

เปรียบเทียบวิธีการย้อมสีอินคลูชันบอดีสำหรับการตรวจวินิจฉัย ทางจุลพยาธิวิทยาโรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัส

ทริกา จันทมณีโชติ* ลัดดา ตรงวงศา

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

*ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 025798908-14 e-mail:tharikac@dld.go.th

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบวิธีการย้อมสีอินคลูชันบอดี เพื่อยืนยันการตรวจพบกลุ่มอนุภาคเซอร์โคไวรัสในสุกร โดยทำการศึกษาย้อนหลังโดยนำบล็อกเนื้อเยื่อของลำไส้เล็กส่วน ileum และต่อมน้ำเหลืองอย่างละ 5 ตัวอย่าง ที่ได้รับการยืนยันว่าติดเชื้อเซอร์โคไวรัสโดยวิธี PCR และตรวจพบอินคลูชันบอดีในซัยโตพลาสซึมของ macrophage โดยวิธีมาตรฐานทางจุลพยาธิวิทยา และย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) นำพาราฟินบล็อกดังกล่าวมาตัดทำสไลด์เนื้อเยื่อ ย้อมด้วยสีพิเศษ 3 วิธี คือ Lendrum's phloxine – tartrazine Page – Green และ Feulgen reaction โดยทำ 3 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบผลการย้อมอินคลูชันบอดีของโรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัสจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดา โดยนักพยาธิวิทยา 6 คน พบอินคลูชันบอดีลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ หรือเป็นกลุ่มคล้ายรวงงุ่นกระจายอยู่ในซัยโตพลาสซึมของ macrophage ใน Peyer's patch ของลำไส้เล็กส่วน ileum และต่อมน้ำเหลือง โดยพบว่าวิธี Lendrum's phloxine – tartrazine ให้ผลชัดเจนที่สุด คือ อินคลูชันบอดีติดสีชมพูเข้มจนถึงม่วงแดง แตกต่างจากนิวเคลียสและส่วนประกอบอื่นชัดเจน ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะกับการย้อมอินคลูชันบอดีในการตรวจวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยา เพื่อยืนยันการติดเชื้อเซอร์โคไวรัส

คำสำคัญ: การย้อมสี อินคลูชันบอดี เซอร์โคไวรัส

บทนำ

เซอร์โคไวรัส (Circovirus) เป็นดีเอ็นเอไวรัส จัดอยู่ใน Family Circoviridae, Genus circovirus (Mori et al., 2000) แบ่งเป็น 2 ชนิด ชนิดแรกพบในปี ค.ศ. 1974 จากการปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยง continuous porcine kidney cell line (PK – 15) เป็นเชื้อไม่ก่อโรคและไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของเซลล์ (Tischer et al., 1974, Tischer et al., 1982) ชนิดที่สอง พบครั้งแรกจากรายงานการป่วยของสุกรหลังหย่านมด้วยกลุ่มอาการ Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) ในประเทศแคนาดา ในปี ค.ศ. 1991 สามารถติดเชื้อในเซลล์ของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ ตับอ่อน เซลล์บุลำไส้ เซลล์บุท่อไต และเซลล์บุทางเดินหายใจ ทำให้สุกรมีสุขภาพทรุดโทรม ชุบซีด จนถึงตีšanās แคระแกร็น หายใจลำบากและอาจพบอาการท้องเสีย (Clark and Harding, 1998) ส่งผลให้สุกรป่วยและตาย ทำความเสียหายเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกร การตรวจหาเชื้อเซอร์โคไวรัสด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) วิธี direct sequencing และวิธี immunohistochemistry ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายสูง สำหรับการวินิจฉัยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) พบรอยโรคที่จำเพาะคือ การตรวจพบอินคลูชันบอดีในไซโตพลาสซึม (intracytoplasmic inclusion bodies) ของ macrophage ใน Peyer's patches ของลำไส้ส่วน ileum และต่อมน้ำเหลือง มีลักษณะกลมเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenous) มีรูปร่างเป็นก้อนกลมเดี่ยว (single globule) หรือเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (botryoid cluster) (Mori et al., 2000) ติดสีน้ำเงิน (basophilic) หรือติดสีระหว่างน้ำเงินและแดง (amphophilic) (ตวงทองและคณะ 2543) ซึ่งเหมือนกับการติดสีของส่วนประกอบชนิดอื่น ๆ เช่น นิวเคลียส ซึ่งทำให้วินิจฉัยแยกความแตกต่างค่อนข้างยาก ซึ่งเมื่อนำเนื้อเยื่อดังกล่าว ไปตรวจด้วยวิธี electronmicroscopy พบว่าในก้อนอินคลูชันบอดีดังกล่าวเป็นกลุ่มอนุภาคของเซอร์โคไวรัส แต่การตรวจด้วยวิธี electronmicroscopy มีความยุ่งยาก ใช้เวลานานและเสียค่าใช้จ่ายสูงเช่นกัน

องค์ประกอบทางเคมีและปฏิกิริยาการย้อมสีอินคลูชันบอดีทางจุลพยาธิวิทยาของกลุ่มอนุภาคไวรัสแต่ละชนิดแตกต่างกัน บางชนิดมองเห็นได้ง่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดาโดยการย้อม H&E Morton และ Dietherish (1979) ได้นำวิธี Lendrum's phloxine – tartrazine มาย้อมอินคลูชันบอดีของ poxvirus โดยพบอินคลูชันบอดีติดสีแดง (acidophilic intracytoplasmic inclusion bodies) ส่วน Bollinger et al. (1999) ตรวจพบอินคลูชันบอดีของเชื้อ iridovirus จากตัวอย่างเนื้อเยื่อของซาลาแมนเดอร์ และพบ intracytoplasmic inclusion bodies ติดสีแดงจนถึงม่วงแดงโดยการย้อมด้วยวิธี Lendrum's phloxine – tartrazine และเมื่อนำตัวอย่างเดียวกันนี้ย้อมด้วยวิธี Feulgen reaction ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอ โดยใช้ N-HCl ที่ร้อน ไป hydrolysis เอา purine และ pyrimidine ออกจาก sugar phosphate group แล้วปล่อย aldehyde group ออกมา จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ Schiff's reagent พบว่าอินคลูชันบอดีของดีเอ็นเอไวรัสติดสีชมพู ส่วนวิธี Page-Green สามารถย้อมสีอินคลูชันบอดีในไซโตพลาสซึมได้ดี

โดยย้อมด้วย Shorr's staining solution ที่มีส่วนผสมของ biebrich scarlet ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น acid dye ทำให้อินคลูชันบอดีติดสีแดง(Luna ,1992) แต่ยังไม่มียางานการย้อมอินคลูชันบอดีของโรคติดเชื้อ เซอร์โคไวรัส จุดประสงค์ของรายงานนี้เพื่อยืนยันการตรวจพบอินคลูชันบอดีของกลุ่มอนุภาคเซอร์โคไวรัส โดยเปรียบเทียบผลจากการย้อมสีพิเศษ 3 วิธี ได้แก่ Lendrum's phloxine- tartrazine Page – Green และ Feulgen reaction เพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมในการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

วิธีการ

ศึกษาย้อนหลังโดยนำบล็อกเนื้อเยื่อของตัวอย่างชิ้นเนื้อลำไส้เล็กส่วน ileum และต่อมน้ำเหลืองของสุกร ที่ตรวจพบอินคลูชันบอดีในซัยโตพลาสซึมของ macrophage ใน Peyer's patches ของลำไส้เล็กส่วน ileum และของต่อมน้ำเหลืองทางจุลพยาธิวิทยา โดยการย้อมสี H&E (รูปที่ 1)และได้รับการตรวจยืนยันว่าติดเชื้อเซอร์โคไวรัสโดยวิธีPCRจากกลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ นำบล็อกเนื้อเยื่อดังกล่าว ซึ่งเป็นบล็อกชิ้นเนื้อลำไส้เล็กส่วนปลาย 5 ตัวอย่าง และต่อมน้ำเหลือง 5 ตัวอย่าง มาตัดให้เป็นแผ่นด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อหนาประมาณ 4 ไมครอน ตัวอย่างละ 9 แผ่น ยึดแผ่นชิ้นเนื้อในน้ำร้อนอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วซ้อนด้วยแผ่นสไลด์แก้ว จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แบ่งสไลด์ออกเป็น 3 ชุด แต่ละชุดประกอบด้วยตัวอย่างลำไส้เล็กส่วน ileum 15 แผ่น และตัวอย่างสไลด์ต่อมน้ำเหลือง 15 แผ่น แล้วนำไปย้อมด้วยสีพิเศษ ดังนี้

- สไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 1 ย้อมด้วยวิธี Lendrum's phloxine- tartrazine (Luna , 1968) โดยย้อมนิวเคลียสด้วยสี Meyer's hematoxylin เป็นอันดับแรก แล้วย้อมอินคลูชันบอดี ด้วยสี phloxine ที่เติม calcium chloride เพื่อให้สีย้อมมีความเข้มมากขึ้น จากนั้นย้อมส่วนผสมอื่นๆ ด้วยสารละลาย tartrazine

- สไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 2 ย้อมด้วยวิธี Page – Green ซึ่งดัดแปลงมาจาก Luna (1968)โดยย้อมนิวเคลียสด้วยสี Meyer's hematoxylin แทน Harri's hematoxylin เนื่องจากติดสีเข้มกว่า จากนั้นย้อมอินคลูชันบอดี และส่วนประกอบอื่นๆ ด้วย Shorr's staining solution

- สไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 3 ย้อมด้วยวิธีFeulgen reaction ตามวิธีของ Sheehan and Hrapchak (1980) โดย hydrolysis เนื้อเยื่อด้วย N-HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วย้อมDNAและอินคลูชันบอดีด้วย Schiff's reagent จากนั้นย้อมส่วนผสมอื่นๆ ด้วยสารละลาย light green

โดยแต่ละวิธีทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำสไลด์ดังกล่าวมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดาเพื่อเปรียบเทียบผลการย้อมและให้คะแนนโดยมีเกณฑ์ของระดับคะแนนดังนี้

- 1 หมายถึง ไม่สามารถแยกอินคลูชันบอดี ออกจากนิวเคลียสและส่วนประกอบอื่นได้
- 2 หมายถึง สามารถแยกอินคลูชันบอดี ออกจากนิวเคลียสและส่วนประกอบอื่นได้ แต่ไม่ชัดเจน

3 หมายถึง สามารถแยกอินคลูชันบอดี ออกจากนิวเคลียสไม่ชัดเจน แต่แยกจากส่วนประกอบอื่นชัดเจน

4 หมายถึง สามารถแยกอินคลูชันบอดี ออกจากนิวเคลียสและส่วนประกอบอื่นได้ชัดเจน

จากนั้นนำสไลด์ดังกล่าวไปให้นักพยาธิวิทยาตรวจรวมจำนวน 6 คน โดยให้ทุกคนลงคะแนนความพอใจของผลการย้อมแต่ละวิธี ที่สามารถตรวจแยกอินคลูชันบอดีออกจากส่วนประกอบอื่นๆ โดยใช้หลักเกณฑ์เดียวกัน บันทึกผลการให้คะแนนแล้วคำนวณหาคะแนนเฉลี่ย ตามวิธีของซูศรี (2525)

ผล

พบการติดสีของอินคลูชันบอดี มีลักษณะกลมเป็นเนื้อเดียวกัน โดยพบเป็นก้อนกลมเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้งนกระจายอยู่ในซัยโตพลาสซึมของ macrophage ใน Peyer's patches ของลำไส้เล็กส่วน ileum และต่อมน้ำเหลือง โดยติดสีชมพู แดง หรือม่วงแดง ขึ้นอยู่กับการย้อมแต่ละวิธี แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการย้อมอินคลูชันบอดีโดยการย้อมวิธี Lendrum's phloxine- tartrazine วิธี Page – Green และ วิธี Feulgen reaction

วิธี	Inclusion bodies	Background	* คะแนนความพอใจของนักพยาธิวิทยา
1. Lendrum's phloxine – tartrazine	Deep pink and purplish red	Nucleus : deep blue Connective tissue : yellow	4
2. Page – Green	Brilliant red	Nucleus : purplish blue Connective tissue : green	3
3. Feulgen reaction	Pink	Nucleus : pink Connective tissue : light green	2

* 1 หมายถึง ไม่สามารถแยกอินคลูชันบอดี ออกจากนิวเคลียสและส่วนประกอบอื่นได้

2 หมายถึง สามารถแยกอินคลูชันบอดี ออกจากนิวเคลียสและส่วนประกอบอื่นได้ แต่ไม่ชัดเจน

3 หมายถึง สามารถแยกอินคลูชันบอดี ออกจากนิวเคลียสไม่ชัดเจน แต่แยกจากส่วนประกอบอื่นชัดเจน

4 หมายถึง สามารถแยกอินคลูชันบอดี ออกจากนิวเคลียสและส่วนประกอบอื่นได้ชัดเจน จากนั้นนำสไลด์เนื้อเยื่อดังกล่าวไปให้นักพยาธิวิทยาตรวจรวมจำนวน 6 คน โดยให้ทุกคนลงคะแนนความพอใจของผลการย้อมแต่ละวิธี ที่สามารถตรวจแยกอินคลูชันบอดีออกจากส่วนประกอบอื่นๆ พบว่า ได้รับคะแนนความพอใจเฉลี่ยแตกต่างกันไป แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการย้อมอินคลูชันบอดีของโรคติดเชื้อเซอริโคไวรัสโดยการย้อมวิธี Lendrum's phloxine- tartrazine วิธี Page – Green และ วิธี Feulgen reaction จากคะแนนความพอใจเฉลี่ยของนักพยาธิวิทยา 6 คน

วิธี	* คะแนนความพอใจเฉลี่ยของนักพยาธิวิทยา 6 คน
1. Lendrum's phloxine – tartrazine	3.83
2. Page – Green	3.16
3. Feulgen reaction	2.00

- * 1 หมายถึง ไม่สามารถแยกอินคลูชันบอดี ออกจากนิวเคลียสและส่วนประกอบอื่นได้
- 2 หมายถึง สามารถแยกอินคลูชันบอดี ออกจากนิวเคลียสและส่วนประกอบอื่นได้ แต่ไม่ชัดเจน
- 3 หมายถึง สามารถแยกอินคลูชันบอดี ออกจากนิวเคลียสไม่ชัดเจน แต่แยกจากส่วนประกอบอื่นชัดเจน
- 4 หมายถึง สามารถแยกอินคลูชันบอดี ออกจากนิวเคลียสและส่วนประกอบอื่นได้ชัดเจน

วิจารณ์

จากตารางที่ 1 พบว่าวิธี Lendrum's phloxine – tartrazine ให้ผลการย้อมสีที่ชัดเจน สามารถแยกอินคลูชันบอดีออกจากนิวเคลียสและส่วนประกอบอื่นได้อย่างเด่นชัด และได้รับคะแนนความพอใจสูงสุดจากนักพยาธิวิทยา ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตารางที่ 2 พบว่าให้ผลสอดคล้องกับคะแนนความพอใจเฉลี่ยของ

นักพยาธิวิทยาจำนวน 6 คน ทั้งนี้เนื่องจากอินคลูชันบอดีที่ตรวจพบจะติดสีชมพูเข้มจนถึงม่วงแดง เพราะมีคุณสมบัติเป็น phloxiophilic จึงดึงดูดสีทำให้ติดสีเข้ม (Sheehan and Hrapchak, 1980) นอกจากนั้น อินคลูชันบอดีดังกล่าวยังสามารถแยกจากส่วนนิวเคลียสที่ติดสีน้ำเงินเข้มและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน(connective tissue) ซึ่งติดสีเหลืองได้อย่างชัดเจน ทำให้เห็นอินคลูชันบอดีเด่นชัด แม้ว่าจะดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (รูปที่ 2) นอกจากนี้รอยโรคที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ เป็นอินคลูชันบอดีที่ตรวจพบในซัยโตพลาสซึม จึงย้อมติดด้วย Lendrum's phloxine – tartrazine ได้ดี (Luna, 1992) สำหรับวิธี Page-Green สามารถย้อมอินคลูชันบอดีในซัยโตพลาสซึมได้ดีเช่นเดียวกับวิธี Lendrum's phloxine – tartrazine แต่ได้รับคะแนนรองลงมาเนื่องจาก อินคลูชันบอดีติดสีแดง แต่นิวเคลียสติดสีน้ำเงินอมม่วง (รูปที่ 3) จึงแยกจากนิวเคลียสค่อนข้างยาก จึงต้องใช้ความระมัดระวัง หรือตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงจึงเห็นความแตกต่างชัดเจนขึ้น อย่างไรก็ตามสามารถแยกจากส่วนประกอบอื่นๆ เช่น เนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งติดสีเขียวได้ชัดเจน ส่วน Feulgen reaction เป็นเทคนิคที่ใช้ย้อม DNA ซึ่งส่วนประกอบของนิวเคลียสและอินคลูชันบอดีมี DNA เช่นเดียวกัน ดังนั้นอินคลูชันบอดีที่พบจึงติดสีชมพูเหมือนนิวเคลียส (รูปที่ 4) จึงตรวจแยกจากกันได้ง่าย ดังนั้นต้องศึกษาจากรูปร่างและลักษณะอื่นๆ ประกอบจึงจะวินิจฉัยได้ วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถย้อมอินคลูชันบอดีในนิวเคลียส (intranuclear inclusion bodies) เนื่องจากติดสีชมพูเหมือนกัน นอกจากนี้พบว่าแม้การ hydrolysis โดยใช้เวลาที่เหมาะสมจะทำให้การติดสีดีขึ้น แต่ถ้านานเกินไปจะไม่ติดสีทำให้มีความยากลำบากในการย้อม (Sheehan and Hrapchak, 1980)

น้ำยาคงสภาพชิ้นเนื้อเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องพิจารณาในการเลือกวิธีการย้อม ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างที่ผ่านน้ำยา 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลินมาแล้ว ซึ่งใช้ได้กับการย้อมทั้ง 3 วิธี แต่ Sheehan และ Hrapchak (1980) รายงานว่าการย้อมวิธี Lendrum's phloxine – tartrazine ให้ผลดีที่สุดกับน้ำยาเมอร์คิวริก คลอไรด์ ฟอร์มาลิน (เมอร์คิวริกคลอไรด์ 9 ส่วน ต่อ ฟอร์มาลิน 1 ส่วน) ซึ่งสามารถนำหลักการนี้ไปใช้ปรับปรุงการย้อมให้ดีขึ้นได้ในการศึกษาครั้งต่อไป

สรุป

จากการทดลองเปรียบเทียบการย้อมสีทั้ง 3 ชนิด สรุปว่าการย้อมด้วยวิธี Lendrum's phloxine – tartrazine ให้ผลชัดเจนที่สุด สามารถยืนยันการติดเชื้อเซอร์โคไวรัสได้แม่นยำขึ้นและมีความสะดวกรวดเร็ว อันนำไปสู่การควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพและสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่นักวิชาการเพื่อนำไปปรับใช้ หรือนำไปพัฒนาการย้อมอินคลูชันบอดีของโรคติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆต่อไป

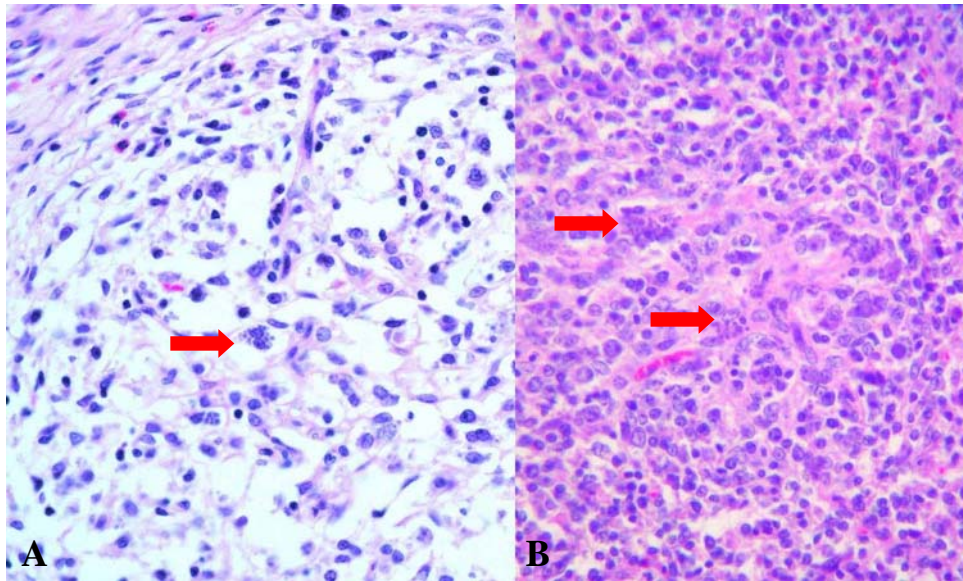
กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพญ. จิรา คงครอง ที่ช่วยให้คำแนะนำในการเขียนรายงาน นักพยาธิวิทยาของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติที่ช่วยตรวจสไลด์เนื้อเยื่อ เจ้าหน้าที่กลุ่มไวรัสวิทยาสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติที่ช่วยตรวจหาเชื้อเซอร์โคไวรัส และคุณสุรศักดิ์ ก้ววงษ์ ที่ช่วยจัดพิมพ์รายงานฉบับนี้

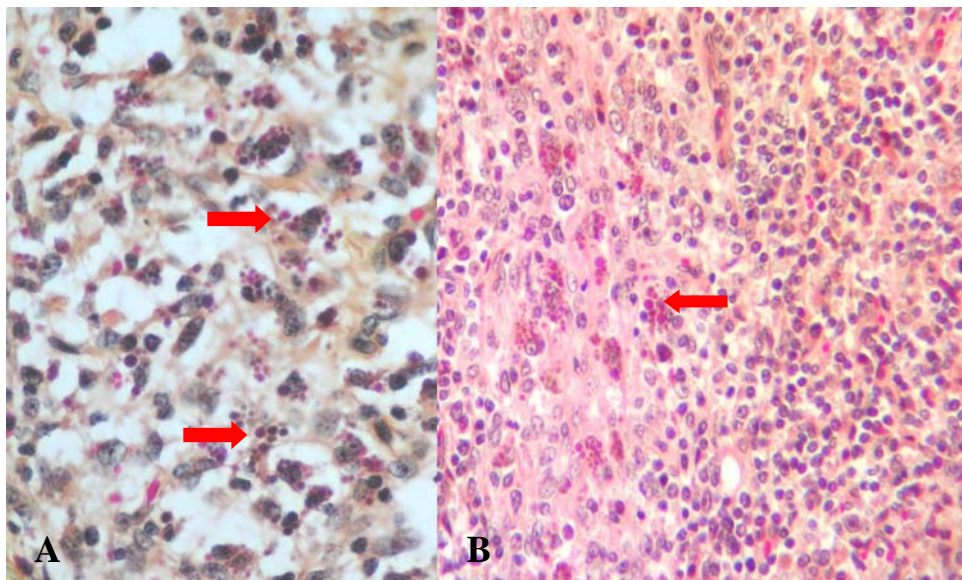
เอกสารอ้างอิง

- ชูศรี วงศ์รัตนะ. 2525. เทคนิคการใช้สัทธิเพื่อการวิจัย. โรงพิมพ์เจริญผล พระราม 6 กรุงเทพฯ. หน้า 31-41.
- ดวงทอง ปัจฉิมะศิริ สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนโกคิน และลัดดา ตรวงศา. 2543. การติดเชื้อ Porcine Circovirus ในสุกรในประเทศไทย. รายงานประจำปี 2542 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 73-83.
- Bollinger, T.K., Mao, J., Schock, D., Brigham, R.M. and Chinchar, V.G. 1999. Pathology, isolation and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan. J. Wildl. Dis. 35 (3) : 413 – 429.
- Clark, E.G. and Harding J.C. 1998. The pathology for postweaning multisystemic wasting syndrome. Proc.15th IPVS Congress. 15 : 212 – 213.
- 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.
- Luna, L.G. 1992. Histopathological methods and color atlas of special stains and tissue artifacts. American histolabs , Inc. Gaithersburg , Maryland .USA. 767 p.
- Mori, M., Sato, S., Akashi, S., Taniguchi, S. and Narita, M. 2000. Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in Japan : seven case in 1989. Vet. Pathol. 37 : 667 – 669.
- Morton, J.K. and Dieterich, R.A. 1979. Avian pox infection in an American green – winged tail (*Anas crecea carolinensis*) in Alaska. J. Wildl. Dis.15 (3) : 451 – 453.
- Sheehan, D.C. and Hrapchak, B.B. 1980. Theory and practice of histotechnology. 2nd ed. The C.V. Mosby Company, St. Louis.USA. p.247 – 249.
- Tischer, I., Rasch, R. and Tochtermann, G. 1974. Charaterization of papovavirus and picornavirus – like particles in permanent pig kidney cell lines. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hgg Ser A 226 : 153 – 167.

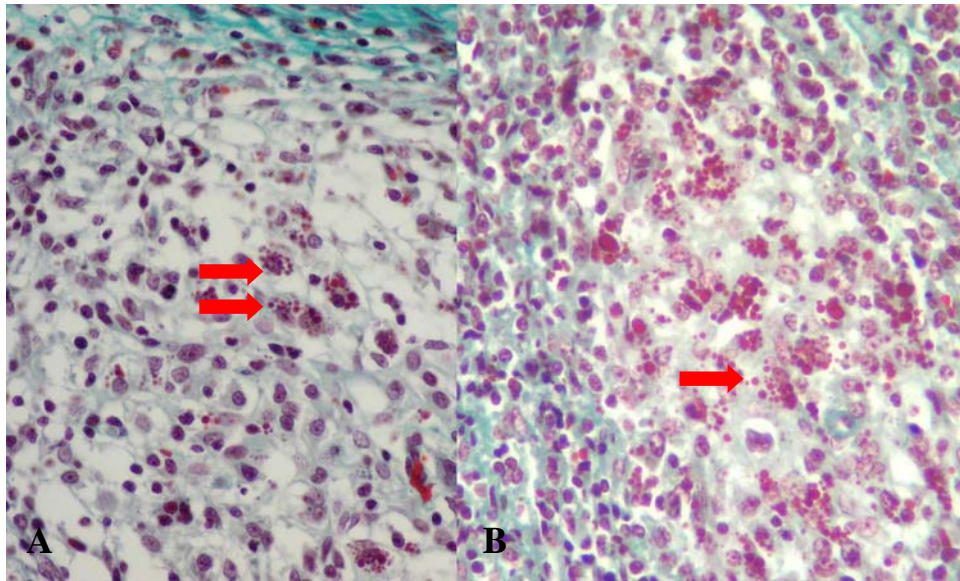
Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W. and Koch M.A. 1982. A very small porcine virus with circular single – stranded DNA. *Nature* 295 : 64 – 66.



รูปที่ 1 Intracytoplasmic inclusion bodies ใน macrophage (ครีซี)
A : ในลำไส้เล็ก B : ในต่อมน้ำเหลือง , H&E X40

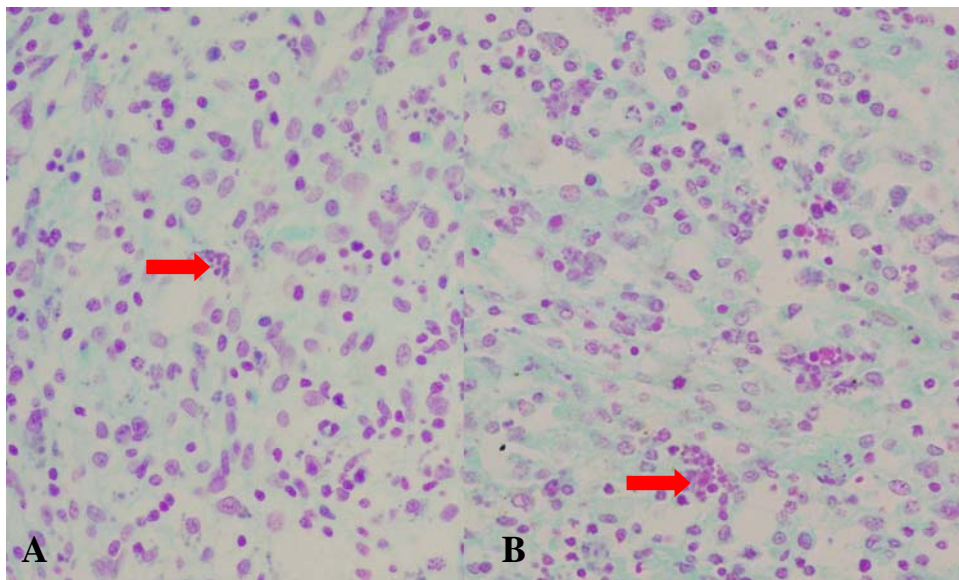


รูปที่ 2 Intracytoplasmic inclusion bodies ใน macrophage (ครีซี)
A : ในลำไส้เล็ก B : ในต่อมน้ำเหลือง , Lendrum's phloxine tartrazine method X40



รูปที่ 3 Intracytoplasmic inclusion bodies ใน macrophage (ครีซี)

A : ในลำไส้เล็ก B : ในต่อมน้ำเหลือง , Page – Green method X40



รูปที่ 4 Intracytoplasmic inclusion bodies ใน macrophage (ครีซี)

A : ในลำไส้เล็ก B : ในต่อมน้ำเหลือง , Feulgen reaction X40

Comparision of Inclusion bodies Staining Method for Histopathological Diagnosis of Circovirus Infection

Tharika Chantamaneechote* Ladda Trongwongsa

National Institute of Animal Health , Kaset Klang ,Chatuchak , Bangkok. 10900

*corresponding author: 025798908-14 ,e-mail:tharikac@dld.go.th

Abstract

The purpose of this study was to compare inclusion bodies staining methods for pathological diagnosis of circovirus infection in swine. The retrospective study was conducted in 5 cases of paraffin blocks of circovirus infection which confirmed by PCR and the microscopic detection of intracytoplasmic in macrophage in ileum and lymph nodes. The paraffin blocks were sectioned and stained with three method ; Lendrum's phloxine - tartrazine, Page – Green method and Feulgen reaction with 3 replication and observed by 6 pathologists. The inclusion bodies were characterized by single globule or botryiod cluster in cytoplasm of macrophages in Peyer's patch of ileum and lymph nodes. By Lendrum's phloxine - tartrazine, inclusion bodies stained deep pink or purplish red which are clearest distinguished from nucleus and background. The results of this study indicate that Lendrum's phloxine - tartrazine method could be a suitable method for circovirus confirmation.

Keyword : Staining, Inclusion bodies, Circovirus