

การตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้าจากเนื้อเยื่อม้าม และปอดโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

Detection of African horse sickness virus from spleen and lung tissues by immunohistochemistry method

ชัยวัลลัญช์ ตุนาค^{1*} กัญญาธิป แสงอรุณ² จิตติมา ไกยะวงษ์²

Chaiwalun Tunak^{1*} Kanyathip Sangarun² Jittima kaiyawong²

Abstract

Background: African horse sickness (AHS) is a highly infectious disease that affects Equidae species. The disease is caused by African horse sickness virus (AHSV), which is classified in the genus *Orbivirus*, family *Reoviridae* causes high mortality rates up to 90% in infected horses. Immunohistochemistry method is a specific method that identified infected viral in the tissue. This method can also specify viral pathogen in paraffin block tissue or formalin tissue samples. This study aims to investigate the distribution of AHSV in the spleens and lungs by gross pathology, histopathology, and Immunohistochemistry method. The findings will contribute to understanding of AHSV pathogenesis:

Method: Necropsies were performed on two infected horses that tested positive for AHS using Real-time RT-PCR. The spleens and lungs were collected and examined the gross pathology, histopathology using hematoxylin and eosin staining, and identification the presence of viral infection and determination the distribution of the AHSV within by Immunohistochemistry method.

Result: Gross pathology of infected horse no.1 revealed generalized subcutaneous edema, pulmonary edema, hydrothorax, and petechial hemorrhage at pericardium. Infected horse no.2 showed tracheal frothy exudate. Histopathological findings of both infected horses revealed splenic hemorrhages and congestion and interstitial pneumonia characterized by infiltration of macrophages and lymphocytes. For Immunohistochemistry method, splenic tissue of both infected horses demonstrated dark brown fine granule from DAB staining in red and white splenic pulp. Lung tissue showed partial staining of alveoli, pneumocyte type I, and type II admix with macrophage.

Conclusion: The study of gross pathology, histopathology, and IHC revealed consistent findings. IHC proved to be a specific technique that not only confirmed the presence of the disease but also provided information on the localization of AHSV within targeted organs, such as the spleen and lungs. This method holds potential for investigating the pathogenesis of AHSV and can also be applied for retrospective studies using formalin-fixed tissues.

Keywords: Horse, African horse sickness, immunohistochemistry, spleen, lung

¹ Veterinary Research and Development Center (Western Region) 126 M.10 Khaochangum subdistrict, Potharam District, Ratchaburi Province 70120

² Veterinary Research and Development Center (Eastern Region) 844 M.9 Khongkew subdistrict, Banbuang District, Chon-buri Province 20220

* Corresponding author: Tel. 0955405989 email:chaiwalun.tunak@yahoo.com

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก 126 ม.10 ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี 70120

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก 844 ม.9 ต.คลองกิว อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี 20220

* ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ : โทร. 0945405989 email:chaiwalun.tunak@yahoo.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า (African Horse Sickness, AHS) เป็นโรคร้ายแรงต่อสัตว์ตระกูลม้า โรคนี้เกิดจากเชื้อ African Horse Sickness Virus (AHSV) ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Orbivirus* วงศ์ *Reoviridae* ก่อให้เกิดอัตราการตายได้สูงถึง 90% ในม้า การวินิจฉัยโรคนี้ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นวิธีที่ให้ความจำเพาะ ช่วยในการระบุตำแหน่งของเชื้อไวรัส และสามารถตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสจากชิ้นเนื้อที่อยู่ในบล็อกพาราฟิน หรือชิ้นเนื้อที่แช่อยู่ในฟอร์มาลินได้ การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายตัวของเชื้อ AHSV ในเนื้อเยื่อม้าม และปอด ทางมหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสำหรับเป็นข้อมูลในการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อ AHSV

วิธีการ: ผ่าซาก และเก็บตัวอย่าง ม้าม และปอดจากม้าจำนวน 2 ตัว ที่ตายด้วยโรค AHS และตรวจยืนยันการติดโรคโดยวิธี Real-time RT-PCR นำมาศึกษาทางมหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยด้วยวิธีย้อมสี hematoxylin และ eosin ตรวจหาเชื้อไวรัสและศึกษาการกระจายของโรค AHS ในเนื้อเยื่อม้าม และปอด ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ผล: รอยโรคทางมหาวิทยาลัยของม้าตัวที่ 1 พบการบวม น้ำบริเวณใต้ผิวหนังทั่วร่างกาย ปอดบวม น้ำพบในช่องอก และจุดเลือดออกบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ ม้าตัวที่ 2 พบของเหลวเป็นฟองสีขาวในหลอดลมและหลอดลมฝอย ลักษณะทางจุลพยาธิของม้าทั้งสองตัวม้ามพบการคั่งเลือดและเลือดออก กระจายทั่วเนื้อเยื่อ และปอดพบการอักเสบของผนังถุงลม โดยพบเซลล์บ่งชี้การอักเสบจำพวก macrophage และ lymphocyte จากการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของม้าทั้งสองตัวในเนื้อเยื่อม้ามพบแกรนูโลสเอียต หรือจุดสีน้ำตาลเข้มของ DAB กระจายบริเวณ splenic parenchyma ทั้งบริเวณ red pulp และ white pulp สำหรับเนื้อเยื่อปอดพบการติดสีกระจายบริเวณถุงลมบางส่วน และ pneumocyte type I และ type II ร่วมกับ macrophage

สรุป: ผลจากการศึกษาทางมหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่ามีความสอดคล้องกันวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีจึงถือเป็นวิธีที่ใช้ในการยืนยันการติดเชื้อ

AHSV อีกทั้งยังช่วยในการระบุตำแหน่งของเชื้อ AHSV ในอวัยวะเป้าหมาย ได้แก่ ม้ามและปอด นอกจากนั้นยังใช้เพื่อการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อ AHSV และใช้เพื่อการศึกษาย้อนหลังโดยใช้ตรวจหาเชื้อ AHSV จากชิ้นเนื้อที่แช่อยู่ในฟอร์มาลินได้

คำสำคัญ: ม้า โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า อิมมูโนฮิสโตเคมี ม้าม ปอด

บทนำ

โรคกาฬโรคแอฟริกาในม้า (African Horse Sickness, AHS) เป็นโรคร้ายแรงต่อสัตว์ตระกูลม้า โรคนี้เกิดจากเชื้อ African Horse Sickness Virus (AHSV) ซึ่งเป็น RNA virus จัดอยู่ใน genus *Orbivirus*, family *Reoviridae* ก่อให้เกิดอัตราการตายได้สูงถึง 90% ในม้า (Mellor *et al.*, 2004) ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจต่อวงการม้าทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนย้ายม้าไปยังต่างประเทศได้ โรคนี้ถูกจัดอยู่ในรายการโรคระบาดที่สำคัญขององค์การสุขภาพสัตว์โลก (WOAH, 2022) และยังเป็นโรคในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 อีกด้วย

การวินิจฉัยโรค AHS สามารถพิจารณาเบื้องต้นจากอาการทางคลินิก และรอยโรคที่พบจากการผ่าซาก ได้แก่ สารน้ำลักษณะเยิ้มข้นจากน้ำเหลืองมีไฟบริน (serofibrinous effusion) และเลือดออก (hemorrhage) จากการที่หลอดเลือดในเนื้อเยื่อและในหลายอวัยวะถูกทำลาย เชื้อ AHSV จะเพิ่มจำนวนในต่อมน้ำเหลือง เป็นบริเวณแรก จากนั้นเชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือด โดยจับกับเม็ดเลือดแดง และจะเพิ่มจำนวนอีกครั้งในเซลล์เยื่อหลอดเลือดและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte จากนั้นจะเข้าไปยังอวัยวะเป้าหมาย ได้แก่ ปอด หัวใจ ม้าม และอวัยวะของระบบน้ำเหลือง จากการศึกษาของ Clift and Penrith (2010) ระบุว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte และ macrophage เป็นเซลล์เป้าหมายในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส แต่จากการศึกษาของ Jones *et al.* (2023) พบว่าสามารถพบเชื้อไวรัสใน lymphocyte ได้เช่นเดียวกัน สำหรับการวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการมี

หลายวิธี เช่น การตรวจหาเชื้อ การตรวจหาสารพันธุกรรม การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ แต่ยังคงข้อจำกัดสำหรับการทดสอบด้วยวิธีใดวิธีหนึ่ง ดังนั้นการทดสอบหลายวิธีร่วมกัน (combination test) จึงเหมาะสมต่อการวินิจฉัยโรคนี้ (WOAH, 2022) การวินิจฉัยโรคด้วยวิธีอิมมูโนสปีชีซทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry, IHC) เป็นหนึ่งในทางเลือกของการวินิจฉัยโรค ที่ให้ความจำเพาะเนื่องจากสามารถระบุตำแหน่งของเชื้อไวรัสเพื่อหาความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิได้ นั่นคือเป็นการตรวจหาแอนติเจนในเนื้อเยื่อ โดยใช้แอนติบอดีที่จับกันอย่างจำเพาะต่อแอนติเจนนั้น เมื่อเกิดการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี จะสามารถทราบได้จากการเกิดสีของ substrate ในบริเวณดังกล่าว สำหรับอนุภาคไวรัส (virion) ของเชื้อ AHSV มีเปลือกหุ้มหลายชั้น ได้แก่ เปลือกหุ้มไวรัสชั้นนอก (outer capsid) ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ VP2 และ VP5 ส่วนแกนกลาง (core) ของเชื้อไวรัสมีเปลือกหุ้มชั้นในและชั้นนอก โดยเปลือกหุ้มแกนกลางชั้นนอก (outer core) ประกอบด้วย โปรตีน VP7 จำนวน 260 ชิ้น เรียงตัวในลักษณะคล้ายวงแหวน (ring-like structure) เปลือกหุ้มแกนกลางชั้นใน (inner core) ประกอบด้วย โปรตีน VP3 จำนวน 60 ชิ้น ทำหน้าที่ห่อหุ้ม VP1 (polymerase), VP4 (capping enzyme), VP6 (helicase) และสารพันธุกรรม RNA ของไวรัส (genomic RNA segments) ซึ่งประกอบเป็นรูปร่างคล้ายดอกไม้ (flower-like transcriptase complex) (Roy *et al.*, 1994; Dennis *et al.*, 2019)

ในขณะที่วิธีการตรวจหาเชื้อหรือสารพันธุกรรมของเชื้อ เช่น Real-time RT-PCR สามารถระบุได้เพียงการมีหรือไม่มีเชื้อไวรัสในตัวอย่างเท่านั้นแต่ไม่ได้ระบุตำแหน่งของเชื้อไวรัส และวิธีการตรวจหาแอนติบอดีของเชื้อจะตรวจหาได้หลังจากการติดเชื้อ 8-12 วัน (WOAH, 2022) ซึ่งใช้เวลานานเกินกว่าการเกิดอาการของโรค ส่วนการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี สามารถตรวจได้ตั้งแต่พบการติดเชื้อในร่างกายในระยะแรก ๆ ทำให้สามารถวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในโรค AHS นั้น ไม่พบปฏิกิริยาข้ามกัน (cross reaction) ต่อเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Orbivirus* ชนิดอื่น และยังให้ผลตรวจที่เชื่อถือได้ว่าเนื้อเยื่อจะถูกตรึงใน

ฟอร์มาลินนาน 365 วัน (Clift *et al.*, 2009) จึงสามารถใช้เพื่อการศึกษาย้อนหลัง ในกรณีที่ชิ้นเนื้อแช่อยู่ในบล็อกพาราฟินหรือชิ้นเนื้อที่แช่อยู่ในฟอร์มาลินเป็นเวลานานได้ ยิ่งไปกว่านี้สามารถใช้วิธีนี้สำหรับห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องตรวจหาสารพันธุกรรม

การศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อ AHSV ในเนื้อเยื่อม้ามและปอดซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อเป็นการตรวจยืนยันโรค และศึกษาการกระจายตัวของเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อม้ามและปอดสำหรับเป็นข้อมูลในการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อ AHSV ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างม้ามและปอดจากม้าที่ตาย ซึ่งให้ผลบวกต่อเชื้อ AHSV ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (Guthrie *et al.*, 2013) จำนวน 2 ตัว จากนั้นนำเนื้อเยื่อม้ามและปอดแช่ในน้ำยา 10% neutral buffered formalin ตัวอย่างควบคุมลบ ได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อม้ามและปอดของม้าที่ทำการศึกษา โดยดำเนินการทุกขั้นตอนเช่นเดียวกับตัวอย่างทดสอบ แต่ใช้น้ำกลั่นหยดลงบนสไลด์แทน primary antibody

การศึกษาทางพยาธิวิทยา (gross pathology) และจุลพยาธิวิทยา (histopathology)

ศึกษาทางพยาธิวิทยาโดยการผ่าซาก สังเกตและบันทึกพยาธิสภาพที่พบ และศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาโดยนำชิ้นเนื้อที่ผ่านการแช่ในน้ำยา 10% neutral buffered formalin เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง มาตัดแต่งให้มีขนาดไม่เกิน 2 x 3 เซนติเมตร หนาประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการดึ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง automatic tissue processor (citadel 1000, Thermo Fisher Scientific, UK) และนำตัวอย่างเนื้อเยื่อฝังในพาราฟินด้วยเครื่อง embedder หลังจากนั้นตัดเนื้อเยื่อตัวอย่างด้วยเครื่อง microtome ให้หนา 3-5 ไมโครเมตร และติด section บนสไลด์ ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) เมื่อเตรียมสไลด์

เรียบร้อยแล้ว นำมาตรวจดูรอยโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์ ชนิดส่องสว่าง (Fischer *et al.*, 2008; Slaoui and Fiette, 2011)

การศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) (Wohlsein *et al.*, 1997)

นำตัวอย่างบล็อกเนื้อชิ้นเนื้อม้าม และปอดที่ตัดด้วยเครื่อง microtome มาติดบนแผ่นสไลด์แก้วชนิดมีประจุบวก (Positive charged slide) สำหรับเตรียมเนื้อเยื่อ และขจัดพาราฟินออก (deparaffinization) ด้วย xylene และคืนน้ำ (rehydration) ด้วย ethanol ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที หรือแช่จนกว่าจะถึงขั้นตอนต่อไป กำจัด endogenous peroxidase โดยหยด 3% H₂O₂ ให้ทั่วสไลด์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที จากนั้นคืนสภาพแอนติเจน (antigen unmasking) โดยใช้เอนไซม์ proteinase K (Dako, USA) โดยหยดให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที หยด 5% bovine serum เพื่อยับยั้งการจับแบบไม่จำเพาะ (non-specific block) และอบที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที และล้างด้วย PBS นาน 5 นาที จากนั้นหยด primary antibody (Ingeneza, Spain) (ความเข้มข้น 1:500) ที่จำเพาะต่อโปรตีน VP7 ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ อบสไลด์เนื้อเยื่อในกล่องความชื้น 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หยด secondary antibody solution (ImmPACT/Imm PRESS-VR polymer reagent, USA) ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ อบสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น อย่างน้อย 30 นาที และไม่ให้เกิดแสง หลังจากนั้น ล้างจุ่มใน PBS และแช่ไว้ 5 นาที จากนั้นหยด substrate (3,3'-Diaminobenzidine, DAB, USA) ให้ทั่วเนื้อเยื่อบนสไลด์ จะเกิดสี แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที หลังจากนั้นทำ counterstain โดยแช่สไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย hematoxylin เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วล้างน้ำไหล 10-15 นาที จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ ด้วย ethanol หลังจากนั้น mount สไลด์ โดยใช้ permount สำหรับตัวอย่างควบคุมลบจากตัวอย่างเนื้อเยื่อม้ามและปอดของม้า

ที่ทำการศึกษาโดยดำเนินการทุกขั้นตอนเช่นเดียวกับตัวอย่างทดสอบ แต่ใช้น้ำกลั่นหยดลงบนสไลด์แทน primary antibody

การอ่านผลของวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

โดยเปรียบเทียบปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดีของตัวอย่างม้ามและปอด กับตัวอย่างควบคุมลบ

- ผลบวก แสดงโดยการเกิดสีตรงตำแหน่งของเนื้อเยื่อม้ามและปอด โดยพบการติดสีน้ำตาลเข้มของ DAB ในไซโตพลาสซึม ของ endothelial cells ของหลอดเลือดขนาดเล็ก (capillaries) small postcapillary venules และ precapillary arterioles ลักษณะการติดสี จะเห็นเป็นแกรนูลละเอียด (finely granular chromogen) หรือจุดกระจายในเนื้อเยื่อ (diffuse dot-like chromogen)

- ผลลบ ไม่พบการติดสีน้ำตาลเข้มของ DAB ที่เนื้อเยื่อม้ามและปอด

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel version 2016 เพื่ออธิบายข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา

ผลและวิจารณ์

ผลการศึกษาทางมหาวิทยวิททยา ทางจุลพยาธิวิทยา และวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ของม้าที่ติดเชื้อ ASHV ทั้ง 2 ตัว แสดงในตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาทางมพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา และวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในม้ามและปอดของม้าทั้ง 2 ตัว ที่ให้ผลบวกต่อ AHSV ด้วยวิธี Real-time RT-PCR

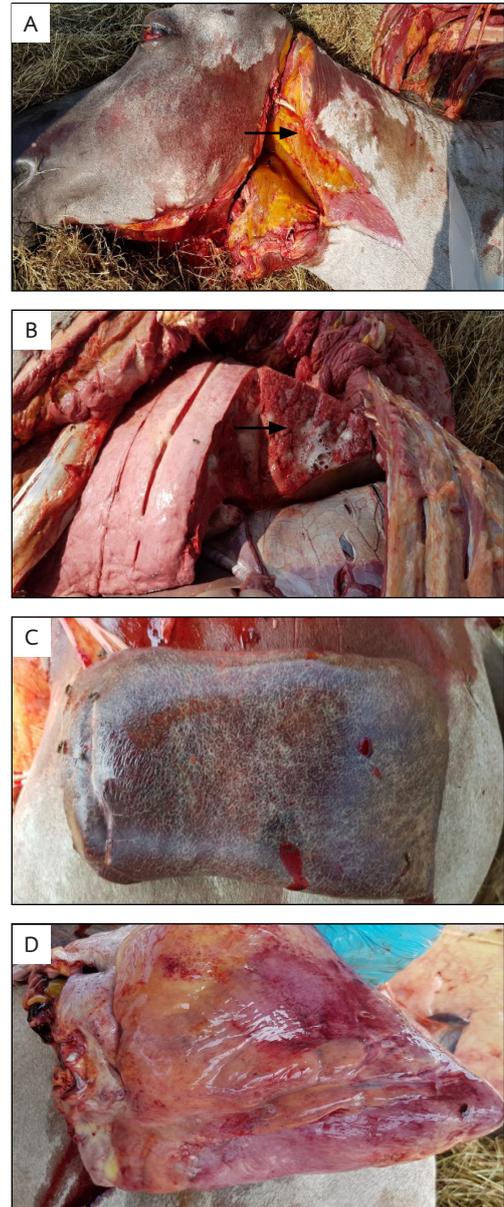
Pathological Change	Spleen		Lung	
	Horse 1	Horse 2	Horse 1	Horse 2
Gross lesion				
Splenic enlargement	++	++	N/A	N/A
Splenic congestion	+	+	N/A	N/A
Diffuse pulmonary edema	N/A	N/A	+++	++
Tracheal frothy exudate	N/A	N/A	+	+
Histopathology				
Splenic congestion and hemorrhage	++	++	N/A	N/A
Hemosiderin accumulation	++	++	N/A	N/A
Diffuse pulmonary edema	N/A	N/A	+++	++
Intra-alveolar hemorrhage	N/A	N/A	-	+
Edematous fluid in bronchiolar lumen	N/A	N/A	+	-
Inflammatory cells infiltration of alveolar lumen	N/A	N/A	-	+
Inflammatory cells infiltration of alveolar wall, alveolar lumen and interlobular vein	N/A	N/A	++	-
Immunohistochemistry				
DAB stain in red and white pulp of spleen	++	++		
DAB stain in alveolus, pneumocyte type I and pneumocyte type II			++	++

Remark: N/A = Not Available, Not Found ++ Mild +++ Moderate ++++ = Severe

ผลการศึกษาทางมพยาธิวิทยา

รอยโรคที่พบจากม้าที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ AHSV ทั้ง 2 ตัว พบว่าเป็นรอยโรคแบบ Mixed form คือพบทั้งอาการที่เป็น Pulmonary form ได้แก่ พบภาวะปอดบวม น้ำในช่องอก ของเหลวปนฟองอากาศในหลอดลม และ Cardiac form ซึ่งพบจุดเลือดออกบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ ซึ่ง CFSPH (2015) ได้อธิบายว่า เป็นผลจากการที่เชื้อไวรัสเข้าไปทำลายหลอดเลือด ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเยื่อบุหลอดเลือด เกิดการเพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด (vascular permeability) ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของแรงดันในหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อ (hydrostatic pressure) ทำให้เกิดการสะสมของเหลวในช่องว่างในปอด (pulmonary edema) และตรงกับที่ Wohlsein *et al.* (1997) ได้พบโปรตีนของเชื้อไวรัส (viral protein) ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในปริมาณที่สูงกว่าตำแหน่งอื่น นอกจากนี้พบว่าม้าตัวที่ 1 มีการดำเนินไปของโรคนานกว่าม้าตัวที่ 2 จึงพบน้ำในช่องอก (hydrothorax) จากการ

สะสมของเหลวปริมาณมากร่วมด้วย สำหรับอวัยวะอื่นๆ ได้แก่ ม้าม และหัวใจ พบรอยโรคจากการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส โดยพบการคั่งเลือด และพบเลือดออกในบริเวณดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบภาวะบวมน้ำใต้ผิวหนังทั่วร่างกาย และบริเวณเข้าตาจากการทำลายหลอดเลือดจากเชื้อไวรัสในบริเวณดังกล่าวเช่นเดียวกัน



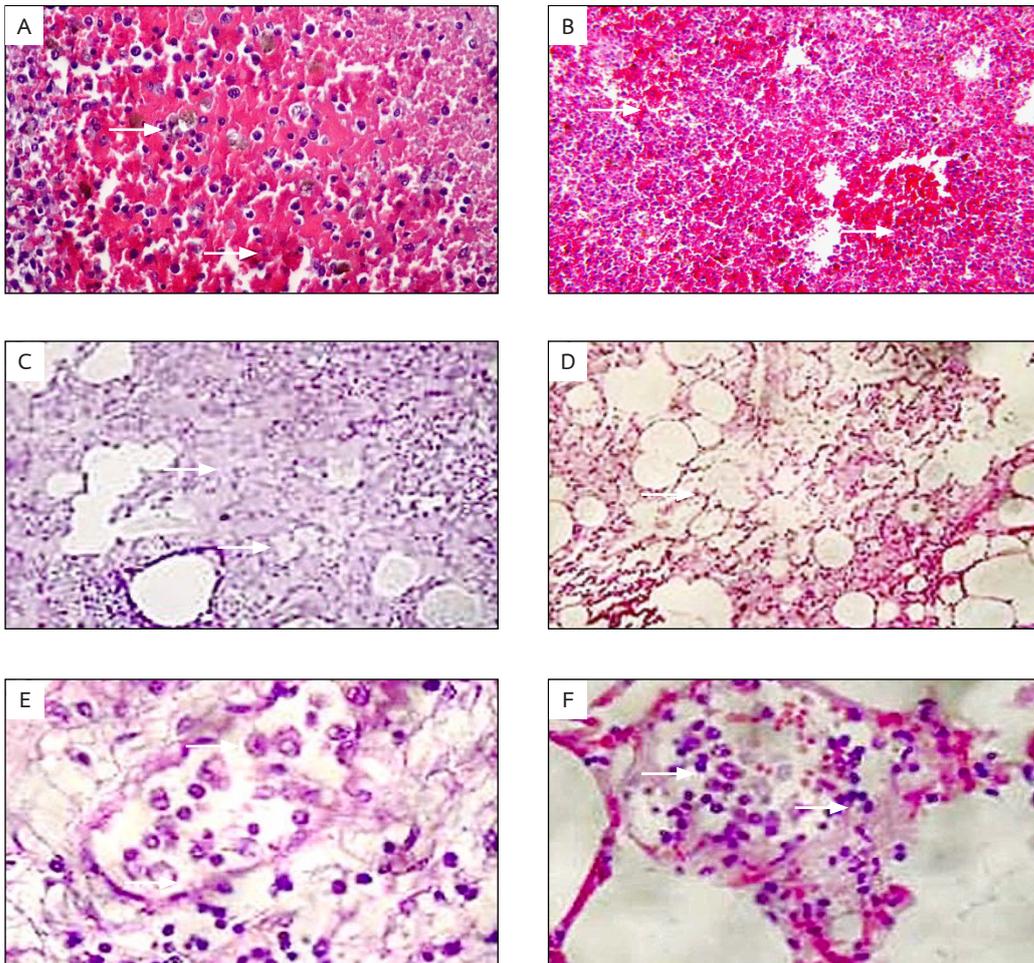
รูปที่ 1 แสดงมพยาธิวิทยาของม้าที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ AHSV ด้วยวิธี Real-time RT-PCR

- (A) พบการบวมน้ำบริเวณใต้ผิวหนังทั่วร่างกาย (ครชี้)
- (B) ปอดพบภาวะบวมน้ำแบบรุนแรง กระจายทั่วไป (ครชี้)
- (C) พบม้ามมีขนาดใหญ่ และคั่งเลือด
- (D) พบจุดเลือดออกบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

มีพบการคั่งเลือดและเลือดออก จากการย้อมสี H&E ปอดพบภาวะบวมน้ำกระจายทั่วปอดแบบรุนแรง เลือดออกบริเวณถุงลมแบบไม่รุนแรง ร่วมกับการพบเซลล์อักเสบ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาว บริเวณถุงลม ผนังถุงลม และหลอดเลือดในเนื้อเยื่อปอด รอยโรคที่พบจากการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Adam (2011) ที่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อปอด จากการสะสมของสารน้ำในเนื้อเยื่อปอด (proteinaceous fluid) ไฟบริน ร่วมกับเซลล์

เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังพบการบวมน้ำในบริเวณอื่นจากการเพิ่มขึ้นของเลือดที่ไหลผ่านในหลอดเลือด และการไหลเวียนของเลือดในร่างกายนี้อาจตรงกับที่ Clift *et al.* (2010) ได้อธิบายว่าการติดเชื้อไวรัสทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเยื่อบุหลอดเลือดในปอด และหลอดเลือดในหัวใจ ทำให้บวมน้ำ เลือดออก จะเห็นว่ารอยโรคที่พบในการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยานี้มีความสอดคล้องกับรอยโรคที่พบจากการศึกษาทางมหพยาธิวิทยา



รูปที่ 2 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อที่ย้อมสี H&E

- (A) แสดงภาวะคั่งเลือดและเลือดออก ในเนื้อเยื่อข้างของม้าม (→) (400x)
- (B) แสดงภาวะคั่งเลือดและเลือดออก ในเนื้อเยื่อข้างของม้าม (→) (100x)
- (C) แสดงภาวะปอดบวมน้ำกระจายทั่วปอด ของม้ามตัวที่ 1 (→) (40x)
- (D) แสดงภาวะปอดบวมน้ำกระจายทั่วปอด ของม้ามตัวที่ 2 (→) (40x)
- (E) แสดงการพบเซลล์อักเสบปานกลางบริเวณถุงลมและเส้นเลือดในเนื้อเยื่อปอด ของม้าม (→) (400x)
- (F) แสดงการพบเซลล์อักเสบเล็กน้อยบริเวณถุงลม ของม้าม (→) (400x)

ผลการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

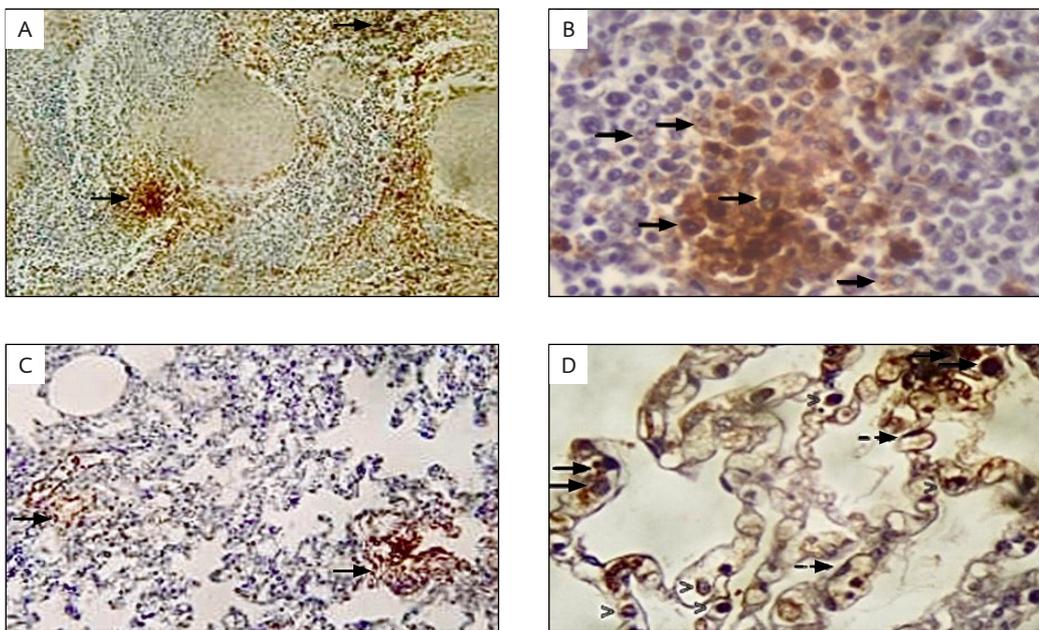
การตรวจหาเชื้อ AHSV ใน เนื้อเยื่อม้ามและปอด ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของม้าทั้ง 2 ตัว แสดงในรูปที่ 3

ในเนื้อเยื่อม้าม พบการติดสี DAB เป็นสีน้ำตาลเข้ม กระจายบริเวณ splenic parenchyma ทั้งบริเวณ red และ white pulp โดยพบการกระจายในบริเวณ red pulp มากกว่าในบริเวณ white pulp ไม่พบการติดสีบริเวณ eccentric arteriole ต่างจากการศึกษาของ Wohlsein *et al.* (1997) ที่พบการติดสี DAB ในนิวเคลียส และไซโตพลาสซึมของเซลล์คล้ายเซลล์เยื่อหลอดเลือด (endothelium-like cells) ในบริเวณ red pulp

สำหรับเนื้อเยื่อปอด พบการติดสีกระจายบริเวณ alveoli บางส่วน นอกจากนั้นยังพบการติดสีของ pneumocyte type I และ type II ร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophages

ทั้งเนื้อเยื่อม้ามและปอดพบการติดสีน้ำตาลเข้มมีลักษณะเป็นแกรนูลละเอียด หรือจุดกระจายในเนื้อเยื่อ สอดคล้องกับลักษณะการติดสีเฉพาะต่อเชื้อไวรัส AHS (Wohlsein *et al.*, 1997) ลักษณะการติดสีบริเวณที่ตรวจ

พบแอนติเจน ในเนื้อเยื่อเป้าหมาย คือ ม้ามและปอด พบการกระจายตัวของแอนติเจนในเนื้อเยื่อดังกล่าว โดยพบการติดสีของ DAB เป็นลักษณะ small bead หรือ dot-like/fine granular ที่บริเวณเซลล์เยื่อหลอดเลือด เลือดฝอย และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte-macrophage ที่เป็นเซลล์เป้าหมายของเชื้อ (Clift and Penrith, 2010) นอกจากนี้ยังระบุได้ว่าสามารถใช้โปรตีน VP7 ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของแกนด้านในของเชื้อ AHSV สำหรับบ่งบอกความเป็นแอนติเจนของเชื้อ เนื่องจากในการศึกษารั้งนี้ใช้ primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน VP7 ในการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีได้ ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงการกระจายของเชื้อ AHSV ในเนื้อเยื่อม้าม และปอด นอกจากนี้ยังช่วยยืนยันความสามารถในการตรวจพบเชื้อ AHSV ในชิ้นเนื้อที่แช่อยู่ในฟอร์มาลิน ทำให้สะดวกในการทำงาน ดังนั้น ในกรณีที่มีปัญหาในการเก็บตัวอย่างในพื้นที่แช่เย็น สามารถแช่เนื้อเยื่อในฟอร์มาลินเพื่อนำมาตรวจได้ นอกจากนี้วิธีนี้ยังช่วยในการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective) สำหรับการศึกษาในอนาคตได้อีกด้วย



รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจหาเชื้ออหิวาต์แอฟริกาในเนื้อเยื่อม้าม และปอดของม้าด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

- (A) แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเซลล์เม็ดเลือดขาวของเนื้อเยื่อม้ามของม้า (→) (40x)
- (B) แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเซลล์เม็ดเลือดขาวของเนื้อเยื่อม้ามของม้า (→) (400x)
- (C) แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเซลล์เม็ดเลือดขาวของเนื้อเยื่อปอดของม้า (→) (100x)
- (D) แสดงลักษณะการติดสี DAB ของแอนติเจนในเนื้อเยื่อปอดของม้า พบการกระจายใน macrophage (→) pneumocyte type I (- - →) pneumocyte type II (>) (400x)

สรุปและข้อเสนอแนะ

การตรวจหาเชื้อกาฬโรคแอฟริกาในม้า ในเนื้อเยื่อ ม้ามและปอด โดยวิธีย้อมสีอิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการวินิจฉัยโรคที่ช่วยในการระบุตำแหน่งของเชื้อไวรัสซึ่งสามารถหาความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิจากชิ้นเนื้อที่แช่อยู่ในฟอร์มาลินได้ การศึกษาในครั้งนี้ ศึกษาเพียงเนื้อเยื่อม้ามและปอด เนื่องจากเป็นอวัยวะเป้าหมายของเชื้อ AHSV แต่แนะนำให้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่น หัวใจ อวัยวะในระบบทางเดินอาหาร อวัยวะในระบบต่อมไร้ท่อ อวัยวะในระบบต่อมน้ำเหลือง เพื่อศึกษาการกระจายของเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อต่าง ๆ สำหรับเป็นข้อมูลในการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อโรคกาฬโรคแอฟริกาในม้าต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการ ข้าราชการและพนักงาน ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาและไวรัสวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจตัวอย่าง เจ้าหน้าที่สำนักงานปศุสัตว์อำเภอปศุสัตว์จังหวัด และสำนักงานปศุสัตว์เขต 2 ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการออกพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

- Adam, W.S. 2011. "African Horse Sickness." [Online]. Available: https://vetfoliovetstreet.s3.amazonaws.com/08/2025f0ae3111e087120050568d3693/file/PV0811_Stern%20revised.pdf. Accessed November 1, 2022.
- Clift, S. and Penrith, M.L. 2010. Tissue and cell tropism of African horse sickness virus demonstrated by immunoperoxidase labelling in natural and experimental infection in horses in South Africa. *Vet. Path.* 47 (4): 690-697.
- Clift, S.J., Williams, M.C., Gerdes, T. and Smit, M.M.E. 2009. Standardization and validation of an immunoperoxidase assay for the detection of African horse sickness virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diag. Invest. official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 21 (5): 655-667. doi:10.1177/104063870902100510.
- Dennis, S.J., Meyers, A.E., Hitzeroth, I.I. and Rybicki, E.P. 2019. African horse sickness: A review of current understanding and vaccine development. *Viruses.* 11 (9): 844.
- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J. and Zeller, R. 2008. Cutting sections of paraffin embedded tissues. *CSH Protocols* (this issue). doi: 10.1101/pdb.prot4987.
- Guthrie, A.J., MacLachlan, N.J., Joone, C., Lourens, C.W., Weyer, C.T., Quan, M., Monyai, M.S. and Gardner, I.A. 2013. Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods.* 189 (1): 30-35.
- Jones, L.M., Hawes, P.C., Salguero, F.J. and Castillo-Olivares, J. 2023. Pathological features of African horse sickness virus infection in IFNAR-/- mice. *Front. Vet. Sci.* 10: 1114240.
- Mellor, P.S. and Hamblin, C. 2004. African horse sickness. *Vet. Res.* 35 (4): 445-466. doi: 10.1051/vetres:2004021. PMID: 15236676.
- Roy, P., Mertens, P.P. and Casal, I. 1994. African horse sickness virus structure. *Comp. Imm. Microb. Infect. Dis.* 17 (3-4): 243-273.
- Slaoui, M., and Fiette, L. 2011. Histopathology procedures: from tissue sampling to histopathological evaluation. *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols.* 69-82.
- The Center for Food Security and Public Health (CFSPH). 2015. "Malignant Catarrhal Fever." [Online]. Available https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/african_horse_sickness.pdf. Accessed November 1, 2022.
- Wohlsein, P., Pohlenz, J., Davidson, F., Salt, J. and Hamblin, C. 1997. Immunohistochemical demonstration of African horse sickness viral antigen in formalin-fixed equine tissues. *Vet. Path.* 34 (6): 568-574.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2022. "Chapter 3.6.1. African horse sickness (infection with African horse sickness virus)" In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. [Online]. Available: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.01_AHS.pdf. Accessed November 1, 2022.