เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2556; 11(3): 271-276

รายงานสัตว์ป่วย

การติดเชื้อมัยโคแบคทีเรีย (*Mycobacterium avium* subsp. *avium*) ในนกแก้วอิเล็กตัส (*Eclectus roratus*)

จิราภรณ์ ศรีทัน[1], กิตติกร บุญศรี[1,*], อนุชา ศิริมาลัยสุวรรณ[2], กฤษฎากรณ์ พริ้งเพราะ[1,2]

[1]หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2]ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ ตัวอย่างชิ้นเนื้ออวัยวะภายในของนกแก้วอิเล็กตัส (*Eclectus roratus*) เพศเมีย อายุ 3 ปีถูกส่งมาตรวจทางห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยาของหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากประวัติผู้ส่งตัวอย่างระบุว่า พบรอยโรคลักษณะก้อนนูนสีขาวแทรกกระจายอยู่ในปอด ตับและเยื่อแขวนลำไส้ ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบรอยโรคลักษณะการสะสมของเซลล์ชนิดมาโครฟาจในเนื้อเยื่อปอด ตับและลำไส้หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ได้ทำการวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium* spp. ด้วยวิธีการย้อมสีพิเศษ Ziehl-Neelsen acid fast โดยพบเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งติดสีแดง (acid fast bacilli) ในเนื้อเยื่อปอด ตับและลำไส้ผลการตรวจหา IS 901 ซึ่งเป็นชิ้นดีเอนเอแทรกที่จำเพาะต่อเชื้อ *Mycobacterium avium* subsp. *avium* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสให้ผลบวกจากตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและลำไส้ จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั้งหมด วินิจฉัยได้ว่านกเสียชีวิตจากการติดเชื้อ *Mycobacterium avium* subsp. *avium* ซึ่งที่ผ่านมายังไม่พบรายงานการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ในนกแก้วอิเล็กตัส **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2556; 11(3): 271-276**

คำสำคัญ: เชื้อมัยโคแบคทีเรีย, นกแก้วอิเล็กตัส, วัณโรคสัตว์ปีก

ติดต่อสำเนาบทความได้ที่ : กิตติกร บุญศรี หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต. แม่เหียะ อ. เมือง จ.เชียงใหม่ 50100 E-mail address : kittik_1@hotmail.com วันที่ได้รับบทความ 6 มีนาคม 2555

บทนำ

วัณโรคสัตว์ปีก (Avian tuberculosis) เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียรุนแรงในสัตว์ปีกเกิดจากเชื้อ *Mycobacterium avium* subsp. *avium* พบได้บ่อยในสัตว์ปีกอายุมาก ในปัจจุบันยังไม่เคยมีรายงานวัณโรคสัตว์ปีกในนกแก้ว อิเล็กตัส (*Eclectus roratus*) แม้จะพบรายงานการสำรวจโรคในกลุ่มนกที่เลี้ยงเป็นเพื่อนในช่วงระยะเวลา 20 ปีก่อนหน้านี้ในแถบยุโรป (Manarolla et al., 2009) รวมถึงการตรวจหาการแพร่กระจายของเชื้อในฝูงสัตว์ปีก (Shitaye et al., 2008)

เชื้อ *Mycobacterium avium intracellulare* complex (MAIC) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 1-10 ไมโครเมตร ผนังเซลล์หนา มีคุณสมบัติพิเศษในการย้อมติดสี acid-fast เชื้อสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ 25-50 องศาเซลเซียส บริเวณที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำและมีการเจริญเติบโตช้า ประกอบไปด้วย 2 สปีชีส์หลักได้แก่ *M. avium* และ *M. intracelluare* โดย *M. avium* แยกเป็นสปีชีส์ย่อยได้อีก 4 ชนิด คือ *M. avium* subsp. *avium M. avium* subsp.

paratuberculosis M. avium subsp. *silvaticum* และ *M. avium* subsp. *hominisuis* เชื้อมัยโคแบคทีเรียสามารถพบได้ทั่วไปตามสภาพแวดล้อม เช่น ดิน ฝุ่นผง น้ำ และน้ำประปา เชื้อสามารถมีชีวิตรอดได้นานหลายเดือนในสิ่งแวดล้อม (L A Tell, Woods, & Cromie, 2001) และสามารถก่อโรคได้ในสัตว์ที่มีภาวะผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน และอาจก่อให้เกิดการแพร่กระจายไปยังนกตัวอื่นกรณีที่มีการเลี้ยงนกอย่างหนาแน่น นอกจากนี้เชื้อมัยโคแบคทีเรียยังสามารถแพร่ไปยังสัตว์ชนิดอื่น หรือคนได้ (Shitaye et al., 2008; Moravkova et al., 2008; Thorel, Huchzermeyer, & Michel, 2001; Lisa A Tell, Foley, Needham, & Walker, 2003)

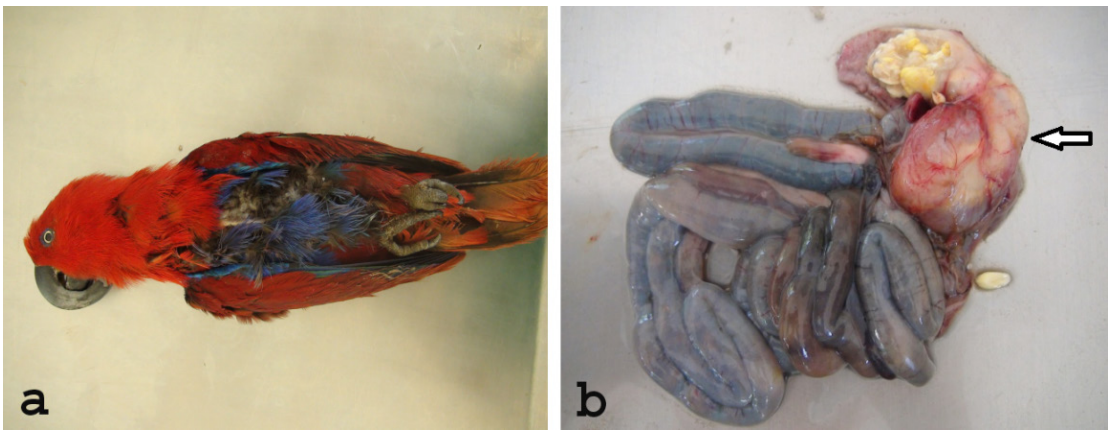
โดยทั่วไปเชื้อมัยโคแบคทีเรียจะเจริญช้าในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงจัดว่าเป็น non-culturable bacteria ก่อนหน้านี้การวินิจฉัยในสัตว์ปีกทำได้ยากเนื่องจากการแสดงอาการป่วยที่ไม่จำเพาะเช่น ผอม ท้องเสีย ซีด ส่วนใหญ่การติดเชื้อจะถูกวินิจฉัยจากการผ่าซาก การตรวจชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยาและยืนยันผลโดยการย้อมสีพิเศษ แต่ในปัจจุบันการตรวจหาเชื้อทำได้ง่ายและรวดเร็วขึ้นโดยวิธีทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนและระบุสารพันธุกรรมที่จำเพาะต่อเชื้อ โดยส่วนของสารพันธุกรรมจำเพาะที่ใช้ในการจำแนกเชื้อมัยโคแบคทีเรียคือ Insertion sequence (IS) ซึ่งเป็น compact DNA sequences ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ซึ่งการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้เป็นประโยชน์ในแง่การควบคุมและตรวจคัดกรองเนื่องจากสามารถเก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่วยที่ยังไม่เสียชีวิต เช่น อุจจาระ มาตรวจได้ แต่ผลในแง่ของความไวและความจำเพาะยังต้องศึกษาประเมินร่วมกับอาการป่วยที่พบในสัตว์ด้วย

ประวัติสัตว์ป่วย

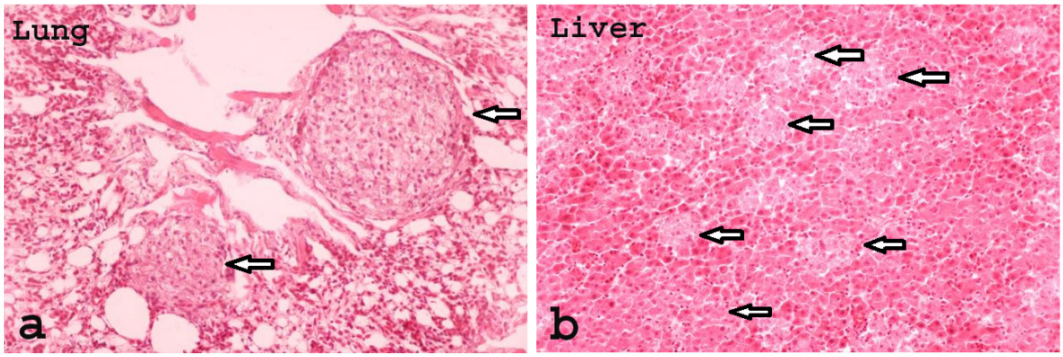
ชิ้นเนื้อตัวอย่างจากนกแก้วสายพันธุ์อิเล็กตัส (*Eclectus roratus*) อายุ 3 ปี เพศเมีย มีประวัติเพิ่งได้รับเข้ามาเลี้ยงในฝูง มีลักษณะผอม (รูปที่ 1a) หลังจากนั้นประมาณ 1 สัปดาห์ นกแสดงอาการอ่อนแอ ซึม เบื่ออาหาร และเสียชีวิต ซึ่งภายหลังจากเสียชีวิต ผู้ดูแลสัตว์ได้ทำการผ่าซากและพบรอยโรคลักษณะเป็นก้อนนูนสีขาวแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อแขวนลำไส้ (รูปที่ 1b) และตับเนื้อปอดมีลักษณะแน่นขึ้นทางผู้ดูแลสัตว์ได้เก็บชิ้นเนื้อจาก หัวใจ ปอด ตับ ไต และลำไส้ แช่ในสารละลายฟอร์มาลิน 10% แล้วส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ณ หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ ศูนย์บริการสุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

เนื้อเยื่อจากปอดและตับพบกลุ่มเซลล์มาโครฟาจแทรกกระจายอยู่ทั่วไป (รูปที่ 2a และ 2b) ซึ่งกลุ่มของ



รูปที่ 1 ลักษณะภายนอกของนกแก้วอิเล็กตัสมีลักษณะผอม (a) ผลการชันสูตรซากพบลักษณะก้อนเนื้อนูนสีขาวแทรกอยู่ในเยื่อแขวนลำไส้ (b: ลูกศรชี้)



รูปที่ 2 ผลการย้อมตรวจทางจุลพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อปอด (a) และตับ (b) ด้วยสี H&E พบเซลล์มาโครฟาจรวมตัวเป็นกลุ่มวินิจฉัยว่าเป็นก้อนแกรนูโลมา (granulomatous nodules) แทรกกระจายทั่วไปในเนื้อเยื่อปอด (a: ลูกศรชี้) และตับ (b: ลูกศรชี้) (a และ b กำลังขยาย 400 เท่า)

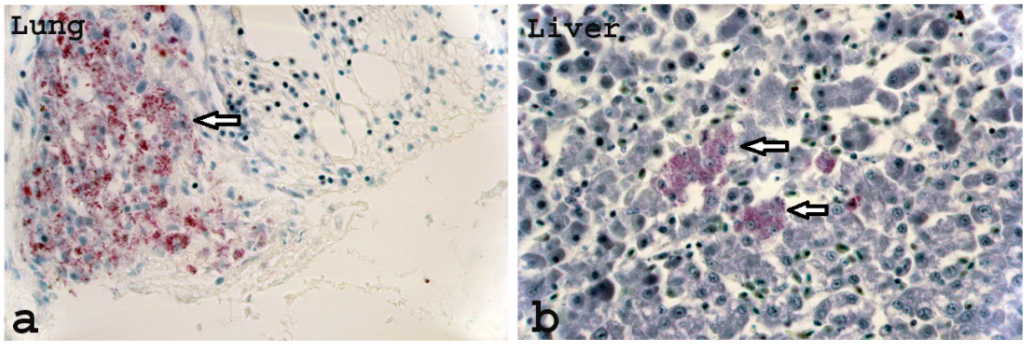
เซลล์มาโครฟาจเหล่านี้วินิจฉัยว่าเป็นก้อนแกรนูโลมา (granulomatous nodules) ในลำไส้พบเซลล์มาโครฟาจจำนวนมากแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อชั้น submucosa โดยลักษณะเซลล์มาโครฟาจที่พบเป็น foamy epitheloid macrophages และในส่วนกลางของก้อนแกรนูโลมาขนาดใหญ่จะพบลักษณะของเนื้อตายมีเนื้อเยื่อเส้นใย (fibrous connective tissue) ล้อมรอบ มี heterophils และ lymphocytes แทรกอยู่ทั่วไป

ผลการย้อมด้วยสีพิเศษ Ziehl-Neelsen acid fast

พบเชื้อรูปร่างเป็นแท่ง (acid fast bacilli; AFB) ติดสีแดงภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์มาโครฟาจจำนวนมาก ในเนื้อเยื่อปอด ตับและลำไส้ (ลูกศรชี้ในรูปที่ 3a และ 3b)

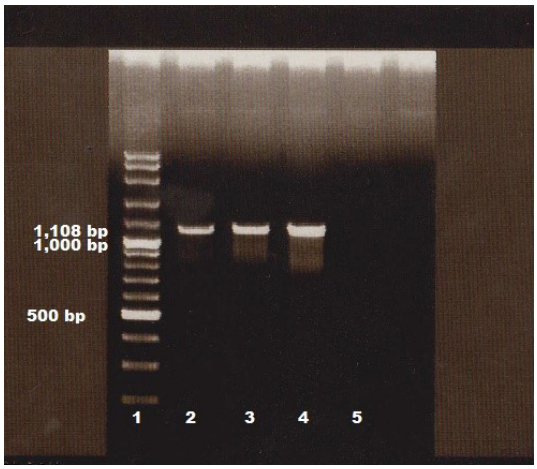
การตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

การพิสูจน์แยกชนิดของเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่เป็นการเพิ่มจำนวนและทำการวิเคราะห์ส่วน Insertion sequence 901 (IS 901) ซึ่งจำเพาะต่อ *Mycobacterium avium* subsp. *Avium* (Kunze, Portaels, & McFadden, 1992) สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อลำไส้และตับที่รักษาสภาพด้วยฟอร์มาลิน 10% โดยใช้ 10% Chelex ตามวิธีของ Walsh และคณะ (Walsh, Metzger, & Higuchi, 1991) ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตัวอย่างโดยใช้ PCR master mix (Fermentas®,Canada) จำนวน 12.5 ไมโครลิตรใช้ primer 5’-GCA ACG GTT GTT GCT TGA AA -3’ และ 5’- TGA TAC GGC CGG AAT CGC GC-3’ เป็น forward และ reverse ตามลำดับที่



รูปที่ 3 การย้อมสี Ziehl-Neelsen พบ AFB รูปร่างเป็นแท่ง ติดสีแดงในเซลล์มาโครฟาจที่แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อปอด (a: ลูกศรชี้) และตับ (b: ลูกศรชี้) (a และ b กำลังขยาย 400 เท่า)

ความเข้มข้น 25 pmol ใช้ดีเอ็นจากการสกัด 2.5 ไมโครลิตร และเติม Nuclease free water (Fermentas®,Canada) ให้ครบ 25 ไมโครลิตร นำไปเพิ่มจำนวนโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (MJ research®, USA) ตามสภาวะดังนี้คือรอบแรกสำหรับ denaturation ใช้อุณหภูมิ 96°C นาน 60 วินาทีและอีก 30 รอบต่อมาใช้ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 15 วินาที Annealing condition ที่ 60°C นาน 60 วินาที และextention condition ที่ 72°C นาน 60 วินาที และสุดท้ายในสภาวะ 72°C นาน 8 เพื่อให้ได้ผลผลิตสมบูรณ์ นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR จำนวน 5 ไมโครลิตรไปแยกโดยการใช้การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า (gel electrophoresis) และย้อมเจลด้วย ethidium bromide พบผลบวกจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่สกัดจากเนื้อเยื่อตับและลำไส้โดยมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 1108 bp ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ผลิตภัณฑ์ชิ้นส่วน ดี เอ็น เอ จากการ ตรวจด้วยเทคนิค PCR ต่อยีน IS 901 ที่มีขนาด 1108 bp ช่องที่ 1 เป็น molecular weight marker ช่องที่ 2 และ 3 เป็นผลผลิต ดี เอ็น เอ จากวิธี PCR ที่สกัดจากเนื้อเยื่อตับและเนื้อเยื่อลำไส้ขนาด 1108 bp ช่องที่ 4 เป็นเชื้อมาตรฐาน *M. avium* subsp. *avium* (ATCC 25291) ซึ่งใช้เป็น ตัวควบคุมบวก ในช่องที่ 5 เป็น ดี เอ็น เอ ของเลือดนกแก้วที่สุขภาพดีและใช้เป็นตัวควบคุมลบ

อภิปรายผล

โรควัณโรคในสัตว์ปีกพบรายงานในฝูงไก่ไข่และกลุ่มนกเลี้ยงชนิดต่างๆ ในต่างประเทศ (Manarolla et al., 2009; Shitaye et al., 2008; L A Tell et al., 2001; Pocknell, Miller, Neufeld, & Grahn, 1996) สำหรับประเทศไทยรายงานด้านระบาดวิทยาเกี่ยวกับวัณโรคสัตว์ปีกยังพบได้น้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในนกแก้วอิเล็กตัสยังไม่พบรายงานจากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสัตว์ปีกแต่ละชนิดพบว่ามีความไวต่อการติดเชื้อ *M. avium* subsp. *avium* แตกต่างกัน (Shitaye et al., 2008) การเกิดรอยโรคส่วนใหญ่พบเซลล์มาโครฟาจเป็นหลัก (histiocytic granuloma) ซึ่งเป็นกระบวนการค่อนข้างจำเพาะของการติดเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียในสัตว์ปีก หรือบางครั้งพบในกรณีของการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น coligranuloma และการติดเชื้อราได้เช่นกัน (Riddell, 1996)

รายงานนี้ไม่สามารถระบุช่วงระยะเวลาของการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียได้ โดยคาดว่าการติดเชื้ออาจเริ่มจากระบบทางเดินอาหารโดยผ่านทางการกิน จากนั้นเมื่อระดับภูมิคุ้มกันลดต่ำลงทำให้พบการติดเชื้อบริเวณปอดตามมา หรือในบางรายงานพบรอยโรคลักษณะแกรนูโลมาในปอดอย่างรุนแรงซึ่งอาจเกิดจากการติดเชื้อโดยการหายใจ ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในนกที่ติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียจะพบเชื้อแบคทีเรียรูปร่างแท่งเป็นจำนวนมากอยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์มาโครฟาจที่แทรกในเนื้อเยื่อสำหรับสัตว์ปีกการติดเชื้อ *Salmonella* spp. *E. coli* และ *Enterococcus* spp. สามารถทำให้เกิดก้อนแกรนูโลมาในอวัยวะภายในต่างๆได้เช่นกัน นอกจากนี้การติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียของสัตว์ปีกในตับมักไม่พบลักษณะคล้ายแคปซูลล้อมรอบก้อนแกรนูโลมา โดยจะพบลักษณะสารสีชมพูแทรกระหว่างเนื้อเยื่อตับและพบมาโครฟาจแทรกกระจายอยู่ตลอดเนื้อตับและเมื่อย้อมสีพิเศษ Ziehl-Neelsen พบเชื้อแบคทีเรียรูปแท่ง ติดสีแดงลักษณะตับอักเสบแบบแกรนูโลมาถือว่าเป็นรอยโรคเฉพาะของการติดเชื้อ *M. avium* ในสัตว์ปีกแต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรคซึ่งมีผลให้เกิดความแตกต่าง

ของรอยโรค ในรายงานนี้ยังไม่สามารถระบุสาเหตุโน้มนำในการติดเชื้อของนกแก้วที่ส่งตรวจ

วัณโรคสัตว์ปีกเป็นโรคที่มีความรุนแรง นอกจากเชื้อ *M. avium* subs *avium* แล้วเชื้อมัยโคแบคทีเรียในกลุ่ม MAIC ซึ่งประกอบไปด้วย *M. avium*, M. *intracellulare* และ *M. genavense* ยังสามารถก่อโรครุนแรงได้ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องได้เช่นกัน (Sutha, 2006) การตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี PCR มีความเหมาะสมสำหรับการยืนยันการติดเชื้ออย่างรวดเร็ว จึงมีประโยชน์ในการช่วยป้องกันและควบคุมโรคแต่ปัจจุบันยังไม่มีลักษณะเฉพาะของเชื้อที่ก่อโรคในสัตว์ปีกเนื่องจากลักษณะ IS901 (Insertion element 901) ที่เป็นส่วนของสายพันธุกรรมที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อนั้นสามารถพบได้ในเชื้อ *M. avium* subs *avium* ที่แยกจากสัตว์จำพวกกวางและโคด้วยเช่นกัน (O'Grady et al., 2011) ปัจจุบันการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสำคัญทางสาธารณสุขเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะปัญหาเชื้อมัยโคแบคทีเรียดื้อยา (Multi-drug resistant tuberculosis, MDR-TB) ซึ่งหมายถึงวัณโรคที่เกิดจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษาโรคอย่างน้อย 2 ชนิด รวมทั้งการดื้อต่อยา Isoniazid และ Rifampicin เพิ่มขึ้น โดยปัจจุบันพบผู้ป่วย MDR-TB เพิ่มมากขึ้นทั่วโลกโดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางระบบภูมิคุ้มกันหรือภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Sutha, 2006) จึงควรมีมาตรการควบคุมการเกิดโรคในกลุ่มสัตว์ที่มีความเสี่ยง และควรมีการจัดทำระบบการเฝ้าระวังการติดต่อโรคระหว่างสัตว์ต่างชนิด หรือโรคจากสัตว์สู่คนด้วย

เอกสารอ้างอิง

Kunze, Z. M., Portaels, F., & McFadden, J. J. (1992). Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *Journal of clinical microbiology*, 30(9), 2366–2372.

Manarolla, G., Liandris, E., Pisoni, G., Sassera, D., Grilli, G., Gallazzi, D., ...Rampin, T. (2009). Avian mycobacteriosis in companion birds: 20-year survey. *Veterinary microbiology*, 133(4), 323–327. doi:10.1016/j.vetmic.2008.07.017

Moravkova, M., Hlozek, P., Beran, V., Pavlik, I., Preziuso, S., Cuteri, V., &Bartos, M. (2008).Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues.*Research in veterinary science*, 85(2), 257–264. doi:10.1016/j.rvsc.2007.10.006

O'Grady, J., Maeurer, M., Mwaba, P., Kapata, N., Bates, M., Hoelscher, M., &Zumla, A. (2011). New and improved diagnostics for detection of drug-resistant pulmonary tuberculosis.*Current opinion in pulmonary medicine*, 17(3), 134–141. doi:10.1097/MCP.0b013e3283452346

Pocknell, A. M., Miller, B. J., Neufeld, J. L., &Grahn, B. H. (1996).Conjunctivalmycobacteriosis in two emus (Dromaiusnovaehollandiae).*Veterinary pathology,* 33(3), 346–348.

Shitaye, J. E., Matlova, L., Horvathova, A., Moravkova, M., Dvorska-Bartosova, L., Treml, F., ...Pavlik, I. (2008). *Mycobacterium avium* subsp. *avium* distribution studied in a naturally infected hen flock and in the environment by culture, serotyping and IS901 RFLP methods. *Veterinary microbiology*, 127(1-2), 155–164. doi:10.1016/j.vetmic.2007.07.026

Sutha, P. (2006). *Mycobacterium avium* Complex Infection in AIDS Patients.*Disease Control Journal*, 32(1), 73–80.

Tell, L A, Woods, L., &Cromie, R. L. (2001). Mycobacteriosis in birds.*Revue scientifiqueet technique* (International Office of Epizootics), 20(1), 180–203.

Tell, Lisa A, Foley, J., Needham, M. L., & Walker, R. L. (2003). Diagnosis of avian mycobacteriosis: comparison of culture, acid-fast stains, and polymerase chain reaction for the identification of *Mycobacterium avium* in experimentally inoculated Japanese quail (Coturnixcoturnix japonica). *Avian diseases*, 47(2), 444–452.

Thorel, M. F., Huchzermeyer, H. F., & Michel, A. L. (2001). *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. *Revue scientifiqueet technique* (International Office of Epizootics), 20(1), 204–218.

Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques,* 10(4), 506–513.