

การใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในการตรวจหา เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในสมองของสัตว์

ลัดดา ตรงวงศา^{1*} สันทนา มิมะพันธุ์¹ ปรีชา เรืองเวชวรชัย² ทริกา จันทมนิโชติ¹

¹ กลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง กทม.10900

² ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม.10330

* ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 0-257-98908 โทรสาร 0- 2579-8919 Email: laddat@dld.go.th

บทคัดย่อ

โรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคติดต่อร้ายแรงเกิดจากเชื้อไวรัส Genus Lyssavirus และ Family Rhabdoviridae เมื่อคนหรือสัตว์ถูกสัตว์ที่มีเชื้อกัด เชื้อจะเจริญและกระจายตัวเดินทางไปตามเส้นประสาทแล้วเข้าสู่สมองก่อนจะไปที่ต่อมน้ำลาย เนื่องจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิดสามารถติดโรคได้และมีศักยภาพสูงในการนำโรคร้ายแรงมาสู่คน การตรวจวินิจฉัยโรคให้ได้ผลรวดเร็ว แม่นยำ ถูกต้อง ในสัตว์ที่สงสัยว่าเป็นโรคพิษสุนัขบ้าจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะนำเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (immunohistochemistry, IHC) มาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ศึกษาความใช้ได้ของวิธีทดสอบ และศึกษาการกระจายตัวของไวรัสในสมองส่วนต่างๆของสัตว์แต่ละชนิดที่ผ่านการยืนยันว่าติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าโดยวิธี fluorescence antibody test (FAT) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อสมองของสุนัข 8 ตัวอย่าง โค 1 ตัวอย่าง และช้าง 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อสมองของสุนัข โค และช้างที่ให้ผลลบต่อการตรวจด้วยวิธี FAT ชนิดละ 1 ตัวอย่างซึ่งใช้เป็นตัวอย่างควบคุมลบมาทำการทดสอบ ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในสัตว์ทั้ง 3 ชนิด พบการอักเสบของสมองแบบ nonsuppurative encephalitis โดยพบ lymphocytic perivascular cuffing ในส่วน gray matter และสามารถตรวจพบ intracytoplasmic inclusion bodies หรือ Negri Bodies ใน neurons ในสมองสัตว์ทุกตัวอย่าง ในขณะที่พบสมองสุนัข 3 ตัวให้ผลลบ ส่วนผลการตรวจโดยใช้เทคนิค IHC โดยใช้ primary antibody คือ polyclonal anti-rabies nucleocapsid antibody (Bio-Rad[®]; Marnes-la-Coquette, France) แล้วตรวจโดยใช้ชุดทดสอบ EnVision[™] system, rabbit/mouse (DAKO[®]; Denmark, A/S) พบว่าสามารถตรวจพบแอนติเจนของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าจากเนื้อเยื่อสมองทุกตัวอย่าง โดยสมองส่วนที่ตรวจพบผลบวกได้แก่ cerebrum cerebellum hippocampus และ brainstem สำหรับในสุนัขพบว่าสมองส่วนที่พบการติดสีชัดเจนและมีการกระจายตัวค่อนข้างมากคือสมองส่วน hippocampus และ brainstem ส่วนในโคและช้างให้ผลชัดเจนในส่วน cerebellum และ brainstem ดังนั้น เทคนิค IHC จึงนับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าจากตัวอย่างสมองที่ผ่านการ fixed ด้วยน้ำยาฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน และเป็นวิธีที่ปลอดภัยสำหรับผู้ปฏิบัติเพราะไม่ต้องสัมผัสกับเชื้อไวรัสที่มีชีวิต

คำสำคัญ : อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ไวรัสพิษสุนัขบ้า สุนัข โค ช้าง

บทนำ

โรคพิษสุนัขบ้าเกิดจาก Rabies virus ซึ่งเป็น RNA virus อยู่ใน Genus Lyssavirus, Family Rhabdoviridae มีทั้งหมด 7 species ไวรัสแต่ละตัวมี nucleocapsid และรูปแบบของ surface protein ที่อาจแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคของโลก แต่มี antigenicity ที่คล้ายคลึงกัน สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิดรวมทั้งคนสามารถติดเชื้อนี้ได้ อาการป่วยมี 2 แบบ คือ แบบดุร้าย (furious form) จะแสดงอาการทางประสาท ตื่นเต้น ดุร้าย อุนิสัยเปลี่ยนไป อัมพาต ชัก และตาย ส่วนแบบซึม (dumb form) จะแสดงอาการซึม อ้าปาก ลิ้นห้อย จากนั้นจะมีอาการอัมพาต ชัก และตาย (Maxie and Youssef, 2007) เชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถติดต่อกันได้โดยการถูกสัตว์ที่เป็นโรคกัด ข่วน เลีย น้ำลายกระเด็นเข้าทางปาก ตา หรือทางผิวหนังที่มีบาดแผล จากนั้นเชื้อจะเข้าสู่แขนงประสาท และระบบประสาทส่วนกลาง ระยะฟักตัวหลังจากเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายจนเกิดอาการ ใช้เวลาประมาณ 2-8 สัปดาห์ หรืออาจสั้นเพียง 5 วัน หรือยาวนานเกิน 1 ปี ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างเช่น ความรุนแรงของบาดแผล ปริมาณของปลายประสาทที่ตำแหน่งแผล และระยะทางจากแผลไปสมอง เป็นต้น (Perl and Good, 1991) ความสำคัญของโรคนี้คือไม่มียารักษา คนหรือสัตว์เมื่อติดเชื้อจะตายในที่สุด ในแต่ละปีพบผู้เสียชีวิตทั่วโลกจากโรคพิษสุนัขบ้าประมาณ 55,000 ราย ส่วนใหญ่อยู่ในทวีปแอฟริกา อเมริกาใต้ และเอเชีย (WHO, 2013) อัตราการเป็นโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ในประเทศไทยแม้ว่าตัวอย่างที่พบผลบวกจากตัวอย่างส่งตรวจทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงจาก 46.42 % ในปี 2538 เป็น 15.38% ในปี 2554 และอุบัติการณ์การเป็นโรคในคนมีแนวโน้มลดลงด้วย (Puanghat and Hoonsuwan, 2005) แต่ไม่ได้หมายความว่าประเทศไทยสามารถควบคุมสถานการณ์ของโรคได้ ประกอบกับปี 2550 องค์การอนามัยโลก (WHO) และองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) ได้มีข้อตกลงร่วมกัน ในการกำหนดเป้าหมายให้มีการกำจัดโรคนี้ให้หมดไปในปี 2563 โดยกรมปศุสัตว์และกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้ร่วมจัดทำแผนยุทธศาสตร์การกำจัดโรคพิษสุนัขบ้า โดยกรมฯให้มีการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า ทำหมันสุนัขและแมว เพื่อควบคุมจำนวนสุนัขและแมวจรจัด และสร้างความรู้ความเข้าใจแก่ประชาชน (กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2552) เนื่องจากโรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคติดต่อร้ายแรงจากสัตว์สู่คนและยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย การชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้ามีส่วนสำคัญที่จะพิสูจน์ทราบถึงอุบัติการณ์ของโรค ทำให้สามารถวางแผนและแก้ไขสถานการณ์ โดยเฉพาะการตัดสินใจให้การรักษาในคนที่ได้สัมผัสเชื้อ (Yang et al., 2011) ในปัจจุบันการชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าสัตว์มีหลายวิธี เช่น วิธี fluorescent antibody test (FAT) วิธีฉีดเชื้อเข้าสมองหนูทดลอง และวิธีทางจุลพยาธิวิทยา เป็นต้น โดยวิธี FAT ถือเป็นวิธีมาตรฐานในการชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้า หากวิธี FAT ให้ผลลบ จะต้องตรวจยืนยันโดยวิธีบดเนื้อสมองเพื่อฉีดเข้าสมองหนูทดลอง ในกรณีที่ตัวอย่างมีเชื้อพิษสุนัขบ้าหนูจะแสดงอาการผิดปกติในวันที่ 9-12 และอาจต้องเฝ้าระวังถึง 21-28 วันซึ่งใช้เวลานาน (Whitfield et al., 2001) ผู้ป่วยจึงมีความเสี่ยงที่จะได้รับการรักษาไม่ทันการณ์ การใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry, IHC) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนในเนื้อเยื่อโดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนหยดลงบนสไลด์เนื้อเยื่อ และทำให้เกิดสีที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ส่องสว่าง ปัจจุบันเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับว่ามีความไวเทียบเท่ากับวิธี FAT (Palmer et al., 1985) และยังมีความไวมากกว่าในกรณีที่มีการติดเชื้อในระยะแรกซึ่งวิธี FAT ไม่สามารถตรวจได้ (Arslan et al., 2004) การศึกษารังสีจึงมีวัตถุประสงค์ที่ทดลองใช้วิธี IHC ศึกษาการกระจายตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในสมองแต่ละส่วนในสัตว์แต่ละชนิด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาโรคในเชิงลึกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างเนื้อเยื่อสมองของสัตว์ 3 ชนิด คือ สุนัขจำนวน 8 ตัวอย่าง โคจำนวน 1 ตัวอย่าง และช้างจำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ผ่านการ fixed ด้วยน้ำยา 10% buffered formalin และฝังในพาราฟิน ซึ่งทุกตัวอย่างได้ผ่านการชันสูตรยืนยันว่าติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าโดยวิธี FAT

คัดเลือกตัวอย่างสมองของสัตว์ 3 ชนิด ได้แก่ สุนัข โค และช้างอย่างละ 1 ตัวอย่าง ที่ให้ผลลบต่อการติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าโดยวิธี FAT เพื่อทำเป็นตัวอย่างควบคุมลบ

การศึกษาด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา

ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อสมองที่ฝังในพาราฟินให้มีความหนา 3 ไมครอน วางบนแผ่นสไลด์ แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธีของ Luna (1968) แล้วตรวจดูรอยโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์ส่องสว่าง

การศึกษาด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry, IHC)

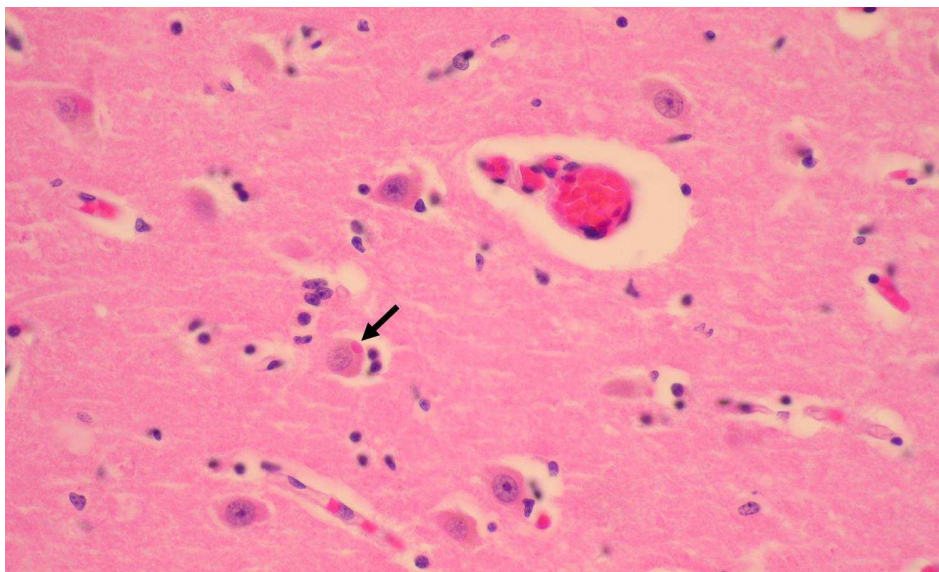
ตัดเนื้อเยื่อสมองที่ต้องการทดสอบและตัวอย่างควบคุมลบที่ฝังในพาราฟินให้มีความหนา 3 ไมครอน วางบนสไลด์ชนิด SuperFrost Plus (Menzel®; Braunschweig, Germany) อบที่ 60°C 30 นาที นำไปผ่านกระบวนการละลายพาราฟิน (deparaffinization) และกำจัด endogenous peroxidase ด้วย 0.3% H₂O₂ in methanol เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ใน phosphate buffered saline (PBS) 5 นาที แล้วอบสไลด์ที่แช่ในสารละลาย ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Dako®; Denmark, A/S) ด้วยความร้อนโดยใช้ไมโครเวฟที่ 750 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที และลดมาที่ 150 วัตต์ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำ antigen retrieval แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที จากนั้นหยด 10% normal goat serum ใน PBS pH 7.4 เพื่อเป็นการยับยั้ง nonspecific site ซึ่งจะทำให้ back ground ลดลง จากนั้นหยด primary antibody ซึ่งเป็น polyclonal conjugated anti-rabies nucleocapsid antibody (Bio-Rad®; Marnes-la-Coquette, France) แอนติบอดีนี้ปกติใช้ในการทดสอบโรคพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี FAT โดยใช้ความเข้มข้น 1:50 นำไปอบใน humidified chamber ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที จึงเริ่มทำการทดสอบตามขั้นตอนของชุดทดสอบ EnVision™ system, rabbit/mouse (DAKO®; Denmark, A/S) ในชุดทดสอบมีสารที่เป็น polymer ที่มีโมเลกุลของ peroxidase และ secondary antibody อยู่รวมกันซึ่งคือ horse-radish peroxidase (HRP) - labeled dextran polymer conjugated to immunoglobulins (Polymer/HRP) นำสารดังกล่าวมาหยดบนสไลด์นาน 10 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วเติม 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) ซึ่งทำหน้าที่เป็น substrate-chromogen อบนาน 5 นาที จึงล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปย้อมทับด้วยสี hematoxylin นาน 5-10 วินาที จากนั้น mount ด้วย glycergel (DakoCytomation®; Carpinteria, CA, USA) ปิดด้วย cover glass นำไปอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ส่องสว่าง

การอ่านผล: ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อแอนติเจนของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าจะพบการติดสีแดง

ผล

ผลการศึกษาด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา

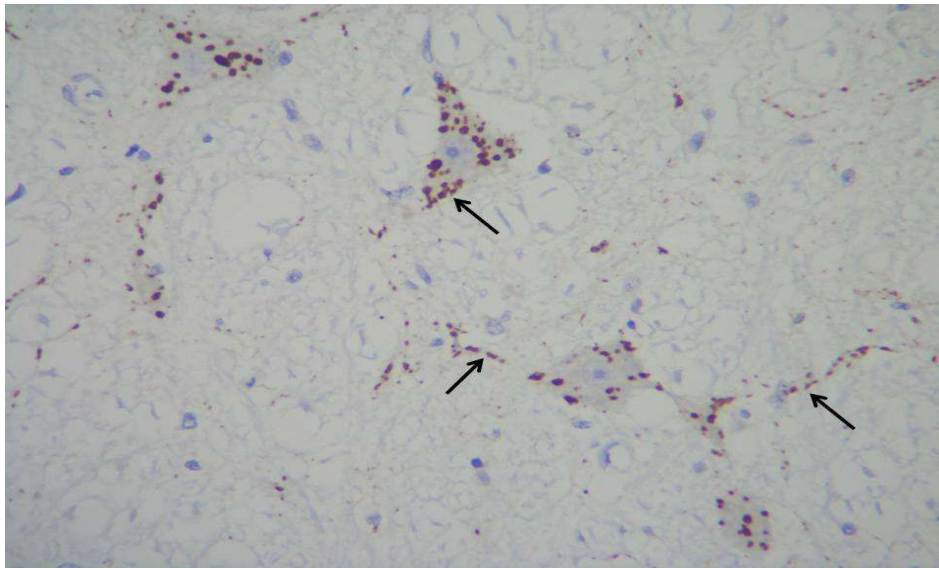
ผลการตรวจด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาจากตัวอย่างสมอง (ตารางที่ 1) ตรวจพบรอยโรคการอักเสบของสมองส่วน gray matter แบบ nonsuppurative encephalitis โดยมี lymphocytic perivascular cuffing ในสัตว์ทั้ง 3 ชนิด ส่วนการตรวจพบ intracytoplasmic inclusion bodies หรือ Negri Bodies ใน neurons ซึ่งถือเป็นลักษณะจำเพาะที่บ่งชี้ถึงการติดเชื้อพิษสุนัขบ้า พบว่าสามารถตรวจพบในสมองสุนัขเพียง 5 ตัวอย่าง (5/8) พบในสมองโค (1/1) และ ช้าง (1/1) (รูปที่ 1) ส่วนตัวอย่างควบคุมลบทั้งหมดตรวจไม่พบรอยโรค และ Negri Bodies



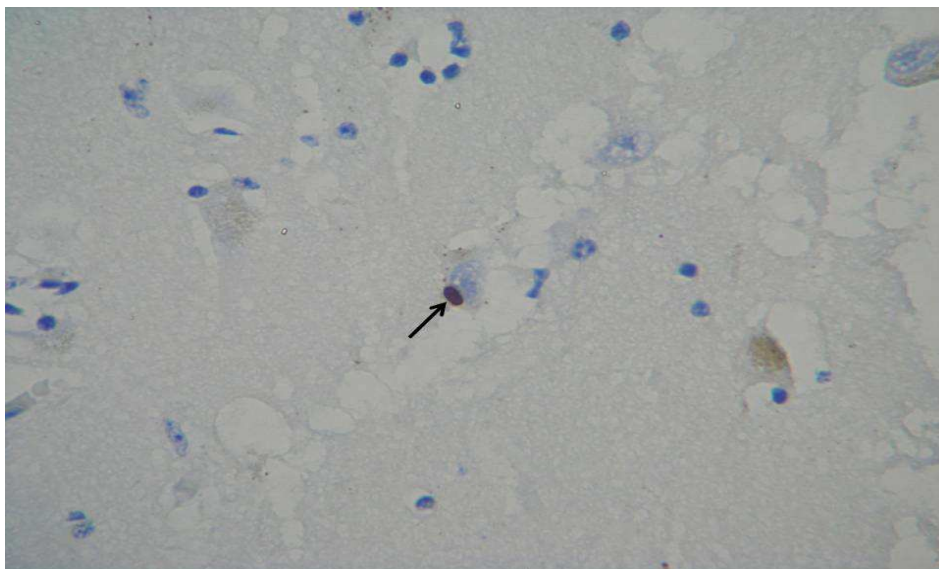
รูปที่ 1 แสดงลักษณะของ intracytoplasmic inclusion bodies หรือ Negri bodies (ลูกศรชี้) มีลักษณะกลม ติดสีชมพูเข้ม ใน cytoplasm ของ neurons ในสมองของช้าง (H&E, 40X)

ผลการศึกษาด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry, IHC)

ผลการตรวจด้วยวิธี IHC (ตารางที่ 1) พบแอนติเจนของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าติดสีแดงที่ cytoplasm ของ neurons จากตัวอย่างสมองของสุนัข โค และช้าง โดยพบมากในส่วนของ gray matter และมีลักษณะเป็น granule กระจายทั่วไปใน perikaryon ของ neurons รวมทั้งส่วนของ axon และ dendrite (รูปที่ 2) รวมทั้งพบได้ใน Negri bodies (รูปที่ 3) โดยสมองส่วนที่ตรวจพบผลบวกได้แก่ cerebrum cerebellum hippocampus brainstem ทั้งนี้มีความแตกต่างกันของการกระจายตัวของแอนติเจนเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในสมองแต่ละส่วนของสัตว์แต่ละชนิด โดยในสุนัขพบว่าสมองส่วนที่ติดสีชัดเจนและพบการกระจายตัวค่อนข้างมากคือสมองส่วน hippocampus และ brainstem ส่วนในโค และช้าง คือส่วน cerebellum และ brainstem ทั้งนี้ตรวจไม่พบการติดสีในตัวอย่างควบคุมลบ



รูปที่ 2 แอนติเจนของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าติดสีแดงใน cytoplasm ของ neurons ซึ่งมีลักษณะเป็นแกรนูล กระจายทั่วไปใน perikaryon รวมทั้งส่วนของ axon และ dendrite (ศรีษี) ที่สมองส่วน brainstem ของโค ย้อมด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยใช้ 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) เป็น substrate-chromogen และย้อมทับด้วยสี hematoxylin (20X)



รูปที่ 3 แอนติเจนของโรคพิษสุนัขบ้าติดสีแดงที่ Negri bodies ใน neuron ที่สมองส่วน cerebrum ของช้าง ย้อมด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยใช้ 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) เป็น substrate-chromogen และย้อมทับด้วยสี hematoxylin (20X)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจโรคพิษสุนัขบ้าในสมองสัตว์ด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) และเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (immunohistochemistry, IHC) ในสัตว์ที่ให้ผลบวกด้วยวิธี fluorescent antibody test (FAT)

ชนิดสัตว์	ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา		ผลการตรวจด้วยเทคนิค IHC			
	Nonsuppurative encephalitis	Intracytoplasmic inclusion bodies (Negri bodies)	cerebrum	cerebellum	hippocampus	brainstem
สุนัขตัวที่ 1	+	+	+	+	+++	+++
สุนัขตัวที่ 2	+	+	+	+	+++	+++
สุนัขตัวที่ 3	+	+	++	+	+++	+++
สุนัขตัวที่ 4	+	+	+	+	++	+++
สุนัขตัวที่ 5	+	+	+	+	++	+++
สุนัขตัวที่ 6	+	-	++	+	++	+++
สุนัขตัวที่ 7	+	-	+	+	++	+++
สุนัขตัวที่ 8	+	-	++	+	++	+++
สุนัขตัวที่ 9*	-	-	-	-	-	-
โคตัวที่ 1	+	+	+	+++	+	+++
โคตัวที่ 2*	-	-	-	-	-	-
ช้างตัวที่ 1	+	+	+	+++	+	+++
ช้างตัวที่ 2*	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : จุลพยาธิวิทยา + = พบรอยโรค
 จุลพยาธิวิทยา - = ไม่พบรอยโรค
 IHC + = พบแอนติเจนของโรคพิษสุนัขบ้าจำนวนน้อย
 IHC ++ = พบแอนติเจนของโรคพิษสุนัขบ้าจำนวนปานกลาง
 IHC +++ = พบแอนติเจนของโรคพิษสุนัขบ้าจำนวนมาก
 IHC - = ไม่พบแอนติเจนของโรคพิษสุนัขบ้า
 * = ตัวอย่างสัตว์ที่ให้ผลลบโดยวิธี FAT ใช้เป็นตัวควบคุมลบ

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้เป็นการประยุกต์ใช้ polyclonal anti-rabies nucleocapsid antibody (Bio-Rad[®]; Marnes-la-Coquette, France) conjugated ด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC) ที่ใช้ในการทดสอบวิธี FAT มาทำหน้าที่เป็น primary antibody และใช้ secondary antibody คือ HRP-labeled dextran polymer ที่ conjugated ด้วย immunoglobulins (Polymer/HRP) ในการทำให้ปฏิกิริยาเกิดสีและสามารถอ่านผลได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ส่องสว่างโดยไม่ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence โดยผลการศึกษาพบการติดสีชัดเจน อ่านผลง่าย พบ background น้อยจึงมีความแม่นยำ ถูกต้อง และเชื่อถือได้ และยังเป็นวิธีที่มีความไวสูงเพราะสามารถตรวจพบผลบวกได้ทุกตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี FAT และให้ผลลบทุกตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธี FAT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ให้ผลการตรวจรวดเร็ว (OIE, 2011) แต่วิธี FAT มีข้อด้อยคือ ต้องใช้ตัวอย่างสมองสด และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence ในการอ่านผลซึ่งมีราคาแพง และผู้ปฏิบัติงานต้องมีความเสี่ยงกับการสัมผัสไวรัสเชื้อเป็น โดยกระบวนการเก็บตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า นั้น อาจส่งเฉพาะหัวหรือทั้งตัวในกรณีที่เป็นสัตว์เล็ก ส่วนสัตว์ใหญ่จะตัดเฉพาะหัวใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็ง (กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2555) และการส่งตัวอย่างสมองสดจากพื้นที่ที่อยู่ห่างไกลมายังห้องปฏิบัติการอาจทำให้ตัวอย่างสมองเน่า ซึ่งทำให้การอ่านผลคลาดเคลื่อน ดังนั้นการใช้วิธี IHC ซึ่งสามารถทดสอบบนตัวอย่างที่แช่น้ำยาฟอร์มาลินซึ่งสามารถฆ่าเชื้อไวรัสได้ (Last et al., 1994) ทำให้การส่งตัวอย่างลักษณะนี้ปลอดภัยกว่าการส่งตัวอย่างสด นอกจากนี้วิธี IHC ยังสามารถที่จะตรวจหาแอนติเจนของไวรัสได้พร้อมกับรอยโรคและทราบการกระจายตัวของไวรัสในสมองแต่ละส่วนด้วย รวมทั้งรอยโรคที่ตรวจพบนั้นยังอาจบ่งชี้ได้ถึงโรคอื่นซึ่งช่วยในการทำการวินิจฉัยแยกโรคได้ด้วย

การตรวจพบแอนติเจนของไวรัสและการกระจายตัวของไวรัสในแต่ละส่วนของสัตว์แต่ละชนิดในการศึกษานี้พบว่า ในสุนัขสมองส่วนที่ติดสีชัดเจนและพบการกระจายตัวค่อนข้างมากคือสมองส่วน hippocampus และ brainstem ส่วนในโคและช้าง พบในสมองส่วน cerebellum และ brainstem สอดคล้องกับการศึกษาของ Bingham and Van Der Merwe (2002) และ Zimmer et al. (1990) ที่พบว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่กินพืช (herbivores) จะตรวจพบเชื้อมากที่สมองส่วน cerebellum ส่วนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่กินสัตว์ (carnivores) จะตรวจพบเชื้อมากที่สมองส่วน hippocampus ซึ่งการตรวจหาเชื้อพิษสุนัขบ้าในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยาโดยทั่วไปมักตรวจหา Negri bodies จากสมองส่วน hippocampus จากเนื้อเยื่อสมองที่ย้อมด้วยสี H&E โดยได้รับการยอมรับว่าเป็นลักษณะจำเพาะของการติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า (Jones et al., 1996) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสุนัข 8 ตัวที่ให้ผลบวกต่อเชื้อพิษสุนัขบ้าโดยวิธี FAT ทั้งหมด แต่ตรวจพบ Negri bodies เพียง 5 ตัวอย่างเท่านั้น ดังนั้นการใช้วิธีทางจุลพยาธิวิทยาเพียงอย่างเดียวในการชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าจึงนับว่าไม่เพียงพอ เพราะอาจพบเพียง 40-80% ของสมองที่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเท่านั้น (Jogai et al., 2000) นอกจากนั้นยังมีรายงานการพบ protein-related inclusions ใน cytoplasm ของ neurons ที่คล้ายกับ Negri bodies และอาจทำให้การชันสูตรคลาดเคลื่อนได้ (Nietfeld et al., 1989) และมีรายงานการพบ intracytoplasmic inclusion bodies ใน neurons ของโคและแมวที่ไม่ได้ติดเชื้อพิษสุนัขบ้า (Maxie and Youssef, 2007; Summers et al., 1995) ดังนั้นควรทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี FAT หรือ IHC ทุกครั้งที่ตรวจพบ intracytoplasmic inclusion bodies ใน neurons

จากการศึกษาครั้งนี้นอกเหนือจากสุนัข ยังมีตัวอย่างจากสมองของโคและช้างที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้า ซึ่งมีเพียงชนิดละ 1 ตัวอย่าง จากการสืบประวัติ และสอบสวนโรคพบว่า โคและช้างถูกสุนัขจรจัดกัด ซึ่งน่าจะประเมินได้ว่าสุนัขดังกล่าวเป็นสุนัขที่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ต่อมาโคและช้างดังกล่าวแสดงอาการซึม และ อัมพาตที่ขาหลัง มีการผ่าซากและเก็บตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ จนได้รับการชันสูตรในที่สุดว่าสัตว์ป่วยและตายด้วยโรคพิษสุนัขบ้า ดังนั้นทุกครั้งที่ปศุสัตว์ เช่น โค กระบือหรือสัตว์ป่า เช่น ช้าง โดยเฉพาะที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแสดงอาการทางประสาท เจ้าของสัตว์ สัตวแพทย์ และผู้ทำการผ่าซากหรือเก็บตัวอย่างส่งตรวจควรปฏิบัติงานด้วยความระมัดระวังตามหลักความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosafety) และทำการตรวจยืนยันโรคพิษสุนัขบ้าด้วยทุกครั้งเพื่อความมั่นใจและความปลอดภัยแก่ผู้สัมผัสสัตว์ เพื่อสามารถดำเนินการรักษาได้อย่างทันท่วงที (post-exposure treatment) ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2552. แผนยุทธศาสตร์การกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าให้หมดไปภายในปี พ.ศ.2563 (ค.ศ. 2020). โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กทม. หน้า 1-52.
- กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2555. คู่มือประชาชน กำจัดโรคพิษสุนัขบ้าในคน สัตว์ และชุมชน. สำนักงานกิจการโรงพิมพ์ องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก กทม. หน้า 7.
- Arslan, A., Saglan, Y.S. and Temur, A. 2004. Detection of rabies viral antigens in non- autolysed and autolysed tissues by using an immunoperoxidase technique. *Vet Rec.*155: 550-552.
- Bingham, J., and van der Merwe, M. 2002. Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J. Virol Methods.* 101(1-2): 85-94.
- Jogai, S., Radotra, B.D. and Banerjee, A.K. 2000. Immunohistochemical study of human rabies. *Neuropathology.* 20: 197-203.
- Jones, T.C., Hunt, R.D., and King, N.W. 1996. *Veterinary Pathology.* 6th ed., Williams & Wilkins, Philadelphia, PA., USA. p. 325-329.
- Last, R.D., Jardine, J.E., Smith, M.M.E. and Van, D.L. 1994. Application of immunoperoxidase technique to formalin-fixed brain tissues for the diagnosis of rabies in Southern Africa. *Onderstepoort J Vet Res.* 61: 183-187.
- Luna, L. G. 1968. *Manual of histologic staining method of the Arm Forces Institute of Pathology.* 3rd ed., Mc-Graw-Hill Book company, New York, USA. p. 207-235.
- Maxie, M.G. and Youssef, S. 2007. Nervous System. In: *Pathology of Domestic Animals.* Vol. 1. 5th ed., edited by K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer. Elsevier, Philadelphia, PA., USA. p 283-457.
- Nietfeld, J.C., Rakich, P.M., Tyler, D.E. and Bauer, R.W. 1989. Rabies-like Inclusions in dogs. *J.Vet Diagn Invest.* 1: 333-338.
- OIE. 2011. Chapter 2.1.13 Rabies. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.* Office International Des Epizooties, France. p. 1-20.

- Palmer, D.G., Ossent, P., Suter, M.M. and Ferrari, E. 1985. Demonstration of rabies viral antigen in paraffin sections: comparison of the immunofluorescence technique with the unlabelled antibody enzyme method. *Am J Vet Res.* 46: 283-286.
- Perl, D.P. and Good, P.F. 1991. The Pathology of Rabies in the Central Nervous System. In: *The Natural History of Rabies*. 2nd ed., edited by G.M. Baer. CRC Press, Boca Raton, FL., USA. p. 163- 190.
- Puanghat, A. and Hoonsuwan, W. 2005. Rabies situation in Thailand. *J. Med Assoc Thai.* 88(9):1319-1322.
- Summers, B., Cummings, J.F. and de Lahunta, A. 1995. Inflammatory diseases of the central nervous system. In: *Veterinary Neuropathology*. Mosby, St. Louise, MO, USA. p.95-188.
- Whitfield, S.G., Fekadu, M., Shaddock, J.H., Niezgod, M., Warner, C.K., Messenger, S.L., Hanlon, C., Morrill, K., Orciari, L., Rupprecht, C.E., Shoemaker, H., Wright, C. and Yager, P. 2001. A comparative study of the fluorescence antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. *J. Virol Methods.* 95:145-151.
- World Health Organization (WHO). 2013. "Rabies". [Online] Available source: <http://www.who.int/medacentre/factsheets/fs99/en/>. Accessed April 22, 2012.
- Yang, D.K., Shin, E.K., Oh, Y.I., Lee, K.W., Lee, C.S., Kim, S.Y., Lee, J.A. and Song, J.Y. 2011. Comparison of four diagnostic methods for detecting rabies viruses circulating in Korea. *Vet Science.* 13(1): 43-48.
- Zimmer, K., Wiegand, D., Manz, D., Frost, J.W., Reinacher, M., and Frese, K. 1990. Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. *Zbl. Vet. Med. B.* 37(5): 392-400.

Application of Immunohistochemistry for Detection of Rabies Virus in Brains of Animal

Ladda Trongwongsa^{1*} Sontana Mimapan¹ Preecha Ruangvejvorachai²
Tharika Chantamaneechote¹

¹ Pathology section, National Institute of Animal Health, Kasetklang, Bangkok, 10900

² Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330

* Corresponding author Tel 0-257-98908 Fax 0- 2579-8919 Email: laddat@dld.go.th

Abstract

Rabies is caused by Lyssavirus of the family Rhabdoviridae. It is a neurotropic virus which viral replication and dissemination occurs widely throughout the central nervous system before it spreads to salivary glands. All mammalian species are susceptible and because of its zoonotic potential and fatality disease, the rapid and accurate diagnosis of the suspected animals are very important. The aim of this study is to apply immunohistochemistry technique (IHC), and examine the reliability of this diagnostic testing for detection of rabies virus and viral dissemination in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) brain samples of naturally infected animals. The samples consisted of 8 dogs, 1 cattle and 1 elephant, previously diagnosed as rabies by fluorescent antibody test (FAT) were studied histopathologically and IHC using polyclonal anti-rabies nucleocapsid antibody (Bio-Rad[®]; Marnes-la-Coquette, France) and EnVision[™] system, rabbit/mouse kit (DAKO[®]; Denmark, A/S). In addition one brain sample of dog, cattle, and elephant which are negative for rabies virus by FAT were employed as negative control. Histopathological examination revealed nonsuppurative encephalitis characterized by perivascular lymphocytic cuffing in gray matter with intracytoplasmic inclusion bodies in neurons, called Negri bodies in all animals except 3 dogs. Rabies virus antigen was successfully detected by IHC technique in all cases, which distributed in cerebrum, cerebellum, hippocampus and brainstem. The target sites of rabies virus in dogs were hippocampus and brainstem, while cerebellum and brainstem were target sites in cattle and elephant. Thus IHC was proved to be useful as an alternative rabies diagnosis in FFPE brain tissues and the technique is save for the laboratory technician as the infected specimens was fixed by formalin.

Key words : immunohistochemistry (IHC), rabies virus, dog, cattle, elephant