

การศึกษาทางพยาธิวิทยาจากรอยโรคที่ผิวหนังของแพะเนื้อ
ที่ติดเชื้อโรคปากเปื่อยพุพองตามธรรมชาติ

Pathological study of contagious ecthyma from skin lesion
in naturally infected meat goats

ภุริดา ศรีพิพัฒน์กุล* วรา วรงค์ เจษฎา รัตน์ภาส สมจิตร รุจิขวัญ

Phurida Sripipattanakul* Vara Varong Jedsada Ratthanophart Somjit Rujikwan

Abstract

Backgrounds: Contagious ecthyma is a zoonotic viral disease, causing problems of meat goat farming in Thailand. It can cause different types of skin lesions around lip resulting in misdiagnosis of other virus-induced skin lesions. The aim of the study is to describe pathological characteristics of skin lesions from naturally orf viral infected meat goats for final and differential diagnosis.

Methods: The goat-skin samples were collected from 16-infected meat goats. The samples were sent to confirm infection of contagious ecthyma and rule out foot and mouth disease by real-time PCR, and real-time RT-PCR, respectively. Pathological study was conducted including gross pathology, histopathology and ultrastructural study.

Results: The samples were positive for contagious ecthyma, and were negative for foot and mouth disease. Gross pathology revealed hard dark scabs 100% (16/16) and erythema 6.25% (1/16) on lip 100% (16/16) and in nostril 25% (4/16). Histopathological study found main lesions in epidermal layer of both types of the samples. The 93.75% (15/16) scab lesion samples only had lesions at the top layer of epidermis with hyperkeratosis whereas, the 6.25% (1/16) scab lesion sample showed in all of epidermal layer. The erythema lesion sample presented ballooning degeneration with eosinophilic intracytoplasmic inclusions, and the inclusions were round and oval shaped, size 1-15 μm , in keratinocyte of stratum spinosum layer. Ultrastructural study found round shaped virions (150 nm) and oval shaped virions (150-180 nm x 250-300 nm) in cytoplasm of keratinocyte which morphologic and size consistent with orf virus.

Conclusions: The characteristic pathological formation in this study is particularly useful for final and differential diagnosis of contagious ecthyma in naturally infected meat goats. Besides, the proper samples for pathological diagnosis are epidermal skin of erythematous and scab lesions.

Keywords: Orf virus, contagious ecthyma, meat goat, pathological study

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900

*ผู้รับผิดชอบ: โทร 0894425515 e-mail: xuaiya55@gmail.com

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

*Corresponding author: Tel. 0894425515 e-mail: xuaiya55@gmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคปากเปื่อยพุพองเป็นโรคติดต่อไวรัสที่ติดต่อระหว่างสัตว์และคนซึ่งก่อปัญหาในการเลี้ยงแพะเนื้อในประเทศไทย โดยรอยโรคส่วนใหญ่พบบริเวณผิวหนังที่ริมฝีปาก และมักเกิดการวินิจฉัยผิดพลาดกับโรคที่มีรอยโรคใกล้เคียงกัน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำรอยโรคที่ผิวหนังของแพะเนื้อที่ติดเชื้อโรคปากเปื่อยพุพองจากการติดเชื้อตามธรรมชาติมาศึกษาทางพยาธิวิทยา สำหรับนำไปใช้วินิจฉัยโรคและวินิจฉัยแยกโรคได้

วิธีการ: เก็บตัวอย่างผิวหนังจากแพะเนื้อจำนวน 16 ตัว ส่งตรวจยืนยันการเกิดโรคปากเปื่อยพุพองและโรคปากและเท้าเปื่อยทางไวรัสวิทยาด้วยเทคนิค real-time PCR และ real-time RT-PCR ตามลำดับจากนั้นนำตัวอย่างผิวหนังดังกล่าวมาศึกษาพยาธิวิทยาทางจุลพยาธิวิทยา และศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ผล: การตรวจทางไวรัสวิทยาพบว่าทุกตัวอย่างให้ผลบวกต่อ orf virus และให้ผลลบต่อ foot and mouth disease virus การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าแพะทุกตัวแสดงรอยโรคเฉพาะที่ผิวหนังริมฝีปาก และ 25% (4/16) พบต่อเนื่องไปที่รูจมูก โดยรอยโรคที่พบมี 2 แบบ ได้แก่ แบบผื่นแดง 6.25% (1/16) และแบบสะเก็ด 100% (16/16) การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาในตัวอย่างทั้ง 2 แบบพบรอยโรคส่วนใหญ่ที่ชั้นหนังกำพร้า โดยรอยโรคแบบสะเก็ด 93.75% (15/16) พบเพียงส่วนบนของชั้นหนังกำพร้า และแสดงรอยโรค hyperkeratosis เป็นหลัก ขณะที่ตัวอย่างสะเก็ดที่มีชั้นหนังกำพร้าสมบูรณ์ 6.25% (1/16) นั้นพบรอยโรคได้เช่นเดียวกับรอยโรคแบบผื่นแดง คือ epidermal hyperplasia และการเสื่อมแบบ ballooning ที่มี eosinophilic intracytoplasmic inclusions ซึ่งมีลักษณะกลมรีขนาด 1-15 μm ในเซลล์ keratinocyte ที่พบในชั้น stratum spinosum ของหนังกำพร้า และการศึกษาในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบอนุภาคของ virus ทั้งที่มีรูปร่างกลมขนาด 150 nm และรูปไข่ขนาดกว้าง 150-180 nm ยาว 250-300 nm ในบริเวณไซโทพลาสซึมของเซลล์ keratinocyte ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นอนุภาคของ orf virus

สรุป: ผลการศึกษานี้พบว่ารอยโรคทางพยาธิวิทยาของโรคปากเปื่อยพุพองในแพะเนื้อที่ติดเชื้อตามธรรมชาติมีลักษณะจำเพาะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการวินิจฉัยโรคและวินิจฉัยแยกโรคได้ โดยตำแหน่งที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างสำหรับการวินิจฉัยโรคทางพยาธิวิทยาคือผิวหนังส่วนหนังกำพร้าของรอยโรคแบบผื่นแดงและแบบสะเก็ด

คำสำคัญ: Orf virus โรคปากเปื่อยพุพอง แพะเนื้อ การศึกษาทางพยาธิวิทยา

บทนำ

โรคปากเปื่อยพุพอง (contagious ecthyma, scabby mouth หรือ orf) เป็นโรคติดต่อของผิวหนังที่สำคัญในแพะ-แกะสามารถติดต่อจากสัตว์สู่คน และพบได้ทั่วโลก เกิดจาก orf virus ใน genus *Parapoxvirus* family *Poxviridae* ซึ่งเป็น double-stranded DNA virus รูปไข่ (Delhon, 2017) ขนาดยาว 230-300 nm และกว้าง 130-150 nm (Nashiruddullah *et al.*, 2018) รอยโรคมักพบจำเพาะที่ผิวหนังโดยทำให้เกิดผื่นแดง (erythema) ผื่นราบ (macule) ตุ่มนูน (papule) ตุ่มน้ำใส (vesicle) ตุ่มหนอง (pustule) และกลายเป็นสะเก็ดแห้งแข็ง (crust) ที่ลอกหลุดเป็นแผลเป็น (scar) (Wang and Luo, 2018) กรณีเกิดโรครุนแรงอาจพบรอยโรคที่ผิวหนังเปลือกตา ต้านม กีบ และอวัยวะเพศ ส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลงเนื่องจากกินและเดินลำบาก (de la Concha-Bermejillo *et al.*, 2003) อัตราการป่วยอาจถึง 100% และอัตราการตายประมาณ 5-15% สัตว์ที่หายป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้นาน 2-3 ปี และกลับมาเป็นอีกได้แต่หายเร็วขึ้น นอกจากนี้ภูมิคุ้มกันต่อโรคนี้ไม่สามารถส่งผ่านทางน้ำนม ทำให้แพะอายุน้อยมีความเสี่ยงสูงกว่าแพะเต็มวัย (Constable *et al.*, 2017)

ในประเทศไทยแพะเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่กรมปศุสัตว์มีนโยบายพัฒนาอาชีพการเลี้ยงให้ยั่งยืน มีผลผลิตที่มีคุณภาพเพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศและการส่งออก รวมถึงส่งเสริมการพัฒนาสู่อุตสาหกรรมฮาลาล (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 2559) อย่างไรก็ตามปัญหา

ด้านสุขภาพสัตว์อาจทำให้ได้ผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการ และหนึ่งในปัญหานั้นคือโรคปากเปื่อยพุพองที่ก่อปัญหาในการเลี้ยงแพะมานาน โดยมีรายงานพบโรคครั้งแรกจากฝูงแพะ-แกะในกรุงเทพมหานคร (ประภาสและคณะ, 2528) และมีรายงานการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี real-time PCR และ duplex PCR ในฝูงแพะจังหวัดชลบุรี (Choe-ngern *et al.*, 2014) รวมถึงมีรายงานผลการวิเคราะห์ ทดสอบ และชันสูตรโรคสัตว์ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติพบโรคในแพะจังหวัดลพบุรีและจังหวัดนนทบุรีใน พ.ศ.2560 อีกทั้งในประเทศไทยยังไม่มีการใช้วัคซีนสำหรับป้องกันโรค และโรคนี้มีการติดต่อผ่านผิวหนังที่มีแผล โดยแหล่งของเชื้อไวรัสที่สำคัญคือสะเก็ดแผลที่สามารถคงทนในสิ่งแวดล้อมได้นาน (Constable *et al.*, 2017)

การวินิจฉัยโรคนี้ทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น วิธี ELISA และ serum neutralization ซึ่งไม่ใช่วิธีที่เหมาะสมสำหรับเป็นวิธีวินิจฉัยหลัก (primary diagnosis) เนื่องจากปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ orf virus ของสัตว์ป่วยส่วนใหญ่เป็นภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) และมี neutralizing antibodies ที่มีความเข้มข้นต่ำ (Wang and Luo, 2018) วิธีทางอนุชีววิทยา เช่น เทคนิค PCR และเทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP) ยังไม่สามารถทำการตรวจได้ทุกห้องปฏิบัติการ และการเพาะแยกเชื้อซึ่งไม่นิยมเนื่องจากไวรัสนี้เจริญเติบโตช้า (Iowa State University Center for Food Security and Public Health, 2015) นอกจากนี้หากใช้การประเมินจากรอยโรคอาจทำให้เกิดการสับสนกับโรคติดเชื้ออื่น ๆ เช่น โรคปากและเท้าเปื่อย (foot and mouth disease; FMD) และฝีดาษแพะ-แกะ (sheep pox and goat pox; SGP) (Hosamani *et al.*, 2009) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีรายงานการวินิจฉัยแยกโรคผิดพลาดกับโรคปากเปื่อยพุพองหลายครั้ง เช่น ในประเทศไทยรายงานผลการตรวจตัวอย่างผิวหนังแพะที่ส่งเข้าตรวจโรคปากและเท้าเปื่อยใน พ.ศ. 2562 ของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทั้งหมดให้ผลลบต่อโรคปากและเท้าเปื่อยแต่ให้ผลบวกต่อโรคปากเปื่อยพุพองในประเทศลาวระหว่าง พ.ศ. 2558-2559 มีรายงาน

การพบโรคปากและเท้าเปื่อยในแพะสูงจากการวินิจฉัยด้วยตาเปล่า ซึ่งต่อมาเมื่อมีการส่งตัวอย่างตรวจทางห้องปฏิบัติการกลับพบว่าแพะเหล่านั้นเป็นโรคปากเปื่อยพุพอง (Windsor *et al.*, 2017) และใน สหราชอาณาจักร พ.ศ. 2544 มีการรายงานแกะที่เป็นโรคปากเปื่อยพุพองผิดพลาดเป็นโรคปากและเท้าเปื่อยถึง 23% (Watson, 2002) นอกจากนั้นประเทศออสเตรเลียยังเคยถูกปฏิเสธการส่งออกแกะมีชีวิตไปยังประเทศซาอุดีอาระเบียเนื่องจากพบว่าแกะบางตัวแสดงรอยโรคปากเปื่อยพุพองซึ่งทำให้ประเทศปลายทางกังวลว่าอาจเป็นโรคปากและเท้าเปื่อย (Fletcher and Crawford, 2013) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำรอยโรคที่ผิวหนังของแพะเนื้อที่ติดเชื้อโรคปากเปื่อยพุพองตามธรรมชาติมาศึกษาทางพยาธิวิทยาเพื่อรวบรวมข้อมูลรอยโรคทางพยาธิวิทยา (gross lesion) รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological lesion) และรอยโรคระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ultrastructural lesion) สำหรับนောင်ความรู้ที่ได้ไปใช้วินิจฉัยโรคและวินิจฉัยแยกโรคทางพยาธิวิทยา

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างผิวหนังโดยวิธี skin biopsy จากแพะเนื้อพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ผสม อายุระหว่าง 4 เดือนถึง 1 ปี จำนวน 16 ตัวที่แสดงรอยโรคปากเปื่อยพุพองในพื้นที่อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี จากการระบาดของโรคในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 จากนั้นแบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกทำการตัดแต่งชิ้นเนื้อสำหรับการศึกษาทางพยาธิวิทยาโดย fixed ตัวอย่างด้วย 10% formalin และอีกส่วนเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C สำหรับส่งตรวจทางไวรัสวิทยา

ตัวอย่างผิวหนังจากแพะเนื้อทั้ง 16 ตัวส่งตรวจยืนยันโรคปากเปื่อยพุพองด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ forward primer: 5'-TACACGGAGTTGGCCGT-GATCTTGTA-3' reverse primer: 5'-CGCCAAGTA-CAAGAAGCTGATGA-3' และ probe sequence: 5' Hex-TGCATCGAGTTGTAGATCTCGC GGT-BHQ-1 3' ตามวิธีของ Choe-ngern *et al.* (2014) และทดสอบ

โรคปากและเท้าเปื่อยด้วยเทคนิค real-time RT-PCR โดยใช้ forward primer: 5'-ACTGGGTTTTACAAACCT-GTGA-3' reverse primer: 5'-GCGAGTCCTGCCACG-GA-3' และ TaqMan® probe: 5'-FAM-TCCTTTGCAC-GCCGTGGGAC-TAMRA-3' ตามวิธีของ Callahan *et al.* (2002)

การศึกษาทางพยาธิวิทยา

1. การศึกษาทางมหพยาธิวิทยา (gross pathology): บันทึกลักษณะรอยโรคของแพะป่วยทุกตัว

2. การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology): นำตัวอย่างที่ fixed ด้วย 10% formalin มาผ่านขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin (H&E) โดยประยุกต์จากวิธีของ Luna (1968) และศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3. การศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ultrastructural study): นำตัวอย่างที่ fixed ด้วย 10% formalin มาผ่านขบวนการมาตรฐานในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) โดยล้างตัวอย่างด้วย phosphate buffer แล้ว fixed ในน้ำยา 1% osmium tetroxide แล้วตัด ultrathin-section ให้หนา 100 nm ย้อมด้วยสี lead citrate และ uranyl acetate ซึ่งประยุกต์จากวิธีของ เวคิน (2524) และศึกษาผ่าน TEM ยี่ห้อ HITACHI รุ่น HT7700 (Hitachi High-Technologies Corporation, Japan)

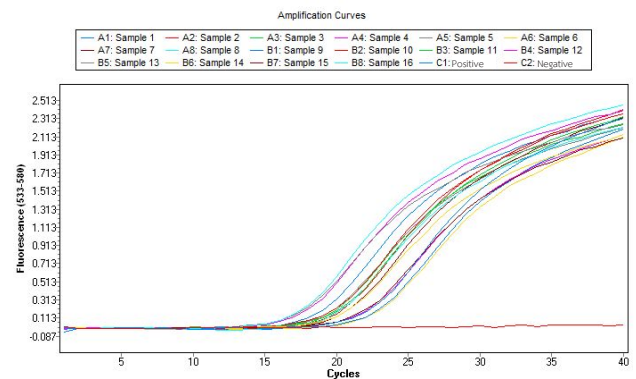
การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลรอยโรคทางพยาธิที่พบมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับโรคอื่น ๆ ที่พบรอยโรคคล้ายกัน

ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจทางไวรัสวิทยาจากแพะเนื้อทั้ง 16 ตัว ให้ผลบวกต่อโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยเทคนิค real-time PCR ดังแสดงในรูปที่ 1

ในขณะที่ผลการตรวจยืนยันไวรัส โรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR ให้ผลลบจากตัวอย่างผิวหนังทั้ง 16 ตัวอย่าง



รูปที่ 1 แสดงกราฟการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค real-time PCR ในการตรวจหา orf virus จากตัวอย่างผิวหนังแพะทั้ง 16 ตัว

ผลการศึกษาทางมหพยาธิวิทยาในแพะเนื้อทั้ง 16 ตัว พบแสดงลักษณะรอยโรคเฉพาะที่ผิวหนังริมฝีปากยาวไปจนถึงมุมปากทั้งด้านบนและล่าง รวมถึงพบต่อเนื่องไปที่จมูก 25% (4/16) โดยลักษณะรอยโรคที่พบมี 2 แบบ คือ แบบผื่นแดง 6.25% (1/16) ที่มีลักษณะเป็นผิวหนังนูนสีแดงหนาไม่เกิน 1 mm และแบบสะเก็ด 100% (16/16) ที่มีลักษณะแข็ง นูน ขรุขระไม่มีรูปทรงแน่ชัดมีลักษณะเป็นหย่อมโดยบางส่วนเชื่อมต่อกัน (multifocal-to-coalescing proliferative and necrotizing scabs) สีเทาอ่อนถึงเข้ม น้ำตาลเข้ม และดำ หนา 1-5 mm (รูปที่ 2A-B) ทั้งนี้มีแพะเนื้อ 1 ตัวที่แสดงรอยโรคทั้ง 2 แบบร่วมกันซึ่งอาจเกิดจากเมื่อเข้าเก็บตัวอย่างมีการลุกลามของรอยโรคขยายไปที่ตำแหน่งของจมูก จากการพบรอยโรคแบบสะเก็ดข้างต้นพบว่ามีความลักษณะและตำแหน่งของรอยโรคสอดคล้องกับรายงานโรคนี้ในแพะป่าประเทศตุรกีของ Ozmen and Dolu (2018) แต่ต่างจากรายงานในแพะ-แกะของประภาส และคณะ (2528) ที่นอกจากพบสะเก็ดที่ริมฝีปากแล้ว ยังพบรอยโรคเม็ดตุ่มแดง (red vesicle) ที่ริมฝีปากและเหงือกก่อนจะแตกเป็นสะเก็ด และต่างจากรายงานในลูกแพะของ Choe-ngern *et al.* (2014) ที่พบตุ่มใส และสะเก็ดทั้งบริเวณริมฝีปาก จมูก และกีบ ทั้งนี้รอยโรคที่ต่างกันอาจเป็นผลจากระยะการดำเนินของโรคที่ต่างกัน และช่วงวัยที่ต่างกัน เช่น สัตว์อายุน้อยจะมีความไวต่อโรคที่มากกว่า (Constable *et al.*, 2017) นอกจากนี้เป็นที่น่าสนใจว่าผิวหนังบริเวณที่พบรอยโรคเมื่อสัมผัสจะมีเลือดออกได้ง่ายเนื่องจากรอยโรคของโรคปากและเท้าเปื่อยมีลักษณะเด่นคือมีเลือดมาเลี้ยงจำนวนมาก (Hosamani *et al.*, 2009)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของแพะที่เป็นโรคปากเปื่อยพุพองทั้ง 2 แบบ

A: แสดงรอยโรคแบบผื่นแดง (->)

B: แสดงรอยโรคแบบสะเก็ด ที่พบมีลักษณะแข็ง ขรุขระ สีเทา-ดำ (->)

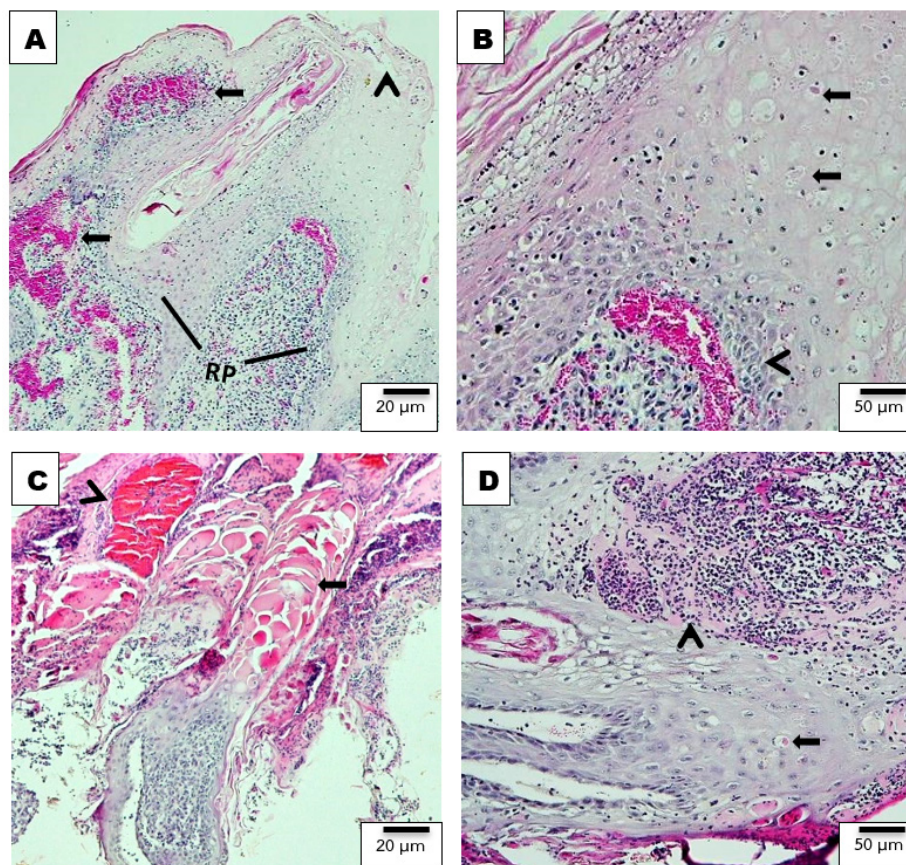
ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาจากรอยโรคแบบผื่นแดง และแบบสะเก็ดแสดงในตารางที่ 1 ในส่วนรอยโรคแบบผื่นแดงซึ่งเป็นบริเวณที่ผิวหนังเกิดการเปลี่ยนเป็นสีแดงนั้น พบการเปลี่ยนแปลงทั้งชั้นหนังกำพวด (epidermis) และหนังแท้ (dermis) โดยพบ hyperkeratosis ซึ่งเป็นการผิดปกติของการสร้างชั้นของ keratin (keratinization) ร่วมกับการเจริญเพิ่มขึ้นของเซลล์ชั้นหนังกำพวด (epidermal hyperplasia) และพบการเจริญของชั้นหนังกำพวดขยายไปที่ส่วนหนังแท้ที่เรียกว่า “rete pegs” (รูปที่ 3A) ร่วมด้วย ซึ่งเป็นรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบได้เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสใน family *Poxviridae* โดยมีรายงานพบได้ในระยะท้ายของการติดเชื้อ orf virus (Delhon, 2017) ในส่วนชั้น stratum granulosum และ stratum spinosum ของชั้นหนังกำพวดพบการเสื่อมแบบ ballooning และเฉพาะในชั้น stratum spinosum เท่านั้นที่พบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies ในเซลล์ keratinocyte (รูปที่ 3B) โดยมีลักษณะกลมรีเป็นปื้นติดสี eosin หลายระดับ ขนาด 1-15 μm และพบได้ตั้งแต่ 1 inclusions ขึ้นไป ส่วนชั้น stratum basale พบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการหนาตัวของชั้น stratum spinosum (รูปที่ 3B) โดยรอยโรคที่พบในชั้นหนังกำพวดเหล่านี้เป็นรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่สำคัญในการติดเชื้อ orf virus นอกจากนี้

ยังพบการบวมน้ำของเซลล์ keratinocyte (epidermal edema หรือ spongiosis) (รูปที่ 3B) ซึ่งรอยโรคนี้สามารถพัฒนาเป็น microvesicle (รูปที่ 3A) ได้ในระยะต่อมา อย่างไรก็ตามในส่วนของชั้นหนังแท้พบการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือดฝอยร่วมกับการคั่งเลือด (รูปที่ 3A) ที่เป็นหนึ่งในรอยโรคสำคัญในการติดเชื้อ orf virus ตามธรรมชาติ (Wang and Luo, 2018)

จากการศึกษารอยโรคแบบสะเก็ดซึ่งโดยทั่วไปเป็นบริเวณที่พบสิ่งคัดหลั่งจากการอักเสบ (exudate) ที่แห้งร่วมกับส่วนบนของชั้นหนังกำพวดพบว่าจาก 16 ตัวอย่างมีเพียง 6.25% (1/16) ที่พบชั้นหนังกำพวดครบสมบูรณ์ โดยพบรอยโรค hyperkeratosis (รูปที่ 3C) และ rete pegs รวมถึงพบการเสื่อมแบบ ballooning ของเซลล์ keratinocyte และสามารถตรวจพบ inclusions (รูปที่ 3D) ได้เช่นเดียวกับตัวอย่างผิวหนังจากรอยโรคแบบผื่นแดง แต่พบ inclusions ได้น้อยกว่า ส่วนอีก 93.75% (15/16) พบเพียงชั้น stratum corneum เท่านั้น โดยพบรอยโรค hyperkeratosis ร่วมกับพบเศษเซลล์ (cell debris) และเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) (รูปที่ 3D) ซึ่งข้อมูลข้างต้นนี้บ่งชี้ได้ว่าตัวอย่างผิวหนังของแพะที่ติดเชื้อ orf virus ที่แสดงรอยโรคแบบสะเก็ดสามารถนำมาตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคเช่นเดียวกับรอยโรคแบบผื่นแดง

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาจากรอยโรคแบบผื่นแดง และแบบสะเก็ดของแพะที่ติดเชื้อโรคปากเปื่อยพุพอง

Histopathological lesions	Gross lesions	
	Erythema lesions (n=1)	Scab lesions (n=16)
Hyperkeratosis	1	16
Epidermal hyperplasia with rete pegs	1	1
Inflammatory cell infiltration	1	16
Ballooning degeneration with eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies	1	1
Capillaries proliferation	1	0
Intralesional organisms		
- Bacteria	1	15
- Fungi	0	1



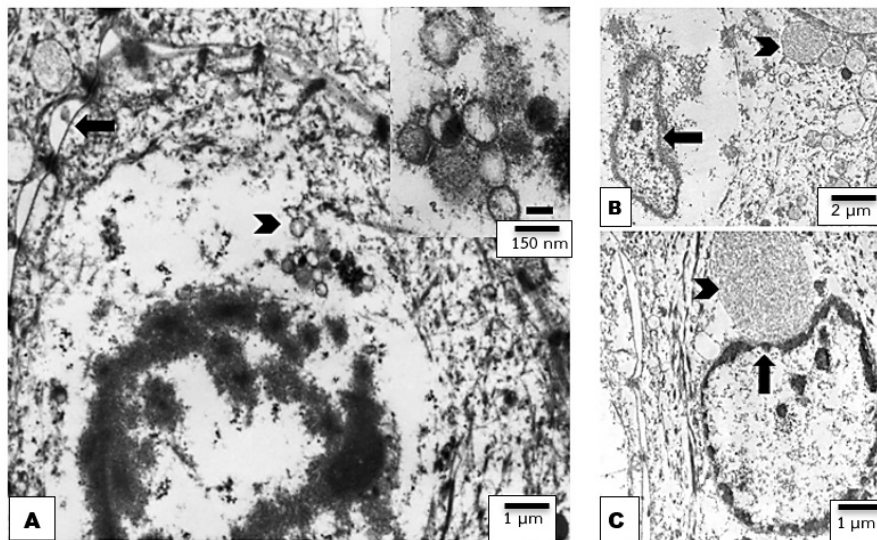
รูปที่ 3 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของโรคปากเปื่อยพุพองจากตัวอย่างผิวหนังแพะเนื้อ

A: แสดงรอยโรค epithelial hyperplasia ร่วมกับพบ rete pegs (RP) ในชั้นหนังกำพร้า และชั้นหนังแท้ พบการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือดฝอยร่วมกับการคั่งเลือดหลายตำแหน่ง (->) และ microvesicle (>) จากตัวอย่างผื่นแดง

B: แสดงภาพเซลล์ keratinocyte ในชั้น stratum spinosum ที่พบการเสื่อมแบบ ballooning ร่วมกับพบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies (->) และรอยโรค spongiosis ร่วมกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในชั้น stratum basale (>) จากตัวอย่างผื่นแดง

C: แสดงรอยโรค hyperkeratosis (->) และหยาบเลือดออก (>) จากตัวอย่างสะเก็ด

D: แสดงภาพเซลล์ keratinocyte ในชั้น stratum spinosum ที่พบการเสื่อมแบบ ballooning ร่วมกับพบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies (->) และบริเวณที่พบเซลล์อักเสบร่วมกับเศษเซลล์ (>) จากตัวอย่างสะเก็ด



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเซลล์ keratinocyte ที่ติดเชื้อ orf virus

A: แสดงเซลล์ keratinocyte ที่เกิด cytoplasmic proteolysis ร่วมกับพบนุภาคของ orf virus (>) โดยแสดงภาพขยายที่ด้านขวาบนของภาพ และการขยายออกของช่องว่างระหว่างเซลล์ (>)

B: แสดง nuclear collapse (>) และกลุ่ม inclusion bodies หลายขนาด (>)

C: แสดง nuclear invagination (>) และ inclusion bodies ขนาดใหญ่ (>)

การศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในการศึกษานี้เลือกศึกษาเฉพาะตัวอย่างที่ผิดปกติเนื่องจากตัวอย่างสะเก็ดมีความแข็งแรงมากจึงไม่สามารถตัดตัวอย่างได้ โดยพบเซลล์ keratinocyte ที่ไม่มี organelle ภายในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4A-C) และการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มนิวเคลียส เช่น การขยายของ nuclear pore การเกิด nuclear collapse (รูปที่ 4B) และ nuclear invagination (รูปที่ 4C) เป็นต้น ซึ่งบ่งถึงเซลล์ keratinocyte เกิดการบวมน้ำ (cytoplasmic edema) และการสลายของโปรตีน (cytoplasmic proteolysis) (Cheville and Lehmkuhl, 2009) และพบ cytoplasmic inclusion bodies (รูปที่ 4B-C) รวมถึง อนุภาคของ virus ที่มีรูปร่างกลมขนาด 150 nm และรูปไข่ขนาดกว้าง 150-180 nm ยาว 250-300 nm (รูปที่ 4A) บ่งชี้ว่าเป็น orf virus (Cheville and Lehmkuhl, 2009) โดยการศึกษาพบนุภาคของไวรัสไม่มากนัก ทั้งนี้เนื่องจาก orf virus มีกลไกการหลบเลี่ยงจากภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยสามารถเข้าไปหลบอยู่ในส่วนของสะเก็ดแผล (Wang and Luo, 2018) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่สามารถแสดง ultrastructural morphology ของเซลล์ที่ติดเชื้อได้ทั้งหมดโดยเฉพาะในส่วน fine structure ของเซลล์เนื่องจากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ใช้ศึกษาเป็นตัวอย่างที่ใช้ 10% formalin เป็น pre-fixative

ซึ่งสารนี้ไม่สามารถรักษาสภาพไขมันในเซลล์ได้ (ณรงค์, 2529)

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษารังนี้สามารถนำไปใช้วินิจฉัยแยกโรคในแพะที่มีรอยโรคคล้ายกับโรคปากเปื่อยพุพองได้ เช่น โรคปากและเท้าเปื่อย และโรคฝีดาษแพะ-แกะ เป็นต้น โดยโรคปากและเท้าเปื่อย ถึงแม้จะพบรอยโรคที่ผิวหนังบริเวณปากได้เช่นเดียวกัน แต่ส่วนใหญ่เป็นตุ่มใสและเปลี่ยนเป็นแผลถลอกที่ไม่พบการหนาตัวเป็นสะเก็ดแห้งแข็ง (Underwood *et al.*, 2015) ส่วนทางจุลพยาธิวิทยาพบการเสื่อมแบบ ballooning เช่นเดียวกัน แต่ไม่พบการเจริญเพิ่มขึ้นของเซลล์ชั้นหนังกำพร้า และ inclusion bodies (Cheville and Lehmkuhl, 2009) ส่วนโรคฝีดาษแพะ-แกะรอยโรคที่ผิวหนังมักจะกระจายทั่วลำตัวสัตว์ป่วย อีกทั้งยังพบอาการป่วยรุนแรงกว่า โดยพบได้หลายระบบ เช่น ระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร (Constable *et al.*, 2017) ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยามีลักษณะคล้ายคลึงกันโดยสามารถตรวจพบ inclusion bodies ได้เช่นเดียวกันแต่สามารถจำแนกเชื้อไวรัสด้วยการศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยอนุภาคของไวรัสใน genus *capripoxvirus* เป็นรูปอิฐ (brick shape) แต่ orf virus เป็นรูปไข่ (oval shape) (Delhon, 2017) โดยสามารถจำแนกความแตกต่างของอาการรอยโรคทั้ง 3 โรคนี้ได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงความแตกต่างระหว่างรอยโรคของแพะเนื้อที่ติดเชื้อโรคปากเปื่อยพุพอง โรคฝีดาษแพะ-แกะและโรคปากและเท้าเปื่อย (Constable *et al.*, 2017)

Clinical sign/lesions	Contagious Ecthyma	Sheep and Goat Pox	FMD
Clinical sign	Non-systemic	Systemic	Systemic
Skin and mucosal lesions	- Erythema, macules, papules, vesicles, pustules and scabs on lip, muzzle, ear, eyelids, teats, coronary band and in oral cavity (gums, palate, and tongue)	- Macules, papules, vesicles (rare) appear to coalesce over the body, mucous membranes of eyes and nose and mucosae of mouth, anus, and prepuce or vagina	- Vesicle and ulcer on coronary band and in oral cavity (gums, palate, and tongue)
Epithelial lesions	- Epidermal hyperplasia - Ballooning degeneration - Varying size eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies - Spongiosis	- Epidermal hyperplasia - Hydropic degeneration - Large eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies - Spongiosis - Ischemic necrosis	- Epidermal hyperplasia - Vacuolar degeneration - Spongiosis
Virus particle	- Oval shape	- Brick shape	- Icosahedral shape

นอกจากนี้โรคปากเปื่อยพุพองยังเป็นโรคที่กำจัดได้ยากเนื่องจากกลไกการหลบหนีจากภูมิคุ้มกันดังกล่าวข้างต้น ไวรัสจึงอยู่ในสภาวะที่ทำให้สามารถปนเปื้อนในอุปกรณ์การเลี้ยง และสิ่งแวดล้อมภายในฟาร์มได้เป็นเวลานาน (Delhon, 2017) อีกทั้งในสัตว์ป่วยตัวเดิมสามารถเป็นโรคซ้ำได้อีก ถึงแม้มีการทำวัคซีนแล้วยังสามารถแพร่เชื้อไวรัสได้เพียงแต่ความรุนแรงของโรคลดลงเท่านั้น (Hosamani *et al.*, 2009) ดังนั้นการควบคุมป้องกันโรคจึงควรแยกตัวป่วยออกจากฝูง มีการจัดการฟาร์มที่ดี ได้แก่ การทำความสะอาด และฆ่าเชื้ออุปกรณ์การเลี้ยง รวมถึงพื้นที่ฟาร์มทั้งหมดหลังเกิดโรค หรือหากทำได้ยากอาจย้ายพื้นที่การเลี้ยงใหม่ และอีกประการหนึ่งที่ต้องระวังคือปัญหาการติดต่อของโรคจากสัตว์สู่คน ซึ่งทำให้ผู้ป่วยเกิดตุ่มพอง (blister) ที่มีแผลหลุมตรงกลาง ร่วมกับมีอาการเจ็บปวดบริเวณผิวหนังที่สัมผัสสัตว์ป่วย อย่างไรก็ตามอาการดังกล่าวสามารถหายเองได้ภายใน 4-8 สัปดาห์ (Ginzburg and Liauchonak, 2017) แต่จากการลงพื้นที่เก็บตัวอย่างร่วมกับการสัมภาษณ์เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะในการศึกษานี้พบว่าไม่มีเกษตรกรรายใดแสดงรอยโรคดังกล่าวข้างต้น อย่างไรก็ตาม สัตวแพทย์และผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องควรมีความระมัดระวังตลอดจนให้ความรู้และสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับโรคนี้ต่อเกษตรกรเพื่อป้องกันการติดต่อของโรคระหว่างสัตว์และคน รวมถึงลดปัญหาด้านสุขภาพสัตว์เพื่อส่งเสริมการเลี้ยงแพะให้ยั่งยืนและมีผลผลิตที่มีคุณภาพต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้รอยโรคทางพยาธิวิทยาของโรคปากเปื่อยพุพองในแพะเนื้อที่ติดเชื้อตามธรรมชาติมีลักษณะจำเพาะเพียงพอสามารถใช้เป็นข้อมูลในการวินิจฉัยโรคและวินิจฉัยแยกโรคได้ ซึ่งการวินิจฉัยแยกโรคนี้ต้องใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย เนื่องจากไม่สามารถวินิจฉัยแยกโรคจากรอยโรคที่มองเห็นด้วยตาเปล่าได้ สำหรับรอยโรคที่พบส่วนใหญ่อยู่ในชั้นหนังกำพืดของตัวอย่างทั้ง 2 แบบและสามารถพบลักษณะเฉพาะของโรคทางจุลพยาธิวิทยาในรอยโรคแบบผื่นแดงชัดเจนกว่า รอยโรคแบบสะเก็ด ดังนั้นควรเลือกเก็บตัวอย่างที่มีเนื้อเยื่อส่วนหนังกำพืดในการส่งวินิจฉัยโรคทางพยาธิวิทยา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศช.สนทนา มิ้มพันธุ์ ที่ให้คำแนะนำตลอดการศึกษา เจ้าหน้าที่สำนักงานปศุสัตว์อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี และ น.สพ.การุณ ชนะชัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง คุณกัญญ์ณิศา ลิ้มวิบูลพงศ์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน สำหรับการตรวจทางไวรัสวิทยา และเจ้าหน้าที่ห้องพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ จิ่งสมานญาติ. 2529. หลักการและเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน Basic and techniques on biological applications of transmission electron microscope (TEM). คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 6-35.
- ประภาส เนรมิตมานสุข สมชัย พงศ์จรรยากุล ยันต์ สุขวงศ์ นที นิลนพคุณ และ Ahmed H. Dardiri. 2528. รายงานการตรวจพบโรค Contagious Ecthyma ในแพะและแกะที่กรุงเทพมหานคร. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย์.). 19(2): 119-126.
- เวคิน นพนิตย์. 2524. จุลทรรศน์อิเล็กตรอน electron microscopy. อักษรเจริญทัศน์. กรุงเทพฯ. หน้า 74-80.
- สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 2559. โรคแพะและแกะ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 135 หน้า.
- Callahan, J.D., Brown, F., Osorio, F.A., Sur, J.H., Kramer, E., Long, G.W., Lubroth, J., Ellis, S.J., Shoulars, K.S., Gaffney, K.L., Rock, D.L. and Nelson, W.M. 2002. Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220(11): 1636-1642.
- Cheville, N.F. and Lehmkuhl, H. 2009. Cytopathology of viral diseases. In: Ultrastructural Pathology: The Comparative Cellular Basis of Disease. 2nd eds., edited by N.F., Cheville. Wiley-Blackwell, Danvers, Massachusetts, U.S.A. p. 237-318.
- Choe-ngern, N., Tunak, A., Chalamaat, M. and Bintaviahok, M. 2014. A case report: Orf virus in goats in Chonburi province. *Proceeding of the 3rd Thailand-Japan Joint Conference on Animal Health 2014*. p. 27.
- Constable, P., Hinchcliff, K.W., Done, S. and Gruenberg, W. 2017. Diseases of the Skin, Eye, Conjunctiva, and External Ear. In: Veterinary Medicine: A Textbook Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. 11th eds. Elsevier Ltd. p. 1541-1634.
- de la Concha-Bermejillo, A., Guo, J., Zhang, Z. and Waldron, D. 2003. Severe persistent Orf in young goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15(5): 423-431.
- Delhon, G.A. 2017. Poxviridae. In: Fenner's Veterinary Virology, 5th eds., edited by N.J., MacLachlan and E.J., Dubovi. MPS limited. Chennai, India. p. 157-174.
- Fletcher, R. and Crawford, H. 2013. International Marketing: An Asia Pacific Perspective. Pearson Higher Education, Australia. PP. 558-559.
- Ginzburg, V.E. and Liauchonak, I. 2017. Human orf: Atypical rash in an urban medical practice. *Can. Fam. Physician.* 63(10): 769-771.
- Hosamani, M., Scagliarini, A., Bhanuprakash, V., McInnes, C.J. and Singh, R.K. 2009. Orf: An Update on Current Research and Future Perspectives. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 7(7): 879-893.
- Iowa State University Center for Food Security and Public Health. 2015. "Contagious ecthyma." *Center for Food Security and Public Health Technical Factsheets*. 42. [Online]. Available: https://lib.dr.iastate.edu/cfsph_factsheets/42. Accessed March 15, 2019.
- Luna, L.G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces institute of Pathology. 3rd eds. McGraw-Hill, New York, U.S.A. p. 1-38.
- Nashiruddullah, N., Pathak, D.C., Barman, N.N., Ahmed, J.A., Borah, P., Begum, S.S. and Islam, S. 2018. *In vitro* and *in vivo* assessment of Orf virus (ORFV) by electron microscopy. *Veterinarski Arhiv.* 88(6): 847-861.
- Ozmen, O. and Dolu, H. 2018. Pathological and electron microscopical observations on naturally occurring contagious ecthyma outbreak in two wild goats (*Capra aegagrus aegragus*). *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 65(4): 419-423.
- Wang, R. and Luo, S. 2018. Orf virus: a new class of immunotherapy drugs. *IntechOpen*. p. 1-18. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81535>. Accessed August 9, 2020.
- Watson, P. 2002. The differential diagnosis of FMD in sheep in the UK in 2001. *State Vet. J.* 12: 20-24.
- Windsor, P.A., Nampanya, S., Tagger, A., Keonam, K., Gerasimova, M., Putthana, V., Bush, R.D. and Khouns, S. 2017. Is Orf Infection a Risk to Expanding Goat Production in Developing Countries? A Study from Lao PDR. *Small Ruminant Res.* 154: 123-128.