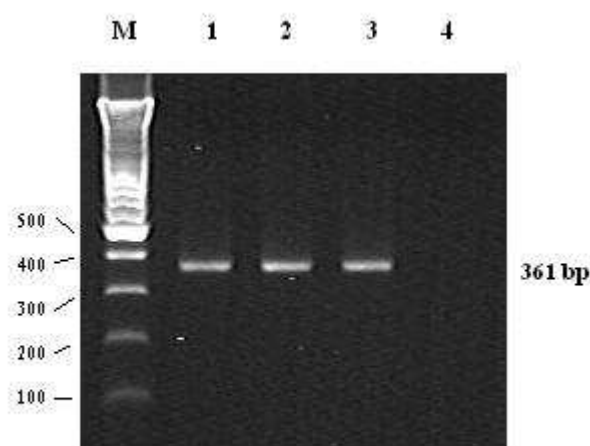


Fig. 3 Detection of 16S rRNA genes of *M. ovipneumoniae* isolated from sheep and from lung samples by PCR showed the amplified fragment of 361 bp. Lane M, 100 bp ladder marker; Lane 1, *M. ovipneumoniae* isolated from sheep; Lane 2, DNA extracted from lung of sheep; Lane 3, *M. ovipneumoniae* ATCC 29419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

ผลการตรวจหา DNA ของ JSRV โดยวิธี seminested PCR

การทำ PCR ด้วย primer JSRV-1 และ JSRV-3 ซึ่งเป็น primer ที่จำเพาะต่อบริเวณ long terminal repeat (LTR) ของเชื้อ JSRV ผลคือ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะพบแถบ PCR product ขนาดประมาณ 176 basepairs และเมื่อทำ seminested PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มทั้งความไว และความจำเพาะของวิธีการตรวจ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะพบแถบ PCR product ขนาดประมาณ 133 basepairs ทั้งนี้ตัวอย่างปอดของแกะตัวนี้ ให้ผลบวกจากการทำ PCR ทั้งสองครั้ง โดยการทำ PCR ในครั้งที่ 2 มีความไวในการตรวจสูง จึงพบแถบ PCR product ที่มีความเข้มมาก (Fig. 4)

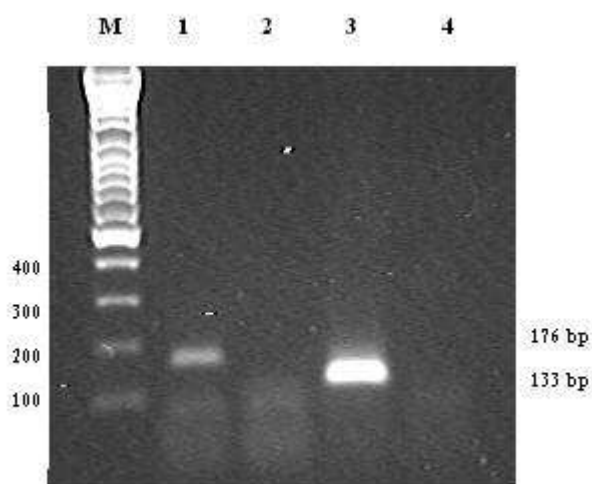


Fig. 4 Detection of viral long terminal repeat region of JSRV from lung samples of sheep by PCR (Lane 1 and 2) and seminested PCR (Lane 3 and 4) showed the amplified fragment of 176 and 133 bp. Lane M, 100 bp ladder marker; Lane 1, DNA extracted from lung of sheep; Lane 2, distilled water (negative control). Lane 3, PCR product from Lane 1. Lane 4, distilled water (negative control)

วิจารณ์

โรค OPA เริ่มมีการรายงานครั้งแรกที่ประเทศอาฟริกาใต้ จึงมีชื่อเรียกเชื้อในภาษาอาฟริกันว่า jaagsiekte (Tustin, 1969) ความหมายในภาษาอังกฤษ คือ driving sickness มักแสดงอาการในแกะที่เพิ่งโตเต็มวัย เนื่องจากแกะแสดงอาการของโรครุนแรงขึ้นเมื่อก่อนเนื้องอกในปอดมีขนาดใหญ่หรือกระจายมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการบกพร่องและสูญเสียการแลกเปลี่ยนอากาศภายในถุงลมของแกะ ทำให้เหนื่อยง่าย เชื่องช้า ติดตามฝูงไม่ทัน และถูกไล่ต้อนอยู่เสมอ (Delas Heras et al., 2003) โดยมากแกะจะตายภายใน 2-3 สัปดาห์ หลังจากเริ่มแสดงอาการ แต่บางรายอยู่ได้นานเป็นเดือนถึงหลายเดือน เมื่อทำการผ่าซากจะพบก้อนเนื้องอกขนาดใหญ่ในปอด มีลักษณะแน่นแข็ง สีเทา หน้าตัดพบของเหลวมีฟองปนใน bronchioles ตรงบริเวณที่มีรอยโรค จากการศึกษาระดับเซลล์พบว่า ก้อนเนื้องอกพัฒนามาจากเซลล์ pneumocytes type 2 และเซลล์ non ciliated bronchiolar (Clara) รอยโรค OPA มีได้ 2 แบบ คือแบบ “classic” ที่เนื้องอกมีการเรียงตัวของเซลล์ชนิด cuboidal, columnar และ papillary และมีเซลล์ macrophage ขนาดใหญ่รวมตัวอยู่ กับแบบ “atypical” ที่นอกจากจะพบก้อนเนื้องอกลักษณะเดียวกันแล้ว ยังพบมีการแทรกตัวอย่างหนาแน่นของเซลล์ mononuclear และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Garcia-Goti et al., 2000) เนื่องจากเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคเป็น retrovirus ซึ่งแม้จะมีสารพันธุกรรมเป็น RNA แต่ในการสร้างไวรัสตัวใหม่ สารพันธุกรรมของเชื้อจะเข้าไปแทรกตัวกับจีโนมของโฮสต์ และสร้าง proviral DNA ขึ้น ทำให้สามารถใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหา proviral DNA ของเชื้อที่อยู่ในบริเวณรอยโรคได้โดยไม่ต้องใช้เทคนิค RT-PCR อย่างไรก็ตาม PCR อาจใช้ไม่ได้ผลดีเท่ากับ RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจากเลือด หรือสิ่งคัดหลั่งซึ่งจะมี viral RNA มากกว่า proviral DNA (Kycko and Reichart, 2010)

สำหรับแกะตัวนี้การตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาโดยเฉพาะที่ปอด พบก้อนเนื้องอกหลายแห่งมีลักษณะเป็น cuboidal หรือ columnar cells แทนที่เซลล์ปกติของถุงลม อันเป็นลักษณะที่จำเพาะของรอยโรค OPA ที่เกิดจากการติดเชื้อ JSRV พร้อมทั้งการตรวจพบ proviral DNA ของเชื้อโดยวิธี seminested PCR ยืนยันได้ว่าการติดเชื้อนี้ในอวัยวะเป้าหมาย คือ ปอดอย่างแน่นอน แม้ว่าในการทดสอบนี้จะไม่มีความควบคุมบวกของการทดสอบ เนื่องจากไม่สามารถหาเชื้อหรือดีเอ็นเออ้างอิงมาตรฐานของ JSRV ได้ แต่ PCR product ที่ได้จากการทดสอบทั้งสองครั้ง

มีขนาดถูกต้องตามที่รายงานไว้โดย Palmarini et al. (2000) โดยที่ตัวควบคุมลบไม่เกิดแถบตีเอ็นเอใด ๆ ทำให้ผู้วิจัยแน่ใจว่าผลการทดสอบครั้งนี้มีความถูกต้องและเชื่อถือได้

เนื่องจาก JSRV เป็นโรคเรื้อรัง แกะจะแสดงอาการเมื่อมีรอยโรคในปอดค่อนข้างมาก ซึ่งทำให้แกะอ่อนแอ น้ำหนักลด และเกิดโรคแทรกซ้อนได้ง่าย โดยเฉพาะการติดเชื้อ *Mannheimia haemolytica* และมักกลายเป็นสาเหตุของการตายของแกะ (OIE, 2008) แต่ในกรณีนี้ไม่พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคใด ๆ นอกจากการพบเชื้อ *M. ovipneumoniae* จากตัวอย่างปอด ซึ่งการพบเชื้อชนิดนี้มีความเป็นไปได้สองกรณีคือ เป็นการพบเชื้อในระบบทางเดินหายใจตามปกติ โดยที่เชื้อไม่ก่อความเสียหายใด ๆ หรือเชื้ออาจเป็นปัจจัยร่วมในการก่อโรคและทำให้สัตว์ตาย จึงทำให้ต้องใช้เทคนิค immunohistochemistry เข้ามาช่วยในการวินิจฉัยและยืนยันเพิ่มเติม

M. ovipneumoniae พบได้ในแกะทั่วโลก สามารถแยกได้ทั้งจากสัตว์ปกติและสัตว์ป่วย แต่โดยมากจะแยกได้จากระบบทางเดินหายใจของสัตว์ป่วย (Leach et al., 1976) เป็นสาเหตุของ atypical pneumonia ซึ่งกลไกการเกิดโรคมียังไม่แน่ชัด (Gilmour et al., 1979) อย่างไรก็ตามเชื้อสามารถสร้างแคปซูลได้เหมือนกับเชื้อ mycoplasma ก่อโรคในคนและสัตว์ชนิดอื่น ซึ่งมีคุณสมบัติทำให้เชื้อสามารถเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุผนังทางเดินหายใจของโฮสต์ได้ดี (Niang et al., 1998) ส่งผลต่อการทำงานของซีเลียและระบบป้องกันภายในทางเดินหายใจบกพร่อง ทำให้ง่ายต่อการติดเชื้อแบคทีเรียทุติยภูมิ (Martin and Atiken, 2000) นอกจากนี้เชื้อยังลดความสามารถในการเก็บกินของเซลล์ macrophage ได้ (Niang et al. 1997) สายพันธุ์ของเชื่อน่าจะมีผลต่อการสร้างแคปซูล และการก่อโรคนั้นจึงอาจพบการเกิดโรคจากเชื้อนี้เดี่ยว ๆ หรือพบร่วมกับการติดเชื้ออื่น เช่น *Mannheimia haemolytica* (Dassanayake et al., 2010) Haziroglu et al. (1996) ใช้เทคนิค immunoperoxidase เพื่อตรวจจับแอนติเจนของเชื้อ *M. ovipneumoniae* ในเนื้อเยื่อปอดที่ตรึงด้วยฟอร์มาลินบนแผ่นสไลด์พบว่า มีการติดสีที่บนพื้นผิวนอกและภายใน cytoplasm ของ ciliated และ non- ciliated epithelial cells ของ bronchioles นอกจากนี้ยังพบการติดสีภายใน alveolar macrophages และ syncytial macrophages ที่อยู่ใน bronchioles เช่นกัน ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะรอยโรคที่เกิดจากเชื้อ mycoplasma และสัมพันธ์กับตำแหน่งรอยโรคในแกะ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า *M. ovipneumoniae* เป็นสาเหตุของรอยโรค bronchopneumonia ในแกะนั้น

การศึกษาความสัมพันธ์ของรอยโรค pneumonia ในแกะที่ส่งมาชันสูตรและวินิจฉัยโรคในครั้งนี้ใช้เทคนิค immunoperoxidase เช่นเดียวกันโดยพบการติดสีน้ำตาลเป็นแกรนูลในเซลล์เยื่อบุผิวของหลอดลมย่อย และในกลุ่มเซลล์อักเสบบริเวณช่องว่างของหลอดลมย่อย เช่นเดียวกับรายงานของ Haziroglu et al. (1996) เป็นการแสดงให้เห็นว่าเชื้อและแอนติเจนของเชื้อ *M. ovipneumoniae* มีการเกาะติดอยู่ที่บริเวณเซลล์เยื่อบุผิวของหลอดลมย่อย และในกลุ่มเซลล์อักเสบบริเวณช่องว่างของหลอดลมย่อย ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดโรคในกรณีติดเชื้อ mycoplasma และการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของแกะ

การชันสูตรและวินิจฉัยสาเหตุการตายของแกะรายนี้ทั้งจากประวัติ อาการ และการตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยวิธีทางพยาธิวิทยา แบคทีเรียวิทยา ตลอดจนการใช้เทคนิค PCR และ immunochemistry ได้ผลที่สอดคล้องกัน จึงสรุปได้ว่า แกะรายนี้ป่วยและตายจากการติดเชื้อร่วมกันของ Jaagsiekte sheep retrovirus และ *M. ovipneumoniae*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณณัฐริกา รัตนพันธุ์ ที่ช่วยในการเพาะแยกเชื้อ คุณชยภัค สืบู ที่ช่วยในการเตรียมแอนติซีรัมต่อเชื้อ *M. ovipneumoniae* คุณรุ่งอรุณ ยอดรัก ที่ช่วยเตรียมตัวอย่างทาง immunohistochemistry และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ประจำภาคตะวันตก จังหวัดราชบุรี ทุกท่านที่ให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการรายงานโรคครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- 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.
- Buddle, B.M., Hecceg, M. and Davies, D.H. 1984. Experimental infection of sheep with *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Pasteurella haemolytica*. Vet. Microbiol. 9: 543-548.
- Dassanayake, R.P., Shanthalingam, S., Herndon, C.N., Subramaniam, R. Lawrence, P.K., Bavananthasivam, J., Cassirer, E.F., Haldorson, G.J., Foreyt, W.J., Rurangirwa, F.R., Knowles, D.P., Besser, T.E. and Srikumaran, S. 2010. *Mycoplasma ovipneumoniae* can predispose bighorn sheep to fatal *Mannheimia haemolytica* pneumonia. Vet. Microbiol. 145: 354-359.
- Delas Heras, M., Gonzalez, L. and Sharp, J.M. 2003. Pathology of ovine pulmonary adenocarcinoma. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 275: 25-54.
- Garcia-Goti, M., Gonzalez, L., Cousens, C. Cortabarria, N., Extramiana, A.B. and Minguijon, E. 2000. Sheep pulmonary adenomatosis: characterization of two pathological forms associated with Jaagsiekte retrovirus. J. Comp. Pathol. 122: 55-65.
- 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.
- 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.
- Ionas, G. and Mews, A.J. 1985. Colonization of the respiratory tract of lambs by strains of *Mycoplasma ovipneumoniae*. Vet. Microbiol. 10: 533-539.
- Jones, G.E. 1983. Mycoplasma of sheep and goats: A synopsis. Vet Rec. 113: 619-620.
- Jones, G.E., Gilmour, J.S., Rae, A.G., MaLauchlan, M. and Nettleton, P.F. 1986. A review of experiments on the reproduction of chronic pneumonia in sheep by the use of pneumonic lung homogenate suspension. Vet. Bull. 56: 251-263.
- 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.
- Kycko, A., Jasik, A. and Reichert, M. 2008. Detection of Jaagsiekte sheep retrovirus in respiratory tract fluid and lung tissue of experimentally infected lambs. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 52: 9-13.

- Kycko, A. and Reichert, M. 2010. PCR-based methods for detection of JSRV in experimentally and naturally infected sheep. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 54: 445-450.
- 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.
- Luna, L. G. 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the Arm Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. McGraw-Hill Inc. New York. 217 p.
- 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. pp. 198-201.
- 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.
- OIE, 2008. *OIE Terrestrial manual*. Chapter 2.7.10 Ovine pulmonary adenocarcinoma (adenomatosis): 1031-1035.
- Palmarini, M., Datta, S., Omid, R., Murgia, C. and Fan, H. 2000. The long terminal repeat of Jaagsiekte retrovirus is preferentially active in differentiated epithelial cells of the lungs. *J. Virol.* 74: 5776-5787.
- Palmarini, M. and Fan, H. 2001. Retrovirus- induced ovine pulmonary adenocarcinoma, an animal model for lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 93(21): 1603-1614.
- Sharp, J.M. and De Martini, J.C. 2003. Natural history of JSRV in sheep. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 275: 55-79.
- Tustin, R.C. 1969. Ovine jaagsiekte. *J.S. Afr. Vet. Med. Assoc.* 40: 3-23.

A case report: Coincidence of Jaagsiekte sheep retrovirus and *Mycoplasma ovipneumoniae* infections in sheep

Pacharee Thongkamkoon * Sontana Mimapan 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

One and a half years old male Katahdin sheep from a farm in Ratchaburi province had the signs of depression, anorexia and nasal discharge with some bloody stain and the sheep died 2 weeks later. Macroscopic examination found that lung was grey, enlarged and firm. There were diffuse small tumors approximately 1-3 centimeters in diameter scattering in the lung tissue. Histopathological examination revealed proliferation of pneumocyte type 2 cells as the cuboidal and columnar tumor cells replaced the normal alveoli and formed papilliform growth projected to the alveoli. Infiltration of neutrophils and macrophages as well as hyperplasia of the bronchiolar epithelial cells was also present. Cellular debris and inflammatory cells were accumulated in the lumen of bronchiole. *Mycoplasma ovipneumoniae* was isolated from the affected lung tissue and specific PCR products of Jaagsiekte sheep retrovirus and *M. ovipneumoniae* were also positive by polymerase chain reactions. Lung sample taken for immunohistochemistry against anti -*M. ovipneumoniae* serum showed positive brown granules at the surface of the epithelial cells and within the inflammatory cells in the bronchiole. From the lesions which were compatible to the bacteriological and molecular findings, we concluded that the sheep was died by the mixed infections of Jaagsiekte sheep retrovirus and *M. ovipneumoniae*. This is a first report of *M. ovipneumoniae* infection in sheep in Thailand.

Keywords: Jaagsiekte sheep retrovirus, *Mycoplasma ovipneumoniae*, sheep