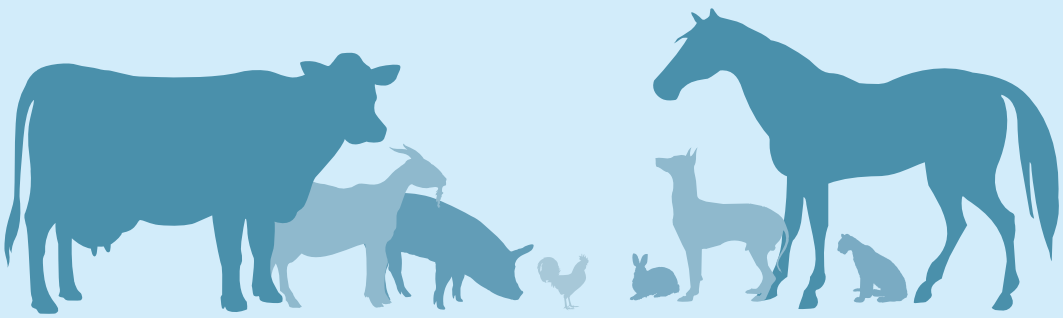
สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

ปีที่ 11 ฉบับที่ 2
กรกฎาคม - ธันวาคม 2559

Volume 11 Number 2
July - December 2016



Faculty of Veterinary Medicine
Mahanakorn University of Technology
www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm
ISSN : 1905-7571

สัตวแพทย์มหานครสาร

Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine

ปีที่ 11 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม 2559

Volume 11 No. 2 July – December 2016

ISSN: 1905-7571

www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ได้จัดทำวารสารทางวิชาการขึ้นด้วยวัตถุประสงค์เพื่อเผยแพร่ผลงานค้นคว้าวิจัยทางวิชาการ รวมถึงกิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับสาขาสัตวแพทยศาสตร์ สัตวบาล และสาขาที่เกี่ยวข้อง ส่งเสริมความสัมพันธ์อันดีระหว่างนักวิชาการที่เกี่ยวข้องกับวิชาชีพสัตวแพทย์ สัตวบาล และเพื่อเผยแพร่เกียรติคุณของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

สำนักงาน: **คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร**
140 ถนนเชื่อมสัมพันธ์ เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530

โทร: 0-2988-3655
โทรสาร: 0-2988-4040

กำหนดตีพิมพ์: ปีละ 2 ฉบับ **ฉบับที่ 1 เดือน มกราคม – มิถุนายน**
ฉบับที่ 2 เดือน กรกฎาคม – ธันวาคม

ค่าสมาชิก:

1 ปี	**140**	**บาท**
2 ปี	**280**	**บาท**
3 ปี	**420**	**บาท**
ตลอดชีพ	**1,000**	**บาท**
ราคาฉบับละ	**70**	**บาท**

สัตวแพทย์มหานครสาร

Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine

คณะที่ปรึกษา / Advisory Committee

อธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — President of Mahanakorn University of Technology

คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ — Dean of Faculty of Veterinary Medicine

รองคณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ — Associate Dean of Faculty of Veterinary Medicine

บรรณาธิการ / Editor

ผศ.น.สพ.ดร.จำลอง มิตรชาวไทย — Assist.Prof.Dr.Jamlong Mitchaothai
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

ผู้ช่วยบรรณาธิการ / Assistant Editor

ผศ.รัชกฤช เลิศภัทรโกมล — Assist.Prof.Rachakris Lertpatarakomol
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

กองบรรณาธิการ / Editorial Board

ผศ.สพ.ญ.ดร.จิตรบรรจง เวียงเจริญ — Assist.Prof.Dr.Jitbanjong Wiengcharoen
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

น.สพ.ธนากร พจน์ประสาท — Thanakorn Pojprasath
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

สพ.ญ.ภควดี คำพลงาม — Pakawadee Kumpolngam
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

น.สพ.อนุสรณ์ จ่าแสนชื่น — Anusorn Jasancheun
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

น.สพ.เกียรติชัย โรจนมงคล — Kiatchai Rojanamongkol
คณะสัตวแพทยศาสตร์ — Faculty of Veterinary Medicine
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร — Mahanakorn University of Technology

รศ.สพ.ญ.ดร.นันทริกา ชันซื่อ
คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ.น.สพ.อดิศร ยะวงศา
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ผศ.น.สพ.ดร.สรรเพชญ อังกิติตระกูล
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

น.สพ.ดร.วีรพงศ์ ตั้งจิตเจริญ
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผศ.ดร.เฉลิมพล เยื้องกลาง
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน
วิทยาเขตสกลนคร

Prof.Dr.Kazuyoshi Taya
Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture and Technology

Prof.Dr.Kazuyuki Taniguchi
Faculty of Agriculture,
Iwate University

Prof.Dr.Anton C. Beynen
Faculty of Natural Resources,
Rajamangala University of Technology-Isan,
Sakon Nakhon campus

Assoc.Prof.Dr.Nantarika Chansue
Faculty of Veterinary Medicine
Chulalongkorn University

Assist.Prof.Adisorn Yawongsa
Faculty of Veterinary Medicine
Kasetsart University, Kamphaengsaen campus

Assist.Prof.Dr.Sunpetch Angkittitrakul
Faculty of Veterinary Medicine
Khon Kaen University

Dr.Weerapongse Tangjitjaroen
Faculty of Veterinary Medicine
Chiangmai University

Assist.Prof.Dr.Chalermpon Yuangklang
Faculty of Natural Resources
Rajamangala University of Technology Isan,
Sakon Nakhon Campus

Prof.Dr.Kazuaki Takehara
Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture and Technology

Assoc.Prof.Dr.Kazumi Taniguchi
School of Veterinary Medicine,
Kitasato University

ฝ่ายทะเบียนวารสาร / JMVM Member Registration

จุฬาภา สอนกลิ่น
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

สพ.ญ.สุวริน ภาวสุทธิไพศิฐ
คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

Chulabha Sonklein
Faculty of Veterinary Medicine
Mahanakorn University of Technology

Suvarin Pavasutthipaisit
Faculty of Veterinary Medicine
Mahanakorn University of Technology

ฝ่ายจัดการเว็บไซต์ / JMVM Website Administrator

ฟารีส ชื่นภักดี

คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

Faris Cheunpakdee

Faculty of Veterinary Medicine

Mahanakorn University of Technology

ผู้ทรงคุณวุฒิประจำฉบับ / Issue Reviewers

ดร.สุนิษา ศิริมงคลวรกุล

จุฬาภา สอนกลิ่น

สพ.ญ.ดร.พชรธร ลิมกิ่ง

ดร.วีระเกียรติ ทรัพย์มี

รศ.ดร.น.สพ.ปณัฐ อนุรักษ์ปรีดา

สพ.ญ.ดร.ภัคญาณี สุดสาร

น.สพ.ดร.กฤษฎา ขำพลู

ผศ.รัชกฤช เลิศภัทรโกมล

ทัศนีย์ ตรัยรัตน์อภิวัน

ผศ.น.สพ.ดร.ศักดิ์ชัย เรือนเพชร

สพ.ญ.ดร.ทรรศนีย์ บุญยทรรศนีย์

ผศ.สพ.ญ.ดร.สิริขจร ตังควัฒนา

รศ.น.สพ.เกรียงศักดิ์ ไพรหิรัญกิจ

น.สพ.อนุสรณ์ จ่าแสนชื่น

สพ.ญ.สุวริน ภาวสุทธิไพศิฐ

ผศ.น.สพ.ดร.ชนาธิป ธรรมการ

บทบรรณาธิการ

สวัสดีผู้อ่านทุกท่าน

วารสารสัตวแพทย์มหานครสาร ฉบับนี้เป็นปีที่ 11 ฉบับที่ 2 โดยเมื่อประมาณเดือนกรกฎาคม 2559 ทางศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย (TCI Center) ได้ประกาศผลกระทบการอ้างอิง (TCI impact factor) ประจำปี 2558 ของวารสารวิชาการไทย ซึ่งวารสารสัตวแพทย์มหานครสาร มีค่าผลกระทบการอ้างอิงเท่ากับ 0.231 (โดยเพิ่มขึ้นจากปีที่แล้ว) ทางกองบรรณาธิการจะพยายามมุ่งมั่นและพัฒนาวารสารให้ดียิ่งๆ ขึ้นไป

วารสารฉบับนี้มีบทความที่น่าสนใจหลายเรื่อง ซึ่งทางกระผมและกองบรรณาธิการของวารสารหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ท่านผู้อ่านทุกท่านจะได้รับความรู้ที่นำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

สุดท้ายนี้กระผมและกองบรรณาธิการ ขออาราธนาคุณพระศรีรัตนตรัยอำนวยพรให้ท่านผู้อ่านทุกท่านจงประสบแต่ความสุข ความเจริญ ความก้าวหน้าในหน้าที่การงาน มีสุขภาพกายและใจแข็งแรง และมีครอบครัวที่อบอุ่น

จำลอง มิตรชาวไทย

บรรณาธิการ

สัตวแพทย์มหานครสาร

ปีที่ 11 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม 2559

ISSN: 1905 – 7571 **www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm**

สารบัญ

บทความวิจัย

ผลการต่อต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์โดยน้ำมันหอมระเหย

คคนางค์ รัตนานิคม ยุภาพร ขันนาเลา และสรายุทธ ศรีรอด 69

ความหลากรูปแบบของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ในโคไทยพื้นเมือง

อนุสรณ์ จ่าแสนชื่น ประดิษฐ์ แสงทอง และดานัย แสงทอง 79

การประเมินคุณภาพและการตรวจการปลอมปนในปลาป่นที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ อำพล กล่อมปัญญา และกานต์ สุขสุแพทย์ 91

การศึกษาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนพยาธิและความดกไข่ของพยาธิใบไม้ในลำไส้ *Echinostoma revolutum* ในไก่บ้าน

กิตติชัย จันธิมา และชโลบล วงศ์สวัสดิ์ 101

การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อ Cyprinid herpesvirus 3 ของสารสกัดพญายอ (*Clinacanthus nutans*) ในเซลล์เพาะเลี้ยง

ฐนิดา เหตระกูล บุญชู ศรีตุลารักษ์ และนันทริกา ชันซื่อ 115

การตรวจหาปริมาณ Cyanide ในเลือดโคด้วยวิธี Microdiffusion spectrophotometry

สนทนา มิมะพันธุ์ อนุสรณ์ อยู่เย็น เบญจมา เมธารัตน์อนุกูล และสาวิตรี อินทร์อุดม 125

การตรวจหาตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่สร้างอะฟลาทอกซิน B1 จากตัวอย่างข้าวโพดอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

สนทนา มิมะพันธุ์ ภัทราวดี วัฒนสุนทร และพนม ใสยจิตร์ 141

บทความวิชาการ

เนื้องอกชนิดมาสท์เซลล์ในผิวหนังสุนัข: การวินิจฉัยและการพยากรณ์โรค

อารยา สืบขำเพชร 159

Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine

Volume 11 No. 2 July – December 2016

ISSN: 1905 – 7571 **www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm**

Contents

Research article

Antimicrobial Effect against Animal Pathogenic Bacteria by Essential Oils

Khakhanang Ratananikom, Yupaporn Khannalao and Sarayut Srirod 69

The Polymorphism of *Heat Shock Protein 70.1* (*hsp70.1*) Gene at AP2 Box Region in Thai Native Cattle

Anusorn Jasanchuen, Pradit Sangthong and Danai Sangthong 79

Quality Evaluation and Contamination Testing in the Fish Meal used for Livestock Production Industry

Kanokrat Srikijkasemwat, Ampon Klompanya and Kan Suksupath 91

Echinostoma revolutum in Domestic Chickens: Developmental Larval Stages and Fecundity of an Intestinal Trematode

Kittichai Chantima and Chalobol Wongsawad 101

Clinacanthus nutans (Burm. f.) Lindau Extract against Cyprinid Herpesvirus 3 in Koi Fin Cell Line

Thanida Haetrakul, Boonchoo Sritularak and Nantarika Chansue 115

Determination of Cyanide in Cattle Whole Blood by Microdiffusion Spectrophotometric Method

Sontana Mimapan, Anusorn Yooyen, Benjama Metharatanukul and Sawittree Inudom 125

Detection of Aflatoxin B1 Producing *Aspergillus flavus* Genes from Maize Feed using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Technique

Sontana Mimapan, Phattarawadee Wattanasuntorn and Phanom Saijit 141

Review article

Canine cutaneous mast cell tumor: diagnosis and prognosis

Araya Suebkhampet 159

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วัตถุประสงค์และขอบเขตของเนื้อหา (Aim and Scope)

สัตวแพทย์มหานครสารเป็นวารสารทางวิชาการของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร จัดทำขึ้นเพื่อเผยแพร่ผลงานการค้นคว้าวิจัยทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับสัตวแพทยศาสตร์ สัตวศาสตร์ และวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสัตว์ โดยเนื้อหาจะครอบคลุมตั้งแต่ระดับโมเลกุลและเซลล์ วิทยาศาสตร์พื้นฐาน ชีววิทยาของสัตว์ พฤติกรรมสัตว์ พืชอาหารสัตว์ วิทยาศาสตร์การผลิตสัตว์ วิทยาศาสตร์การสัตวแพทย์ (พื้นฐาน พรีคลินิก และคลินิก) ระบาดวิทยาในสัตว์ สัตวแพทยสาธารณสุข และวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ ตลอดจนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแขนงอื่นๆ ที่มีโอกาสในการพัฒนาและ/หรือประยุกต์ใช้ในวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ได้

คำแนะนำสำหรับการเตรียมบทความ

กองบรรณาธิการวารสาร สัตวแพทย์มหานครสาร ยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่ให้ความสนใจ และกรุณาส่งมาเพื่อเผยแพร่ ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการพิจารณา กองบรรณาธิการมีข้อเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำส่งลงตีพิมพ์

1.1 บทความวิจัย (Research article หรือ Original article) เป็นงานค้นคว้าทดลอง หรืองานวิจัยทางวิชาการที่เกี่ยวกับสัตว์หรือพืชอาหารสัตว์ ทั้งที่ทำในประเทศและ/หรือต่างประเทศ

1.2 บทความวิจัยขนาดสั้น (Short communication) เป็นรายงานผลการวิจัย หรือผลงานทดลองทางด้านวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ เพื่อการเผยแพร่โดยสังเขป หรือเพื่อการนำเสนอประเด็นที่ค้นพบใหม่โดยเผยแพร่เฉพาะส่วนสำคัญอย่างกระชับ

1.3 รายงานสัตว์ป่วย (Case report) เป็นรายงานที่ไม่เคยตีพิมพ์มาก่อนและเกี่ยวข้องกับโรคหรือปัญหาที่พบในสัตว์ ซึ่งทางกองบรรณาธิการพิจารณาเห็นประโยชน์ต่อทางวิชาการสัตวแพทย์

1.4 บทความวิชาการ (Review article) เป็นบทความหรือย่อเอกสารที่เป็นประโยชน์ และเกี่ยวข้องกับวิชาการทางสัตวแพทย์ สัตวบาล และสาขาที่เกี่ยวข้องทุกสาขา โดยการรวบรวมและเรียบเรียงจากเอกสารทางวิชาการ

1.5 บทความปกิณกะ (Miscellany article) เป็นบทความที่เกี่ยวกับการให้ข้อมูลทางวิชาการสำหรับผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ เช่น ปริศนาสัตว์ป่วย ปริศนาเซลล์วิทยาวินิจฉัย

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่จะส่งมาลงพิมพ์ต้องไม่เป็นเรื่องที่เคยตีพิมพ์ หรือกำลังอยู่ระหว่างพิจารณาเพื่อลงในหนังสือหรือวารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับพิมพ์เป็นภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษ ด้วยอักษร Browallia new 16 บนกระดาษขาวเอ 4 เว้นขอบกระดาษด้านซ้าย และด้านบน 1.5 นิ้ว ด้านขวาล่าง และด้านล่าง 1 นิ้ว โดยความยาวของเรื่องพร้อมตารางและภาพประกอบรวมแล้วไม่เกิน 12 หน้า และให้ใส่หมายเลขหน้าตามลำดับ โดยพิมพ์ด้วยโปรแกรม Microsoft Word (Window 98 หรือเวอร์ชั่นที่สูงกว่า)

2.3 หากต้นฉบับที่จะส่งมีรูปภาพประกอบด้วย ให้แทรกรูปภาพดังกล่าวในตำแหน่งที่เหมาะสมในต้นฉบับ และ Save ไฟล์ต้นฉบับของรูปภาพที่มีความละเอียดสูงลงในแผ่นซีดีข้อมูลแยกจากไฟล์ต้นฉบับ โดยตั้งชื่อไฟล์ของรูปภาพให้สามารถสอบทวนได้ว่าเป็นรูปภาพใดในต้นฉบับ

2.4 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ ในกรณีที่ไม่ผ่านการพิจารณาแต่จะแจ้งให้ทราบ

3. การลำดับเรื่องควรเรียงดังนี้

3.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สอดคล้อง สื่อความหมายได้ดีกับเนื้อหาในเรื่อง

3.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมเขียน (Author and Co-authors) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวก และกรุณาบอกหมายเลขโทรศัพท์หรือโทรสาร และ E-mail ของผู้รับผิดชอบ (Corresponding author) เพื่อความรวดเร็วในการติดต่อ โดยให้ระบุอยู่ใต้คำสำคัญ

3.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นๆ ให้ได้เนื้อความครอบคลุมทั้งหมด ในกรณีที่ต้นฉบับภาษาไทยจะต้องมีชื่อเรื่องและบทคัดย่อเป็นภาษาอังกฤษ และต้นฉบับภาษาอังกฤษต้องมีชื่อเรื่องและบทคัดย่อเป็นภาษาไทย บทคัดย่อให้เขียนไว้หน้าสุดท้ายของเรื่องเป็นหน้าหนึ่งต่างหาก

3.4 คำสำคัญ (Keywords) เป็นคำหรือข้อความสั้นๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้นๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 5 คำ ระบุอยู่ใต้บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

3.5 บทนำ (Introduction) บรรยายความเป็นมา และควรมีการตรวจเอกสาร (Literature review) ประกอบด้วย รวมทั้งอธิบายถึงจุดประสงค์ของการทดลอง

3.6 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ในกรณีที่เป็นการคิดค้นขึ้นใหม่ควรอธิบายอย่างละเอียด ถ้าเป็นวิธีการที่ทราบกันอยู่แล้วและเคยมีผู้ตีพิมพ์แล้ว ไม่ต้องบรรยายซ้ำควรเขียนในลักษณะอ้างอิง และอธิบายเฉพาะส่วนที่ดัดแปลงหรือเพิ่มเติม พร้อมทั้งวิธีวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วย

3.7 ผลการทดลอง (Results) การรายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยายควรให้ละเอียดและเข้าใจง่าย หากเป็นไปได้ควรเสนอผลในรูปตาราง รูปภาพ หรือกราฟ ไม่ควรแสดงถึงผลที่เหมือนกัน ถ้าเป็นตารางควรให้ชัดเจนและขนาดพอเหมาะกับขนาดของหน้าหนังสือ ตารางควรมีความหมายในตัวเอง และต้องมีคำอธิบายเหนือตารางด้วย ในกรณีที่เป็นรูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาวดำหรือสไลด์ หากต้องการให้ตีพิมพ์ภาพสี ทางคณะผู้จัดทำจะพิจารณาถึงความเหมาะสมและค่าใช้จ่าย หากมีหลายรูปต้องเรียงลำดับก่อนหลังพร้อมทั้งมีเครื่องหมายกำหนดบอกด้านบนของรูปด้วยดินสอ และอธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูป คำอธิบายประกอบรูปภาพและตาราง รวมทั้งองค์ประกอบในตารางและรูปภาพให้ใช้เป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด โดยรวบรวมและเรียงตามลำดับให้สอดคล้องกับหมายเลขของรูปภาพและตารางที่นำเสนอ ควรระบุความหมายของสัญลักษณ์ที่ใช้ ในกรณีที่กำหนดเครื่องหมายแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ให้กำกับ *P*-value ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง ทั้งนี้การกล่าวถึงค่า *P*-value ในเนื้อหาของบทความให้ใช้อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เอียง เช่น *P*-value, $P \leq 0.05$ และ $P > 0.05$

3.8 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง การประเมินผล และการตีค่าของผลงาน

การวิจารณ์ผลควรเปรียบเทียบกับผลงานของผู้อื่นที่ได้กระทำมาแล้ว และควรเน้นถึงสิ่งที่ได้ค้นพบ

3.9 สรุป (Conclusion) อาจมีหรือไม่ก็ได้ หากเป็นบทความ การตรวจเอกสาร หรือเป็นการทดลองที่มีหลายข้อ ควรมีบทสรุปที่เขียนใจความสำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านจะได้เข้าใจมากขึ้น

3.10 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือหรือความร่วมมือในการสนับสนุนงานค้นคว้าวิจัย

3.11 เอกสารอ้างอิง (References)

4. การเขียนอ้างอิงในเนื้อเรื่องควรอ้างอิงดังนี้

- **การอ้างอิงให้เขียนเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด** ทั้งการอ้างอิงในเนื้อหาบทความ และในส่วนของเอกสารอ้างอิงด้านท้ายบทความ โดยหากเนื้อหาของเอกสารที่นำมาใช้อ้างอิงเขียนเป็นภาษาอื่น ที่ไม่ใช่ภาษาอังกฤษ ให้เขียนอ้างอิงเป็นภาษาอังกฤษ พร้อมระบุภาษาที่ใช้เขียนในบทความนั้นๆ ไว้ในวงเล็บด้านท้ายสุดของรายการเอกสารอ้างอิงนั้นๆ ตัวอย่างเช่น

Mitchaothai, J., Wiengchareon, J., Chaiworaporn, J., Srenanuan, P. and Yuangklang, C. 2005. Balantidiasis in growing pigs: A case report. *KKU. Vet. Journal*. Vol.15 No.1: 166-174. (in Thai)

{ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่อ้างอิงมาจากบทความภาษาไทย :

จำลอง มิตรชาวไทย จิตรบรรจง เวียงเจริญ จุฑามาศ ชัยวรภร ไพวัลย์ ศรีนานวล และ เฉลิมพล เยื้องกลาง. 2548. ภาวะการติดเชื้อ Balantidium ในสุกรรุ่น: รายงานสัตว์ป่วย. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 15 (1): 166-174. }

- กรณีอ้างอิงจากการตรวจเอกสารโดยผู้อื่นให้ใช้ คำว่า อ้างถึงโดย (Cited by)

- ผู้รายงานเอกสารทั้งที่เป็นคนไทยและชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยคให้ใช้ Mitchaothai *et al.* (2005), Tomato and Danny (2006), Taylor *et al*. (2006) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางและท้ายประโยคให้ใช้ (Mitchaothai *et al.*, 2005), (Tomato and Danny, 2006), (Taylor *et al*., 2006) ตามลำดับ โดยหากในประโยคหรือส่วนของประโยคที่มีเอกสารอ้างอึงมากกว่าหนึ่งเอกสารให้คั่นระหว่าเอกสารด้วยเครื่องหมาย “ ; ”)

- อ้างถึงบุคคล หรือเรื่องที่ไม่เคยตีพิมพ์มาก่อน (Personal comm.) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง

- การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายบทความ ให้เขียนเรียงลำดับพยัญชนะภาษาอังกฤษของชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง (หากมีผู้แต่งมากกว่าหนึ่งคนให้คั่นระหว่างผู้แต่งด้วยเครื่องหมาย “ , ”) ดังตัวอย่าง คือ

Mitchaothai, J., Everts, H., Yuangklang, C., Wittayakun, S., Vasupen, K., Wongsuthavas, S., Srenanul, P., Hovenier, R. and Beynen, A.C. 2008. Digestion and deposition of individual fatty acids in growing-finishing pigs fed diets containing either beef tallow or sunflower oil. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr*. 92 (4): 502-510.

- หากเอกสารอ้างอิงเป็นตำรา ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา ครั้งที่พิมพ์และชื่อบรรณาธิการ (หากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ และจำนวนหน้าทั้งหมด ดังตัวอย่าง คือ

Mamom, T. 2008. Basic Veterinary Histopathology and Practice. 1st ed. Mahanakorn University of Technology publishing. Bangkok. 227 p.

{ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่อ้างอิงมาจากหนังสือภาษาไทย :
ทนงศักดิ์ มะมม. 2551. ตำราจุลพยาธิวิทยาขั้นพื้นฐานทางสัตวแพทย์และบทปฏิบัติการ (Basic Veterinary Histopathology and Practice). พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร. กรุงเทพมหานคร. 227 หน้า. }

- หากเอกสารอ้างอิงเป็นบทความจากการประชุมวิชาการ (Conference proceedings) ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อการประชุมวิชาการ สถานที่จัดประชุม วัน-เดือน-ปีที่ประชุม สำนักพิมพ์ และเลขที่หน้าของบทความ ดังตัวอย่าง คือ

Lertpatarakomol, R., Mitchaothai, J., Trairatapiwan, T. and Lukkananukool, A. 2010. Preliminary survey on intestinal parasite infestation in natural Thai indigenous beef cattle from Kanchanaburi province at a slaughterhouse. Proceedings of the 14th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP), Pingtung, Taiwan, ROC, 23-27 August 2010: 468.

- หากเอกสารอ้างอิงเป็นบทความจากอินเตอร์เน็ท (Internet) ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่เผยแพร่ทางอินเตอร์เน็ท (สืบค้นข้อมูลเมื่อ วัน-เดือน-ปี) ชื่อเรื่อง ชื่อการประชุมวิชาการ สถานที่จัดประชุม วัน-เดือน-ปีที่ประชุม สำนักพิมพ์ และเลขที่หน้าของบทความ ดังตัวอย่าง คือ

Mitchaothai, J., Yuangklang, C., Wittayakun, S., Vasupen, K., Wongsuthavas, S., Srenanul, P., and Beynen, A.C. 2005 (cited 21 December 2010). Mathematical modelling between Pork Colour and Pork and Carcass Qualities in commercial finishing pigs. Available from: http:// www.scisoc.or.th/stt/31/ sec_f/paper/stt31_F0043.pdf.

5. การพิจารณาบทความ

บทความทุกบทความที่ลงตีพิมพ์ในวารสารสัตวแพทย์มหานครสาร เป็นบทความที่ผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิที่เชี่ยวชาญ (Referees) สำหรับแต่ละสาขาอย่างน้อย 2 ท่านต่อบทความ ยกเว้นบทความปกิณกะผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิที่เชี่ยวชาญอย่างน้อย 1 ท่าน

6. การส่งต้นฉบับบทความ

เอกสารที่ต้องส่ง คือ บทความต้นฉบับจริง ที่จัดเตรียมตามคำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วิธีการส่งบทความ คือ ส่งผ่านระบบออนไลน์ ได้ที่ http://www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

7. ชื่อ-ที่อยู่ สำหรับติดต่อวารสาร

บรรณาธิการ สัตวแพทย์มหานครสาร
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร
140 ถ. เชื่อมสัมพันธ์ เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530
โทร. 0-2988-3655 ต่อ 5102-3, โทรสาร 0-2988-4040

หมายเหตุ

1. ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษาอังกฤษและทับศัพท์ภาษาไทยให้พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรเอียง
2. ไม่มีค่าเรื่องลงพิมพ์และผู้เขียนต้องรับผิดชอบค่าพิมพ์ภาพสี หากเป็นความต้องการของผู้เขียน และผู้เขียนผู้รับผิดชอบทุกเรื่องจะได้รับสำเนาพิมพ์
3. ความคิดเห็นใดๆ ที่ลงตีพิมพ์ในวารสารสัตวแพทย์มหานครสารในแต่ละฉบับเป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นที่กองบรรณาธิการของวารสารฯ และผู้ทรงคุณวุฒิต้องเห็นด้วยเสมอไป

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

ผลการต่อต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์โดยน้ำมันหอมระเหย

คคนางค์ รัตนานิคม[1,#] ยุภาพร ขันนาเลา[1] และสรายุทธ ศรีรอด[1]

[1]คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆที่สกัดมาจากพืชท้องถิ่นของประเทศไทย น้ำมันหอมระเหยจำนวน 8 ชนิดที่สกัดจากตะไคร้ ตะไคร้หอม มะกรูด ส้มมะงั่ว โหระพา พริกไทยดำ กะเพรา และแมงลัก ถูกนำมาทดสอบเพื่อหาสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อก่อโรค คือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี agar-disc diffusion ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่างชนิดกันจะแสดงสมบัติในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบที่แตกต่างกันออกไป พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยอื่นๆ แต่ไม่สามารถพบสมบัติในการยับยั้งเชื้อทดสอบจากน้ำมันหอมระเหยจากกะเพราและแมงลัก ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบทุกชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เมื่อทดสอบด้วยวิธี Microbroth dilution พบว่ามีค่าในช่วง 125-500 ppm ผลจากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชชนิดต่างๆ

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย พืชท้องถิ่นของไทย ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2559. 11(2): 69-78.

E-mail address: khakhanang_r@yahoo.com

Antimicrobial Effect against Animal Pathogenic Bacteria by Essential Oils

Khakhanang Ratananikom[1,#], Yupaporn Khannalao[1] and Sarayut Srirod[1]

[1]Faculty of Agro-Industrial Technology, Kalasin University

Abstract: The objective of this study was to investigate the antimicrobial effect of essential oils from local Thai plants. Eight essential oils of *Cymbopogon citratus* Stapf. (Lemongrass), *Cymbopogon nardus* Rendle (Citronella grass), *Citrus hystrix* DC. (Leech lime), *Citrus medica* Linn (Citron), *Ocimum basilicum* L. (Sweet basil), *Piper nigrum* L. (Black pepper), *Ocimum sanctum* L. (Holy basil) and *Ocimum basilicum* L.f. var *citratum* Back (Hairy basil) were evaluated for their antimicrobial properties by agar-disc diffusion technique against pathogenic bacteria, including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa*. The results showed that various degrees of antibacterial activity were found from different essential oils. The essential oil from *Cymbopogon citratus* Stapf. showed higher tendency to inhibit tested pathogens when compared with other essential oils used in this study. However, the inhibitory effects of essential oils from *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum basilicum* L.f. var *citratum* Back were not observed. Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of *Cymbopogon citratus* Stapf. essential oil by microbroth dilution test was ranged between 125-500 ppm for all tested pathogenic bacteria. The results showed the antimicrobial activities of essential oils from different plants against pathogenic bacteria.

Keywords: Essential oil, Thai plant, Antimicrobial efficiency

[#]Corresponding author

E-mail address: khakhanang_r@yahoo.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2016. 11(2): 69-78.

Introduction

Due to the tremendous demand for meat and dairy products, the livestock production has been growing rapidly worldwide. The Food and Agricultural Organization (FAO) estimated that there are more than 4.0 billion domestic animals including cattle, pigs, sheep, goats and horses which employ over 1.3 billion people (Brooks-pollock *et al*., 2015). Although the productions in livestock are needed and would make a lot of fortune, bacterial

infection is still one of the problems in livestock industry which causes economic losses. To treat bacteria-infectious disease in animals, antibiotics have been wildly used without doubt. However, the use of antibiotics in animal feeds has been raising various hidden problems such as antibiotic-resistant bacteria, antibiotic residue and serious health problems coming over (Hong *et al*., 2012).

Herbal plants have been drawing a lot of attentions as an alternative to as antibiotic in animal feeds because of their naturally phytochemical components, demonstrating antimicrobial activity (Jarriyawattanachaikul *et al*., 2016). Among these phytochemical substances, produced in plants, essential oils are one of the most popular candidates owing to its distinct biological functions (Celikel and Kavas, 2008). Essential oils have been reported to possess beneficial effects to intestinal microflora, digestive enzymes and immune system (Hong *et al*., 2012). In addition, the essential oils have also been reported to have anti-microorganism properties such as bacteria, parasites and fungi (Talbert and Wall, 2012; Katiki *et al*., 2012; Singh *et al*., 2009; Oussalah *et al*., 2007; Fichi *et al*., 2007). Therefore, this study was aimed to determine the *in-vitro* antimicrobial activity of selected essential oils, extract from local plants in Thailand, against pathogenic bacteria in animals.

Materials and Methods

Preparation of essential oils

Essential oils extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. (Lemongrass), *Cymbopogon nardus* Rendle (Citronella grass), *Citrus hystrix* DC. (Leech lime), *Citrus medica*Linn (Citron), *Ocimum basilicum* L. (Sweet basil), *Piper nigrum* L. (Black pepper), *Ocimum sanctum* L. (Holy basil) and *Ocimum basilicum* L.f. var *citratum* Back (Hairy basil) were prepared by hydro-distillation method. Briefly, plant matters were packed in round bottle flask with sufficient amount of water and subsequently brought to boil. Then the vapor mixture of essential oil and water was condensed by indirect cooling from the condensing part. To separate water from essential oil, the essential oil was dried over sodium sulfate anhydrous and store at 4°C until use.

Screening for antimicrobial activity

To screen for the antimicrobial activity of each essential oil, *Staphylococcus aureus* (TISTR 746), *Escherichia coli* (TISTR 117), *Salmonella* Typhimurium (TISTR 1469) and *Pseudomonas aeruginosa* (TISTR 357) were used in this study. A single colony of bacteria was grown in nutrient broth, 16-18 hours at

37°C to obtain the bacterial concentration of $1x10^8$ CFU. The nutrient agar plate was covered with 100 µl of bacteria culture. The 6 millimeter-sterilized paper discs with 10 µL of essential oil to impregnate were placed on the nutrient agar plate. The plates were incubated at 37ºC for 24 hours to observe antimicrobial activity. Disc with of oxytetracycline (50 µg) and distilled water were used as positive and negative control, respectively. All tested were done in triplicate and antimicrobial activity was evaluated by measurement the diameter of inhibition zone in millimeter (mm.).

Microbroth Dilution Assay

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were evaluated by using Resazurin Microtiter Assay Plate method (Rahman *et al*., 2004). One hundred microliters of nutrient broth were pipetted into each well in 96-well plate. A two-fold dilution was prepared the essential oil in various concentrations. One hundred microliters of the bacteria were added to the mixture of essential oil. The concentration used of each essential oil in this study was in the range of 0.12-500 ppm. The 96-well plates were incubated at 37°C for 24 hours to obtain MIC. MIC is defined as the lowest concentration of the essential oil with no visible growth of indicator strain. After that, 30 µL of 0.02% resazurin was added. The plates were then incubated at 37°C for 24 hours to obtain MBC. MBC is defined as the lowest concentration of essential oil with no color change of resazurin, indicating 95% of inoculation was killed.

Results

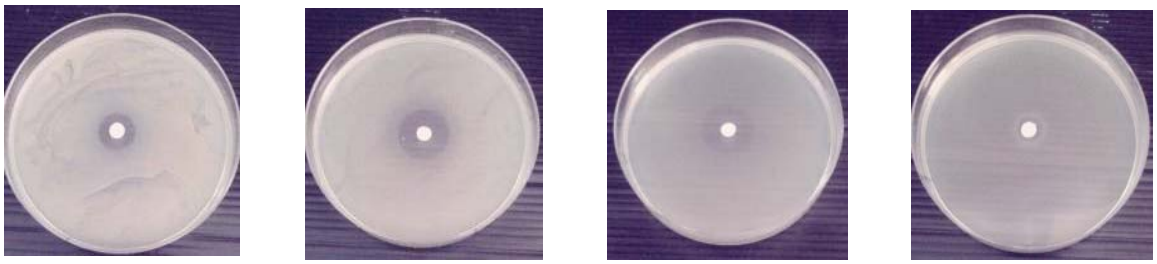
Screening for antimicrobial activity

The results of antimicrobial activity showed in Table 1. There was found that essential oils from different plant species possessed various antimicrobial activity. Of 8 essential oils tested, 6 essential oils revealed their antimicrobial activities over tested bacteria. On the other hand, another two essential oils, extracted from *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum basilicum* L.f. var *citratum* Back did not show any antimicrobial activity against bacteria. The highest inhibition zone (32.06±0.99 mm.) was found in the present of essential oil from *Cymbopogon citratus* Stapf. against *E. coli* (Table1 and Figure 1). It was about 1.5 times higher than control (20.13±0.21 mm.). Oppositely, the lowest inhibition zone was observed when testing the *Ocimum basilicum* L. essential oil with *S. aureus* (7.70±0.49 mm.) (Table1).

Table 1 *In-vitro* antimicrobial activity of essential oils

Source of Essential oil	Indicator strain			
	S. aureus	*E. coli*	*S.* Typhimurium	*Ps. aeruginosa*
Cymbopogon citratus Stapf.	14.14±0.52	32.06±0.99	29.26±0.93	7.95±0.32
Cymbopogon nardus Rendle	11.69±0.18	30.99±0.22	27.97±0.94	9.01±0.58
Citrus hystrix DC.	10.63±0.82	10.31±0.88	11.50±0.75	10.47±0.52
Citrus medica Linn	8.08±0.39	8.20±0.16	9.17±0.83	10.32±0.86
Ocimum basilicum L.	7.70±0.49	11.85±0.82	11.08±0.73	8.42±0.78
Piper nigrum L.	10.54±0.23	11.82±0.50	8.77±0.28	9.98±0.74
Ocimum sanctum L.	-	-	-	-
Ocimum basilicum L.f. var *citratum* Back	-	-	-	-
Distilled water	-	-	-	-
Oxytetracycline (50 μg/disc)	20.27±0.45	20.13±0.21	29.71±0.95	11.61±0.14

Data expressed as mean of triplicate ± standard deviation (SD) including the disc diameter (6 mm.). All values were rounded to two decimal places. "-" indicated no inhibition.



a b c d

Figure 1 Inhibition zone of essential oil from *Cymbopogon citratus* Stapf. Against *S. aureus* (a), *E. coli* (b), *S.* Typhimurium (c) and *Ps. aeruginosa* (d)

Microbroth dilution assay

MIC and MBC values of essential oils were presented in Table 2 and Figure 2. The data showed that MIC values of all essential oils tested in this study towards *S. aureus*, *E. coli*, *S.* Typhimurium and *Ps. aeruginosa* were found as 500, 250, 500 and 125 ppm, respectively. Nevertheless, the MBC values of tested essential oils were diverse, with noted that the essential oil extracted from *Cymbopogon citratus* Stapf. was the most active essential oil. It was because this

essential oil had the lowest MBC values against *S. aureus* and *S.* Typhimurium which were 500 and 500 ppm, respectively. However, the MBC values of the essential oil from *Cymbopogon citratus* Stapf. against *E. coli* and *Ps. aeruginosa* were the same as those of essential oils from other plants (250 and 250 ppm, respectively).

Discussion

Agar-disc diffusion results indicated the variety of antimicrobial activity among essential oils against pathogenic bacteria. The differences between antimicrobial activities might be due to various major and minor components, present in essential oil of each plant. Components, synthesized in each plant were claimed to be responsible for their alteration in antimicrobial activity of essential oils (Oussalah *et al*., 2007). These plant components were influenced by geographical origin and environmental condition (Celikel and Kavas, 2008). However, the broth dilution results were not correlated with agar-disc diffusion test, showing that the inhibition zones of most essential oils against *Ps. aeruginosa* seemed to be lower than the inhibition zones, observed in other indicator strains. The difference between these two methods might come from the problem of the diffusion property of components in essential oils, resulting in agar-disc diffusion technique was less reliable than broth dilution assay. These contradictory results between agar-disc diffusion and dilution assay were also reported by Yousef and Tawil (1980) when they studied on the antimicrobial activities of 22 essential oils. Rios *et al*. (1988) concluded on the conflict between these two methods that the agar-disc diffusion technique was not acceptable for the samples which were difficult to soluble water or non-polar samples. In addition, there is no relation between diffusion power and antimicrobial activity as well as there is no relationship between MIC values and inhibition diameter. However, the agar-disc diffusion method was suitable for screening in the term of the small size sample used and the possibility to test many compounds against a single microorganism.

To determine MIC and MBC with the most precise technique and suitable for non-polar samples such as essential oils, a dilution method was recommended (Clark *et al*., 1981; Miski *et al*., 1983; Rios *et al*., 1988). Therefore, the microbroth dilution assay was employed in this study to evaluate the strength of antimicrobial activity. The result showed that the MIC and MBC values of essential oil from *Cymbopogon citratus* Stapf. towards *S. aureus*, *E. coli*, *S.* Typhimurium showed the same result (500, 250 and 500 ppm, respectively). It demonstrated that this

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) of each essential oil

Source of Essential oil		Indicator strain			
	MIC/MBC (ppm)	*S. aureus*	*E. coli*	*S.* Typhimurium	*Ps. aeruginosa*
Cymbopogon citratus Stapf.	MIC	500	250	500	125
	MBC	500	250	500	250
Cymbopogon nardus Rendle	MIC	500	250	500	125
	MBC	>500	250	>500	250
Citrus hystrix DC.	MIC	500	250	500	125
	MBC	>500	500	>500	250
Citrus medica Linn	MIC	500	250	500	125
	MBC	>500	500	>500	250
Ocimum basilicum L.	MIC	500	250	500	125
	MBC	>500	500	>500	250
Piper nigrum L.	MIC	500	250	500	125
	MBC	>500	500	>500	250

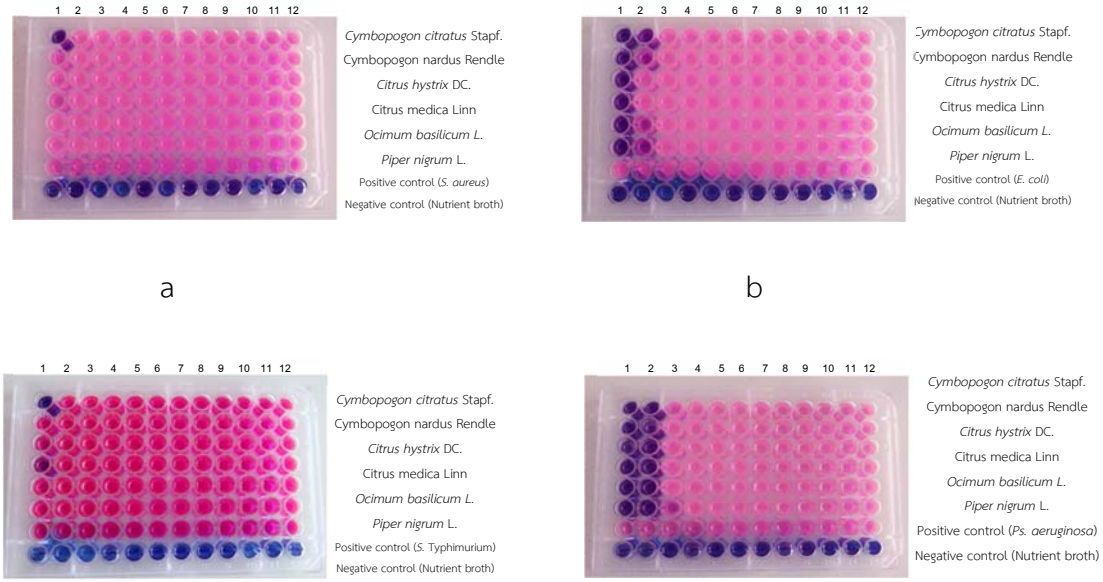


Figure 2 MBC result of essential oils against *S. aureus* (a), *E. coli* (b), *S.* Typhimurium (c) and *Ps. aeruginosa* (d). The concentrations of each essential oil were in the range of 500-0.12 ppm; 500 ppm (1), 125 ppm (2), 62.5 ppm (3), 31.3 ppm (4), 15.6 ppm (5), 7.81 ppm (6), 3.91 ppm (7), 1.95 ppm (8), 0.98 ppm (9), 0.49 ppm (10), 0.24 ppm (11) and 0.12 ppm (12).

essential oil was inhibitory and bactericidal at a single concentration. For *Ps. aeruginosa*, it seemed to be the most sensitive bacteria towards *Cymbopogon citratus* Stapf. as noticed by the lowest MIB and MBC values. Hence, the susceptibility of microorganisms by essential oil from *Cymbopogon citratus* Stapf. was *Ps. aeruginosa* > *E. coli.* > *S. aureus* and *S.* Typhimurium. This data imply that the gram-negative bacteria were more vulnerable than gram-positive bacteria towards essential oils. This data did not agree with the report from Suwanpugdee *et al*. (2012), reporting that the essential oils from lemongrass and citronella grass could successfully inhibit *S. aureus* and followed by *E. coli*. Nevertheless, comparison on the susceptibility of bacteria might vary. It was not only because of the antimicrobial agents in essential oils, but also the variation of tested microorganisms (Kamazen *et al*., 2012; Oussalah *et al*., 2007; Hammer *et al*., 1999). Another possible factor might contribute the different results was the type of media used to test for antimicrobial activity. Using different kinds of media might differ in bacteria growth condition. For example, the media used by Suwanpudee *et al*. was Tryptic Soy Broth while Nutrient Broth was used in this study. These aforementioned factors can contribute the result differently. However, it could be said that the promising antimicrobial property of essential oils, especially the essential oil from *Cymbopogon citratus* Stapf. could be possibly applied in animal treatments, as an alternative to antibiotic for animal infectious treatment. Yet, the toxicity and safety issue of using this essential oil would need to be considered.

Conclusion

To summarize, the essential oils had a potential to inhibit and inactive both gram-negative and gram-positive bacteria. Their antimicrobial activities were different, depending on their phytochemical components. However, the essential oil from *Cymbopogon citratus* Stapf. seem to be the most active to inhibit the tested microorganisms in *in-vitro* condition.

Acknowledgement

An abstract version of this research study was published in the abstract proceedings of the 5th International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2015).

References

Brooks-Pollock, E., Jong, M.C.M., Keeling, M.J., Klinkenberg, D. and Wood, J.L.N. 2015. Eight challenges in modelling infectious livestock diseases. *Epidemics*. 10: 1-5.

Celikel, N. and Kavas, G. 2008. Antimicrobial properties of some essential oil against some pathogenic microorganisms. *Czech J. Food Sci.* 26: 174-181.

Clark, A.M., El-Feraly, F.S. and Li, W.S. 1981. Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L.. *J. Pharm. Sci.* 70: 951-952.

Fichi, G., Flamini, G., Giovannelli, F., Otranto, D. and Perrucci, S. 2007. Efficiency of an essential oil of *Eugenia caryophyllata* against *Psoroptes cuniculi*. *Exp. Parasitol*. 115: 168-172.

Hammer, K.A., Carson, C.F., and Rilley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extract. *J. Appl. Microbiol*. 86: 985-990.

Hong, J.C., Steiner, T., Aufy, A. and Lien, T.F. 2012. Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. *Livest. Sci*. 144: 253-262.

Jarriyawattanachaikul, W., Chaveerach P. and Chokesajjawatee N. 2016. Antimicrobial activity of Thai-herbal plants against food-borne pathogens *E. coli*, *S. aureus* and *C. jejuni*. *Agric. Agric. Sci. Procedia.* 11: 20-24.

Kamazen, T.A., Samah, O.A., Taher, M., Susanti, D. and Qarelleh, H. 2012. Antimicrobial activity and essential oils of *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma manga* and *Zingiber cassumunas* from Malaysia. *Asian Pac. J. Trop. Med*. 1: 202-209.

Katiki, L.M., Chagas, A.C.S., Takahira, R.K., Juliani, H.R., Ferreira, J.F.S. and Amarante, A.F.T. 2012. Evaluation of *Cymbopodon schoenanthus* essential oil in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol*. 186: 312-318.

Miski, M., Ulubelen, A., Johansson, C. and Mabry, T.J. 1983. Antimicrobial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina. J. Nat. Prod.* 46: 874-875.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18: 414-420.

Rahman, M., Kuhn, I., Rahman, M., Olsson-Liljequist, B. and Mollby, R. 2004. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*. 70: 2398-2403.

Rios, J.L., Recio, M.C. and Villar, A. 1988. Screening methods of natural products

with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol*. 23: 127-129.

Singh,T.U., Kumar, D., Tandan, S.K. and Mishra, S.K. 2009. Inhibitory effect of essential oils of *Allium sativum* and *Piper longum* on spontaneous muscular activity of liver fluke, *Fasciola gigantica*. *Exp. Parasitol*. 123: 302-308.

Suwanpugdee, A., Saisornthip, R. and Sutthimusik, S. 2012. The inhibitory efficiency of the essential oil from lemon grass and citronella grass on the growth of Bovine mastitis pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*. *Khonkean Agr. J*. 40: 230-235.

Talbert, R. and Wall, R. 2012. Toxicity of essential and non-essential oils against the chewing louse, *Bovicola* (*Werneckiella*) *ocellatus*. *Res. Vet. Sci*. 93: 831-835.

Yousef, R.T. and Tawil, G.G. 1980. Antimicrobial activity of volatile oils. *Phramazie.* 35: 4-11.

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

ความหลากรูปแบบของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ในโคไทยพื้นเมือง

อนุสรณ์ จ่าแสนชื่น[1] ประดิษฐ์ แสงทอง[2] และดานัย แสงทอง[3,#]

[1]สาขาวิชาคลินิก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร กรุงเทพฯ 10530

[2]ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[3]สาขาวิชาสัตวบาลและพื้นฐานวิชาชีพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร กรุงเทพฯ 10530

บทคัดย่อ: ยีน heat shock proteins family เป็นกลุ่มยีนที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์จากความร้อน หากเกิดการกลาย หรือการขาดหายไปของเบสไซโทซีน (cytocine) ที่ตำแหน่ง AP2 box region ของยีน *hsp70.1* (ตำแหน่ง g895) จะส่งผลกระทบต่อการลดความสามารถในการทนร้อนของโค ซึ่งในโคพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทยยังไม่เคยมีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ตำแหน่งดังกล่าวมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ตำแหน่ง AP2 box region ของยีน *hsp70.1* (ตำแหน่ง g895) ในโคไทยพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ศึกษาจากกลุ่มตัวอย่างโคไทยพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 4 กลุ่มประกอบด้วย โคขาวลำพูน จำนวน 9 ตัวอย่าง โคไทยพันธุ์พื้นเมืองแถบภาคอีสาน จำนวน 22 ตัวอย่าง โคลาน จำนวน 10 ตัวอย่าง และโคชน จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 51 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่ารูปแบบของยีนเป็นแบบ wild type genotype จำนวน 36 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 70.59 แบบ homozygous deletion mutation จำนวน 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 27.45 และแบบ heterozygous deletion mutation จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.96 โดยผลการศึกษาพบว่าการกลายแบบ homozygous mutation เกิดขึ้นกับกลุ่มตัวอย่างของโคขาวลำพูนมากที่สุด ผลการศึกษาครั้งนี้ สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่จะนำไปใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์ที่พบกับความสามารถในการทนร้อนของโคไทยพันธุ์พื้นเมือง และนำไปสู่การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ในโคไทยพันธุ์พื้นเมืองในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: โคไทยพันธุ์พื้นเมือง *hsp70.1* ฮีตช็อคโปรตีน70 PCR-RFLP

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

E-mail address: pdanai@mut.ac.th

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2559. 11(2): 79-90.

The Polymorphism of *Heat Shock Protein 70.1* (*hsp70.1*) Gene at AP2 Box Region in Thai Native Cattle

Anusorn Jasanchuen[1], Pradit Sangthong[2] and Danai Sangthong[3,#]

[1]Department of Clinic, Faculty of Veterinary medicine, Mahanakorn University of Technology, Bangkok 10530, Thailand

[2]Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

[3]Department of Animal Husbandry and Basic Professional Sciences, Faculty of Veterinary medicine, Mahanakorn University of Technology, Bangkok 10530, Thailand

Abstract: Heat shock proteins family (Hsp) is known to play a major role in the protection of cells from thermal stress. It is an important to protect cells from heat damage as well as to prevent protein denaturation and apoptosis. The genotypic variants of *hsp70.1* gene in the AP2 box region, especially the deletion of cytosine base (base position g895) are associated to decrease cellular thermo-tolerance in cattle. In Thailand, There is no information to display the mutation of this gene in Thai native cattle. The aim of this study is to investigate the genotypic variation of *hsp70.1* gene in the AP2 box region in Thai native cattle (at base position g895). To elucidate, we used DNA from 51 samples of Thai native cattle comprise 9, 22, 10 and 10 samples from 4 regions of Thailand composed of the North, North-East, Central region and the South, respectively. Double PCR-RFLP was used to identify the genotypes of *hsp70.1* gene in theAP2 box region. Our results revealed that the wild type genotype was found in 70.59 % (n=36), homozygous mutation 27.45 % (n=14) and heterozygous mutation 1.96 % (n=1) respectively. Furthermore, The North region of Thailand is the most group of mutation. The result from this study may be useful to evaluate the correlation of thermo-tolerance and genotypic variation and useful for selection and improvement of Thai native cattle in the future.

Keywords: Thai native cattle, *hsp 70.1*, Heat shock protein 70, PCR-RFLP

[#]Corresponding author

E-mail address: pdanai@mut.ac.th

J. Mahanakorn Vet. Med. 2016. 11(2): 79-90.

บทนำ

ภาวะเครียดจากความร้อน (heat stress) มีผลกระทบต่อโคที่อาศัยอยู่ในเขตร้อนชื้น โดยเฉพาะในประเทศไทย โดยทำให้การกินอาหารได้น้อยลงทำให้เกิดภาวะขาดพลังงาน ส่งผลทำให้ผลผลิตลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณน้ำนม (Ravagnolo *et al*., 2000; Hansen, 2004; Deb *et al*., 2014) นอกจากนั้นยังส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ ทำให้คุณภาพของเซลล์ไข่ (oocyte) ต่ำลง ลดการฝังตัวของตัวอ่อน และไปเพิ่มระยะการผสมติดหลังคลอด (calving to conception interval) (Rensis *et al*., 2003) โปรตีนในกลุ่ม Heat shock proteins (HSP) family เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญที่ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์ได้รับความเสียหายจากความร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม heat shock protein 70 (HSP70.1 และ HSP70.2) ซึ่งโปรตีน HSP70 จะช่วยในการขดตัวใหม่ (refolding) ของโปรตีน (Chen *et al*., 2009) รวมไปถึงมีส่วนช่วยป้องกันการเกิดกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) ทำให้เซลล์ไม่ได้รับความเสียหายจากความร้อน (Sonna *et al*., 2002) โปรตีน HSP70 จะมีการสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับผลกระทบจากความร้อนมากกว่าการถูกกระตุ้นด้วยภาวะความเครียดจากปัจจัยอื่น เช่น สารอนุมูลอิสระ ภาวะขาดเลือด หรือการอักเสบของเซลล์ (Basirico *et al*., 2011) การสังเคราะห์โปรตีน HSP70 ถูกควบคุมโดยยีน *heat shock protein 70 gene (hsp70)* ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ promoter region ในส่วน 5′-UTR จะมีผลต่อการลดลงของการสังเคราะห์โปรตีนหรือการคงตัวของ mRNA ของยีน hsp70 และมีผลต่อความสามารถในการทนร้อนของเซลล์ลดลงด้วย (Shwerin *et al*., 2003; Basirico *et al*., 2011; Deb *et al*., 2013)

การควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน HSP70 มีตำแหน่งสำคัญที่ตำแหน่ง promoter region ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ heat shock protein transcription factor เข้ามาเกาะและกระตุ้นให้เกิดกระบวนการคัดลอกสารพันธุกรรม ถอดรหัส และสังเคราะห์เป็นโปรตีนต่อไป โดยในโคพบว่าตำแหน่งที่ heat shock transcription factor เข้ามาเกาะจะอยู่ที่ตำแหน่ง AP2 box region (position -130) ซึ่งเป็นส่วนของ promoter region ของยีน *hsp70* พบว่าการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งดังกล่าวมีผลทำให้การสังเคราะห์โปรตีน HSP70 ลดลงทำให้ความสามารถในการทนร้อนของโคลดลง และมีผลทำให้ผลผลิตน้ำนมลดลง (Schwerin *et al*., 2003) เช่นเดียวกับการทดลองในโคนมสายพันธุ์ลูกผสม Frieswal ในประเทศอินเดียและในสายพันธุ์ Chinese Holstein ในประเทศจีน (Xiong *et al*., 2012; Deb *et al*., 2013) ทั้งนี้โคที่อยู่ในกลุ่ม *Bos indicus* จะมีความสามารถในการทนร้อนได้ดีกว่าโคที่อยู่ในกลุ่ม *Bos taurus* (Hansen, 2004; Deb *et al*., 2014)

สำหรับโคไทยพื้นเมืองจัดอยู่ในกลุ่มโคอินเดีย (*Bos indicus*) มีขนาดค่อนข้างเล็ก มีขนสั้นเกรียน หน้ายาวบอบบาง หน้าผากแคบ ตะโหนกเล็ก เหนียงคอและหนังใต้ท้องไม่มากนัก ใบหูเล็ก นิสัยปราดเปรียวตื่นตกใจง่าย มีความแข็งแรงทนทาน นอกจากนี้ยังมีความสามรถในการทนร้อน ทนต่อโรคและแมลงได้ดี หากินเก่ง (กลุ่มวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์) แต่สำหรับข้อมูลความหลากรูปแบบทางพันธุกรรมของยีน *hsp70* ในโคไทยพันธุ์พื้นเมืองที่จัดอยู่ในกลุ่ม

Bos indicus ซึ่งมีความสามารถในการทนต่อสภาพอากาศร้อนได้ดี ยังไม่มีข้อมูลมาก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความหลากรูปแบบทางพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ในโคไทยพันธุ์พื้นเมือง เพื่อที่จะได้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวและเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการคัดเลือกและพัฒนาเพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์โคพื้นเมืองในประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างโคไทยพันธุ์พื้นเมืองที่อาศัยอยู่ในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทยทั้งหมด 4 กลุ่ม ได้แก่ โคขาวลำพูนซึ่งเป็นโคพื้นเมืองทางภาคเหนือ จำนวน 9 ตัวอย่าง โคไทยพื้นเมืองแถบภาคอีสาน จำนวน 22 ตัวอย่าง โคลานซึ่งเป็นโคพื้นเมืองทางภาคกลาง จำนวน 10 ตัวอย่าง และโคชนซึ่งเป็นโคพื้นเมืองทางภาคใต้ จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 51 ตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำ (Jugular vein) บรรจุใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA ตัวอย่างละ 6 มิลลิลิตร จากนั้นรักษาสภาพตัวอย่างในกล่องรักษาความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถึงห้องปฏิบัติการและเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัดดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

- การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในบริเวณ AP2 box region ในโคไทยพันธุ์พื้นเมือง

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ AP2 box region ด้วยไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่คือ Forward: 5′ GTC GCC AGG AAA CCA GAG AC 3′ และ Reverse: 5′GGA ACA CCC CTA CGC AGG AG 3′ (GenBank accession number M98823) (Schwerin *et al*., 2003) จากตัวอย่างเลือดโคที่สกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (FavorPrep™, Favorgen Biotech corporation, Taiwan) โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR Taq-buffer ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร Forward primer ความเข้มข้น 10 pmol/ul ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Reverse primer ความเข้มข้น 10 pmol/ul ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 unit/ul ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร DNA template ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร และเติม dH_2O จนครบ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีสภาวะควบคุมอุณหภูมิจำนวน 35 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (ดัดแปลงจาก Schwerin *et al*., 2003) จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ Thermo Fisher Scientific Inc. USA.)

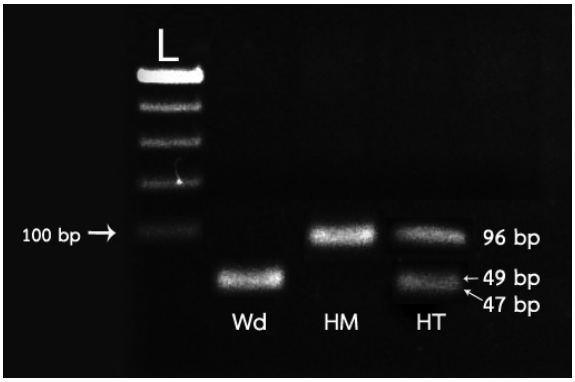
- การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ในบริเวณ AP2 box regionในโคไทยพันธุ์พื้นเมือง

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ในบริเวณ promoter ของ AP2 box region จากผลผลิตพีซีอาร์ในข้อ 2.1 ด้วยไพรเมอร์ Forward: 5'

GTT CTG GGA GGA GAG GCA TTC AG 3' Reverse: 5' CTG CCA TGT CGG GAA TAT TCA AGG 3' (Schwerin *et al*., 2003) โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR Taq-buffer ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร Forward primer ความเข้มข้น 10 pmol/ul ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Reverse primer ความเข้มข้น 10 pmol/ul ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 unit/ul ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร DNA template ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร และเติม dH_2O จนครบ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ที่มีสภาวะควบคุมอุณหภูมิจำนวน 35 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา30 วินาที (ดัดแปลงจาก Schwerin *et al*., 2003) จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ Thermo Fisher Scientific Inc. USA.) จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป FavorPrep™ Gel/PCR Purification (Favorgen Biotech corporation, Taiwan)

การตรวจสอบความหลากรูปแบบของยีน hsp70.1 โดยวิธี PCR-RFLP

หลังจากได้ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *hsp70.1* ในบริเวณ AP2 box region แล้วทำการตรวจสอบความหลากรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด ScrFI (Bme1390I, Thermo Fisher Scientific Inc. USA.) โดยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง และหยุดการทำปฏิกิริยาโดยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ Thermo Fisher Scientific Inc. USA.) โดยมีรูปแบบการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 รูปแบบ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างรูปแบบการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด ScrFI L คือ DNA ladder Wdคือ รูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype ซึ่งจะพบแถบดีเอ็นเออยู่ที่ขนาด 49 และ 47 คู่เบส HM คือ รูปแบบจีโนไทป์แบบ homozygous mutation ซึ่งจะพบแถบดีเอ็นเออยู่ที่ขนาด 96 คู่เบส และ HT คือ รูปแบบจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation ซึ่งจะพบแถบดีเอ็นเออยู่ที่ขนาด 96 49 และ 47 คู่เบส

ผลการทดลอง

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในบริเวณ AP2 box region ในโคไทยพันธุ์พื้นเมือง

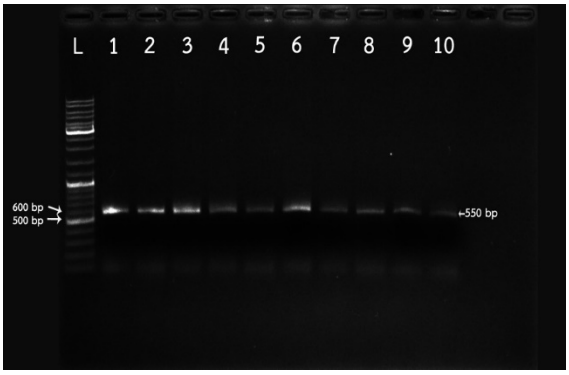
การปรับสภาพการทำปฏิกิริยา โดยปรับช่วง annealing temperature ไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และปรับช่วง extension ไว้ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ในโคไทยพื้นเมืองทั้ง 4 กลุ่มได้ โดยสามารถพบแถบสารพันธุกรรมขนาด 550 คู่เบส ได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอของโคไทยพื้นเมืองทั้ง 51 ตัวอย่างดังรูปที่ 2

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน hsp70.1ในบริเวณ AP2 box region ของโคไทยพันธุ์พื้นเมือง

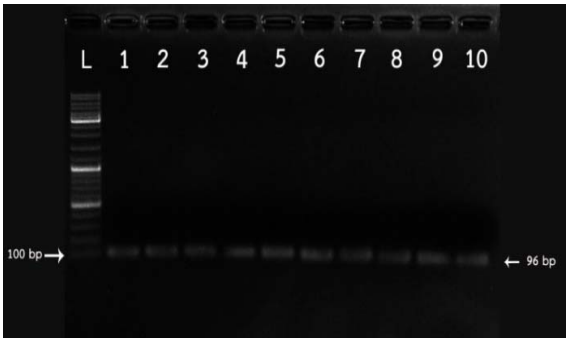
จากการทดลองสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ในบริเวณ AP2 box region ในโคไทยพันธุ์พื้นเมืองได้ทั้ง 4 กลุ่ม รวมทั้งสิ้น 51 ตัวอย่าง โดยพบแถบสารพันธุกรรมอยู่ที่ขนาด 96 คู่เบส ดังรูปที่ 3

การตรวจสอบความหลากรูปแบบของยีน hsp70.1 ในโคไทยพื้นเมืองโดยวิธี PCR-RFLP

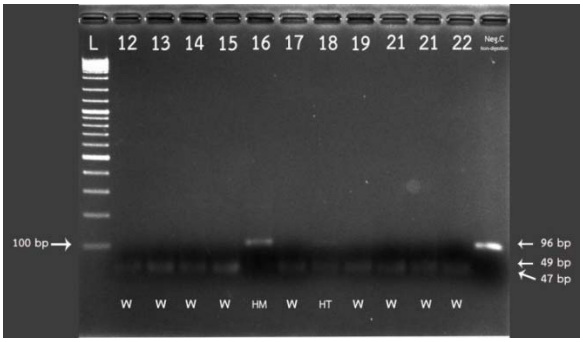
จากการตรวจสอบความหลากรูปแบบของยีน *hsp70.1* ในโคไทยพื้นเมืองโดยวิธี PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด ScrFI พบรูปแบบการตัดได้เป็น 4 รูปแบบ ดังรูปที่ 4 โดยโคขาวลำพูน พบรูปแบบจีโนไทป์เป็นแบบ wild type genotype จำนวน 1 ตัวอย่าง แบบ homozygous mutation จำนวน 8 ตัวอย่าง แต่ไม่พบรูปแบบจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation โคไทยพื้นเมืองแถบภาคอีสานพบจีโนไทป์เป็นแบบ wild type genotype จำนวน 19 ตัวอย่าง แบบ homozygous mutation จำนวน 2 ตัวอย่าง และแบบ heterozygous mutation จำนวน 1 ตัวอย่าง โคลาน พบจีโนไทป์แบบ wild type genotype จำนวน 8 ตัวอย่าง แบบ homozygous mutation จำนวน 2 ตัวอย่าง แต่ไม่พบจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation และโคชนพบรูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype จำนวน 8 ตัวอย่าง และพบจีโนไทป์แบบ homozygous mutation จำนวน 2 ตัวอย่าง แต่ไม่พบจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation โดยจากตารางที่ 1 จะพบว่าสัดส่วนรูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype พบสัดส่วนมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 70.59 รองลงมาคือแบบ homozygous mutation คิดเป็นร้อยละ 27.45 และแบบ heterozygous mutation คิดเป็นร้อยละ 1.96 ตามลำดับ



รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างแถบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในบริเวณ AP2 box region ในโคไทยพื้นเมืองซึ่งพบแถบสารพันธุกรรมที่ขนาด 550 คู่เบส (L คือ DNA Ladder หมายเลข 1-10 คือ ตัวอย่างแถบสารพันธุกรรมที่ได้จากโคชน)



รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างแถบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ในบริเวณ AP2 box region ของโคไทยพื้นเมือง โดยพบแถบสารพันธุกรรมอยู่ที่ขนาด 96 คู่เบส (L คือ DNA Ladder หมายเลข 1-10 คือ ตัวอย่างแถบสารพันธุกรรมที่ได้จากโคลาน)



รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างแถบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด ScrFI (L คือ DNA Ladder หมายเลข 12-22 คือ ตัวอย่างแถบสารพันธุกรรมที่ได้จากโคพื้นเมืองแถบภาคอีสาน Neg.C คือ ตัวอย่างควบคุม)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนและสัดส่วนรูปแบบจีโนไทป์ที่พบของยีน *hsp70.1* ที่บริเวณ AP2 box region ในโคไทยพื้นเมืองแต่ละกลุ่ม

กลุ่มตัวอย่างโคไทยพันธุ์พื้นเมือง	รูปแบบจีโนไทป์			รวม
	Wild type	Homozygous mutation	Heterozygous mutation	
โคขาวลำพูน	1	8	0	**9**
โคภาคอีสาน	19	2	1	**22**
โคลาน	8	2	0	**10**
โคชน	8	2	0	**10**
รวม	**36**	**14**	**1**	**51**
อัตราร้อยละ	**70.59**	**27.45**	**1.96**	

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากตัวอย่างโคไทยพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 4 กลุ่ม รวมทั้งหมด 51 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1 จะพบว่าสัดส่วนรูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype พบเป็นสัดส่วนมากที่สุด รองลงมาคือแบบ homozygous mutation และพบน้อยที่สุดแบบ heterozygous mutation ซึ่งต่างจากรายงานของ Deb *et al*. (2013) ที่ได้ทำการศึกษาถึงรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ต่อความสามารถในการทนร้อนของโคนมลูกผสมสายพันธุ์ Frieswal (Holstein Friesian X Sahiwal) ในประเทศอินเดีย พบว่ารูปแบบจีโนไทป์ที่พบส่วนใหญ่เป็น heterozygous mutation ร้อยละ 60.71 รองลงมาคือแบบ wild type genotype พบร้อยละ 39.29 แต่ไม่พบรูปแบบจีโนไทป์ชนิด homozygous mutation ในขณะที่จากการศึกษาของ Schwerin

et al. (2003) ที่ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์กับลักษณะจีโนไทป์ของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ในโคนมสายพันธุ์ Holstein Friesian ในประเทศเยอรมนี พบว่ารูปแบบจีโนไทป์ที่พบส่วนใหญ่จะเป็นชนิด wild type genotype รองลงมาคือชนิด heterozygous mutation และพบจีโนไทป์ชนิด homozygous mutation น้อยที่สุด ทั้งนี้จากการศึกษาดังกล่าวพบว่ากลุ่มโคที่มีจีโนไทป์แบบ wild type genotype มีประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ดีที่สุดและทำให้อัตราการคัดทิ้งของโคกลุ่มดังกล่าวมีน้อยกว่ากลุ่มที่เกิดการกลายของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Basirico *et al*. (2011) ที่ได้มีการศึกษาถึงรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *hsp70.1* ในส่วน 5'-UTR ที่ตำแหน่ง g895 ในโคนมสายพันธุ์ Holstein Friesian ของประเทศอิตาลี พบว่าโคกลุ่มตัวอย่างมีจีโนไทป์แบบ wild type genotype มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 66.8 รองลงมาคือแบบ heterozygous mutation คิดเป็นร้อยละ 28.8 และกลุ่ม homozygous mutation พบน้อยที่สุดคิดเป็นร้อยละ 4.4 ทั้งนี้เนื่องจากโคกลุ่มตัวอย่างจากรายงานของ Deb *et al*. (2013) ดังกล่าวเป็นโคสายพันธุ์ลูกผสม (Cross breed) มีการผสมข้ามพันธุ์ทำให้มีโอกาสในการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมได้มากกว่าโคกลุ่มที่เป็น Holstein Friesian หรือจากกลุ่มโคไทยพันธุ์พื้นเมือง จึงมีสัดส่วนในการพบรูปแบบจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation มากกว่ารูปแบบอื่นๆ ในขณะที่โคกลุ่มสายพันธุ์ Holstein Friesian จากตัวอย่างรายงานดังกล่าวหรือโคไทยพันธุ์พื้นเมืองเป็นกลุ่มโคที่มีการผสมภายในสายพันธุ์เดียวกัน (Pure breed) ทำให้มีโอกาสในการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมน้อยกว่าจึงพบรูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype มากกว่า

จากข้อมูลในตารางที่ 2 จะพบว่าถึงแม้ว่ายีน *hsp70.1* จะเป็นยีนที่อนุรักษ์ (Kregel, 2002) แต่จากการศึกษาในครั้งนี้พบการกลายของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ในโคไทยพื้นเมือง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบการกลายชนิด homozygous mutation มากกว่า heterozygous mutation ซึ่งขัดแย้งกับรายงานในต่างประเทศที่พบการกลายแบบ

ตารางที่ 2 แสดงสัดส่วนรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *hsp70.1*ที่ตำแหน่ง AP2 box region จากรายงานต่างๆ

สายพันธุ์	**พื้นที่**	**ผู้รายงาน**	**ร้อยละรูปแบบจีโนไทป์ที่พบ**		
			Wd	HM	HT
โคไทยพื้นเมือง	ประเทศไทย	ผู้วิจัย	70.59	27.45	1.96
ฟรีส์วาล	อินเดีย	Deb et. al., 2013	39.29	0.00	60.71
โฮลสไตล์ฟรีเซียน	เยอรมนี	Schwerin et. al., 2003	66.05	6.98	26.97
โฮลสไตล์ฟรีเซียน	อิตาลี	Basirico et. al., 2011	66.8	4.4	28.8

Wd คือ รูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype

HM คือ รูปแบบจีโนไทป์แบบ homozygous mutation

HT คือ รูปแบบจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation

heterozygous mutation มากกว่า homozygous mutation และเมื่อพิจารณาในกลุ่มตัวอย่างโคขาวลำพูนแล้ว พบว่าประชากรกลุ่มดังกล่าวเป็นประชากรส่วนใหญ่ที่พบการกลายของยีน *hsp70.1* ซึ่งพบรูปแบบจีโนไทป์เป็นแบบ homozygous mutation ถึง 8 ตัวอย่างและพบ wild type genotype เพียง 1 ตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากประชากรของโคขาวลำพูนในปัจจุบันนั้นมีการลดจำนวนลงเป็นอย่างมากและยังพบว่าโคขาวลำพูนในสภาพการเลี้ยงตามธรรมชาตินั้นส่วนใหญ่มีการรวมตัวอยู่เพียง 3 จังหวัดแถบภาคเหนือเท่านั้นได้แก่ เชียงใหม่ ลำพูน และลำปาง เป็นต้น (พิชิต และคณะ, 2553) ซึ่งด้วยเหตุนี้อาจทำให้เกิดการผสมพันธุ์กันภายในกลุ่ม (inbreed) ดังนั้นหากพ่อแม่พันธุ์ของกลุ่มประชากรมีลักษณะจีโนไทป์เป็นแบบ homozygous mutation ลักษณะความหลากหลายของจีโนไทป์ก็จะลดลงทำให้กลุ่มประชากรพบมีรูปแบบจีโนไทป์เป็นแบบ homozygous mutation เป็นส่วนใหญ่และจะทำให้สภาพสมดุลของจีโนไทป์ของประชากรนั้นเปลี่ยนแปลงไปไม่เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg ในที่สุด (Hartwell *et al*., 2011)

ทั้งนี้ลักษณะดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่ากลุ่มตัวอย่างโคไทยพื้นเมืองโดยเฉพาะโคขาวลำพูนอาจเกิดเหตุการณ์ ความไม่แน่นอนทางพันธุกรรม (Genetic drift) เกิดขึ้น โดยมีการคง (fix) รูปแบบจีโนไทป์บางรูปแบบไว้จนทำให้จีโนไทป์บางรูปแบบสูญหายไป โดยสาเหตุของการเกิดความไม่แน่นอนทางพันธุกรรมอาจเกิดจากเหตุการณ์ผลกระทบจากผู้ก่อตั้ง (Founder effect) โดยอาจเกิดจาการอพยพของพ่อแม่พันธุ์หรือประชาการจำนวนน้อยกลุ่มหนึ่งมาจากกลุ่มประชากรกลุ่มเดิมซึ่งอาจจะมีรูปแบบจีโนไทป์เพียงแค่บางรูปแบบเท่านั้นดังนั้นเมื่อมีการเพิ่มจำนวนของประชากรมากขึ้น กลุ่มประชากรใหม่จึงจะพบรูปแบบของจีโนไทป์เพียงบางรูปแบบตามพ่อแม่พันธุ์เท่านั้นทำให้จีโนไทป์บางรูปแบบสูญหายไป ดังเช่นที่การศึกษาในครั้งนี้พบว่ารูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype หรือแบบ homozygous mutation จะพบมากกว่าการพบแบบ heterozygous mutation (Matute, 2013) นอกจากนั้นแล้วสาเหตุการเกิดความไม่แน่นอนทางพันธุกรรมอาจเกิดจากเหตุการณ์ประชากรคอขวด (Population bottle neck) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงโดยการลดจำนวนของประชากรเดิมลงอย่างรวดเร็วทำให้ประชากรเดิมเหลือเพียงจำนวนน้อยเท่านั้นและประชากรกลุ่มดังกล่าวนั้นอาจมีรูปแบบจีโนไทป์เพียงบางรูปแบบเท่านั้น ดังนั้นเมื่อกลุ่มประชากรเดิมที่หลงเหลืออยู่มีการเพิ่มจำนวนประชากรมากขึ้น กลุ่มประชากรใหม่จึงจะพบรูปแบบจีโนไทป์เพียงบางรูปแบบเท่านั้นและทำให้รูปแบบจีโนไทป์บางรูปแบบสูญหายไปเป็นต้น (Hartwel *et al*., 2011) นอกจากนี้แล้วสาเหตุการเกิดความไม่แน่นอนทางพันธุกรรม อาจเกิดจากการจงใจคัดเลือกคุณลักษณะตามสายพันธุ์บางประการซึ่งมีผลทำให้รูปแบบจีโนไทป์บางรูปแบบสูญหายไปได้ แต่ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดในการเก็บตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นเพียงส่วนหนึ่งของประชากรที่ใช้ศึกษาถึงลักษณะความหลากรูปแบบทางพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region เท่านั้นการศึกษาถึงลักษณะทางพันธุศาสตร์ประชากรของกลุ่มโคขาวลำพูนดังกล่าวอาจจะต้องมีการเก็บตัวอย่างให้มากขึ้นเพื่อให้คลอบคลุมและเพียงพอสำหรับประเมินความหลากหลายทางพันธุ์กรรมของยีน *hsp70.1* ในโอกาสต่อไป

และจากการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบถึงความหลากรูปแบบทางพันธุกรรมของของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region โคไทยพื้นเมืองในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษาเท่านั้น ยังไม่ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการทนร้อนของโคแต่ละกลุ่มกับรูปแบบจีโนไทป์ต่างๆ ที่พบ ดังนั้นการที่โคไทยพันธุ์พื้นเมืองซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Bos indicus* และมีความสามารถในการทนร้อน (thermotolerance) ได้ดีกว่า *Bos taurus* นั้น (Beatty *et al*., 2006) การทนร้อนดังกล่าวอาจจะอยู่ในลักษณะการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดีร่วมด้วย (compensation) ซึ่งจะเห็นได้จากรูปแบบจีโนไทป์ที่พบมีทั้งส่วนที่เป็น wild type genotype และส่วนที่เกิดการกลายไป และจากรายงานของ จักรกริช และคณะ (2555) พบว่าเมื่อโคอยู่ภาวะเครียดจากความร้อนร่างกายจะมีการปรับตัวโดยการหายใจเร็วขึ้นและมีการขับเหงื่อออกมามากขึ้นแต่ไม่พบความแตกต่างของระดับการเพิ่มขึ้นของ heat shock protein 70 จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคไทยพื้นเมือง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโคไทยพันธุ์พื้นเมืองนอกจากจะมีลักษณะการทนร้อนได้ดีแล้วยังพบรูปแบบการทนร้อนในลักษณะการปรับตัวได้ดีอีกด้วยเช่นเดียวกัน

ถึงแม้ว่าจะมีรายงานจากต่างประเทศหลายฉบับที่มีการทดลองถึงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการทนร้อนกับรูปแบบจีโนไทป์ที่พบและพบว่ารูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype ของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box เหมาะแก่การนำมาใช้เป็น Bio-maker เพื่อการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ (Schwerin *et al*., 2003, Basicrico *et al*., 2011; Deb *et al*., 2013) แต่ก่อนที่จะนำมาใช้เพื่อเป็นเครื่องมือในการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ในโคไทยพันธุ์พื้นเมืองนั้น ควรมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการทนร้อนกับรูปแบบจีโนไทป์ที่พบในรูปแบบต่างๆ ให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้นก่อน เพื่อที่จะสามารถเลือกได้ว่าจะคัดเลือกโคที่มีความสามารถในการทนร้อนได้ดีหรือคัดเลือกโคที่มีความสามารถในการปรับตัวต่อความสภาพแวดล้อมได้ดีเป็นต้น และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในโปรตีนชนิดอื่นด้วย

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า 1) มีการกลายของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region (position g895) ในโคไทยพื้นเมืองทั้ง 4 กลุ่มโดยรูปแบบจีโนไทป์ที่พบมากที่สุดจะเป็นแบบ wild type genotype รองลงมาคือ homozygous mutation และพบน้อยที่สุดเป็นแบบ heterozygous mutation 2) การกลายของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region เกิดขึ้นกับกลุ่มตัวอย่างของโคขาวลำพูนมากที่สุดโดยเป็นการกลายแบบ homozygous mutation

ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่จะนำไปใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์ที่พบกับความสามารถในการทนร้อนของโคไทยพันธุ์พื้นเมืองและนำไปสู่การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ในโคไทยพื้นเมืองในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) ที่อนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการในการทำ gradient PCR ขอขอบคุณ ดร.สรรเพชญ

โสภณ คุณยุทธนา จ่าแสนชื่น สพ.ญ.ภัทราภา ซึ้งประเสริฐ และ น.สพ.นิธิ ศุภธราธาร ที่กรุณาช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. โคพื้นเมือง. เอกสารเผยแพร่ การเรียนรู้ผ่านสื่ออิเล็กทรอนิกส์. เข้าถึงได้จาก : http://breeding.dld.go.th/biodiversity/new%2 0 elearning/animal%20nativos.html. (19/6/2559)

จักรกริช เจริญศิลป์ สุภร กตเวทิน ยุพินผาสุข และสุรางคนา สุขเลิศ. 2555. การตอบสนองทางสรีรวิทยาและปริมาณ HSP70 ในเม็ดเลือดขาวของโคพื้นเมืองไทยต่อสภาพอากาศในรอบวัน. *แก่นเกษตร*. 40 ฉบับพิเศษ 2: 377-380.

พิชิต ชูเสน สุวิช บุญโปร่ง และ ชำนาญ ดงปาลี. 2553. แนวโน้มทางพันธุกรรมลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคขาวลำพูน. E-Journal สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. เข้าถึงได้จาก http://e-journal.dld.go.th/ ?p=642 (19/6/2559)

อุมาพร แพทย์ศาสตร์. 2548. ความหลากหลายของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 90 และยีนกลูโคคอร์ติคอยด์รีเซพเตอร์ในโคพื้นเมืองไทยและโคนมลูกผสม. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 81

Basirico, L., Morera, P., Primi, V., Lacetera, N. and Nardone, A. 2011. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactation cows. *Cell Stress Chaperon*. 16: 441-448.

Beatty, D.T., Barnes, A., Taylor, E., Pethick, D., McCarthy, M. and Maloney, S.K., 2006. Physiological responses of Bostaurus and Bosindicus cattle to prolonged, Continuous heat and humidity. *J. Anim. Sci.* 84: 972-985.

Charoensook, R., Gatphayak, K., Sharifi, A.R., Chaisongkram, C., Brenig, B. and Knorr, C. 2012. Polymorphisms in the bovine HSP90AB1 gene are associated with heat tolerance in Thai indigenous cattle. *Trop. Anim. Health Prod*. 44: 921-928.

Chen, T., Guo, J., Han, C., Yang, M. and Cao, X. 2009. Heat shock protein 70, Released from heat stressed tumor cell, Initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway. *J. Immunol*. 182: 1449-1459.

Deb, R., Sajjanar, B., Singh, U., Kumar, S., Brahmane, M.P., Singh, R., Sengar, G. and Sharma, A. 2013. Promoter variants at AP2 box region of *hsp70.1* affect thermal stress response and milk production traits in Frieswal cross bred cattle. *Gene*. 532: 230-235.

Deb, R., Sajjanar, B., Singh, U., Kumar, S., Singh, R., Sengar, G. and Sharma A. 2014. Effect of heat stress on the expression profile of Hsp90 among Sahiwal (*Bos indicus*) and Frieswal (*Bos indicus* × *Bos taurus*) breed of cattle: A comparative study. *Gene*. 536: 435-440.

Hansen, P.J. 2004. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim. Reprod. Sci*. 82-83: 349-360.

Hartwell, L. H., Hood, L., Goldberg, M.L., Reynolds, A.E. and Silver, L.M. 2011. Genetics From Genes to Genomes. 4th edition. McGraw-Hill company. New York. 730 p.

Kregel, K.C. 2002. Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 92: 2177-2186.

Matute, D.R. 2013. The role of founder effects on the evolution of reproductive isolation. *J. Evol. Biol*. 26(11): 2299-2331.

Ravagnolo, O., Misztal, I. and Hoogenboom, G. 2000. Genetic component of heat stress in dairy cattle, development of heat index function. *J. Dairy Sci*. 83: 2120-2125.

Rensis, F.D. and Scaramuzzi, R.J. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: A review. *Theriogenology*. 60: 1139–1151.

Schwerin, M., Sanftleben, H. And Grupe, S. 2003. Genetic predisposition for productive life is associated with functional inactivation of a AP2-binding site in the promoter of the stress protein 70.1-encoding gene in cattle. *Arch. Tierz. Dummerstorf*. 46(2): 177-185.

Sonna, A. Larry, Fujita, J., Gaffin, L. Stephen, and Lilly, M. Craig. 2002. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* 92: 1725–1742.

Xiong, Q., Chai, J., Xiong, H., Li, W., Huang, T., Liu, Y., Sua, X., Zhang, N., Li, X., Jiang, S. and Chen, M. 2012. Association analysis of HSP70A1A haplotypes with heat tolerance in Chinese Holstein cattle. *Cell Stress Chaperon*. 18: 711-718.

บทความวิจัย

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

การประเมินคุณภาพและการตรวจการปลอมปนในปลาป่นที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์[1,#] อำพล กล่อมปัญญา[1] และกานต์ สุขสุแพทย์[1]

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

บทคัดย่อ: ปลาป่นจัดเป็นวัตถุดิบที่มีองค์ประกอบทางโภชนะสมบูรณ์ มีโภชนะที่ใช้ประโยชน์ได้สูง การศึกษาเพื่อประเมินคุณภาพของปลาป่นในแต่ละเกรดจะสามารถสะท้อนถึงคุณภาพและมาตรฐานของปลาป่นที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ไทย การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมินองค์ประกอบ ลักษณะทางกายภาพจากตัวอย่างปลาป่น จำนวน 25 ตัวอย่าง ที่มีการจัดแบ่งเกรดคุณภาพปลาป่นตามเกณฑ์ของสมาคมผู้ผลิตปลาป่นไทย โดยจัดแบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ เกรดกุ้ง, เบอร์ 1, เบอร์ 2, เบอร์ 3 และหัวปลา จำนวนปลาป่นเกรดละ 5 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าปลาป่นทุกเกรด ส่วนใหญ่ผลิตจากปลาค่อนข้างสดโดย มีสีน้ำตาลและน้ำตาลเหลืองเข้ม แต่พบการปลอมปนด้วยขนไก่ป่นในปลาป่น 8 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างทั้งหมด (2/25) โดยพบการปลอมปนขนไก่ป่นในปลาป่นเบอร์ 2 และเบอร์ 3 เกรดละ 20 เปอร์เซ็นต์ (1/5) และพบการปลอมปนหินฝุ่นและเปลือกหอยในตัวอย่างปลาป่น ถึง 24 เปอร์เซ็นต์ (6/25) โดยพบในปลาป่นเกรดกุ้ง และปลาป่นเบอร์ 1 เกรดละ 60 เปอร์เซ็นต์ (3/5) รองลงมาคือ ปลาป่นเบอร์ 3 คิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ (2/5) และในปลาป่นเบอร์ 2 คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ (1/5) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่พบการปนเปื้อนโครเมียมและ ยูเรียในทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบว่ามีปริมาณเกลือที่ค่อนข้างสูงเกินเกณฑ์มาตรฐานที่กฎหมายกำหนด ข้อมูลที่ได้จากการประเมินคุณภาพปลาป่นที่มีจำหน่ายและนำไปใช้ในอาหารสัตว์ของไทย ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอุตสาหกรรมการผลิตปลาป่นของไทยมีการควบคุมคุณภาพให้เป็นไปตามมาตรฐานได้ดีพอสมควรแต่ยังพบการปลอมปนขนไก่ป่น หินฝุ่น และเปลือกหอย ซึ่งอาจจะกระทบต่อคุณค่าทางอาหารของปลาป่นได้

คำสำคัญ: ปลาป่น วัตถุดิบอาหารสัตว์ การวิเคราะห์ทางกายภาพ

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ
E-mail address: kanokrat.sr@kmitl.ac.th

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2559. 11(2): 91-100.

Quality Evaluation and Contamination Testing in the Fish Meal used for Livestock Production Industry

Kanokrat Srikijkasemwat[1,#], Ampon Klompanya[1] and Kan Suksupath[1]

[1]Department of Animal Production Technology and Fisheries Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Chalongkrung Rd., Ladkrabang , Bangkok 10520

Abstract: Fish meal is also claimed as one of the best feedstuff which contained various valuable nutrients and consists of an optimum quality for livestock. Therefore, it is also necessary to evaluate fish meal before using to confirm its quality. This study was aimed to evaluate the qualities of fish meal samples under the physical characteristic. Twenty-five samples of fish meal were graded to five levels according to the Thai fish meal producers association as the premium grade, number 1, number 2, number 3 and head fish grade which each grade contained five samples. The results showed that color of fish meal presented brown and dark brown which were related to the fresh of fish. Some serious impurities were also found such as feather meal which it was found 8 % (2/25) in fish meal number 2 and 3 as 20% (1/5) each. Limestone and ground shell were found 24 % (6/25) in the grade premium, number 1, 3 and 2 amount 60% (3/5), 40% (2/5) and 20% (1/5), respectively. There were not found chromium and urea granule in all selected fish meal samples. However, the salt content is high above the newest regulation limit. The overall results from this study are able to summarize that the quality of fish meal which supplied to the customer has mostly well prepare to meet a regulation of fish meal standard. Nevertheless, contamination of feather meal, limestone and ground shell are also found and these are able to interfere some nutritional values of fish meal.

Keywords: Fish meal, Feedstuff, Physical evaluation

[#]Corresponding author
J. Mahanakorn Vet. Med. 2016. 11(2): 91-100.
E-mail address: kanokrat.sr@kmitl.ac.th

บทนำ

ปลาป่นเป็นอาหารโปรตีนที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงสัตว์ ผลิตจากปลาชนิดต่างๆ ที่ติดมากับอวนลากของชาวประมง เมื่อนำมาบดป่นและสกัดน้ำมันออกแล้วทำให้แห้งอาจมีวัตถุอื่นๆ รวมทั้งเปลือกปู กุ้ง กั้ง หอย หินและทรายปนมาด้วย คุณภาพของปลาป่นขึ้นกับชนิดของปลาวัตถุเจือปน ความสดของปลาตลอดจนกรรมวิธีในการผลิตเช่น ถ้าให้ความร้อนสูงเกินไปปริมาณของกรดอมิโนจะลดลงต่ำ นอกจากนี้ความชื้นและไขมันที่มีอยู่สูงจะทำให้เก็บรักษาปลาป่นไว้ไม่ได้นานเพราะอาจทำให้เกิดเชื้อราและเหม็นหืนได้ง่าย (ชัยภูมิ และคณะ, 2556) โดยปัจจุบันปลาป่นมีกรรมวิธีการผลิต 2 วิธีซึ่งทำให้ได้ปลาป่นที่มีคุณภาพแตกต่างกันคือการผลิตแบบบีบน้ำและการผลิตแบบอบแห้งการผลิตแบบบีบน้ำนั้นเป็นการผลิตแบบเก่าซึ่งเป็นวิธีที่ก่อให้เกิดภาวะน้ำเสียปัจจุบันนี้โรงงานส่วนใหญ่นิยมใช้กรรมวิธีแบบอบแห้งเพราะให้ความสะอาดและคุณค่าทางโปรตีนสูงกว่าวิธีแบบบีบน้ำ (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2555) ซึ่งด้านคุณภาพและราคาของปลาป่นที่ผลิตจำหน่ายในประเทศไทย จะแตกต่างกันตามระดับของโปรตีน โดยปลาป่นประเภทโปรตีนต่ำ จะมีโปรตีน 55 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลาป่นประเภทโปรตีนสูงมีโปรตีน 60 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการจัดแบ่งเกรดคุณภาพปลาป่นตามเกณฑ์ของสมาคมผู้ผลิตปลาป่นไทยเป็น 5 เกรด คือ เกรดกุ้ง, เบอร์ 1, เบอร์ 2, เบอร์ 3 และหัวปลาโดยจัดแบ่งตามระดับโปรตีนซึ่งต้องมีระดับโปรตีนไม่ต่ำกว่า 65, 60, 56, 52 และ 45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารอาหารอื่นมักอยู่ในระดับใกล้เคียงกัน คือไขมัน 5-8 เปอร์เซ็นต์, เยื่อใย 1 เปอร์เซ็นต์, ความชื้น 8-10 เปอร์เซ็นต์แร่ธาตุประมาณ 20-24 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งของวิตามินมีแคลเซียมประมาณ 5-8 เปอร์เซ็นต์ และฟอสฟอรัสประมาณ 3.0-3.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ปลาป่นมีโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นที่สัตว์ต้องการ เช่น กรดอะมิโนไลซีน มีค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังมีสารที่จำแนกไม่ได้ว่าเป็นชนิดใด (unidentified growth factor; UGF) แต่มีส่วนช่วยเสริมให้สัตว์เจริญเติบโต อย่างไรก็ตามปริมาณการใช้ปลาป่นไม่ควรเกิน 10-15 เปอร์เซ็นต์ ของสูตรอาหาร เนื่องจากเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีราคาแพงและหากใช้มากเกินไปอาจมีกลิ่นของปลาป่นติดไปกับผลิตภัณฑ์ของสัตว์ เช่น น้ำนม เนื้อ หรือไข่ได้ (ยิ่งลักษณ์, 2556) ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันปลาป่นอาจจะมีการปลอมปนด้วยยูเรีย ขนไก่ป่น แกรบกุ้ง ทรายละเอียด เปลือกหอยป่น หรือเศษเปลือกหอยผุ (กาซ้า) ซึ่งเวลามองอาจจะคล้ายกระดูกปลา ถ้านำปลาป่นชนิดนี้ไปให้สัตว์กินอาจจะทำให้ขาดฟอสฟอรัสถ้าปนมาในระดับสูง นอกจากนี้อาจพบพวกผงเหล็ก แกลบบดละเอียด กากวุ้นเส้น เศษหนังขนแห้งบดละเอียด เนื้อป่น เนื้อและกระดูกป่น เลือดป่น กากน้ำมันหมู เศษหัวและไส้ปลาจากโรงงานปลากระป๋อง ซึ่งวัตถุดิบดังกล่าวมาถือว่ามีคุณค่าทางโภชนะต่ำและมีราคาต้นทุนการผลิตที่ถูกกว่าปลาป่นมากจึงมีการนำมาปลอมปนลงในปลาป่นเพื่อลดต้นทุนการผลิตปลาป่น และทำให้คุณภาพของปลาป่นลดต่ำลงได้ (ศรีสกุล, 2542; ยิ่งลักษณ์, 2556)

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้สุ่มเก็บตัวอย่างปลาป่นจากแหล่งผลิตและระดับเปอร์เซ็นต์โปรตีนที่ แตกต่างกัน นำมาตรวจสอบโดยวิธีการทางกายภาพ และทางเคมีอย่างง่ายเพื่อตรวจสอบคุณภาพปลาป่นในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ไทย สร้างองค์ความรู้ในการใช้ข้อมูลด้านคุณภาพของ ปลาป่นในเกรด

คุณภาพต่างๆ ได้อย่างเป็นสาธารณะต่อเกษตรกรและบุคคลทั่วไปสามารถเข้าถึงข้อมูลได้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาป่นจากโรงงานผลิตปลาป่นฟาร์มเลี้ยงสัตว์และร้านจำหน่ายวัตถุดิบอาหารสัตว์ จัดแบ่งตัวอย่างปลาตามชั้นคุณภาพปลาป่นตามชั้นคุณภาพการแบ่งเกรดทางการค้า ทั้งหมด 5 เกรด คือ ปลาป่นเกรดกุ้ง, เบอร์ 1, เบอร์ 2, เบอร์ 3 และหัวปลา เกรดละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างวัตถุดิบ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากแต่ละแหล่ง จำนวน 15 กิโลกรัม นำมา ทำการลดขนาดของตัวอย่างลงให้เหลือเพียงพอสำหรับเก็บไว้ตรวจสอบหรือวิเคราะห์ ตัวอย่างละ 100-150 กรัม เพื่อตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ และการปลอมปนของตัวอย่าง

การตรวจการปลอมปน ปริมาณโปรตีน และลักษณะทางกายภาพในปลาป่น

1. การทดสอบการปลอมปนขนไก่ป่นในปลาป่น ด้วยวิธีคัลเลอริเมตรี (ศรีสกุล, 2542)

2. การทดสอบยูเรียในปลาป่น (ศรีสกุล, 2542)

3. การทดสอบโครเมี่ยมในปลาป่น โดยใช้สารละลาย ไดเฟนิล คาร์บาไซด์ อินดิเคเตอร์ (diphenyl carbazide indicator) 0.1 เปอร์เซ็นต์ และใช้โคเมทเป็นตัวทำมาตรฐาน (standard) ให้มีความเข้มข้น 0.01-0.10 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร เป็นสารละลายเปรียบเทียบ (เยาวมาลย์, 2544)

4. วิเคราะห์ค่าความหนาแน่น (bulk density) โดยการบรรจุวัตถุดิบที่ศึกษาลงในกระบอกตวงขนาดปริมาตร 1 ลิตร ให้เต็ม เกลี่ยผิวหน้าให้เรียบ โดยไม่มีการอัดตัวอย่างวัตถุดิบในภาชนะบรรจุให้แน่น จากนั้นนำวัตถุดิบที่ตวงไว้ไปชั่งน้ำหนัก คำนวณค่าความหนาแน่นรวม ตามสมการดังนี้ (เยาวมาลย์, 2544)

$$\text{bulk density} = \frac{\text{น้ำหนักวัตถุดิบอาหารสัตว์ (กก.)}}{\text{ปริมาตรภาชนะ (ลบ.ม.)}}$$

5. การทดสอบเปอร์เซ็นต์เกลือในปลาป่น ดัดแปลงมาจากวิธี Mohr Method โดยใช้ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ทำปฏิกิริยากับโซเดียมครอไรด์ (NaCl) โดยใช้โปรตัสเซียมไดโครเมท (KCrO) เป็นอินดิเคเตอร์ (เยาวมาลย์, 2544)

6. การแยกสัดส่วนองค์ประกอบของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ของปลาป่นออกจากกันด้วยตัวทำละลายคาร์บอนเตรทตร้าคลอไรด์โดย ชั่งตัวอย่างปลาป่น ซ้ำละ 10 กรัม แล้วเติมด้วยตัวทำละลาย คาร์บอนเตรทตร้าคลอไรด์ 40 มิลลิลิตร (เยาวมาลย์, 2544) เพื่อหาสัดส่วนค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบอินทรีย์ซึ่งเป็นส่วนที่ลอยในละลายคาร์บอนเตรทตร้าคลอไรด์แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ของระดับโปรตีนจากส่วนลอยโดยตามสมการ (ศุภมาส และคณะ, 2530)

ระดับของโปรตีนในปลาป่น = 4.25 + 0.90 x (% ส่วนลอยของปลาป่นที่ได้จากการแยกส่วน)

จากนั้นประเมินลักษณะทางกายภาพและการปลอมปนของปลาป่นโดยการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของอย่างจากแต่ละส่วน

ผลการทดลองและวิจารณ์

การประเมินการปลอมปน ขนไก่ป่นหรือยูเรียที่มักพบว่ามีการปลอมปนเพื่อเพิ่มระดับโปรตีนให้สูงขึ้น รวมทั้งหินฝุ่น หรือเปลือกหอย ในปลาป่นทั้ง 25 ตัวอย่าง พบว่ามีการปลอมปนด้วยขนไก่ป่นในปลาป่น คิดเป็น 8 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างทั้งหมด (2/25) โดยพบในเกรดปลาเบอร์ 2 (1/5) และ เกรดปลาเบอร์ 3 (1/5) แต่ไม่พบการปลอมปนขนไก่ป่นในตัวอย่างปลาป่นเกรดกุ้ง, เกรดปลาเบอร์ 1 และ เกรดหัวปลา (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามไม่พบการปลอมปนยูเรียในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ทั้งนี้เคยมีรายงานจาก นวรัตน์ (2544) ที่ศึกษาอย่างปลาป่นที่พบว่าลักษณะทางกายภาพที่อยู่ในสภาพที่ปกติ แล้วนำมาทำการตรวจสอบการปลอมปน พบการปลอมปนด้วยขนไก่ป่น ปริมาณ 1-3 เปอร์เซ็นต์ซึ่งพบถึง 21.74 เปอร์เซ็นต์ (5/25) ของตัวอย่างทั้งหมด โดยพบในตัวอย่างที่มีโปรตีนในระดับสูง เนื่องจากการซื้อขายปลาป่นมักกำหนดราคาของปลาป่นตามระดับของโปรตีน ดังนั้นจึงมีการนำขนไก่ป่นที่ผ่านการย่อยสลายตามกระบวนการแล้วปนลงไปในวัตถุดิบปลาป่น และไม่พบการปลอมปนของยูเรียในปลาป่น

นอกจากนี้พบการปลอมปนหินฝุ่นและเปลือกหอยในตัวอย่างปลาป่น ถึง 24 เปอร์เซ็นต์(6/25) โดยพบมากที่สุดในตัวอย่างปลาป่นเกรดกุ้ง และเกรดปลาเบอร์ 1 คือ 60.0 เปอร์เซ็นต์ (3/5) รองลงมาคือเกรดปลาเบอร์ 3 และ เกรดปลาเบอร์ 2 เท่ากับ 40.0 เปอร์เซ็นต์ (2/5) และ 20.0เปอร์เซ็นต์ (1/5) ตามลำดับ แต่กลับไม่พบการปลอมปนหินฝุ่นและเปลือกหอยในปลาป่นเกรดหัวปลา ทั้งนี้ไม่พบการปลอมปนสารโครเมียม ในทุกตัวอย่างซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างปลาป่นที่ได้มาไม่มีการปลอมปนของเศษหนังจากโรงงานฟอกหนัง (ตารางที่ 1)

การประเมินลักษณะทางกายภาพของวัตถุดิบในส่วนค่าความหนาแน่น (bulk density) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งการทดสอบค่าความหนาแน่นนั้นค่าความหนาแน่นที่ต่ำแสดงถึงคุณภาพที่ดีของปลาป่น ซึ่งยิ่งลักษณ์ (2556) กล่าวว่า ปลาป่นที่มีคุณภาพดีลักษณะเนื้อปลาจะเกาะกันอย่างหลวมๆ เนื้อจะฟูนุ่ม กลิ่นหอม จึงมีความหนาแน่นต่ำ การศึกษาครั้งนี้พบว่าคุณภาพปลาป่นค่อนข้างเป็นไปตามลำดับชั้นกล่าวคือ ปลาป่นเกรดกุ้งมีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นต่ำสุด คือ 0.506 กรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือ ปลาป่นเบอร์ 1, เกรดหัวปลา และ ปลาป่นเบอร์ 2 มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่น 0.517, 0.551 และ 0.557 กรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างปลาป่นเบอร์ 3 มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นสูงสุด 0.584 กรัม/มิลลิลิตร อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยความหนาแน่นที่พบในปลาป่นแต่ละเกรดแตกต่างกันไม่มากนักแสดงถึงคุณภาพปลาปนไทยอยู่ในเกณฑ์ที่ดีพอสมควร ทั้งนี้ปลาป่นที่มีความหนาแน่นสูงถูกจัดอยู่ในกลุ่มปลาป่นคุณภาพต่ำ เช่นปลาป่นกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์เกลือในระดับสูงมากพบว่าเมื่อเก็บไว้ระยะหนึ่งแล้วปลาป่นมักจะมีการจับตัวกันเป็นก้อนหรือปลาป่นที่มีระดับไขมันที่สูงรวมถึงมีการปลอมปนของแกลบกุ้ง หินฝุ่น ทราย จะส่งผลให้ปลาป่นกลุ่มดังกล่าวมีค่าความหนาแน่นสูง (ยิ่งลักษณ์, 2556)

การศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์เกลือในตัวอย่างปลาป่นทั้ง 5 ระดับชั้นคุณภาพ พบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เกลือในตัวอย่างปลาป่นในระดับที่ค่อนข้างสูงโดยพบสูงที่สุดในเกรดกุ้งคือ 5.176 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ปลาป่นเบอร์ 3, ปลาป่นเบอร์ 2, เกรดหัวปลาและปลาป่นเบอร์ 1 มีเปอร์เซ็นต์เกลือ

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบการปลอมปนของขนไก่ป่น ยูเรีย หินฝุ่น เปลือกหอย และโครเมียมในตัวอย่างปลาป่นทั้ง 5 เกรด ได้แก่ ปลาป่นเกรดกุ้ง ปลาป่นเบอร์ 1 ปลาป่นเบอร์ 2 ปลาป่นเบอร์ 3 และเกรดหัวปลา จำนวนทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง

เกรดปลาป่น	เปอร์เซ็นต์การปลอมปน (จำนวนที่พบ/จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ)			
	ขนไก่ป่น	ยูเรีย	หินฝุ่นและเปลือกหอย	โครเมียม
เกรดกุ้ง	0	0	60 (3/5)	0
ปลาป่นเบอร์ 1	0	0	60 (3/5)	0
ปลาป่นเบอร์ 2	20 (1/5)	0	20 (1/5)	0
ปลาป่นเบอร์ 3	20 (1/5)	0	40(2/5)	0
เกรดหัวปลา	0	0	0	0

เฉลี่ยคือ 5.020, 4.662, 4.634 และ 4.336 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตาม ปริมาณเกลือที่พบดังกล่าวยังอยู่ในเกณฑ์ที่รับได้โดยไม่ขัดกับมาตรฐานที่กฎหมายกำหนด แต่ต้องระมัดระวังในการนำไปใช้ เนื่องจากปลาป่นที่มีเกลือสูงอาจเป็นสาเหตุให้สัตว์ท้องเสียได้ โดยควรให้มีเกลือในปลาป่นไม่มากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ แต่กฎหมายอาจให้มีปริมาณเกลือได้ถึง 7 เปอร์เซ็นต์ (เยาวมาลย์, 2544) โดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบก่อนหน้านี้ที่ Ravindran and Blair (1993) รายงานไว้ว่าปลาป่นที่ผลิตในแถบภูมิภาคเอเชีย มีโปรตีนประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์จัดอยู่ในเกรดปลาป่นคุณภาพต่ำ อันเนื่องมาจากขาดการเอาใจใส่ในการควบคุมคุณภาพของปลาสด กระบวนการผลิต และการเก็บรักษา ในบางครั้งพบว่าปลาป่นเน่าเสียง่าย มีการปลอมปน หรือมีเกลือปริมาณมากในปลาป่นประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์

ในการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์โปรตีนของปลาป่นแต่ละเกรดสามารถใช้การศึกษาส่วนจมส่วนลอยเพื่อหาสัดส่วนค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบอินทรีย์ซึ่งเป็นส่วนที่ลอยในละลายคาร์บอนเตรทตร้าคลอไรด์แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ของระดับโปรตีนจากส่วนลอย เป็นวิธีการที่ใช้ในการประเมินเกรดของปลาป่นได้อย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ส่วนลอยในตัวอย่างปลาป่นที่ศึกษาพบค่า สูงสุด คือ72.395 เปอร์เซ็นต์ ในปลาป่นเกรดกุ้ง รองลงมา คือ ปลาป่นเบอร์ 1, ปลาป่นเบอร์ 2, ปลาป่นเบอร์ 3 และ เกรดหัวปลาต่ำที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ย 68.690, 65.565, 64.327 และ 60.190 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) การที่ปลาป่นมีสัดส่วนองค์ประกอบอินทรีย์สูงนั้นสามารถบ่งบอกได้ถึงคุณภาพปลาป่นที่ดีและมีโปรตีนสูง และเมื่อพิจารณาสัดส่วนค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบ อนินทรีย์ของปลาป่นจากเปอร์เซ็นต์ส่วนจมในตัวอย่างปลาป่น พบว่าปลาป่นเกรดกุ้ง มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ส่วนจม 18.644 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีค่าต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ส่วนจมของปลาป่นเกรดที่ต่างๆ ส่วนในปลาป่นเบอร์ 1, ปลาป่นเบอร์ 2 และ ปลาป่นเบอร์ 3 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ส่วนจมเพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ย 19.554, 23.108 และ 25.287 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกรดหัวปลาจะมีค่าสูงที่สุด คือ 27.690 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) การที่ปลาป่นมีสัดส่วนองค์ประกอบ

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยลักษณะทางกายภาพของความหนาแน่น (bulk density) ปริมาณเกลือ ส่วนลอยจม และระดับโปรตีนคิดจากส่วนลอยในตัวอย่างปลาป่นทั้ง 5 เกรด คือ ปลาป่นเกรดกุ้ง ปลาป่นเบอร์ 1 ปลาป่นเบอร์ 2 ปลาป่นเบอร์ 3 และเกรดหัวปลา

เกรดปลาป่น	ค่าทางสถิติ[1/]	ความหนาแน่น (กรัม/มิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)			
			เกลือ	ส่วนลอย	ส่วนจม	โปรตีน[2/]
เกรดกุ้ง	ค่าเฉลี่ย	0.51	5.58	72.39	18.64	69.68
	ค่า SD	0.05	1.84	4.02	3.80	3.61
ปลาป่นเบอร์ 1	ค่าเฉลี่ย	0.52	4.34	68.69	19.55	66.34
	ค่า SD	0.02	2.19	5.61	4.97	5.05
ปลาป่นเบอร์ 2	ค่าเฉลี่ย	0.56	4.66	65.57	23.11	63.53
	ค่า SD	0.03	1.56	4.52	6.25	4.07
ปลาป่นเบอร์ 3	ค่าเฉลี่ย	0.58	5.02	64.33	25.29	62.42
	ค่า SD	0.03	1.68	5.40	6.91	4.86
เกรดหัวปลา	ค่าเฉลี่ย	0.55	4.63	60.19	27.69	58.69
	ค่า SD	0.09	1.42	3.53	7.38	3.18

[1/] ค่า SD หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐาน

[2/] โปรตีนที่คำนวณได้จาก % ส่วนลอยมีความคลาดเคลื่อน +/- 1.68 (ศุภมาส และคณะ, 2530)

อนินทรีย์สูงส่งผลให้คุณค่าทางโภชนะในปลาป่นลดต่ำลง ทำให้สัตว์ใช้ประโยชน์จากปลาป่นได้ลดลง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ เยาวมาลย์ (2544) ที่ว่า ปลาป่นเกรดอาหารกุ้งมีที่ระดับโปรตีน มากกว่า 62 เปอร์เซ็นต์จะมีน้ำหนักส่วนจม น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์, ที่ระดับโปรตีน มากกว่า 65 เปอร์เซ็นต์จะมีน้ำหนักส่วนจม น้อยกว่า 16 เปอร์เซ็นต์, ที่ระดับโปรตีน มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์จะมีน้ำหนักส่วนจมน้อยกว่า 12 เปอร์เซ็นต์และปลาป่นเกรดอาหารสัตว์ที่ระดับโปรตีน มากกว่า 58 เปอร์เซ็นต์จะมีน้ำหนักส่วนจม น้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์, ที่ระดับโปรตีน 55-58 เปอร์เซ็นต์จะมีน้ำหนักส่วนจม น้อยกว่า 35 เปอร์เซ็นต์, ที่ระดับโปรตีน 50-55 เปอร์เซ็นต์จะมีน้ำหนักส่วนจม น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์และ ปลาป่นที่ระดับโปรตีน 35-50 เปอร์เซ็นต์จะมีน้ำหนักส่วนจมมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำค่าที่ได้จากส่วนจมและส่วนลอยมาคำนวนค่าเปอร์เซ็นต์โปรตีนในตัวอย่างปลาป่นทั้ง 25 ตัวอย่าง พบว่าเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดโดยในตัวอย่างปลาป่นเกรดกุ้ง มีเปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงสุดเฉลี่ย 69.676 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ ปลาป่นเบอร์ 1, ปลาป่นเบอร์ 2, ปลาป่นเบอร์ 3 และ เกรดหัวปลาโดยมีค่าเฉลี่ย 66.341, 63.529, 62.415 และ 58.690 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ควรมีในแต่ละเกรดทางการค้าที่ของปลาป่น โดย ศุภมาส (2536) รายงานว่า ในการนำค่าส่วนลอยในปลาป่นมาคำนวณค่าระดับเปอร์เซ็นต์โปรตีนเทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์โปรตีน

ทางการค้าพบว่ามีค่าใกล้เคียง แต่จะได้ค่าที่ใกล้เคียงความจริงมากเมื่อปลาป่นนั้นมีความชื้นและไขมันอยู่ในปริมาณต่ำและหากพบว่าระดับโปรตีนแตกต่างจากผู้ขายระบุไว้มากมักพบว่ามีปัญหาการปลอมปนในปลาป่นนั้นๆ

เมื่อนำตัวอย่างปลาป่นทั้งหมดมาทำการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำที่ 1 เท่า และ 4 เท่า ในส่วนลอยหรือส่วนที่เป็นสารอินทรีย์พบเส้นใยกล้ามเนื้อปลามีลักษณะแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งบ่งบอกถึงแหล่งของวัตถุดิบที่นำมาผลิตปลาป่นที่มีคุณภาพแตกต่างกัน โดยในปลาป่นเกรดกุ้ง และ ปลาป่นเบอร์ 1 มีลักษณะของเส้นใยกล้ามเนื้อปลาที่ยาวและเห็นได้หนาแน่น ชัดเจน เป็นเส้นสีเหลืองทอง และ สีน้ำตาลอ่อน-เข้ม ในส่วนปลาป่นเบอร์ 2 มีลักษณะเส้นใยกล้ามเนื้อสั้น เนื้อฟู, ปลาป่นเบอร์ 3 มีลักษณะบางตัวอย่างมีเนื้อปลาเกาะกันเป็นก้อน ส่วนในเกรดหัวปลานั้นมีลักษณะเส้นใยกล้ามเนื้อสั้น เป็นเนื้อละเอียดเป็นก้อนมีสีน้ำตาลเข้ม มีเศษก้างและแกลบกุ้งปนมาด้วย ทั้งนี้ปลาป่นที่ถือได้ว่าผลิตจากปลาสดจะมีสีน้ำตาลออกเหลืองหรือน้ำตาลเข้มส่วนปลาป่นที่ผลิตจากปลาไม่สดจะมีสีเทา

ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 4 เท่าจากส่วนอนินทรีย์หรือส่วนจม ซึ่งถือว่าเป็นส่วนที่ปลอมปนพบก้างปลา, กระดูกปลา, เปลือกปู, แกลบกุ้ง, เปลือกหอย, กาบหอย และ ลูกตาปลา พบมากในตัวอย่าง ปลาป่นเบอร์ 3 และเกรดหัวปลา ดังแสดงในรูปที่ 1-5 ซึ่งสอดคล้องกับ ยิ่งลักษณ์ (2556) ที่กล่าวว่า เมื่อนำปลาป่นมาทำการแยกส่วนที่เป็นอินทรีย์ และอนินทรีย์ พบว่า ในส่วนอินทรีย์ที่เห็นก็คือ เนื้อปลา ลูกตาปลา เปลือกกุ้ง เปลือกปู ขนไก่ และสิ่งปลอมปนอื่นๆ ส่วนอนินทรีย์ได้แก่ เกรดปลา ก้างปลา กรวดทราย เปลือกหอย ผงเหล็ก และ



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางกายภาพการปลอมปนเปลือกกุ้ง



รูปที่ 2 แสดงลักษณะทางกายภาพการปลอมปนก้าง กระดูกปลา



รูปที่ 3 แสดงลักษณะทางกายภาพการปลอมปนเปลือกหอยป่น



รูปที่ 4 แสดงลักษณะทางกายภาพ A: เปลือกปู, B: กาบหอย



รูปที่ 5 แสดงลักษณะทางกายภาพ A: แกลบกุ้ง, B: ลูกตาปลา

สอดคล้องกับ กรมปศุสัตว์ (2540) ที่รายงานผลการตรวจการปลอมปนในปลาป่น 287 ตัวอย่าง เมื่อนำปลาป่นมาทำการแยกส่วนจม และส่วนลอย พบว่ามีส่วนจม คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 22-27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็น กระดูกและก้างปลา อาจมีการปะปนสิ่งอื่นๆในปริมาณน้อย เช่น ทราย หินฝุ่น เปลือกหอย เปลือกปู และเปลือกกุ้ง

สรุปผลการทดลอง

ปัจจุบันการพิจารณาคุณภาพปลาป่นในประเทศไทยยังเน้นเพียงแค่การตรวจระดับโปรตีนให้เป็นไปตามมาตรฐานแต่ยังไม่มีรายงานถึงคุณภาพอื่นๆ งานวิจัยในครั้งนี้จึงทำการสุ่มประเมินคุณภาพปลาป่นจากโรงงานผลิตปลาป่น ฟาร์มเลี้ยงสัตว์และร้านจำหน่ายวัตถุดิบอาหารสัตว์ ตามการจัดแบ่งเกรดคุณภาพปลาป่นตามเกณฑ์ของสมาคมผู้ผลิตปลาป่นไทย พบว่าระดับโปรตีนเป็นไปตามมาตรฐานทุกระดับชั้นและใช้ปลาค่อนข้างสดในการผลิตเมื่อพิจารณาจากสีของปลาป่น และไม่พบการปลอมปนของโครเมียมหรือยูเรียแต่พบว่ามีการปลอมปนขนไก่ป่นเพื่อเพิ่มระดับโปรตีนในปลาป่นเบอร์ 2 เบอร์ 3 และพบระดับเกลือที่สูงซึ่งผู้ใช้พึงนำไปประกอบการพิจาณาสูตรอาหารสัตว์เพื่อป้องกันปัญหาสัตว์ท้องเสีย ข้อมูลจากการประเมินคุณภาพและการตรวจการปลอมปนในปลาป่นที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในครั้งนี้จะมีส่วนช่วยให้ผู้เลี้ยงสัตว์พิจารณาเลือกใช้หรือระมัดระวังในการนำไปใช้มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัท เพาเวอร์โฟร์เวท จำกัด และบริษัท ไทยฟู้ด อาหารสัตว์ จำกัด ที่สนับสนุนวัตถุดิบและทุนในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2540. พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525. พิมพ์ครั้งที่ 4. กองควบคุมอาหารสัตว์. กรุงเทพมหานคร.

ชัยภูมิ บัญชาศักดิ์, สมเกียติ ประสานพานิช, ธีรวิทย์ เปย่คำภา, วิริยา ลุ้งใหญ่, พงศ์ธร คงมั่น, เชาว์วิทย์ ระฆังทอง และ ชาญวิทย์ แก้วตา ปี. 2556. โภชนะศาสตร์สัตว์. แดเน็กซ์อินเตอร์คอร์ปอเรชั่น. กรุงเทพมหานคร. 260 หน้า.

นวรัตน์ ผอบงา. 2544. การศึกษาค่าการย่อยได้ของกรดอะมิโนในวัตถุดิบ แหล่งโปรตีนบางชนิดโดยสัตว์ปีก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร. 141 หน้า.

ยิ่งลักษณ์ มูลสาร. 2556. การวิเคราะห์อาหารสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. 312 หน้า.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ. 2544. เทคนิคการตรวจคุณภาพอาหารสัตว์อย่างง่ายและรวดเร็ว. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. ขอนแก่น. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 69 หน้า.

ศรีสกุล วรจันทรา. 2542. ปฏิบัติการเทคโนโลยีอาหารสัตว์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร. 73 หน้า.

ศุภมาส ตันติภาสวศิน, อุทัย คันโธ และ สุกัญญา จัตตุพรพงษ์. 2530. สมการคาดคะเนเปอร์เซ็นต์โปรตีนในปลาป่น. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตวศาสตร์ สัตวแพทย์ ครั้งที่ 25, กรุงเทพฯ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 3-5 กุมภาพันธ์ 2530: 178-183.

สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร. 2555. การศึกษาเศรษฐกิจการผลิตการตลาดปลาป่นระบบประกันคุณภาพ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพมหานคร. 81 หน้า.

Ravidran, V. and Blair, R. 1993. Feed resources for poultry production in Asia and the Pacific. III. Animal protein sources. *World Poult. Sci. J*. 49: 219-235.

บทความวิจัย

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

การศึกษาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนพยาธิและความดกไข่ของพยาธิใบไม้ในลำไส้ *Echinostoma revolutum* ในไก่บ้าน

กิตติชัย จันธิมา[1] และชโลบล วงศ์สวัสดิ์[2,3,#]

[1]โปรแกรมวิชาพลังงานและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย เชียงราย 57100

[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

[3]หน่วยวิจัยประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเพื่อการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

บทคัดย่อ: การศึกษาวิจัยการตรวจพบการเจริญเติบโตของไข่พยาธิ และความไข่ดกของพยาธิใบไม้ในลำไส้ *Echinostoma revolutum* ในไก่บ้าน (*Gallus gallus domesticus*) โดยทำการคัดแยกตัวอ่อนพยาธิใบไม้ *E. revolutum* ระยะเมตาเซอร์คาเรียจากหอยขม (*Filopaludina martensi martensi*) และทำการป้อนระยะติดต่อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียจำนวน 50 ตัว ต่อลูกไก่บ้านอายุ 3 วัน 1 ตัว (n=60 ตัว) จากนั้นทำการตรวจหาไข่พยาธิจากอุจจาระไก่ เพื่อหาจำนวนไข่และตรวจนับไข่พยาธิในมดลูกของพยาธิ ตรวจนับปริมาณไข่ต่อกรัมมูลไก่ (EPG) และศึกษาสัณฐานวิทยาและการเจริญของไข่พยาธิ จากผลการศึกษาวิจัยพบว่าพยาธิใบไม้ชนิดนี้สามารถดำรงชีวิตอยู่ในตัวไก่บ้านได้ 36 วัน และหลังจากการป้อนตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิใบไม้ชนิดนี้ พบว่าค่าความชุกของการติดเชื้อเท่ากับ 60.0% (36/60) และจากการป้อนตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะติดต่อทั้งหมด 1,800 ตัวในไก่บ้าน สามารถตรวจพบตัวพยาธิใบไม้ 465 ตัว (27.1%) ส่วนใหญ่จะพบในลำไส้ ส่วน jejunum และ ileum และมีส่วนน้อยที่พบใน caeca และนอกจากนั้นยังพบว่าพยาธิใบไม้ระยะโตเต็มวัยสามารถสร้างไข่ได้ประมาณวันที่ 10 หลังจากทำให้ติดโรค และสามารถตรวจพบไข่พยาธิได้ในมูลไก่บ้านจากการใช้วิธีตรวจด้วยเทคนิคการตกตะกอน formalin-ether ได้นับตั้งแต่วันที่ 10 หลังการป้อนตัวอ่อนพยาธิใบไม้เข้าไป สำหรับการนับจำนวนไข่พยาธิ หรือ EPG นั้นพบว่าปริมาณไข่จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 10-16 จากนั้นจะเริ่มคงที่ไปจนถึงวันที่ 36 หลังการป้อนตัวอ่อนพยาธิใบไม้ ไข่ของพยาธิจะเริ่มมีการเจริญเติบโตตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 10 ภายหลังจากที่วางไข่ปนออกมากับอุจจาระ และสามารถเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 ไมราซีเดียม ที่สมบูรณ์ได้หลังจากวันที่ 10 ไปแล้วก่อนที่มันจะฟักออกมาจากไข่ในภายหลัง

คำสำคัญ: *Echinostoma revolutum* ไก่บ้าน ความดกไข่ การเจริญของไข่

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

E-mail address: cwongsawad@gmail.com

Echinostoma revolutum in Domestic Chickens: Developmental Larval Stages and Fecundity of an Intestinal Trematode

Kittichai Chantima[1] and Chalobol Wongsawad[2,3,#]

[1]Energy and Environment Program, Faculty of Science and Technology, Chiang Rai Rajabhat University, Chiang Rai, 57100, Thailand; [2]Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand; [3]Applied Technology for Biodiversity Research Unit, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Abstract: This study was conducted to observe the recovery and fecundity of intestinal trematode, *Echinostoma revolutum* in domestic chick (*Gallus gallus domesticus*) and notes on their egg development. Each 60 three days old domestic chicks were fed 50 cysts of *E. revolutum* isolated from *Filopaludina martensi martensi*. Worm recovery, uterine egg counts, numbers of eggs per gram of feces (EPG), egg morphology and development of *E. revolutum* during of experimental infection in chicks were analyzed. The worms survived in chicks for 36 days post infection (PI). The incidence of infection was 60.0% (36/60). Of the 1,800 cysts fed to chicks, 465 (27.1%) worms mainly recovered from the jejunum and ileum, occasionally in caeca. The worms became ovigerous by day 10 and produced eggs, which were detected in feces as early as 10 days PI. The number of EPG, determined by a modified formalin-ether concentration technique, as well as EPG per worm increased slowly during day 10-16 PI and then remaining stable and showed a little fluctuation until day 36 PI. Additionally, egg development was characterized from day 0 to 10 post embryonation. Eggs developed fully formed miracidia from chicks after 10 days and emerged later.

Keywords: *Echinostoma revolutum*, Domestic chicks, Fecundity, Egg development

[#]Corresponding author

E-mail address: cwongsawad@gmail.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2016. 11(2): 101-114.

Introduction

Echinostoma revolutum (Froelich, 1802) Looss, 1899 (Digenea: Echinostomatidae) is an intestinal parasite of a broad range of vertebrate hosts, such as birds, mammals, including human and occasionally reptiles and fishes (Kanev, 1994; Fried and Graczyk, 2004). *E. revolutum* is cosmopolitan and infect a

large number of different hosts, both in nature and the laboratory. This worm has a wide range of experimental definitive hosts, though the compatibility may differ considerably between species (Fried, 1984; Franco *et al.*, 1986; Humphries *et al*., 1997). The establishment of *E. revolutum* in experimental animals has been studied in mice (Hosier and Fried, 1986), golden hamsters (Chai *et al*., 2011; Chantima *et al*., 2013) and domestic chicks (Fried *et al*., 1997). Several studies have been reported the fecundity of echinostomes, which had made on the basis of eggs per gram of feces (Odaibo *et al*., 1988, 1989), uterine egg counts (Christensen *et al*., 1990) and total amount of eggs in the feces of the host (Toledo *et al*., 2003; Munoz-Antoli *et al*., 2007). Detailed information concerning uterine egg counts and egg output to determine fecundity appears limited to infections with *E. revolutum* in experimental animals. However, the fecundity of *E. revolutum* in experimental animals has been studied in detail, but no report for studying in details of the uterine egg counts and egg output of this worm infection in domestic chicks.

Echinostome eggs are unembryonated when laid and require a period of incubation in the environment to form mature miracidia capable of hatching (Huffman and Fried, 1990). A comparative photographic study of the eggs of echinostomes, including *E. paraensei*, *E. trivolvis* and *E. caproni* was done by Krejci and Fried (1994) and Fujino *et al*. (2000). There are not morphologically different from other echinostome eggs, whereas the ultrastructure of *E. revolutum* eggs was not reported previously. Incubation of *E. revolutum* eggs from laboratory infected hosts used to study in avian hosts (Kanev, 1994). In addition, the studied on storage and incubation of this worm eggs recovered from wild Canada geese was done by Davis (2005). Most studies concerned about the hatchability of miracidium in various conditions, without observations on the development of *E. revolutum* egg to form mature miracidia. The developments of *E. revolutum* eggs are not well understood, and there is no report on egg development of this worm recovered from the domestic chicks. Therefore, the present study was aimed to determine the worm recovery and fecundity of *E. revolutum* in an experimental chick. Moreover, the authors have described the ultrastructure and development of eggs to form mature miracidia.

Materials and Methods

Experimental infections and worm recovery

Three days old domestic chicks (*Gullus gallus domesticus*), weighing between 48-60 g were used as the experimental hosts.

Metacercariae of *E. revolutum* were collected from naturally infected snails, *Filopaludina martensi martensi* from Chiang Mai province, Thailand. They were collected by the crushing method and isolated using a sharp pin, gently covered with a coverslip, and observed under a light microscope. The presence of a head collar with 37 spines was highly indicative of *E. revolutum.* Fifty encysted metacercariae of *E. revolutum* were orally forced fed to each chick. Each 60 chicks were sacrificed daily at day 1-60 post-infection (PI) by excess diethyl ether for examination of the parasite. All experimental hosts were managed according to the guideline approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Science, Chiang Mai University. All Chick digestive tracts were roughly divided into the esophagus, crop, stomach (proventriculus and gizzard), small intestine (duodenum, jejunum, ileum), caecum and rectum, longitudinally with a pair of scissors and placed in 0.85% NaCl. Worms were collected and examined under a stereo microscope. The number of recoveries was recorded to determine the infectivity and worm recovery.

Fecundity of the worm

Data on fecundity were determined by uterine egg counts (UEC) and a number of eggs per gram feces (EPG). Fecal samples were examined for determining the EPG. The chick feces were collected separately, incubated at 60°C for 24 hours, weighed and fixed in 10% formalin before an examination. Chick feces were checked daily by a modification of the formalin-ether concentration technique (MFECT) (Elkins *et al*., 1991). Eggs per gram of feces were determined according to Odaibo *et al*. (1988, 1989). The number of eggs in the uterus of 10 worms from each day during early appeared in uterus (10 days PI) to the end of experimental was determined by dissection (Christensen *et al*., 1990). The correlation was used to quantify the association between the worm recovery and UEC, and/or EPG. In addition, the correlation of UEC per worm (UEC/worm) and EPG per worm (EPG/worm) was determined.

Egg morphology

The eggs were photographed, measured and illustrated under a compound microscope for morphological study. Morphological traits of eggs (n=30) were studied and measured by an Olympus eye-piece micrometer. Some eggs were studied for the surface ultrastructure with scanning electron microscope (SEM). Briefly, the eggs were rinsed several times in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and fixed in 2.5% glutaraldehyde at 4°C for 24 hours, and post-

fixed with 1% osmium tetroxide for 3 hours. Then they were dehydrated in a graded alcohol series, transferred into acetone, and finally dried in a critical-point dryer. The specimens were mounted on stubs and then coated with gold. The specimens were observed and photographed using a JEOL JSM-5400LV SEM.

Observations of egg development

Mature unembryonated eggs were purified from chick feces by filtration through a series of graded sieves, then observed under a stereo microscope. The eggs were washed in 0.85% NaCl several times and then incubated in multi-well plate cultures containing 2 ml of distilled water. The eggs were incubated at room temperature (25-28°C) with ambient room lighting for at least 2 weeks to observe the final hatch to obtain eggs with fully developed miracidia. Egg development was observed under a compound microscope from live eggs prepared as wet mounts. Egg development was monitored daily. Developmental stages were photographed using a compound microscope (OLYMPUS DP20, Olympus).

Results

Worm recovery

After orally introduced to chicks, the metacercariae excysted and developed into adults in the small intestine. From day 1 to day 36 PI, a total of 465 worms were recovered from 36 chicks that had been infected with a total of 1,800 metacercariae. The incidence of infection was 60.0% (36/60) and the average worm recovery per chick was 27.1%, which varied from 2.0 to 74.0%. Metacercariae of *E. revolutum* developed into mature adults after 8 days PI and ovigerous adults developed after 9 days PI. The worms were mostly recovered from the jejunum (75.2%), ileum (23.4%), and some from the caecum (1.4%) while not found the worms in other parts of the digestive tract. The worms were survived until day 36 PI.

Fecundity of worm

The worms vigerous and began to produce eggs on day 10 PI. Based on the eggs in feces (Figure 1), they firstly appeared at 10 days PI and egg was released continuously from the first day until day 36 PI. Egg per gram of feces per worm (EPG/worm) increased slowly and showed a little fluctuation during day 10-22 PI and then slowly decreased until day 36 PI. After that, the worms were expelled from the chicks by day 37 PI. Figure 1 also shows that the uterine egg counts per worm (UEC/worm) during early appeared in uterus (10 days PI) to the end of experimental. The UEC/worm rapidly increased during the first two weeks of

infection and the mean number of UEC/worm observed daily was 172.8±64.6. When the UEC/worm and EPG/worm were plotted, no correlation was observed between those 2 parameters (*r=0.06*) whereas the worm recovery and the number of EPG/worm were highly correlated (*r=0.98*), also the correlation coefficient of worm recovery and UEC/worm were relatively high (*r=0.58*) (Figure 2).

Egg morphology

The morphology of *E. revolutum* eggs were photographed under a light microscope (LM) and SEM (Figure 3). LM observations revealed the structures of the operculum and abopercular region. The eggs were ovoid, pyriform or elliptical, operculate and yellow-brown. They are unembryonated, with a smooth shell with a definite knob like thickening at the abopercular end of the shell. The eggs of *E. revolutum* were 113-133 μm long and 60- 0 μm wide. As determined by SEM, the surface ultrastructure of the eggs showed that the egg shell surface is smooth and operculate. The operculum was smooth and surrounded by an opercular junction (Figure 3C). The abopercular knob wrinkled invaginates the eggshell (Figure 3D).

Egg development

Egg development showed in Figure 4. The mature eggs were unembryonated when laid (day 0). In 1-3 days old eggs, there are clusters of vitellocytes, which are small cells peripheral to the early embryo, like foam bubbles. The vitellocystes became progressively smaller and then not apparent. In 4 day-old eggs, the vitellocytes surrounded the embryo. In 5 day-old eggs, there was a spherical core of cells forming the developing embryo with clusters of vitellocytes. In 6 day-old eggs, the growing embryo is surrounded by a layer of vitellocytes. In 7 day-old eggs, there was larger enlarged embryo, contained in defined clusters of vitellocystes and balloon-like vesicles. From day 8 to 9, the embryo began to resemble a miracidium, contained balloon-like vesicles. The embryo developed a body with cilia and the embryo had attained nearly the same size as the miracidium with apical papillae and the eye spots obvious in 9 day-old eggs. At day 10, the miracidia was oriented along the long axis of the egg and the balloon-like vacuoles filled with a clear refrainment fluid. The vacuoles incompletely encircled the miracidium and they fill a large space between the shell and the miracidium. Most eggs had two vesicles, but some three or only one fully developed miracidia observed by day 10-11 and hatched later.

Miracidia formed within a week and developed slowly. The first miracidia hatched at day 10 and eggs usually hatched in greater

numbers by day 11. The miracidia showed slight motility within the eggs, with the larva moving longitudinally from the posterior end to the anterior end of the egg. The miracidial tegument is ciliated and began to beat and showed bending movements. Newly hatched miracidia swim rapidly, changing direction from time to time.

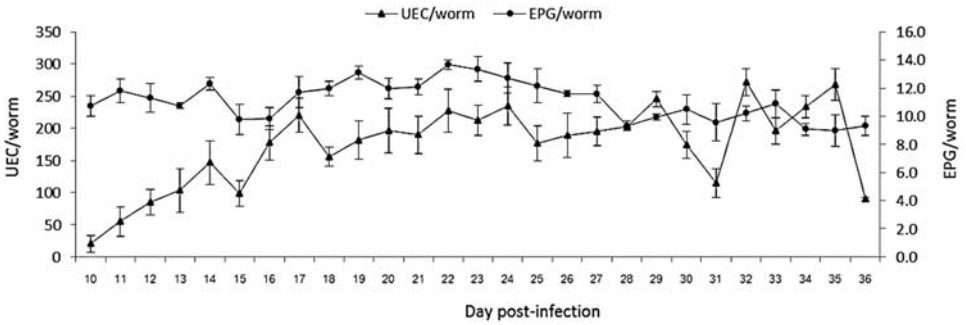


Figure 1. The number of uterine egg counts per worm (UEC/worm) and egg per gram of feces per worm (EPG/worm) detected during experimental from day 10-36 post-infection. Vertical bars represent the standard deviation.

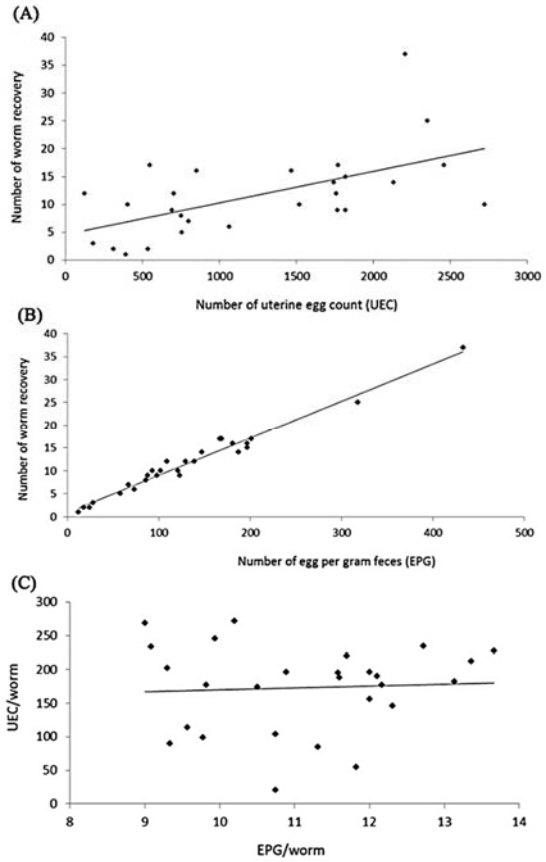


Figure 2. Illustrated the correlation among the parameters used in this experiment: (A) Correlation of the worm recovery and uterine egg counts (UEC); (B) Correlation of worm recovery and egg per gram of feces (EPG); (C) Correlation of UEC per worm (UEC/worm) and EPG per worm (EPG/worm).

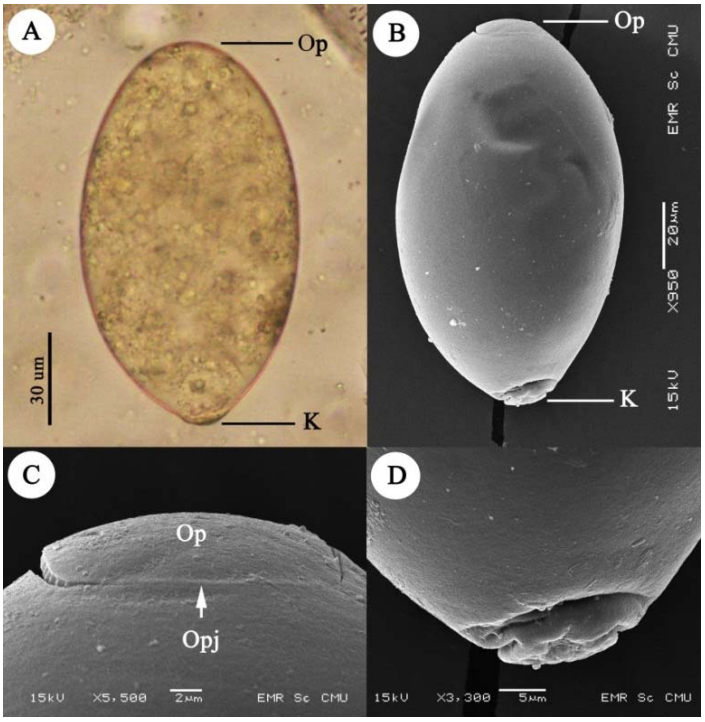


Figure 3. The eggs of *E. revolutum*. (A) Newly laid egg collected from chick feces showing the operculum (Op) and abopercular knob (K); (B) Surface ultrastructure of the egg showing the smooth egg shell surface with the operculum and abopercular knob; (C) Enlarged view of the operculum showing the operculum and operular junction (OpJ); (D) Abopercular knob.

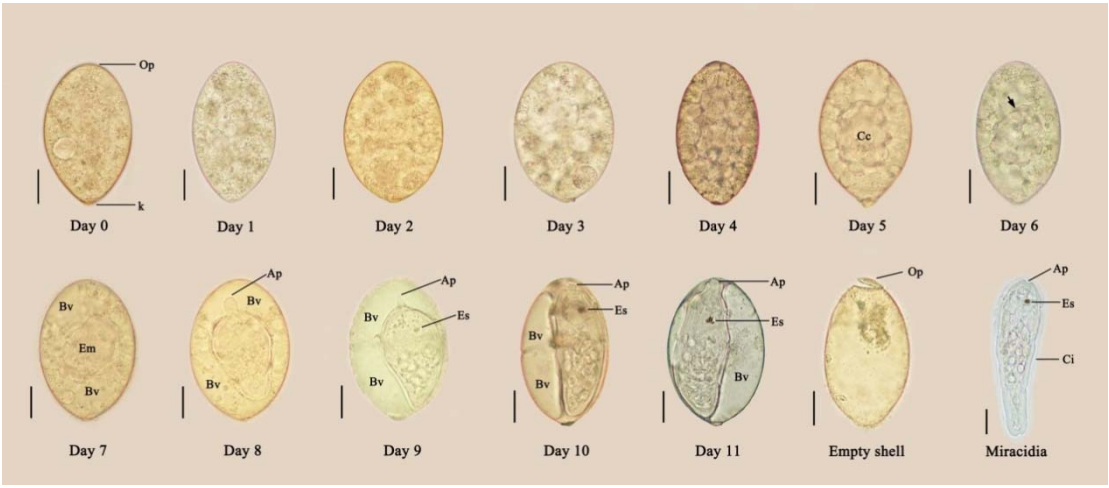


Figure 4. Light micrographs of egg development to form mature miracidia of *E. revolutum*. Note the operculum (Op), abopercular knob (K), the central core cell (CC), the embryo (Em), balloon-like vesicle (Bv), apical papilla (Ap), eye spots (Es), cilia (Ci) and layer of vitellocytes (arrowhead); scale bar = 30 µm.

Discussion

The results of this study has been pointed out that the worm recovery and fecundity of *E. revolutum* in the experimental chicks. The average of worm recovery was high (27.1%) and maintained thus in domestic

chick until day 36 PI. The worm recovery rate in this study was relatively higher than previous reports in the domestic chick by Fried *et al*. (1997). Based on the distribution of worm indicate that this worm will invade the jejunum and ileum, and some in the caecum. Nevertheless, no study about the longevity of *E. revolutum* in domestic chick was found. Kanev (1994) reported the longevity of *E. revolutum* in pigeons lived between 4 and 8 weeks under laboratory conditions, while in this study they were survived in domestic chick intestine for 36 days (5 weeks).

The eggs of *E. revolutum* usually appeared in feces on day 10 PI of young pigeons and day 11 or 12 PI in hamster (Kanev, 1994), while the worms in this study were ovigerous and began to produce eggs on day 10 PI. These findings suggested the birds (chicks) were compatible host than mammalian hosts. Several studies used quantitative methods for measuring fecundity of echinostomes (Toledo, 2009). The quantitative measurements for fecundity of *E. revolutum* are not well understood and had no report. The fecundity of *E. revolutum* in this study was measured by the UEC and EPG. The patterns of EPG/worm is similar to *E. malayanum* in mice (Srisawangwong *et al*., 2004), *E. friedi* in rat (Toledo *et al*., 2006) and *E. caproni* in mice (Munoz-Antoli *et al*., 2007) and hamster and rat (Toledo *et al*., 2004), that gradually increases and high egg output observed on day 22. The UEC of *E. revolutum* was not constant during this experiment. The UEC rapidly increased during the first two weeks of infection, which probably in relation to the progressive maturation of the adult worms. The UEC/worm in *E. revolutum* infection in domestic chick in the present study is similar to that observed for the closely related *E. caproni* in NMRI mice (Odaibo *et al*., 1988, 1989). Recovered worm dependent constraint on worm fecundity was observed in these studies. The correlation coefficient indicates that the worm recovery and EPG/worm were highly correlated. This result also showed the positive correlation between worm recovery and UEC/worm. In other words, an increase of recovered worm may reveal higher the egg production in uterus and egg output in feces. In contrast, the correlation between EPG/worm and UEC/worm are not correlated. Therefore, the numbers of egg in uterus may not reflect the egg release of worm. The authors prefer both parameters, UEC/worm and EPG/worm can be used to determine the fecundity of *E. revolutum* in experimental chick. Nevertheless, the egg production on the basis of UEC/worm and EPG/worm constitute only partial measurement of fecundity, because the egg output of echinostomes depends on

a number of factors. Toledo (2009) suggests that these factors include echinostome species, population density, age of infection and host species. Uterine egg counts and the number of egg releases as measurements of the fecundity in *E. revolutum* infections in other host species needs to be re-evaluated.

Furthermore, there was considering the morphology of eggs worm. LM investigations revealed the opercular and abopercular region in eggs of *E. revolutum*, which agrees with Chai *et al*. (2011). Moreover, eggs of *E. revolutum* are similar morphologically to other echinostome, including *E. paraensei, E. caproni* and *E. trivolvis* (Fujino *et al*., 2000). The SEM of *E. revolutum* eggs has not been documented previously. The present results reveal that the surface ultrastructure is similar to other echinostomes (Krejci and Fried, 1994; Fujino *et al*., 2000). Eggs are characterized by a smooth shell, opercular area with an opercular junction and an abopercular knob. The opercular junction was not conspicuous as with the eggs of other trematodes, heterophyid and opisthorchiid (Lee *et al*., 2012). The abopercular knob has winkles, deep invagination and infolding of the shell, while that of other echinostomes (*E. paraensei*, *E. caproni* and *E. trivolvis*) has superficial winkles and shallow infolding (Krejci and Fried, 1994; Fujino *et al*., 2000). This distinguishes this worm from other echinostomes. Additionally, the present SEM finding of this worm egg was newly added for study and significant finding of abopercular knob were obtained.

The egg development of *E. revolutum* has only one other reported (Davis, 2005). Direct comparison between their studies and this study is not able to be made because of differences in the methods of egg preparation and incubation. Davis (2005) determines the effect of cold storage duration on the incubation success of *E. revolutum* eggs. The eggs were stored at 4-8 ℃ for up to 72 weeks before being examined, whereas this study were used fresh eggs isolated from host feces which were undeveloped (unembryonated) when laid. The eggs contained clusters of vitellocytes at an early phase of development which was also described in *E. caproni* eggs by Schmidt (1998), while the vitellocystes in other trematode, *Fasciola hepatica* termed as yolk cells (Hussein *et al*., 2010). During the late phase of egg development, balloon-like vesicles are formed and filled with a clear refrainment fluid. Schmidt (1998) suggested that these vesicles are probably cell debris left from the vitellocytes which are dispersed by movements of the miracidia. The ballon-like vesicles seem to be identical to those in *E. caproni* (Idris and Fried, 1996; Schmidt, 1998). These vesicles in *E. caproni* described as

glycan vesicles become altered during the late phase of development of the miracidium. They fuse into larger entities ending up as one or two vesicles per egg (Schmidt, 1998).

In the present study, miracidia become fully developed and hatch at as early as 10 days, but maximal miracidia hatching occurred in day 11. In comparison, initial hatching of *E. trivolvis* occurred after 11 days and hatching of *E. caproni* from hamster-source eggs in day 11 and from mouse-source eggs after 13 days (Behrens and Nollen, 1993; Nollen, 1994). However, the authors did not study the viability of egg produced from experimental host. More detail about viability of eggs need to be included in the determination of the fecundity and parasite reproductive success.

Conclusion

Conclusively, the authors evaluated the worm recovery and fecundity of *E. revolutum* in the experimental chick. The results presented in this study provide the most extensive up to date of experimental host for this worm. The authors provided a background for further studies on the fecundity of this worm infection and use of the *E. revolutum*/chick system as a model for the study of host-parasite relationships. Additionally, the present report is the first report reveals the development of eggs to form miracidium of this worm. Such information provides an essential background for the further development of this worm as an applied for treatments and management of this parasite.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Thailand Research Fund (TRF) for financial support through the Royal Golden Jubilee Ph.D. scholarship program (Grant No. PHD/0293/2550). Special thanks are given to the Energy and Environment Program, Faculty of Science and Technology, Chiang Rai Rajabhat University and Applied Parasitology Research Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University for providing facilities. Thanks are also extended to Dr. J.F. Maxwell Hollis for editing this manuscript.

References

Behrens, A.C. and Nollen, P.M. 1993. Hatching of *Echinostoma caproni* miracidia from eggs derived from adults grown in hamsters and mice. *Parasitol. Res*. 79(1): 28-32.

Chai, J.Y., Sohn, W.M., Na, B.K. and De, N.V. 2011. *Echinostoma revolutum*: Metacercariae in *Filopaludina* snails from Nam Dinh Province, Vietnam, and

adults from experimental Hamsters. *Korean J. Parasitol*. 49(4): 449-455.

Chantima, K., Chai, J.Y. and Wongsawad, C. 2013. *Echinostoma revolutum*: Freshwater snails as the second intermediate hosts in Chiang Mai, Thailand. *Korean J. Parasitol*. 51 (2): 183-189.

Christensen, N.O., Simonsen, P.E., Odaibo, A.B. and Mahler, H. 1990. Establishment, survival and fecundity in *Echinostoma caproni* (Trematoda) infections in hamsters and birds. *J. Helminthol. Soc. Washington*. 57(2): 104-107.

Davis, N.E. 2005. Storage and incubation of *Echinostoma revolutum* eggs recovered from wild *Branta canadensis*, and their infectivity to *Lymnaea tomentosa* snails. *J. Helminthol*. 79(4): 321-326.

Elkins, D.B., Sithithaworn, P., Haswell-Elkins, M.S., Kaewkes, S., Awacharagan, P. and Wongratanacheewin, S. 1991. *Opisthorchis viverrini*: relationships between egg counts, worms recovered and antibody levels within an endemic community in Northeast Thailand. *Parasitol*. 102(2): 283-288.

Franco, J., Huffman, J.E. and Fried, B. 1986. Infectivity, growth and development of *Echinostoma revolutum* (Digenea: Echinostomatidae) in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *J. Parasitol.* 72(1): 142-147.

Fried, B. 1984. Infectivity, growth and development of *Echinostoma revolutum* (Trematoda) in the domestic chick. *J. Helminthol*. 58(3): 241-244.

Fried, B. and Graczyk, T.K. 2004. Recent advances in the biology of *Echinostoma* species in the ‘‘*revolutum*’’ group. In: Baker, J., Muller, R., Rollinson, D., editors. Advances in Parasitology 58. Academic Press, London; p. 140-195.

Fried, B., Mueller, T.J. and Frazer, B.A. 1997. Observations on *Echinostoma revolutum* and *Echinostoma trivolvis* in single and concurrent infections in domestic chicks. *Int. J. Parasitol*. 27(11): 1319-1322.

Fujino, T., Nakano, T., Washioka, H., Tonosaki, A., Ichikawa, H. and Fried, B. 2000. Comparative ultrastructure of eggs in *Echinostoma paraensei*, *E. caproni*, and *E. trivolvis* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitol. Res*. 86(5): 427-430.

Hosier, D.W. and Fried, B. 1986. Infectivity, growth and distribution of *Echinostoma revolutum* in Swiss Webster and ICR mice. *Proc. Helminthol. Soc. Washington*. 53(2): 173-176.

Huffman, J.E. and Fried, B. 1990. *Echinostoma* and Echinostomiasis. In: Baker, J., Muller, R., editors. Advances in

Parasitology 29. Academic Press, London; 1990. p. 215-270.

Humphries, J.E., Reddy, A. and Fried, B. 1997. Infectivity and growth of *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) in the domestic chick. *Int. J. Parasitol*. 21(1): 129-130.

Hussein, A.A., Hassan, I.M. and Khalifa R.M.A. 2010. Development and hatching mechanism of *Fasciola eggs*, light and scanning electron microscopic studies. *Saudi J. Biol. Sci*. 17(3): 247-251.

Idris, N., and Fried, B. 1996. Development, hatching and infectivity of *Echinostoma caproni* (Trematoda) eggs, and histologic and histochemical observations on the miracidia. *Parasitol. Res*. 82(2): 136-142.

Kanev, I. 1994. Life-cycle, delimitation and redescription of *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) (Trematoda: Echinostomatidae). *Syst. Parasitol*. 28(2): 125-144.

Krejci, K.G. and Fried, B. 1994. Light and scanning electron microscopic observations of the eggs, daughter rediae, cercariae, and encysted metacercariae of *Echinostoma trivolvis* and *E. caproni*. *Parasitol. Res*. 80(1): 42-47.

Lee, J.J., Jung, B.K., Lim, H., Lee, M.Y., Choi, S.Y., Shin, E.H., and Chai, J.Y. 2012. Comparative morphology of minute intestinal fluke eggs that can occur in human stools in the Republic of Korea. *Korean J. Parasitol*. 50(3): 207-213.

Munoz-Antoli, C., Sotillo, J., Monteagudo, C., Fried, B., Marcilla, A. and Toledo, R. 2007. Development and pathology of *Echinostoma caproni* experimentally infected mice. *J. Parasitol*. 93(4): 854-859.

Nollen, P.M. 1994. The hatching behavior of *Echinostoma trivolvis* miracidia and their responses to gravity, light and chemicals. *Int. J. Parasitol*. 24(5): 581-587.

Odaibo, A.B., Christensen, N.O. and Ukoli F.M.A. 1988. Establishment, survival and fecundity in *Echinostoma caproni* (Trematoda) infections in NMRI mice. *Proc. Helminthol. Soc. Washington*. 55(2): 265-269.

Odaibo, A.B., Christensen, N.O. and Ukoli F.M.A. 1989. Further studies on the population regulation in *Echinostoma caproni* infections in NMRI mice. *Proc. Helminthol. Soc. Washington*. 56(2): 192-198.

Schmidt, J. 1998. Glycan vesicle formation in vitellocytes and hatching vacuoles in eggs of *Echinostoma caproni* and *Fasciola hepatica* (Digenea). *Tissue Cell*. 30(4): 416-426.

Srisawangwong, T., Chantaluk, S., Sithithaworn, P., and Charoensiri, D.J. 2004. Infectivity, growth and fecundity

of *Echinostoma malayanum* in mice. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 35(1): 302-305.

Toledo, R. 2009. Echinostomes in the definitive host: A model for the study of host-parasite relationships. In: Fried, B., Toledo, R., editors. The Biology of Echinostomes. Springer, New York, p. 89-109.

Toledo, R., Carpena, I., Espert, A., Sotillo, J., Munoz-Antoli, C. and Esteban, J.G. 2006. A Quantitative approach to the experimental transmission success of *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) in rats. *J. Parasitol*. 92(1): 16-20.

Toledo, R., Espert, A., Carpena, I., Munoz-Antoli, C. and Esteban, J.G. 2003. An experimental study of the reproductive success of *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) in the golden hamster. *Parasitol*. 126(5): 433-441.

Toledo, R., Espert, A., Carpena, I., Munoz-Antoli, C., Fried, B. and Esteban J.G. 2004. The comparative development of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) adults in experimentally infected hamsters and rats. *Parasitol. Res*. 93(6): 439-444.

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อ Cyprinid herpesvirus 3 ของสารสกัดพญายอ (*Clinacanthus nutans*) ในเซลล์เพาะเลี้ยง

ฐนิดา เหตระกูล[1] บุญชู ศรีตุลารักษ์[2] และนันทริกา ชันซื่อ[1,#]

[1]หน่วยปฏิบัติการวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสัตว์น้ำเพื่อการอนุรักษ์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330

[2]ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330

บทคัดย่อ: เคเอชวีเป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงและมีอัตราการตายสูงในปลาไนและปลาคาร์พทั่วโลก ก่อให้เกิดความสูญเสียทั้งในปลาสวยงามและปลาบริโภคทั้งในที่เพาะเลี้ยงและในธรรมชาติ พญายอเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีรายงานถึงประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ในมนุษย์ในห้องทดลองและทางคลินิก การวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาผลของพญายอที่ทำการสกัดด้วยเอทานอลและส่วนของสารสกัดที่แยกโดยใช้คุณสมบัติการละลายของตัวทำละลาย 2 ชนิดในการต้านเชื้อไวรัสเคเอชวีโดยทำการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสทั้งก่อนและหลังจากที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงเคเอฟเซลล์ การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเอทานอลพบว่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายไป 50% ของเซลล์ทั้งหมดคือ 1,701.57 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดส่วนไดคลอโรมีเทนคือ 522.47 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดส่วนบิวทานอลคือ 1,797.98 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดหยาบจาก เอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ที่ความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทั้งก่อนที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง และหลังจากเชื้อติดเข้าสู่เซลล์แล้ว ในขณะที่สารสกัดส่วนไดคลอโรมีเทนและบิทานอลความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัสเคเอชวีในเซลล์ทั้งก่อนและหลังการติดเชื้อ จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพญายอมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสเคเอชวีในปลาคาร์พ โดยสามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้และพัฒนาต่อไปเพื่อการรักษาโรคไวรัสเคเอชวีในอนาคตได้

คำสำคัญ: พญายอเคเอชวี ต้านเชื้อไวรัส ความเป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์เพาะเลี้ยง

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2559. 11(2): 115-124.

E-mail address: nantarikachan@gmail.com

Clinacanthus nutans (Burm. f.) Lindau Extract against Cyprinid Herpesvirus 3 in Koi Fin Cell Line

Thanida Haetrakul[1], Boonchoo Sritularak[2] and Nantarika Chansue[1,#]

[1]Ornamental Aquatic animals and Aquatic animals for Conservation research unit, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

[2]Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Abstract: Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) or Koi herpesvirus (KHV) is a virulence viral infection in common carp and koi. The disease has caused global epizootic and economic loss in fish aquaculture and in the wild. *Clinacanthus nutans* (Burm. f.), belonging to the family Acantaceae, is a well-known medicinal plant used in Thai traditional medicine. Virucidal effects of the plant extract against human herpes simplex virus have been reported. In this study, *C. nutans* crude extract, dichloromethane fraction and n-butanol fraction were tested for antiviral activities against CyHV-3 in koi fin cell line. The extracts were tested for cytotoxicity, pre and post infection antiviral activities. The 50% cytotoxic concentration of crude extract was at 1,701.57 µg/ml, dichloromethane fraction at 522.47 µg/ml and n-butanol fraction at 1,797.98 µg/ml. Effective concentrations of the crude extract pre and post-infection were at 250, 500 and 1,000 µg/ml. The dichloromethane fraction and n-butanol fraction did not have antiviral activity. The results showed that crude extract expressed antiviral activity against CyHV-3 which can be applied as therapeutic agents in common carp and koi in the future.

Keywords: *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau, Cyprinid Herpesvirus 3, Antiviral activity, Cytotoxicity, Cell line

[#]Corresponding author

E-mail address: nantarikachan@gmail.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2016. 11(2): 115-124.

Introduction

Cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3) or Koi Herpesvirus (KHV) has been reported in common carp (*Cyprinid Carpio* L.) and koi (*Cyprinid Carpio* koi) from many countries worldwide including Thailand. The first report of this disease was isolated from mass mortality of common carp in Israel in 1998

(Hedrick *et al*., 2000). It is highly virulence and contagious viral disease which causes high mortality. Many criteria for viral prevention were reported. For example, produce fish strains and crossbreeds for more resistance to virus (Ronen *et al*., 2005). Immunization is another option to prevent those fish from infection. Unfortunately, the use of inactivated virus vaccine (Yasumoto *et al*., 2006) or viral proteins has been proven unsuccessful. Two methods of fish immunization were developed and used only in Israel by immunizing fish with pathogenic virus (natural immunization) (Ronen *et al*., 2003) or with live attenuated virus vaccine (Perelberg *et al*., 2005). At present, there is no report of any drug or chemical that can effectively treat the virus in fish. *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau is one of Thai herbal plants with antiviral activities. Extracts from leaves showed antiviral activity against Herpes Simplex Virus (HSV) and Varicella Zoster Virus (VZV) in human both in experiments and clinical trials (Jayavasu *et al*., 1992[a]; Jayavasu *et al*., 1992[b]; Thawaranantha *et al*., 1992; Sangkitporn *et al*., 1995). The herb extract was also reported to be effective against Yellow-head Rhabdovirus in Black tiger shrimp by feeding for 7 days (Direkbusarakorn *et al*., 1998). Moreover, it was reported to have *in vitro* antiviral activity against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) and Oncorhynchus Masou Virus (OMV) which is herpesvirus disease in salmonid fish (Direkbusarakorn *et al*., 1996). This study was focused on the antiviral activity of *Clinacanthus nutans* Burm.f.) Lindau ethanol extracts against CyHV-3 in cell culture (*in vitro*). The results of this study would be useful for alternative treatment and prevention of Cyprinid Herpesvirus 3 disease in koi and common carp.

Materials and Methods

Virus isolation and cell cultures

Koi Fin Cell line (KFC) was obtained from Dr. Peiyu Alison Lee, The Central Taiwan University of Science and Technology. Cell was propagated in Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®) and 25% Leibovitz medium (L-15) (Gibco®) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco®) and antibiotics (Gibco®) at 22°C. Cells were cultured for 3 passages before using in the experiments. Cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3) was isolated from infected koi that was confirmed by nested PCR (IQ2000TM KHV Detection System, Farming IntelliGeneTech. Corp®) at the Veterinary Medical Aquatic Animal Research Center, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. The viral titer was determined by viral assays and was expressed as 50% Tissue Culture Infected Dose ($TCID_{50}$).

Preparation of herb and extraction

Fresh aerial parts of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau was collected from medicinal herb plantation in Chiang Rai province during October to December. The plants (weight 9.8 kg) were washed thoroughly and dried before blended. The sample was extracted with 95% ethanol at room temperature for 72 hours. The extracted solutions were filtered through filter sheet and the filtrates were concentrated on a rotary evaporator to give a dark green thick oil which was crude extract (3,764 g). The crude extract then was partitioned between water and dichloromethane (CH_2Cl_2) and the water layer then was extracted with n-butanol (C_4H_9OH). Removal of the solvent of each fraction gave the CH_2Cl_2 fraction as the dark green thick oil (192.6 g), the n-butanol fraction as brown wax (178.63 g). The crude extract, CH_2Cl_2 fraction and n-butanol fraction were dissolved in DMSO before tested to compare their antiviral activities against CyHV-3 in this study.

Cytotoxicity assay of C. nutans extracts

The cytotoxicity assays were performed in order to find the concentrations of crude extract, CH_2Cl_2 fraction and n-butanol fraction that were non-toxic to KFC which were used in antiviral activity tests. Briefly, KFC was seeded in 24-well plate at concentration 2.4 x 10^5 cells/ml and incubate at 24ºC for 24 hours. The crude extract, CH_2Cl_2 fraction and n-butanol fraction were prepared into 2-fold serial dilution for 5 concentrations before adding to cell 500 µl per well for 6 wells. Control groups were added with 500µl of L-15-2% medium and DMSO at 0.01%, 0.1% and 1% then incubated at 24ºC for 72 hours. The cell viability was counted by dying cell with 1% trypan blue and calculated for % cell viability. The cell viability was then calculated to compare % cell viability between experimental groups and control group using Chi square with IBM SPSS statistic version 22 (New York, USA). The results were considered statistically significant if the *P*-value less than 0.05. The concentrations that reduce the number of viable cells by 50% were evaluated as 50% Cytotoxicity Concentration (CC_{50}) by using doses-response curve between doses and percentages of survival cells and calculated by probit analysis with IBM SPSS statistic version 22 (New York, USA).

Pre-infection antiviral activity test

To compare the efficacy between crude extract, CH_2Cl_2 fraction and n-butanol fraction of *C. nutans* against CyHV-3 before infected to cell line, tests were performed as briefly: cells were seeded in 96-well plate and incubated at 24ºC for 24 hours. The extracts were prepared at the highest

concentrations that were non-toxic to cells. Then make 2-fold serial dilution with L-15-2% for 5 concentrations. The control group was added with L-15 2% without extract. The virus (MOI 0.1) was mixed with each extract at different concentrations. The mixtures were incubated at 24ºC for 1, 2, 3 and 4 hours before infected to cells. All plates were incubated at 24ºC for 14 days and cytopathic effect (CPE) were observed and recorded daily for 14-21 days. The end point dilutions ($TCID_{50}$) were calculated and the tests were done in triplications.

Post-infection antiviral activity test

To compare the efficacy between crude extract, CH_2Cl_2 fraction and n-butanol fraction extract of *C. nutans* against CyHV-3 after infected to cell line. The virus was prepared as 10-fold serial dilution for 5 concentrations with L-15-2% then added 50 µl of the virus per well in 96-well plate. Infected cell was incubated at 24ºC for 1 hour then removed the inoculums. The 2-fold serial dilutions of extracts (five concentrations) were added after removing the inoculums. The extracts were added 100 µl to each well for 8 wells per concentrations then incubated at 24ºC. The control group was added with L-15 2%. CPE was observed and recorded daily for 14-21 days. The end point dilutions ($TCID_{50}$) were calculated and the tests were done in triplications.

Statistical Analysis

The end point dilution of virus in the antiviral activity experiments were calculated by the method of Reed and Muench (1938). The concentration that reduced virus titer for more than 1 log10 when compared to the control group was the effective concentration that inhibits 90% viral replications (Haetrakul, 2009).

Results

*Cytotoxicity assay of C. nutans extracts*Crude extract of *C. nutans* at 2,000, 1,000, 500, 100 and 50 µg/ml, CH_2Cl_2 fraction at 1,000, 500, 100, 50 and 10 µg/ml, n-butanol fraction at 2,000, 1,500, 1,000, 500 and 100 µg/ml were tested for toxicity in cell line. The toxic concentration of extracts to KFC was determined by comparing % cell viability between experimental groups and control group. Crude extract at 1,000 µg/ml, CH_2Cl_2 fraction at 100 µg/ml and n-butanol fraction at 1,000 µg/ml were significantly different from the control group ($P \leq 0.05$), respectively. All concentrations of DMSO were not cytotoxic. The CC_{50} of crude extract was 1,701.57 µg/ml, dichloromethane fraction was 522.47 µg/ml and n-butanol was 1,797.98 µg/ml.

Pre-infection antiviral activity

The direct antiviral activity of *C. nutans* against CyHV-3 after mixing each fraction of herb extracts with the virus at room temperature for 1, 2, 3 and 4 hours are shown in figure 1-4. The viral titers of CyHV-3 in the control group were $1.75x10^4$, $1.39x10^4$, $1.15x10^4$ and $1.35x10^4$ $TCID_{50}$/ml at 1, 2, 3 and 4 hours before infected to the cell, respectively. In all incubation time, the minimal concentration of the crude extract that could reduce CyHV-3 at least 10 times (>1 log10) was 250 µg/ml.

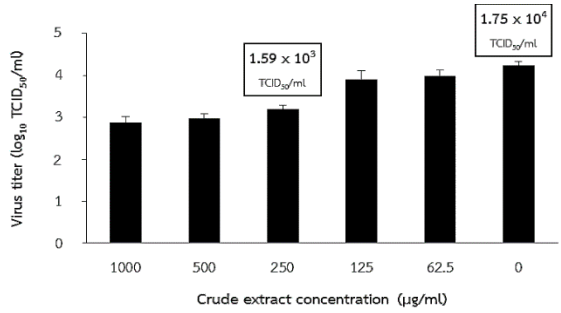


Figure 1 Pre-infection antiviral assay of crude extract and CyHV-3 at 1 hour, effective concentration started from 250 µg/ml

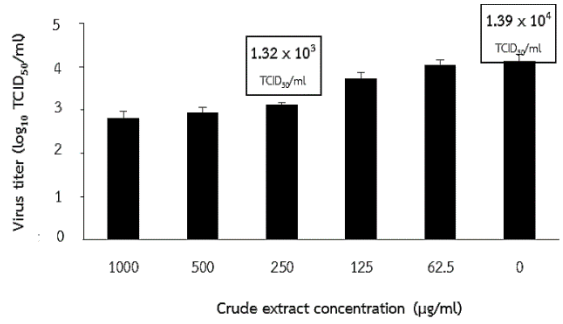


Figure 2 Pre-infection antiviral assay of crude extract and CyHV-3 at 2 hours, effective concentration started from 250 µg/ml

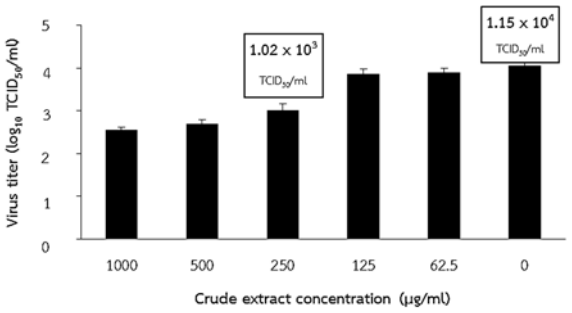


Figure 3 Pre-infection antiviral assay of crude extract and CyHV-3 at 3 hours, effective concentration started from 250 µg/ml

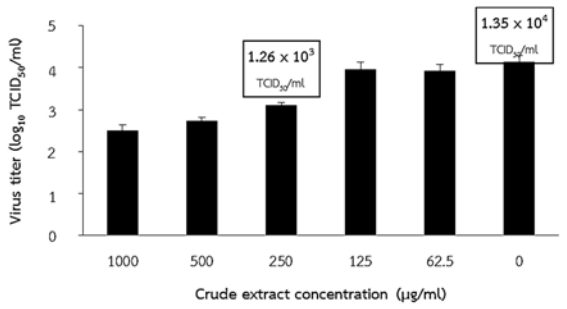


Figure 4 Pre-infection antiviral assay of crude extract and CyHV-3 at 4 hours, effective concentration started from 250 µg/ml

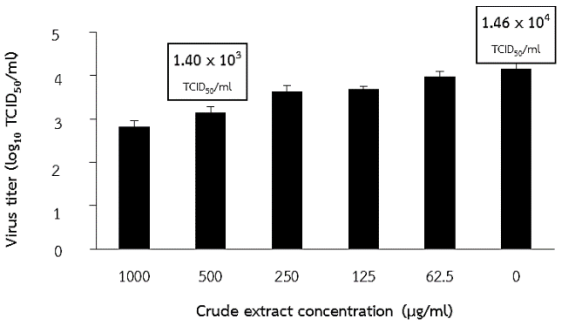


Figure 5 Post-infection antiviral assay of crude extract, effective concentration started from 500 µg/ml

Post-infection antiviral activity

CyHv-3 was used as a control and viral titer was $1.46x10^4$ $TCID_{50}$/ml. The results show that since 500 µg/ml of crude extract concentration, could reduce CyHV-3 >1 log10 (Fig.5). However, CH_2Cl_2 fraction and n-

butanol fractions at non-toxic concentrations could not reduce virus replication post-infection.

Discussion

Ethanol crude extract from *C. nutans* could reduce CyHV-3 pre and post infection in KFC. However, dichloromethane and n-butanol fractions could not reduce CyHV-3 atnon-toxic concentrations. Phytochemical analysis of *C. nutans* was reported to contain alkaloids, flavonoid (Satayavivad *et al*., 1996), chlorophyll (Sakdarat *et al.,* 2009) and cerebrosides (Tuntiwachwuttikul *et al*., 2004). Ethanol extracts of *C. nutans* were reported to have antiviral activities against Herpes simplex virus (HSV) before infection in the human cell line (Jayavasu *et al*., 1992[b]; Tuntiwachwuttikul *et al*., 2004; Vachirayonstien *et al*., 2010). The report of Vachirayonstien *et al*. (2010) also indicated that treating HSV with either less or higher purified extracts before infection gave great reductions of viral infectivity in HEp-2 cells. Chloroform extract of *C. nutans* was isolated to give chlorophyll a and chlorophyll b related compounds which had anti HSV-1 activity before infection (Sakdarat *et al.,* 2009). Dichloromethane fraction was ineffective which was contradicted to previous report on the effectiveness against HSV-1 pre-infection in the cell line (Kunsorn *et al*., 2013). N-butanol soluble fractions were reported to have 6 compounds of C-glycosyl flavones (Tuntiwachwuttikul *et al*., 2004) and 5 sulfur-containing glucosides (Teshima *et al*., 1998). The C-glycosyl flavones are flavonoids which contain anti-inflammatory activity (Satayavivad *et al*., 1996). The recent study showed an antiviral activity of monogalactosyl diglyceride and digalactosyl diglyceride from *C .nutans* extract against HSV-1 and HSV-2 post-infection (Pongmuangmul *et al*., 2016). The same pattern of antiviral activity resulted from synthesis monoglycosyl diglycerides showed high inhibitory activity against HSV in human cell line (Janwitayanuchit *et al*., 2003). The antiviral activities of *C. nutans* crude extract with ethanol gave significant results in reducing viral number after entering into the cells. The possibility of inhibition may occur during viral replication after infection. Some monoglycerides showed antiviral activity against virus by a destruction of viral envelopes (Thormar *et al*., 1994). The previous study of *C. nutans* alcohol extract showed deformity of CyHV-3 virion in KFC after the treatment under Transmission Electron Microscope (TEM) (Haetrakul, 2009). Pre-infection antiviral activities at 1, 2, 3 and 4 hours showed an efficiency of crude extract against CyHV-3 directly before entering into the cell. The concentration that significant reduced viral titer when comparing to control started from 250 µg/ml. Some researchers reported that CyHV-3 can surveil in water at

least 4 hours without hosts (Perelberg *et al*., 2003).So this crude extract can be applied for water treatment in common carp or koi ponds. The direct effect of *C. nutans* extract also reported to inhibit Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) and Oncorhynchus Masou Virus (OMV) in fish which showed 100% plaque reduction rate in cell line before infection (Direkbusarakorn *et al*., 1996).

Conclusion

Crude extract of *C. nutans* could inhibit cyprinid herpesvirus-3 pre and post infection in koi fin cell line. The present study showed direct detrimental effects of the extract to the virus and possibly interrupted viral replication process post infection. The use of crude extract from *C. nutans* against cyprinid herpesvirus 3 would be an alternative treatment to prevent and decrease mortality in infected fish. In vivo study should be performed to evaluate the toxicity of extract in fish and check for antiviral activities. This will be beneficial to common carp and koi aquaculture to prevent the losses of valuable fish and minimizing the economy loss.

Acknowledgement

This study was supported by the 90thanniversary of Chulalongkorn University fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund). The authors would like to thank the Veterinary Medical Aquatic animal Research Center, Faculty of Veterinary Science and the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for the facilities and equipment support.

References

Direkbusarakom, S., Herunsalee, A., Yoshimizu, M. and Ezura, Y. 1996. Antiviral activity of several Thai traditional herb extracts against fish pathogenic viruses. *Fish Pathol*. 31(4): 209-213.

Direkbusarakom, S., Ruangpan, L., Ezura, Y. and Yoshimizu, M. 1998.Protective efficacy of *Clinacanthus nutans* on Yellow-head disease in Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol*. 33(4): 401-404.

Haetrakul, T. 2009. *In vitro* antiviral activity of Acyclovir and *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau extract against Koi Herpesvirus (KHV). M.S. thesis, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. 72pp.

Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S.C., Spangenberg, J.V., Marty, G.D., Nordhausen, R.W. and Kebus, M.J. 2000. A herpesvirus associated with mass

mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health*. 12(1): 44-57.

Janwitayanuchit, W., Suwanborirux, K., Patarapanich, C., Pummangura, S., Lipipun, V. and Vilaivan, T. 2003.Synthesis and anti-herpes simplex viral activity ofmonoglycosyl diglycerides. *Phytochemistry*. 64(7): 1253-1264.

Jayavasu, C., Balachandra, K., Sangkitjaporn, S., Maharungraungrat, A., Thavatsu, P., Bunjob, M., Chavalittumrong, P., Dechatiwongse, T. and Sittisomwong, N. 1992[a]. Clinical trial in the treatment of genital herpes patients with *Clinacanthus nutans* extract. *J. Com. Dis*. 18(3): 152 – 161.

Jayavasu, C., Dechatiwongse, T., Balachandra, K., Chavalittumrong, P. and Jongtrakulsiri, S. 1992[b]. The virucidal activity of *Clinacanthus nutans* Lindau extracts against herpes simplex virus type-2: an *in vitro* study. *Bull. Dept. Med. Sci*. 34(4): 153-158.

Kunsorn, P., Ruangrungsi, N., Lipipun, V., Khanboon, A. and Rungsihirunrat, K. 2013. The identities and anti-herpes simplex virus activity of *Clinacanthus nutans* and *Clinacanthus siamensis*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3(4): 284-290.

Perelberg, A., Ronen, A., Hutoran, M., Smith, Y. and Kotler, M. 2005. Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine. *Vaccine*. 23(26): 3396-3403.

Perelberg, A., Smirnov, M., Hutoran, M., Diamant, A., Bejerano, Y. and Kotler, M. 2003. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinuscarpio* in Israel. *Isr. J. Aquacult*. 55(1): 5-12.

Pongmuangmul, S., Phumiamorn, S., Sanguansermsri, P. and Wongkattiya, N. 2016. Anti-herpes simplex virus activities of monogalactosyl diglyceride and digalactosyl diglyceride from *Clinacanthus nutans*, a traditional Thai herbal medicine. *Asian Pac J Trop Biomed*. 6 (3): 192-197.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A Simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg*. 27(3): 493-497.

Ronen, A., Perelberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Steinitz, M. and Kotler, M. 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine*. 21(32): 4677-4684.

Ronen, A., Perelberg, A., Hutoran, M., Shapira, Y., Steinitz, M., Levavi-Sivan, B., Pikarsky, E. and Kotler, M. 2005. Prevention of a mortal disease of carps induced by the

carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) in Israel. *Bull. Fish. Agen*. 2: 9–11.

Sakdarat, S., Shuyprom, A., Pientong, C., Ekalaksananan, T. and Thongchai, S. 2009. Bioactive constituents from the leaves of *nutans* Lindau. *Bio. Med. Chem.* 17(5): 1857-1860.

Sangkitporn, S., Chaiwat, S., Balachandra, K., Na-Ayudhaya, T.D., Bunjob, M. and Jayavasu, C. 1995. Treatment of herpes zoster with *Clinacanthus nutans* (bi phaya yaw) extract. *J. Med. Assoc. Thai*. 78(11): 624-627.

Satayavivad, J., Bunyapraphatsara, N., Kittisiripornkul, S. and Tanasomwang, W. 1996. Analgesic and anti-inflammatory activities of extract of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau. *Thai J. Phytophar.* 3(1): 7-17.

Teshima, K., Kaneko, T., Ohtani, K., Kansai, R., Lhieochaiphant, S., Picheansoonthon, C. and Yamasaki, K. 1998. Sulfur-containing glucosides from *Clinacanthus nutans*. *Phytochemistry.* 48 (5): 831-835.

Thawaranantha, D., Balachandra, K., Jongtrakulsiri, S., Chavalittumrong, P., Bhumiswasdi, J. and Jayavasu, C. 1992. *In vitro* antiviral activity of *Clinacanthus nutans* on varicella-zoster virus. *Siriraj Hosp. Gaz.* 44(4): 285-291.

Thormar, H., Isaacs C.E., Kim, K.S. and Brown, H.R. 1994. Inactivation of visna virus and other enveloped viruses by free fatty acids and monoglycerides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 724: 465-471.

Tuntiwachwuttikul, P., Pootaeng-On, Y., Phansa, P., Taylor, W.C. 2004. Cerebrosides and a mono acylmonogalactosylglycerol from *Clinacanthus nutans*. *Chem. Pharm. Bull*. 52: 27-32.

Yasumoto, S., Kuzuya, Y., Yasuda, M., Yoshimura, T. and Miyazaki, T. 2006. Oral immunization of common carp with a liposome vaccine fusing koi herpesvirus antigen. *Fish Pathol*. 41(4):141–5.

Vachirayonstien, T., Promkhatkaew, D., Bunjob, M., Chueyprom, A., Chavalittumrong, P., and Sawanpanyalert, P. 2010. Molecular evaluation of extracellular activity of medicinal herb *Clinacanthus nutans* against herpes simplex virus type-2. *Nat. Prod. Res*. 24: 236-245.

บทความวิจัย

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

การตรวจหาปริมาณ Cyanide ในเลือดโคด้วยวิธี Microdiffusion spectrophotometry

สนทนา มิมะพันธุ์[1,#] อนุสรณ์ อยู่เย็น[1] เบญจมา เมธารัตน์อนุกุล[1] และสาวิตรี อินทร์อุดม[1]

[1]กลุ่มพิษวิทยาและชีวเคมี สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง กรุงเทพ 10900

บทคัดย่อ: cyanide เป็นสารเคมีที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ได้แก่ การผลิต สแตนเลส การถลุงเงินหรือทอง การผลิตยาฆ่าแมลง ยาฆ่าหนู นอกจากนี้ยังพบในธรรมชาติจากพืชที่มีสาร cyanogenic glycosides เป็นส่วนประกอบ เช่น มันสำปะหลัง ข้าวฟ่าง ไมยราบไร้หนาม เป็นต้น ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดพิษจากไซยาไนด์ (cyanide poisoning) ในปศุสัตว์ที่กินพืชเหล่านี้เข้าไป การศึกษานี้เป็นการพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ cyanide ในเลือดโค เริ่มจากการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด cyanide ออกจากเลือดโคด้วยเทคนิค microdiffusion แล้วนำเวลาที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้ในขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธี ตรวจหาปริมาณ cyanide ในสารละลายที่สกัดได้ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 587 นาโนเมตร ผลการศึกษาพบว่า ขั้นตอนการสกัด cyanide ใน microdiffusion cell ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมงให้ผลดีที่สุด จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นพบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.2 – 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเปียร์สัน (*r*) เท่ากับ 0.997 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) เท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (LOQ) เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน (%Recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 102-109 และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) เท่ากับ 2.56 ผลการทดสอบความแม่น (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีจากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดโคที่เติม cyanide ที่ทราบค่าแน่นอนใน 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0.5, 1.0 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นมีค่าเฉลี่ย %Recovery เท่ากับ ร้อยละ 105.16, 97.24 และ 92.43 ตามลำดับ โดย %Recovery ของทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วงร้อยละ 90 - 108 (เกณฑ์ที่ยอมรับได้อยู่ในช่วงร้อยละ 80 - 120) ส่วนความเที่ยงที่ประเมินด้วย %RSD พบอยู่ในช่วงร้อยละ 1.73 – 2.56 (เกณฑ์ที่ยอมรับได้น้อยกว่าร้อยละ 10) และค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.16 – 0.26 (เกณฑ์ที่ยอมรับได้น้อยกว่า 2) ซึ่งทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เมื่อนำวิธีไปวิเคราะห์กับตัวอย่างเลือดโคนมที่กินกากมันสำปะหลังเป็นอาหารจำนวน 48 ตัวอย่าง ผลตรวจวิเคราะห์ cyanide พบว่ามีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.24-0.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงของความเข้มข้น cyanide ที่พบได้ในเลือดของสัตว์ปกติ สรุปได้ว่า วิธี microdiffusion spectrophotometry ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดโค ได้อย่างแม่นยำ เที่ยงตรง และเชื่อถือได้ โดยเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเลือดสัตว์ชนิดอื่นได้

คำสำคัญ: Cyanide เลือด โค Microdiffusion spectrophotometry

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

E-mail address: sontanam@dld.go.th

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2559. 11(2): 125-139.

Determination of Cyanide in Cattle Whole Blood by Microdiffusion Spectrophotometric Method

Sontana Mimapan[1,#], Anusorn Yooyen[1], Benjama Metharatanukul[1], and Sawittree Inudom[1]

[1]Toxicology and Biochemistry Section, National Institute of Animal Health, Bangkok, Thailand 10900

Abstract: Cyanide is a chemical substance found in plants, pesticides, rodenticides and salts used in the industrial process such as stainless, refining precious metals (gold and silver). Cyanogenic glycoside, one of the chemical forms of cyanides, is naturally presented in many plants including cassava, sorghum and mimosa. Consuming toxic forage is the main cause of acute cyanide poisoning in livestock. In this study, we developed microdiffusion spectrophotometric method to validate the quantitative determination of cyanide in cattle whole blood. Microdiffusion extraction method was performed and the time required to achieve full recovery in the extraction was studied. The optimal time then was used to validate the quantitative determination of cyanide using UV-Vis spectrophotometer at 587 nm wavelength. It was found that the time required to achieve full recovery in the microdiffusion extraction was considerably 2 hours. The established method gave a linearity in a concentration ranging from 0.2 to 4.0 µg/ml. (r=0.997). The limit of detection (LOD) was 0.2 µg/ml while the limit of quantitation (LOQ) was 0.5 µg/ml (102 – 109%Recovery, 2.56 %RSD). The accuracy was evaluated using fortified sample blanks (0.5, 1.0 and 3.0 µg/ml) was 105.16, 97.24 and 92.43 µg/ml, respectively which ranged from 90-108% (standard at 80-120%) and the precision was evaluated by %RSD ranging from 1.73-2.56 (standard at <10) and HorRat ranging from 0.16-0.26 (standard at <2) which all are acceptable. The method was then used for the determination of cyanide in 48 whole blood samples of cassava pulp-fed dairy cattle. The results revealed that the concentrations of cyanide ranged from 0.24 to 0.54 µg/ml, which were in the same range of normal expectation in blood of most animal species. In conclusion, the microdiffusion spectrophotometric method developed in this study provided accuracy and precision as well as proved to be easy and reliable and it should be suitable for use in blood of other species.

Keywords: Cyanide, Whole blood, Cattle, Microdiffusion spectrophotometry

[#]Corresponding author

E-mail address: sontanam@dld.go.th

J. Mahanakorn Vet. Med. 2016. 11(2): 115-139.

บทนำ

ปัจจุบันโรคที่เกิดจากสารพิษถือเป็นปัญหาที่สำคัญและนับวันจะทวีความรุนแรงมากขึ้น ไซยาไนด์ (cyanide) เป็นสารพิษชนิดหนึ่งที่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์ มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยคาร์บอน 1 อะตอม และไฮโดรเจน 1 อะตอม อาจพบได้ทั้ง 3 สถานะ เช่น ในรูปของแข็งคือเกลือ cyanide สารละลาย และในรูปของแก๊สไฮโดรไซยานิก (HCN) เป็นต้น cyanide เป็นสารเคมีที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ได้แก่ การผลิตสแตนเลส การถลุงเงินหรือทอง การชุบโลหะ อุตสาหกรรมปิโตรเคมี การผลิตยาฆ่าแมลง ยาฆ่าหนู และนำมาใช้ในการเตรียมบ่อ เตรียมน้ำเพื่อเพาะเลี้ยงกุ้งและสัตว์น้ำอื่นๆ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมี cyanide ที่เกิดจากควันบุหรี่ และการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงอาจพบสารนี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ (Way, 1984) ทั้งนี้สาเหตุการได้รับสารพิษเหล่านี้เข้าไปอาจเกิดจากการใช้ที่ขาดความระมัดระวัง ใช้เกินปริมาณที่กำหนดหรือได้รับเข้าไปโดยไม่ได้ตั้งใจ รวมถึงการใช้สารเคมีในทางที่ผิด โดยอาศัยคุณสมบัติความเป็นพิษของสาร cyanide นำไปใช้ผิดวัตถุประสงค์ เช่น การฆ่าตัวตายหรือก่ออาชญากรรม วางยาเบื่อสัตว์ เป็นต้น cyanide จากธรรมชาติที่พบในพืชที่เป็นอาหารของคนและสัตว์ซึ่งจะมีสารประกอบ cyanogenic glycosides เป็นองค์ประกอบ เช่น มันสำปะหลัง ข้าวฟ่าง หน่อไม้ ไมยราบไร้หนาม เป็นต้น ซึ่งหากสัตว์เคี้ยวเอื้องกินพืชเหล่านี้เข้าไปจะเป็นสาเหตุหลักของการเกิดพิษจาก cyanide (Arnold *et al*., 2014) โดยเมื่อคนหรือสัตว์กินและถูกย่อยโดยเอนไซม์จะปลดปล่อย cyanide ที่เป็นพิษออกมา (The Merck Veterinary Manual, 2014) ทั้งนี้ปริมาณต่ำสุดของ cyanide ที่ทำให้สัตว์โดยทั่วไปเสียชีวิตได้ (minimal lethal dose) เท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปริมาณของ cyanide ในพืชอาหารสัตว์ที่สูงเกิน 200 หนึ่งส่วนในล้านส่วน (ppm) จะทำให้สัตว์แสดงอาการพิษได้ (Radostits *et al*., 2000)

อาการเกิดพิษของ cyanide มีทั้งแบบเฉียบพลัน (acute cyanide poisoning) และแบบเรื้อรัง (chronic cyanide poisoning) โดยกลไกของการเกิดพิษแบบเฉียบพลันนั้นเมื่อสัตว์ได้รับ cyanide ในขนาดสูง สารพิษนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytochrome C oxidase บน membrane ของ mitochondria ทำให้เซลล์ไม่สามารถนำออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการเผาผลาญพลังงานได้และทำให้เกิดภาวะ cellular hypoxia โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้ามเนื้อหัวใจและสมองทำให้สัตว์แสดงอาการกระวนกระวาย หายใจขัด ตัวสั่น ล้มลงนอน ชัก และเสียชีวิตในที่สุด เมื่อเจาะเลือดดูหลังจากที่สัตว์เสียชีวิตใหม่ๆ จะเห็นเลือดเป็นสีแดงสด (cherry red) เนื่องจากเลือดมีออกซิเจนคั่งสูง อาการเกิดพิษจะเกิดภายใน 15-20 นาที จนถึง 2-3 ชั่วโมง หลังจากสัตว์เริ่มได้รับสารพิษทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่สัตว์ได้รับเข้าไป (มาลินี, 2527; Ballantyne, 1987) สำหรับรายงานการเกิดพิษของ cyanide ในคนนั้นมีรายงานในกรณีที่คนงานที่ลงไปในบ่อหมักหน่อไม้ดองประสบเหตุหมดสติพร้อมกัน 8 รายและเสียชีวิต 2 คนจากการสูดดม cyanide ที่ถูกปลดปล่อยจากหน่อไม้ (ปานทิพย์, 2551) ส่วนการเกิดพิษของ cyanide แบบเรื้อรังจะพบในกรณีที่สัตว์ได้รับ cyanide หรือกินพืชที่มี cyanide ในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำแต่ได้รับเป็นระยะเวลานานโดยจะส่งผลกระทบต่อระบบประสาทส่วนกลางและการทำงานของต่อมไธรอยด์ทำให้เกิดภาวะ

hypothyroidism นอกจากนี้ยังสามารถพบภาวะกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (cystitis) ภาวะปัสสาวะเล็ด (urine incontinent) และภาวะเดินไม่สัมพันธ์กัน (ataxia) เป็นต้น ซึ่งเรียก ภาวะ เหล่านี้ว่าcystitis ataxia syndrome โดยที่สามารถพบได้ทั้งในม้า วัว แพะ แกะ เป็นต้น (The Merck Veterinary Manual, 2014) สำหรับรายงานความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของ cyanide ในสัตว์นั้น ในปี 2517 สมใจและเชิดชัย ได้รายงานความเป็นพิษในไก่กระทงที่ให้กินอาหารผสมมันสำปะหลัง โดยไก่จะมีอาการซึมและตายอย่างรวดเร็ว พบจุดเลือดออกที่อวัยวะภายใน มาลินีและคณะ (2525) รายงานความเป็นพิษในโคพันธุ์อเมริกันบราห์มันจำนวน 5 ตัวที่กินไมยราบไร้หนาม (*Mimosa invisa*) แล้วโคแสดงอาการป่วยอย่างรุนแรง มีอาการน้ำลายฟูมปาก กล้ามเนื้อสั่น หายใจลำบากและเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว และ McKenzie and McMicking (1977) รายงานพิษที่เกิดขึ้นในโคที่กินข้าวฟ่างอ่อนในทุ่งหญ้า แสดงอาการกล้ามเนื้อสั่นและปัสสาวะเล็ด ล้มลงนอน และเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิดพิษของ cyanide แบบเรื้อรังในแกะ โดยสัตว์แสดงอาการกล้ามเนื้อสั่น หัวสั่น คอบิดและเสียชีวิต ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบการอักเสบของสมองและไขสันหลัง การเสื่อมของเส้นประสาท axon (Bradley *et al*., 1995; Bourke *et al*., 2008) และยังมีการศึกษาพิษของ cyanide แบบเรื้อรังในแพะ พบว่าทำให้เจริญเติบโตช้า มีรอยโรคที่ต่อมไธรอยด์และตับอ่อน (Soto-Blanco *et al*., 2001) ส่วนในสุกรจะทำให้เกิดการเสื่อมของตับ ไตและอวัยวะในระบบประสาท (Manzano *et al*., 2007) และจากการศึกษาในแม่สุกรที่ตั้งท้องพบว่า cyanide ทำให้แม่สุกรแท้งและลูกสุกรตายแรกคลอด (Andre *et al*., 2015)

การตรวจวิเคราะห์ cyanide โดยทั่วไปสามารถตรวจได้จากตัวอย่างอาหารในกระเพาะของสัตว์ที่ตายโดยใช้วิธี paper strip test หรือ colorimetric test โดยเป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพและใช้เพื่อการคัดกรองเป็นส่วนใหญ่ (Ballantyne and Marrs, 1987) อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ cyanide จากตัวอย่างเลือดถือว่ามีความสำคัญในการวินิจฉัยพิษจาก cyanide เพราะเป็นวิธีทดสอบเชิงปริมาณและสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธี Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) (Murphy *et al*., 2006; Boadas-Vaello *et al*., 2008) วิธี Fluorometry (Morgan and Way, 1980) และวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Chinaka et al., 1998) เป็นต้น แต่วิธีเหล่านี้มีขั้นตอนที่ซับซ้อน ต้องอาศัยอุปกรณ์ที่มีราคาแพง การบำรุงรักษามีต้นทุนสูง และผู้ปฏิบัติต้องมีความรู้ความชำนาญสูงทำให้ต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างมีราคาแพง

Microdiffusion เป็นวิธีการทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยการระเหยของสารจากตัวอย่างและถูกดักเก็บโดยสารเคมีที่เหมาะสมและแยกเก็บในช่องอีกส่วนซึ่งทำในระบบปิด การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณสาร cyanide ในตัวอย่างเลือดโคโดยอาศัยเทคนิค microdiffusion spectrophotometry ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการพิษวิทยาพื้นฐานทั่วไปที่มีเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ซึ่งสามารถทำได้ง่ายและ

ประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการตรวจหาปริมาณสาร cyanide ด้วยเทคนิควิธีอื่นๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี

Potassium cyanide (AR grade, Asia Pacific Specialty Chemicals Ltd, Australia), Barbituric acid 99% (ReagentPlus®, Sigma-Aldrich Co. LLC., Germany), Sodium hydroxide (AR grade, Merck, Germany), Sodium dihydrogen phosphate (AR grade, Merck, Germany), Chloramine-T trihydrate 97% (ACROS Organics, U.S.A.),Sulfuric acid(AR grade, QRëC,New Zealand),Pyridine (AR grade, VWR International, LLC., EU)

วัสดุและเครื่องมือ

Microdiffusion cell ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรอบนอก-(Outer Diameter: O.D.) 83 มิลลิเมตร ขนาดของช่องบรรจุสารด้านใน (center compartment) เส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ลึก 4 มิลลิเมตร และ ขนาดของช่องบรรจุสารด้านนอก (outer compartment) เส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ลึก 10 มิลลิเมตร (Bel-Art products, U.S.A.), UV-Vis Spectrophotometer model DU-64 (BECKMAN, U.S.A.) พร้อมด้วยระบบ Sipper, analytical balance model BP 221S (Sartorius, Germany)

วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย cyanide มาตรฐานเพื่อเป็น stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง potassium cyanide 0.0500 กรัม ละลายด้วยสารละลาย sodium hydroxide 0.1 M ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ หลังจากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน (working standard cyanide solution) โดยทำการเจือจางสารละลายมาตรฐาน cyanide เข้มข้น ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 1.0, 2.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีเตรียมน้ำยาเคมี

เตรียม pyridine-barbituric acid reagent โดยชั่ง barbituric acid 6 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรเติมกรด hydrochloric เข้มข้น 6 มิลลิลิตร เจือจางด้วย pyridine 30 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้)

เตรียม สารละลาย 0.25% chloramine-T โดยชั่ง chloramine-T 0.25 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติม ค่อยๆเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ

วิธีเตรียมตัวอย่างควบคุม

เตรียมโดยการทำ ตัวอย่างเลือดโคที่เติม cyanide ที่ทราบค่าความเข้มข้นแน่นอนหรือ fortified sample blank โดยเติมสาร cyanide มาตรฐาน ลงใน sample blank หรือ pooled cattle whole blood ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1 และ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1) **การสกัด cyanide ออกจากสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างเลือดโคด้วยเทคนิค microdiffusion และตรวจวัดด้วยวิธี**

spectrophotometry วิธีวิเคราะห์ดัดแปลงมาจากวิธีของ Flanagan *et al*. (1995)

1.1 การสกัดสาร cyanide จากสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างด้วยเทคนิค microdiffusion

ปิเปตสารละลาย 0.1 M sodium hydroxide 2 มิลลิลิตร ลงใน center compartment ของ microdiffusion cell (ดังรูปที่ 1) แต่ละอันที่ label ชื่อน้ำกลั่น(blank) สารละลายมาตรฐาน ตัวอย่างควบคุม หรือตัวอย่างเลือดไว้ จากนั้นปิเปต blank สารละลายมาตรฐาน ตัวอย่างควบคุม หรือตัวอย่างเลือดที่จะตรวจวิเคราะห์อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในส่วนของ outer compartment ก่อน ตามด้วยสารละลาย 1 M sulfuric acid 1 มิลลิลิตรจากนั้นปิดฝา microdiffusion cell ที่ทาด้วยซิลิโคนกรีซและ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดควันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.2 การตรวจวัดปริมาณสาร cyanide ด้วยวิธี spectrophotometry

ปิเปตสารละลาย 0.1 M sodium hydroxide 0.5 มิลลิลิตรจาก center compartment ในแต่ละความเข้มข้นที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แบบมีฝาปิด แต่ละหลอดเติมสารละลาย sodium dihydrogen phosphate 1 มิลลิลิตรและสารละลาย 0.25% chloramine-T 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นเติมน้ำยา pyridine-barbituric acid 1.5 มิลลิลิตรลงในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนของแสง (absorbance) ที่ 587 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer โดยใช้ peristaltic sipper สร้างกราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) โดยนำค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารละลายมาตรฐานที่เครื่องวัดได้มาสร้างเป็นแกน y และปริมาณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละระดับมาสร้างเป็นแกน x คำนวณหาความเข้มข้นของ cyanide ในเลือดโคจากสมการ linear regression; y = ax + b

2) การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด cyanide ด้วยเทคนิค microdiffusion

ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน cyanide ในน้ำกลั่นความเข้มข้น 0.2, 1.0, 2.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ชุดพร้อม blank มาวิเคราะห์ตามขั้นตอนในข้อ 1.1 ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยตั้ง microdiffusion cell ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดควันที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเมื่อครบเวลาในแต่ละชั่วโมง นำสารละลาย sodium hydroxide จาก inner chamber ที่ได้ไปวิเคราะห์ตามขั้นตอนในข้อ 1.2 หาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) ของค่า absorbance ที่วัดได้จากเครื่อง spectro photometer พิจารณาเปรียบเทียบหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด แล้วนำช่วงเวลาดังกล่าวไปใช้ในการศึกษาในขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีการต่อไป

3) การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) การทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ทำตาม ทิพวรรณ (2549); ตติย (2547)

3.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range)

หาช่วงการวิเคราะห์ (range) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน cyanide ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ คือ 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 และ 6.0

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 1.1 และ 1.2 ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐาน (แกน x) กับค่า absorbance (แกน y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

หาความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยดูจากกราฟของ range เลือกช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงมาอย่างน้อย 6 ระดับ วิเคราะห์ตามวิธีความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานที่ตรวจพบกับค่า absorbance คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเปียร์สัน (Pearson's correlation coefficient: *r*) เกณฑ์การยอมรับ *r* มากว่าหรือเท่ากับ 0.995

3.2 การหาขีดจำกัดในการตรวจพบหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (Limit of detection: LOD)

นำ sample blank (pooled cattle whole blood) มาวิเคราะห์ตามขั้นตอนใน 1.1 และ 1.2 จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าความเข้มข้นและความเข้มข้นเฉลี่ย ($\overline{X}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ sample blank แล้วคำนวณหาค่า LOD จากสูตร LOD = $\overline{X}$ + 3SD

3.3 การหาขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (Limit of quantitation: LOQ)

หาค่า LOQ เบื้องต้นจากค่า LOD โดยคำนวณจากสมการ LOQ = $\overline{X}$ + 10SD (ของค่า LOD) จากนั้นยืนยันค่า LOQ โดยการเตรียม fortified sample blank (เติมสาร cyanide มาตรฐานลงใน sample blank) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ (ที่ประมาณการ) หรือใกล้เคียง วิเคราะห์ตามขั้นตอนในข้อ 1.1 และ1.2 จำนวน 10 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาปริมาณเทียบกับสารมาตรฐานแล้วคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) จากสมการ

$$\%Recovery = \frac{C1-C2}{C3} \times 100$$

โดย C1 คือ ความเข้มข้นเฉลี่ยของ fortified sample
C2 คือ ความเข้มข้นของ sample blank
C3 คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanide ที่เติม
และหาร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) จากสมการ

$$\%RSD = \frac{SD}{\overline{X}} \times 100$$

3.4 การทดสอบหาความแม่นและความเที่ยง (accuracy and precision)

เตรียม fortified sample blank โดยการเติมสาร cyanide มาตรฐานลงใน sample blank ให้ได้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ระดับ LOQ, 1 และ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นวิเคราะห์ตาม ขั้นตอนในข้อ 1.1 และ 1.2 จำนวน 10 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาค่า % Recovery, % RSD และหาค่า HorRat (Horwitz ratio) จากสมการ

$$\text{HorRat ratio} = \frac{\%\text{Experimental RSD}}{\text{Predicted HorwitzRSD}}$$

ประเมินความแม่นของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy) โดยพิจารณาจากค่า % Recovery ให้อยู่ในช่วงร้อยละ 80–120 ส่วนความเที่ยง (precision) นั้นประเมินจากค่า HorRat (Horwitz ratio) โดยเกณฑ์การยอมรับ คือ น้อยกว่า 2 (Horwitz and Albert, 2006)

4) การประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาปริมาณสาร cyanide กับตัวอย่างเลือดโค

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ cyanide ในตัวอย่างเลือดโค จำนวน 48 ตัวอย่างที่กินกากมันสำปะหลังเป็นส่วนผสมหลักของการให้อาหารข้นตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 1.1 และ 1.2 พร้อมกับตัวอย่างควบคุม (fortified sample blank) 3 ระดับ เพื่อหา %Recovery เทียบกับสารละลาย cyanide มาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2, 1.0, 2.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และระหว่างการวิเคราะห์ตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ซ้ำ (Duplicate analysis) 1 ตัวอย่างในทุกๆ 10 ตัวอย่างที่ตรวจหรืออย่างน้อย 10% ของตัวอย่างที่ทำการตรวจ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ควบคู่ไปด้วย จากนั้นคำนวณหา %ความแตกต่างสัมพัทธ์ (%Ralative percent difference; %RPD) โดยมีเกณฑ์การยอมรับของการวัดซ้ำน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10% จากสมการ

$$\%RPD = \frac{(A1 - A2)}{(A1+A2)/2} \times 100$$

A1 คือ ผลการทดสอบครั้งที่ 1
A2 คือ ผลการทดสอบครั้งที่ 2

ผลการศึกษา

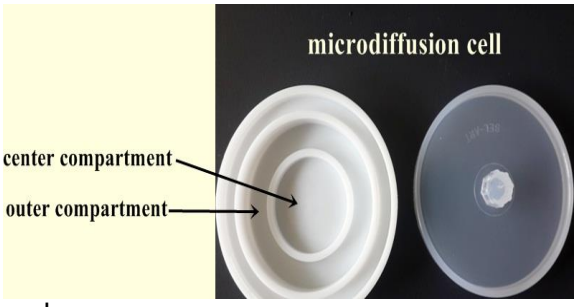
จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด cyanide ด้วยเทคนิค microdiffusion ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า ที่ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 2 โดยให้ค่า absorbance แปลผกผันตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นของปริมาณ cyanide ที่ใช้ในการทดสอบ นอกจากนั้นแล้วค่า % RSD ในชั่วโมงที่ 2 ยังมีความใกล้เคียงกันโดยแตกต่างกันน้อยกว่า 2% (เกณฑ์การยอมรับที่น้อยกว่า 10%) ส่วนชั่วโมงที่ 3 ให้ผลเช่นเดียวกันแต่ใช้เวลามากกว่า ทางผู้วิจัยจึงเลือกใช้ระยะเวลาในชั่วโมงที่ 2 สำหรับนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีการต่อไป

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range) พบว่าช่วงการวิเคราะห์มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.2 - 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเปียร์สัน (r) เท่ากับ 0.997 ดังแสดงในกราฟที่ 1

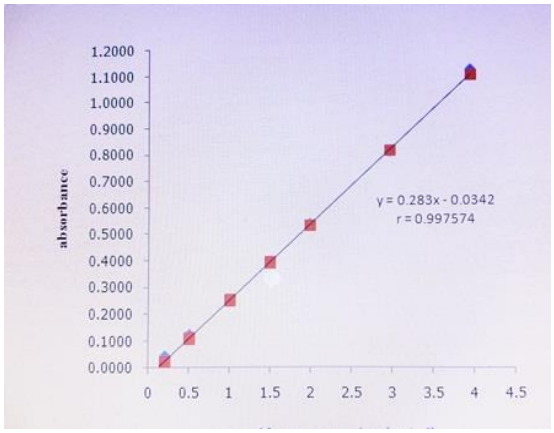
ผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (Limit of detection: LOD) มีค่าเท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างแม่นยำ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยมีค่า %Recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 102-109 และ %RSD เท่ากับ 2.56

ผลการทดสอบความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีการวิเคราะห์จากตัวอย่าง fortified sample blank ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0.5,1.0 และ3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นมีค่าเฉลี่ย % Recovery เท่ากับ 105.16, 97.24 และ 92.43 ตามลำดับ โดย %Recovery ของทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นอยู่ ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ ช่วงร้อยละ 80 - 120 ส่วนการประเมินความเที่ยง พบว่าค่า% RSD อยู่ในช่วง 1.73 – 2.56 ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 10 และค่า HorRat ratio พบอยู่ในช่วง 0.16 – 0.26 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือน้อยกว่า 2 ดังนั้นการทดสอบความแม่นของวิธีการและการทดสอบความเที่ยงจึงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

จากการตรวจหาปริมาณสาร cyanide จากตัวอย่างเลือดโคที่ที่กินอาหารซึ่งใช้กากมันสำปะหลังเป็นส่วนผสมหลักด้วยวิธีดังกล่าว จำนวน 48 ตัวอย่าง พบปริมาณสาร cyanide ในเลือดโคในช่วงความเข้มข้น 0.24 - 0.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เฉลี่ย 0.38 ± 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างควบคุมที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %Recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 95 - 117 และ %RPD จากการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ มีค่าไม่เกินร้อยละ 10



รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างและส่วนประกอบของ micro diffusion cell



กราฟที่ 1 แสดงผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์จากสารละลาย cyanide มาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 0.2- 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแกน x คือ ความเข้มข้นของสารละลาย cyanide มาตรฐาน แกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เปียร์สัน (*r*) เท่ากับ 0.997

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (abs), ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และ %RSD ของสารละลาย cyanide มาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยการสกัดด้วยเทคนิค microdiffusion ในชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3

Std. cyanide (µg/ml)	ระยะเวลา 1 ชั่วโมง			ระยะเวลา 2 ชั่วโมง			ระยะเวลา 3 ชั่วโมง		
	abs (mean)	SD	%RSD	abs (mean)	SD	%RSD	abs (mean)	SD	%RSD
blank	0.0134	0.0005	3.98	0.0143	0.0005	3.41	0.0154	0.0005	3.46
0.2	0.0340	0.0037	11.00	0.0484	0.0008	1.62	0.0487	0.0005	1.00
1.0	0.1931	0.0476	24.63	0.2474	0.0008	0.31	0.2456	0.0005	0.22
2.0	0.3669	0.1112	30.31	0.5353	0.0023	0.42	0.5563	0.0090	1.62
4.0	0.6370	0.2469	38.77	1.0889	0.0085	0.77	1.1125	0.0084	0.74

ตารางที่ 2 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างแม่นยำ (LOQ) ของวิธีการตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดโคด้วยวิธี microdiffusion spectophotometry

ชนิดสาร	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Cyanide	0.2	0.5

ตารางที่ 3 แสดงค่า %Recovery ของการทดสอบความแม่น ค่า%RSD และค่า HorRat ratio ของการทดสอบความเที่ยง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

ความเข้มข้น (µg/ml)	%Recovery ± SD	%RSD	HorRat ratio
0.5	105.16±2.70	2.56	0.22
1.0	97.24±1.68	1.73	0.16
3.0	92.43±2.17	2.35	0.26

วิจารณ์

จากการศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์การตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดโคด้วยวิธี microdiffusion spectrophotometry ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Flanagan *et al*. (1995) ซึ่งเป็นวิธีตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดคน พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด cyanide จากเลือดโคด้วยเทคนิค microdiffusion อยู่ที่ชั่วโมงที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าวิธีของ Flanagan *et al*. (1995) 1 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษานี้มีการปรับใช้ปริมาตรของสารละลาย cyanide มาตรฐาน ตัวอย่างเลือดและน้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดสอบต่างกันจึงส่งผลให้การตรวจวัดได้ระยะเวลาที่เหมาะสมแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Lundquest *et al*., 1995 ที่พบว่าปริมาตรของสารละลายมีผลต่อค่า absorbance อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด cyanide ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ใช้เวลามากกว่าการศึกษาของ Tsuge *et al*. (2001) ที่ใช้เวลาในขั้นตอนการสกัด cyanide ที่ปนเปื้อนในเครื่องดื่มเพียง 1 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการศึกษาครั้งนี้ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง แต่การศึกษา ของ Tsuge *et al*. (2001) ทำการสกัด Cyanide ที่อุณหภูมิ 40ºC ซึ่งอุณหภูมิที่สูงขึ้นกว่าอุณหภูมิห้องนี้ มีผลช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง cyanide ในตัวอย่างกับกรดได้ดีขึ้นทำให้ใช้เวลาน้อยลง (Holzbecher and Ellenberger, 1985) ทั้งนี้แก๊สที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาคือ แก๊สไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) จะถูกจับไว้ด้วยสารละลาย 0.1 M sodium hydroxide ใน center compartment ของ microdiffusion cell ก่อนนำสารละลายดังกล่าวมาตรวจหาปริมาณ cyanide ด้วยเครื่อง spectrophotometer

เมื่อเปรียบเทียบค่า LOD, LOQ, %Recovery และ %RSD ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาของ Shafi *et al*. (2015) ที่ใช้วิธี Headspace GC/FID ตรวจวิเคราะห์ cyanide มีค่า LOD เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, LOQ เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, %Recovery เท่ากับร้อยละ 95 - 102,

%RSD เท่ากับร้อยละ 1.3 - 3.9 พบว่าการศึกษาครั้งนี้มีค่า LOD และ LOQ ต่ำกว่า และค่าของ %Recovery มีช่วงกว้างกว่า แต่ %RSD มีค่าน้อยเช่นเดียวกัน บ่งชี้ว่าวิธี microdiffusion spectrophotometry สามารถตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดได้ในระดับที่ต่ำกว่าวิธี Headspace GC/FID แต่ทั้งสองวิธีมีความแม่นและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยวิธี microdiffusion spectrophotometry มีข้อเสียคือใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่า เนื่องจากต้องใช้เวลาในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างนานถึง 2 ชั่วโมง แต่วิธี Headspace GC/FID ไม่ต้องสกัดตัวอย่างก่อนนำไปตรวจวัด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Mateus *et al*. (2005) ที่ใช้วิธี HPLC ตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดหนูซึ่งมีค่า LOQ เท่ากับ 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (LOD ไม่พบรายงานข้อมูล) %Recovery เท่ากับร้อยละ 103 - 112, %RSD เท่ากับร้อยละ 5.4 - 7.9 พบว่าวิธี HPLC มีค่า LOQ ต่ำกว่าวิธี microdiffusion spectrophotometry ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงว่าวิธี HPLC สามารถตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดได้ในระดับที่ต่ำกว่าวิธี microdiffusion spectrophotometry แต่ทั้งสองวิธีมีความแม่นและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามเครื่อง HPLC มีราคาสูงกว่า ระบบการทำงานมีความยุ่งยากซับซ้อนมากกว่าเครื่อง spectrophotometer ทั้งนี้การจะนำวิธีใดไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างขึ้นอยู่กับนักวิเคราะห์ที่จะเลือกพัฒนาวิธีให้เหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการนั้น ตลอดจนพิจารณาระดับหรือค่าความเป็นพิษของ cyanide ที่ทำให้สัตว์ชนิดนั้นเสียชีวิตเพราะเครื่องมือแต่ละประเภทมีขีดความสามารถในการตรวจวัดสารได้ไม่เท่ากัน

เมื่อนำวิธีที่พัฒนาได้มาวิเคราะห์กับตัวอย่างเลือดโคนมที่กินกากมันสำปะหลังเป็นอาหาร จำนวน 48 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณ cyanide อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.24 - 0.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เฉลี่ย 0.38 ± 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งค่าที่ตรวจพบดังกล่าวไม่เกินค่าปกติ โดยความเข้มข้นของ cyanide ที่ไม่ทำให้เกิดพิษในสัตว์คือน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (The Merck Veterinary Manual, 2014) ทั้งนี้เนื่องจากสาร cyanogenic glycosides ในมันสำปะหลังเมื่อถูกบด กรอง อัด จากกระบวนการสกัดเอาแป้งมันออกจนกลายเป็นกากมันจะทำให้สารนี้ละลายออกไปส่งผลให้ HCN ที่เป็นพิษลดลง (ศิริรัตน์, 2555)

อย่างไรก็ตามจากการตรวจหาปริมาณสาร cyanideในตัวอย่างเลือดโค 48 ตัวอย่างนี้ พบว่ามีเพียง 7 ตัวอย่างมีค่า cyanide สูงกว่าระดับ LOQ ซึ่งเป็นค่าที่สามารถรายงานปริมาณที่มีความแม่นและเที่ยงตรงในระดับที่ยอมรับได้ (ทิพวรรณ, 2549) ส่วนอีก 41 ตัวอย่างที่เหลือ พบปริมาณสาร cyanide ต่ำกว่าค่า LOQ ดังนั้นในการรายงานผลการตรวจวัดระดับปริมาณสาร cyanide จากตัวอย่างควรมีการระบุค่า LOD และค่า LOQ ของวิธีที่ใช้ตรวจไว้ในใบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างร่วมด้วย รวมถึงระดับหรือค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดพิษในสัตว์ ทั้งนี้เพื่อให้ผู้รับบริการได้ทราบและใช้ประกอบการวินิจฉัย

เมื่อพิจารณาถึงผลกระทบจากพิษของ cyanide ต่อสุขภาพสัตว์พบว่าพืชอาหารสัตว์หลายชนิดมีสาร cyanogenic glycosides และ nitrate สะสมอยู่ในต้น มาลินี (2525) รายงานความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในโคพันธุ์อเมริกันบราห์มัน 5 ตัวใน

จังหวัดขอนแก่นที่ผูกให้กินแปลงไมยราบไร้หนามแล้วแสดงอาการป่วยอย่างรุนแรงและเสียชีวิต โดยโค 3 ตัว-เสียชีวิตภายใน 3 วัน และ โคอีก 2 ตัว เสียชีวิตภายใน 11-12 วันต่อมา ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างอาหารในกระเพาะพบสารพิษ nitrate และ cyanide โดยการเทียบสีกับสารมาตรฐานซึ่งเป็นการตรวจเชิงคุณภาพในขณะที่ Lerdsri *et al*. (2014) รายงานความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในโค 9 ตัวในจังหวัดบุรีรัมย์ที่กินไมยราบไร้หนามแล้วแสดงอาการป่วยในลักษณะเดียวกัน และเสียชีวิต ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยาจากตัวอย่างไมยราบไร้หนามและอวัยวะภายในของโคที่เสียชีวิต คือ หัวใจ ตับ ไต พบสารพิษ nitrate แต่ตรวจไม่พบ cyanide อย่างไรก็ตามรายงานเหล่านี้ชี้ชัดให้เห็นถึงพิษของไมยราบไร้หนามที่เจ้าของสัตว์พึงระมัดระวังไม่นำมาเป็นพืชอาหารสัตว์เพราะมีหลายการศึกษาวิจัยที่ยืนยันถึงอันตรายที่ร้ายแรงของพืชชนิดนี้ (Alex, 1991; Rajan *et al*., 1986; Usha *et al*., 2009) จากการศึกษาครั้งนี้ วิธีตรวจหาปริมาณ cyanide ในเลือดโคด้วยเทคนิค microdiffusion spectrophotometry ที่ได้พัฒนาขึ้น สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ cyanide ในเลือดเพื่อบ่งบอกถึงระดับความเป็นพิษได้ โดยสามารถตรวจจากตัวอย่างเลือดโคที่กำลังแสดงอาการป่วย หรือจากตัวอย่างเลือดโคที่เสียชีวิตใหม่ๆ ซึ่งจะช่วยให้สามารถยืนยันการวินิจฉัยโรคได้ อย่างไรก็ตามตัวอย่างส่งตรวจควรส่งมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุด หากไม่สามารถทำได้ควรเก็บรักษาสภาพตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4 ºC และควรส่งตัวอย่างให้เร็วที่สุดภายใน 1-2 วัน (Ballantyne, 1987) ทั้งนี้เป็นการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการพิษวิทยาให้ทันต่อสถานการณ์ และแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นจากการได้รับสารพิษชนิดนี้ได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Sung-Won Park และ Dr. Sohee Kim จาก Analytic Toxicology Laboratory, Animal and Plant Quarantine Agency (QIA) ประเทศเกาหลี ที่ให้คำปรึกษาในด้านเทคนิค Microdiffusion spectrophotometry จนสามารถนำมาปรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์ Cyanide เชิงปริมาณในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

ตติย สีหร่าย. 2547. เอกสารประกอบการอบรม-สัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร: การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี. สถาบันอาหาร. กรุงเทพฯ. หน้า 1-44.

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 124 หน้า.

ปานทิพย์ ศิริโชติ. 2551. เหตุการณ์กรณีผู้ประสบเหตุหมดสติและเสียชีวิตในโรงงานหน่อไม้ดอง. การสัมมนาเครือข่ายนิติพิษวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่2 ณ กรีนเลครีสอร์ท อ. เมือง จ. เชียงใหม่. [Online]. Available: http://www.med.cmu.ac.th/dept/forensic/2012/ images/ files/ forensic-toxicology 2560.pdf, Accessed August 31, 2016.

มาลินี ลิ้มโภคา. 2523. พิษวิทยาและการวินิจฉัยโรคทางสัตวแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์จรัญสนิทวงศ์, กรุงเทพฯ. 276 หน้า.

มาลินี ลิ้มโภคา สุชาติ ศราธพันธุ์ วิมล จิระธนวัฒน์ วิมลพร จิระวัฒนพงศ์ นวรัตน์ สาครรัตน์ นิยมศักดิ์ อุปทุม และ ชาญยุทธ เทพา. 2525. ไมยราบไร้หนามเป็นพิษในโค. กรุงเทพฯ: วารสารสัตวแพทย์. 3(1): 43-48.

มาลินี ลิ้มโภคา. 2527. พิษวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์. โรงพิมพ์จรัญสนิทวงศ์ กรุงเทพฯ. หน้า 364.

ศิริรัตน์ บัวผัน. 2555. เทคนิคการใช้กากมันสดเป็นอาหารโคนม. วารสารปศุสัตว์เกษตรศาสตร์. ปีที่38. ฉบับที่ 151. หน้า 48-50.

Alex, P.C., Rajankutty, K., Valsala, K.V. and Nair, K.N.M. 1991. Mimosa poisoning in a heifer. *J. Vet. Anim. Sci.* 22(1): 134-136.

Andre, T.G., Isis, M.H., Helena, M., Viviane, M.M., Paulo, C.M. and Silvana, L.G. 2015. Intoxication by cyanide in pregnant sows: prenatal and postnatal evaluation. *J. Toxicol*. 2015: 1-9.

Arnold, M., Gaskill, C., Smith, R. and Lacefield, G. 2014. Cyanide poisoning in ruminants. University of Kentucky College of Agriculture, Food and Environment. p. 1-2. [Online]. Available: http://www2.ca.uky.edu/agcomm/pubs/ID/ID220/ID220.pdf. Accessed August 30, 2016.

Ballantyne, B. 1987. Toxicology of cyanides. In: Ballantyne, B., Marrs, T.C., editors. Clinical and Experimental Toxicology of Cyanides. Bristol, UK: Wrights. p. 41-126.

Ballantyne, B. and Mars, T.C. 1987. Clinical and Experimental Toxicology of Cyanides. Bristol, UK, Wright.

Bourke, C.A., Bunker, E.C., Reece, R.L. and Whittaker, S.J. 2008. Cerebella ataxia in sheep grazing pastures infested with *Romulea rosea* (onion grass or Guildford grass). *Aust. Vet. J*. 86(9): 354-6.

Bradley, G.A., Metcalf, H.C., Reggiardo, C., Noon, T.H., Bicknell, E.J., Lozano-Alarcon, F., Reed, R.E. and Riggs, M.W. 1995. Neuroaxonal degeneration in sheep grazing Sorghum pastures. *J. Vet. Diag. Invest*. 7: 229-336.

Boadas-Vaello, P., Jover, E., Llorens, J. and Bayona, J.M. 2008. Determination of cyanide and volatile alkylnitriles in whole blood by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 870(1): 17-21.

Chinaka, S., Takayama, N., Michigima, Y., and Ueda, K. 1998. Simultaneous determination of cyanide and thiocyanate in blood by ion chromatography with fluorescence and ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl*. 713: 353–359.

Flanagan, R.J., Braithwaite, R.A., Brown, S.S., Widdop, B. and de Wolff, F.A. 1995.

Cyanide. In: Basic Analytical Toxicology. World Health Organization. Geneva. p. 117-121.

Holzbecher, M. and Ellenberger, H.A. 1985. An evaluation and modification of a microdiffusion method for the emergency determination of blood cyanide. *J. Anal. Toxicol*. 9: 251 – 253.

Horwitz, W. and Albert, R. 2006. The Horwitz Ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *J. AOAC Inter.* 89: 1095–1109.

Lerdsri, J., Doonsungnern, A. and Chuachan, U. 2014. Nitrate poisoning due to ingestion of *Mimosa invisa* in cattle. Proceedings of the 3rd Thailand-Japan joint conference on animal health. p. 41.

Lundquist, P., Kagedal, B. and Nilsson, L. 1995. An improved method for determination of thiocyanate in plasma and urine. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem*. 33: 343–349.

Manzano, H., de Sousa A.B., Soto-Blanco B., Guerra J.L., Maiorka P.C. and Gorniak S.L. 2007. Effects of long-term cyanide ingestion by pigs. *Vet. Res. Commu.* 31(1): 93-104.

Mateus, F.H., Lepera, J.S. and Lanchote, V.L. 2005. Determination of acetonitrile and cyanide in rat blood: Application to an experimental study. *J. Anal. Toxicol.* 29(2): 105–109.

McKenzie, R.A. and McMicking, L.I. 1977. Ataxia and urinary incontinence in cattle grazing sorghum. *Aust. Vet. J*. 53: 496-497.

Morgan, **R.L.** and Way, **J.L.** 1980. Fluorometric determination of cyanide in biological fluids and pyridoxal. *J. Anal. Toxicol.* 4(2): 78-81.

Murphy, K.E., Schantz, M.M., Butler, T.A., Benner, B.A., Wood, L.J. and Turk, G.C. 2006. Determination of cyanide in blood by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chem*. 52: 458-467.

Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D. 2007. Veterinary Medicine; A text book of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th ed. Saunders Publishers, London, UK. p. 1852-1854.

Rajan, A., Manomohan, C.B., Valsala, K.V., Sreekumaran, K.M. and Nair, N.D. 1986. Experimental studies on the toxicity of the plant *Mimosa invisa* in calves. *Kelara J. Sci*. 17: 91-98.

Shafi, H., Subhani, A., Imran, M., Watoo, S.A., Sarwar, M., Hussan, S.S., Latif, A., Ashiq, M.Z., Tahir, M.A. and Tahir, A.M. 2015. Determination of cyanide in biological and non-biological matrices by headspace gas chromatography coupled to flame - ionization detector.

Arab J. Foren. Sci. Foren. Med. 1(1): 123–129.

Soto - Blanco, B., Gorniak, S.L. and Kimura, E.T. 2001. Physiopathological effects of the administration of chronic cyanide to growing goats- a model for ingestion of cyanogenic plants. *Vet. Res. Commun*. 25(5): 379-389.

The Merck Veterinary Manual. 2014. "Overview of Cyanide Poisoning". [Online]. Available : http://www.merckvetmanual.com/mvm/toxicology/cyanide_poisoning/overview_of_cyanide_poisoning.html. Accessed February 12, 2016.

Tsuge, K., Kataoka, M. and Seto, Y. 2001. Rapid determination of cyanide and azide in beverages by microdiffusion spectrophoto metric method. *J. Anal. Toxicol.* 25: 228–236.

Usha, P.T.A., Gopakumar, N. and Chandrasekharan, A.M.N. 2009. Toxicity of fresh juice of *Mimosa* invisa in rabbits. *J. Vet. Anim. Sci.* 40: 6-8.

Way, J.L. 1984. Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 24: 451-481.

บทความวิจัย

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

การตรวจหาตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่สร้างอะฟลาทอกซิน B1 จากตัวอย่างข้าวโพดอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

สนทนา มิมะพันธุ์[1,#] ภัทราวดี วัฒนสุนทร[1] และพนม ใสยจิตร์[1]

[1]กลุ่มพิษวิทยาและชีวเคมี สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ: การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในข้าวโพดอาหารสัตว์ซึ่งเป็นหนึ่งในผลผลิตทางการเกษตรนับเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตร้อนชื้นเช่นประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้นำตัวอย่างข้าวโพดที่มีการติดเชื้อราตามธรรมชาติมาเพาะเลี้ยง และพิสูจน์เชื้อ *Aspergillus flavus* โดยการตรวจหายีน ITS, Beta-tubulin and calmodulin genes ด้วยปฏิกิริยาพอลีมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) ร่วมกับพิสูจน์เชื้อ *A. flavus* ชนิดที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินB1 (AFB1) โดยการตรวจหายีนสี่ชนิดคือ *Ver1, Omt1, Nor1*, *aflR* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง AFB1 ด้วยวิธี PCR และตรวจยืนยันการสร้าง AFB1 จากเชื้อที่แยกได้โดยตรงด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) จากนั้นนำเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งใช้ในการเพิ่มขยายและตรวจหายีนเป้าหมายมาทดสอบในเชื้อราที่แยกได้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนทั้งสี่ชนิดดังกล่าว และใช้สารฟลูออเรสเซนต์ calcein เติมก่อนการเพิ่มปริมาณยีน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP คือ การใช้อุณหภูมิคงที่ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า มีความแตกต่างของสีอย่างชัดเจนระหว่างผลบวกและผลลบ โดยภายใต้แสงธรรมชาติผลบวกให้สีเหลืองและผลลบให้สีส้ม ส่วนภายใต้แสง UV ผลบวกจะเรืองแสงสีเขียว วิธีนี้มีความไวในการตรวจที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 10^{-6} (89 pg/µl) ส่วนวิธี PCR มีความไวในการตรวจที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 10^{-5} (0.0089 ng/µl) สามารถตรวจยืนยันผลผลิตจาก LAMP โดยการทำ agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นนำเทคนิค LAMP นี้ไปใช้ในการตรวจข้าวโพดอาหารสัตว์ที่เก็บจากฟาร์มของเกษตรกรจำนวน 50 ตัวอย่าง พบผลบวก 18 ตัวอย่าง (36%) ผลลบ 32 ตัวอย่าง (64%) โดยมีความจำเพาะร้อยละ 100 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี multiplex PCR นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างผลของ LAMP กับการตรวจวิเคราะห์ AFB1 ด้วยวิธี HPLC โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันพบว่ามีความสัมพันธ์ทางบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (r = 0.83, P<0.05) แสดงว่าตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค LAMP มีความเสี่ยงสูงที่จะมีโอกาสปนเปื้อน AFB1 ดังนั้นเทคนิค LAMP ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจหาตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมของเชื้อ *A. flavus* ที่สร้าง AFB1 จากตัวอย่างข้าวโพด โดยเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถนำไปใช้เป็นวิธีการทดสอบความเป็นไปได้และความเสี่ยงของการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินจากอาหารในปศุสัตว์ได้

คำสำคัญ: อะฟลาทอกซิน B1 *Aspergillus flavus* ข้าวโพด Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ยีนที่ควบคุมการสร้างอะฟลาทอกซิน B1

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

E-mail address: sontanam@dld.go.th

Detection of Aflatoxin B1 Producing *Aspergillus flavus* Genes from Maize Feed using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Technique

Sontana Mimapan[1,#], Phattarawadee Wattanasuntorn[1] and Phanom Saijit[1]

[1]Toxicology and Biochemistry section National Institute of Animal Health Bangkok 10900 Thailand

Abstract: Aflatoxin contamination in maize feed, one of several agriculture crops grown for livestock feeding, is still a problem throughout the world mainly under hot and humid weather conditions like Thailand. In this study *Aspergillus flavus* (*A. flavus),* the key fungus for aflatoxin production especially aflatoxin B1 (AFB1), isolated from naturally infected maize were identified and characterized according to colony morphology and PCR detected on ITS, β-tubulin and calmodulin genes. The isolates were analysed for the presence of four aflatoxigenic biosynthesis genes in relation to their capability to produce AFB1, *Ver1, Omt1, Nor1*, and *aflR*. AFB1 production of the isolates was then confirmed using high performance liquid chromatography (HPLC) technique. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was applied as an innovative technique for rapid detection of target nucleic acid. The reaction condition was optimized at 65°C for 60 min and calcein fluorescent reagent was added before amplification. The LAMP results showed clear differences between positive and negative reactions in end point analysis under daylight and UV light by the naked eye. In daylight, the samples with AFB1 producing *A. flavus* genes developed a yellow color, but those without the genes retained the orange color. When excited with UV light, the positive samples become visible by bright green fluorescence. LAMP reactions were positive after addition of purified target DNA until dilutions of 10^{-6} (89 pg/µl) whereas PCR reactions were positive after addition of purified target DNA until dilutions of 10^{-5} (0.0089 ng/µl). The reaction products were then confirmed and visualized with 1% agarose gel electrophoresis. To test the LAMP utility, 50 maize samples were collected from livestock farms and tested for the presence of four aflatoxigenic biosynthesis genes. The results were positive in 18 samples (36%) but negative in 32 samples (64%). All of the samples were rechecked by multiplex PCR and the results were the same as LAMP, indicating 100% specificity. Additionally, when assessing LAMP results with the HPLC aflatoxin analysis results using correlation coefficient, there was a significant correlation between the two methods (r = 0.83, P<0.05) which suggested that positive maize samples were likely to be a high- risk feed. In conclusion, the LAMP technique in this study can provide a simple and rapid approach for detecting AFB1 producing *A. flavus* genes from maize and appeared to be a promising tool for the prediction of potential aflatoxigenic risk in livestock feedings.

Keywords: Aflatoxin B1, *Aspergillus flavus*, maize, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), Aflatoxigenic biosynthesis genes

[#]Corresponding author
J. Mahanakorn Vet. Med. 2016. 11(2): 141-158.
E-mail address: sontanam@dld.go.th

Introduction

Aspergillus flavus (A. flavus) is one of the major producers of the well-known carcinogenic aflatoxins. Based on their fluorescence under UV-light (blue or green), the four major aflatoxins are call aflatoxin B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) and G2 (AFG2) (Squire, 1981). Not all strains of *A. flavus* are aflatoxin-producing, several strains are non-toxigenic because aflatoxin synthesis may become unstable in these fungi (Bennett and Christensen, 1983; Rodrigues *et al*., 2007). Aflatoxin-producing strains of *A. flavus* can produce AFB1 and AFB2 (Horn and Corner, 1999). Among them, AFB1 is of great concern because of its toxic effects such as carcinogenicity and immunosuppression in human and animal. Contamination by AFB1 can occur in several agricultural products and commonly found in maize. AFB1 production on maize feed appeared to be greatly influenced by environment under hot and humid weather conditions and it may cause serious consequences to animal health (Hussein and Brasel, 2001). Several reports have shown the impact of AFB1 on animal health including pigs (Harvey *et al*, 1989; Lindemann *et al*., 1993), poultry birds (Espada *et al*., 1992) and dairy cows (Fink-gremmels., 2008).

Analytical methods for detection of aflatoxin contamination in food and feedstuffs have been carried out including thin-layer chromatography (TLC), immunochemical methods and high-performance liquid chromatography (HPLC). One of the major chromatographic methods used for determination of AFB1 is HPLC. The HPLC technique makes use of a stationary phase and a mobile phase which flow through the solid absorbent. While HPLC is considered the gold standard for AFB1 analysis, it requires expertise, extensive sample preparation and expensive equipment (Wacoo *et al*., 2014).

Conventional methods used to distinguish between aflatoxin producing and non-aflatoxin producing strains of *A. flavus* are based on cultural and analytical methods (Bennett and Papa, 1988; Hamed *et al*., 2004). These methods are time-consuming, labor-intensive and need the expertise of mycologists to avoid misidentification. To date, molecular methods have been introduced as a powerful tool for detecting and identifying aflatoxin producing strains of *A. flavus* (Shapira *et al*., 1996). Recently, it has been demonstrated that 25 identified genes clustered in 70 Kb DNA regions in the chromosome of aflatoxin producing strains of *A. flavus* are involved in the biosynthetic pathway of AFB1 and the sequences of these genes appear to be highly conserved in *A. flavus* (Yu *et al*., 2004). Therefore, PCR

detection of aflatoxin biosynthetic gene presence has been used as a diagnostic tool for aflatoxin producing strains of *A. flavus* (Giesen, 1998; Levin, 2012). However, it needs sophisticated instruments like thermal cycler to maintain different temperature and a long detection period. These limitations affect their applications to use in the low-technology laboratory.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was originally described as a specific, rapid and cost-effective method by Notomi *et al*. (2000). This novel nucleic acid amplification method relies on auto cycling strand displacement DNA synthesis performed by the *Bst* DNA polymerase. All reactions can be conducted under isothermal conditions ranging from 60 to 65 C°. The specificity of the reaction is very high because it uses four primers recognizing six distinct regions on the target DNA. The amplification products are stem-loop DNA structures with several inverted repeats of the target and cauliflower-like structures with multiple loops and can be detected by visual assessment of turbidity or fluorescence of the reaction mixture (Mori *et al*., 2001).

For these reasons, LAMP has been used as a powerful tool for the detection of bacteria (Iwamoto *et al*., 2003; Zhuang *et al*., 2014), virus (Zhou *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2011) and parasites (Kuboki *et al*., 2003; Ikadai *et al*., 2004) but only few application of LAMP have been used for detecting and identifying mycotoxin producing fungi (Niessen *et al*., 2013). The aim of this study was to apply LAMP technique for the detection of AFB1 producing *A. flavus* genes in maize feed samples collected from livestock farms, and compared its sensitivity and specificity with results from PCR. The correlation between LAMP and HPLC aflatoxin analysis results were assessed using correlation coefficient.

Materials and methods

Fungal isolation and identification:

1) Media and culture conditions

A. flavus tested in this study were isolated from five naturally infected samples selected from contaminated stored maize. They were directly cultured on Petri dishes containing Yeast Extract Sucrose (YES) Agar. Petri dishes were incubated at 25° C for 7 days at pH 7. Macromorphological observation of fungal colonies was done based on the study of Varga *et al*. (2011).

2) Aflatoxigenic ability of the isolates

For the determination of AFB1 production in YES agar, aflatoxin extraction was carried out as follows. After incubation, the entire culture was blended and extracted with 100 mL of 80% methanol. The extraction solution was filtered through a glass micro

fiber filter (VICAM, Milford, MA, USA). Two mL of the filtered extraction from YES agar were applied to the immunoaffinity cleanup column AflaTest (VICAM, Milford, MA, USA). Then, the column was washed by 5 mL of distilled water for two times and aflatoxins were eluted with 1 mL of methanol. The eluted extract was dried under gentle air stream and the residue redissolved in 0.25 mL of HPLC mobile phase. AFB1 was determined by HPLC/fluorescence detector set at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 435 nm (Agilent 100 Series, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA).

3) Multiplex PCR analysis of fungal isolates

The purified fungal genomic DNA was extracted using DNA extraction kit (Biotech rabbit GmbH, Neuendorf str. 24a 16761 Hennigsdorf, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA samples were resuspended in 100 µl of sterile distilled water at a concentration of 5 ng μL^{-1}.

For multiplex PCR analysis of *A. flavus*, amplification of a part of the ITS, β-tubulin and calmodulin genes were performed using the primer sets as shown in Table 1. Each multiplex PCR reaction contained 10 ng of template DNA, 12.5µl of 1X multiplex PCR, 1µM of forward and reverse primers and 25 µl of final volume. Thermal cycling conditions were: initial denaturation temperature of 95°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of denaturation temperature of 95°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds, and extension at 72° C for 30 seconds. Final DNA extension was at 72°C for 10 minutes and then 4°C was set at the holding temperature for storage.

4) Multiplex PCR analysis of Aflatoxin B1 producing strain of fungal isolate

Multiplex PCR assay for direct identification of pure culture of aflatoxin-producing *A. flavus* was carried out for four genes (Ver1, Omt1, Nor1 and aflR) as these genes are considered as indicators of AFB1 production (Shapira *et al*., 1996, Farber *et al*., 1997 and Rahimi *et al*., 2008). The primers used for multiplex PCR detection of the four genes are shown in Table 2.

Multiplex PCR reaction conditions were optimized with a 10 µL reaction mixture containing 1 unit of Taq polymerase, 0.6 µM of each published forward and reverse primers, 0.2 µM dNTP solution mix, 1 µL 10x buffer with 20 mM $MgCl_2$, and 1 µL of DNA template of aflatoxin-producing *A. flavus* (DNA template from AFB1 nonproducing strain of *A. flavus* which was isolated from this study and water were used as negative control). Thermal cycling conditions were: initial denaturation temperature of 95°C for 5

minutes, followed by 30 cycles of denaturation temperature of 95°C for 30 seconds, annealing at 65 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 30 seconds. Final DNA extension was at 72°C for 10 minutes, then 4 °C was set at the holding temperature for storage. PCR products were viewed using agarose gel electrophoresis at 1% gel concentration.

5) LAMP reaction solution and optimization

LAMP assay for direct identification of pure culture of AFB1 producing *A. flavus* was tested. We used primer sets designed by Nagamine *et al*. (2002) with the nucleic acid sequences as shown in Table 3.

The LAMP assay was carried out in a total of 25 µl reaction mixture. The reaction solution was modified from the protocol outlined by Niessen and Vogel (2010). It contained 2.5 µl of 10X Thermopol buffer, 2 µl of primer mix (10µM of FIP, BIP, F3, B3, LoopF and LoopB primer), 6mM $MgSO_4$, 0.4mM Betaine, 1mM of dNTP, 1.5 µl of calcein, 8U *Bst* DNA polymerase and DNA template of AFB1 producing *A. flavus.* DNA template from AFB1 non-producing strain of *A. flavus* and water were used as negative control. The reaction mixture was incubated in a Thermoblock at 60 °C - 65°C for 1 h.

Assay sensitivity (limit of detection) was determined by using 10-fold serial dilutions of the total genomic DNA of AFB1 producing strain of *A. flavus* ranging from 10^{-1} to 10^{-7} were prepared and amplified with the four gene sets of primers as described above. The experiments were repeated three times. Detection limits were defined as the lowest concentrations that tested positive in all three repeats.

Table 1 The primer sets for detection of *Aspergillus flavus*

Genes	Primer pair	Primer sequence (5'>3')	References
Internal Transcribe spacer	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White *et al*., 1990
	ITS2	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White *et al*., 1990
	V9G	TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA	Masclaux *et al*., 1995
	LS266	GCA TTC CCA AAC AAC TGC ACT C	Masclaux *et al*., 1995
β-tubulin (Ben A)	Bt2a	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	Glass & Donaldson., 1995
	Bt2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Glass & Donaldson., 1995
Calmodulin (CaM)	CMD5	CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC	Hong *et al*., 2005
	CMD6	CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG	Hong *et al*., 2005
	CF1	GCC GAC TCT TTG ACY GAR GAR	Peterson *et al*., 2005
	CF4	TTT YTG CAT CAT RAG YTG GAC	Peterson *et al*., 2005

Table 2 PCR primers used for the four genes involved in aflatoxin B1 biosynthesis

Primer pair	Gene	Primer sequences (5'>3')	Optimal Annealing Temp. (°C)	PCR product size (bp)	References
VER-F	Ver-1	ATGTCGGATAATCACCGTTTAGATGGC	65	895	Shapira *et al*., 1996
VER-R		CGAAAAGCGCCACCATCCACCCCAATG			
OMT-F	Omt-1	GGCCCGGTTCCTTGGCTCCTAAGC	65	1024	Shapira *et al*., 1996
OMT-R		CGCCCCAGTGAGACCCTTCCTCG			
Nor-F	Nor-1	ACCCGTACGCCGGCACTCTCGGCAC	65	400	Farber *et al*., 1997
Nor-R		GTTGGCCGCCAGCTTCGACACTCCG			
aflR-F	aflR	CGCGCTCCCAGTCCCCTTGATT	65	630	Rahimi *et al*., 2008
aflR-R		CTTGTTCCCCGAGATGACCA			

Table 3 Loop-mediated isothermal amplification primers for the detection of Aflatoxin B1 used in this study

Primer sets	Primer sequences (5'>3')	Reference
FIP-Afla	TAGACCTGCTTGAGCACGCCATGAGGGAGGCTGGTATCC	Nagamine *et al*., 2002
BIP-Afla	AGGTCAGCAAGGGCAACATCCGGCCCAGGAGTAGTCGATAG	
F3-Afla	ACCGCTGTTGCTAAGAACAA	
B3-Afla	TTACGGACGAGACCGAGC	
LoopF-Afla	ATGTCCTCAAAGGTCTCGGG	
LoopB-Afla	GAGCCTGTTCCCCCTAAGAT	

6) Observation of LAMP products

Lamp amplified products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels and photography.

Maize sample analysis:

1) LAMP assay in spiked maize and maize samples

Fifty samples of maize feed were collected from various livestock farms. Spike maize samples were inoculated by immerge in suspension of AFB1 producing *A. flavus* for 3 days and then used as ~~a~~ positive controls whereas maize samples without AFB1 producing *A. flavus* as well as water were used as negative controls). DNA extraction was performed by the same method as above.

LAMP reactions for the presence of four aflatoxigenic biosynthesis genes also were performed by the same method described above.

2) Multiplex PCR analysis

DNA extraction from the same maize samples used for LAMP assay, with and without inoculation with AFB1 producing *A. flavus* were performed by multiplex PCR using the same method as described above.

3) HPLC analytical method for detection of AFB1

Maize samples were finely ground using a household electric grinder and the ground samples were subjected to solvent extraction with 100 mL of 70% methanol. The extraction solution was filtered through a glass micro fiber filter (VICAM, Milford, MA, USA). Two mL of the filtered extraction were applied to the immunoaffinity clean up column AflaTest (VICAM, Milford, MA, USA). The column was then washed with 5 mL of distilled water for two times and aflatoxins were eluted with 1 mL of methanol. The eluted extract was dried under gentle air stream and the residue re-dissolved in 0.25 mL of HPLC mobile phase. AFB1 was determined by HPLC/fluorescent detector set at an excitation wavelength of 365 nm and the emission wavelength of 435 nm (Agilent 100 Series, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA).

4) Statistical analysis:

Statistical analysis of the relationship between LAMP and HPLC results in 50 maize samples was done using IBM SPSS Statistic (ver. 22, NIDA, Thailand).

Results

Cultural and morphological observations:

The fungal colonies on YES agar were grown well, appeared after 2-4 days and mostly reached all plate within 7 days as shown in Fig. 1. The colonies were first white and rapidly became typical yellow-green colonies of *A. flavus* (Varga *et al*., 2011).

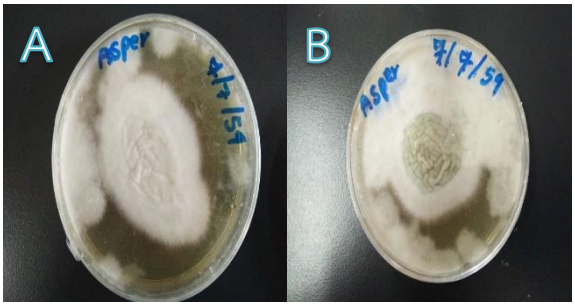


Fig. 1 Characteristic white and yellow-green color change by fungal colonies on Yeast Extract Sucrose (YES) agar

Aflatoxin B1 production of the fungal colonies

The chemical analysis by HPLC revealed that the fungal colonies in this study were able to produce AFB1.

Multiplex PCR identification of Aflatoxin B1 producing strain of fungal isolate

The yellow-green colony was identified as AFB1 producing *A. flavus*

whereas the white colony was identified as non-AFB1 producing *A. flavus*.

PCR identification of the fungal isolates

Multiplex PCR identification of Aflatoxin B1 producing strain of fungal isolate

The yellow-green colony was identified as AFB1 producing *A. flavus* whereas the white colony was identified as non-AFB1 producing *A. flavus*.

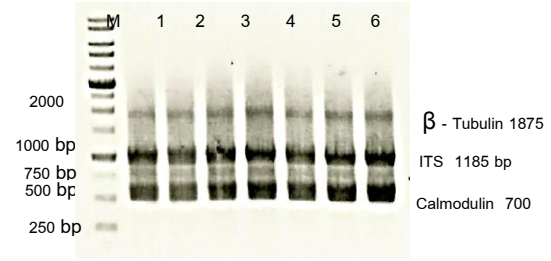


Fig. 2 PCR product of ITS, β-tubulin and calmodulin genes of *A. flavus* were amplified. M: DNA size marker; Lane1-2; The white colony of fungal isolates; Lane 3-7; the yellow-green colony of fungal isolates.

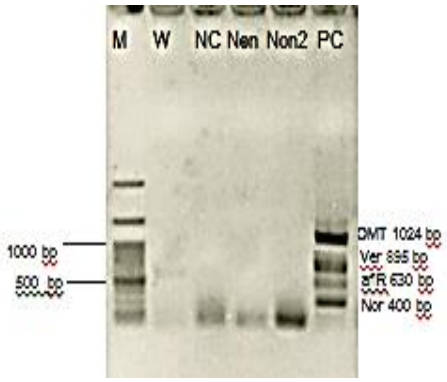


Fig. 3 PCR products of *Omt1, Ver1*, *aflR* and *Nor1* were amplified. M: DNA size marker; W: water; NC: buffer and water; Non1, Non2: the white colony of fungal isolate; PC: the green colony of fungal isolates.

Multiplex PCR identification of the fungal isolates

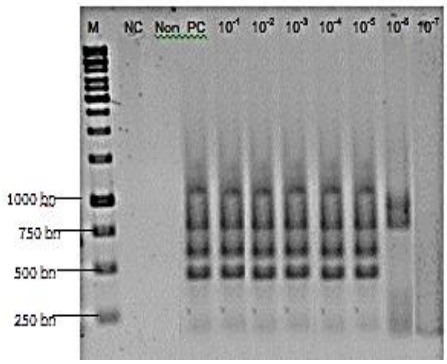


Fig. 4 Multiplex PCR reactions were positive after addition of purified target DNA until dilutions of 10^{-5} (0.0089 ng/µl)

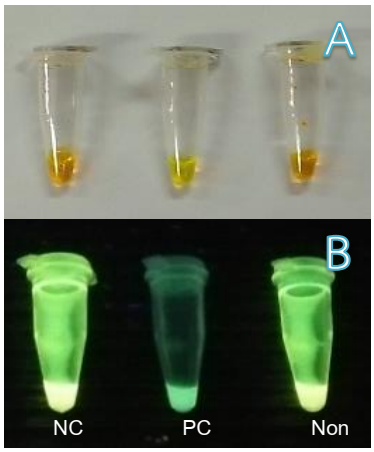


Fig. 5 (A) The LAMP positive result showed yellow color and the negative result showed orange color in daylight. (B) The LAMP positive result showed bright green color under UV light. Negative control (NC) = the tube without DNA template, Positive control (PC) = tube with AFB1 producing *A. flavus*, Non = tube with non AFB1 producing *A. flavus.*

LAMP results of pure culture

The LAMP results showed clear differences between positive and negative reactions in end point analysis under daylight and UV light by the naked eye as shown in Fig. 5

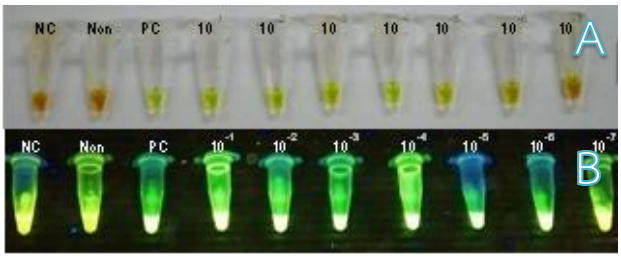


Fig. 6 LAMP reactions were positive after addition of purified target DNA until dilutions of 10^{-6} (89 pg/µl). A = under daylight, B= under UV light.

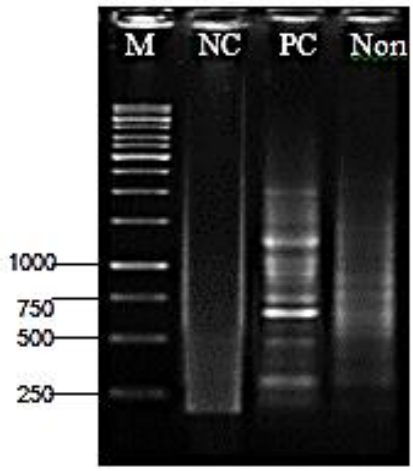


Fig. 7 Electrophoresis analysis of LAMP products of pure culture. Left to right: lane M, DNA size marker; lane NC, negative control (water); lane PC, positive sample; lane Non, non-AFB1 producing *A. flavus*

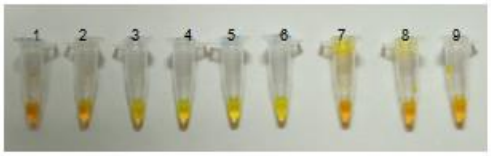


Fig. 8 LAMP results of maize samples: No. 1= water; No 2= negative control maize sample No.3 = spiked maize sample; No. 4, 5 and 6: positive results (yellow color) and No. 7, 8 and 9: negative results (orange color) under daylight

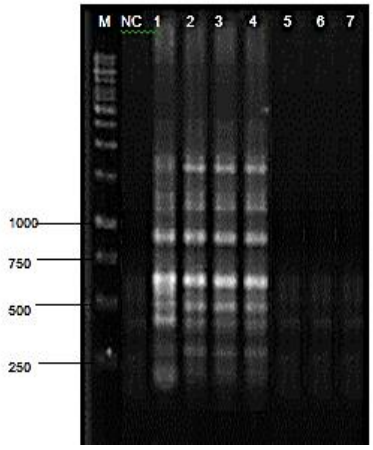


Fig. 9 Electrophoresis analysis of LAMP products of maize samples. Left to right: lane M = DNA size marker; lane NC= water, lane 1= Spiked maize samples 2, 3, 4 = positive sample; lane5, 6, 7=negative maize sample

Assessment of the results obtained with LAMP assays and HPLC analysis using Pearson's correlation coefficient showed that the correlation coefficient (r) equals 0.83, indicating a strong relationship between the two methods (r = 0.83, P<0.05).

Table 4 LAMP and multiplex PCR detection of four aflatoxin B1 biosynthesis genes and HPLC detection of aflatoxin B1 in 50 maize samples

No.	Samples	LAMP	PCR	HPLC
1	A1	-	-	-
2	A2	-	-	-
3	A3	-	-	-
4	A4	+	+	+
5	B1	+	+	+
6	B2	-	-	-
7	B3	-	-	-
8	B4	-	-	-
9	B5	+	+	+
10	C1	-	-	-
11	C2	-	-	-
12	C3	-	-	-
13	C4	-	-	-
14	D1	-	-	-
15	D2	+	+	+
16	D3	+	+	+
17	D4	+	+	-
18	E1	+	+	-
19	E2	+	+	+
20	E3	+	+	+
21	E4	-	-	-
22	F1	-	-	-
23	F2	-	-	-
24	F3	+	+	+
25	F4	+	+	+
26	G1	+	+	-
27	G2	-	-	-
28	G3	-	-	-
29	G4	-	-	-
30	H1	-	-	-
31	H2	-	-	-
32	H3	-	-	-
33	H4	+	+	+
34	I1	+	+	+
35	I2	-	-	-
36	I3	-	-	-
37	I4	-	-	-
38	J1	+	+	+
39	J2	-	-	-
40	J3	-	-	-
41	J4	-	-	-
42	K1	-	-	-
43	K2	-	-	-
44	K3	-	-	-
45	K4	+	+	+
46	L1	+	+	+
47	L2	+	+	-
48	L3	-	-	-
49	L4	-	-	-
50	L5	-	-	-

+: positive; -: negative.

A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K and L represented different livestock farms.

Discussion

In this study, a range of methods was used to detect aflatoxigenic *A. flavus* including cultural, analytical and molecular methods. The identification of *A. flavus* is complicated because of the similarities of morphological characters with *A. parasiticus* and other closely related species (Klich and Pitt, 1988). According to Gqaleni *et al*. (1996) YES agar is a great medium for the biosynthesis of AFB1. For this reason, YES agar was selected to culture the aflatoxigenic potential of *A. flavus.* To identify the toxin production, the culture was directly extracted and AFB1 was identified by HPLC. Thus, the result of this study suggested that the use of YES agar at 25 ºC, at pH of 7 and with an incubation period time of 7 days was suitable

to detect the aflatoxigenic potential of *A. flavus*. However, differentiation of aflatoxin producing and non-aflatoxin producing strains of *A. flavus* is very important because conventional methods like cultural and analytical methods are not entirely reliable (Criseo *et al*., 2001). Furthermore, these methods are time-consuming, require facilities and sometimes they fail to detect some aflatoxin producing strains because instability of aflatoxin production may occur in certain toxigenic strains growing in culture media (Abarca *et al*., 1988). Therefore, multiplex PCR method using three genes (Table 1) ITS, β-tubulin and calmodulin for different target regions is an alternative approach to confirm *A. flavus* (Shapira *et al*., 1996; Haugland *et al*., 2002).

The successful amplification of the three genes (Fig. 2) can be used for species identification but do not confirm aflatoxin production. For this reason, multiplex PCR has been used for distinguishing aflatoxin producing and non-aflatoxin producing *A. flavus* by targeting one or several genes in AFB1 biosynthesis (Levin, 2012; Yin *et al*., 2009). In the present study, the use of multiplex PCR with four sets of primers (Table 2) to amplify AFB1 biosynthetic genes, Ver1, Omt1, Nor1 and aflR was performed in pure culture of aflatoxin producing and non-aflatoxin producing *A. flavus*. The result demonstrated that multiplex PCR assay with aflatoxin producing isolate exhibited the complete sets of genes whereas the non-aflatoxin producing isolate lacked the PCR products (Fig. 3). Here LAMP assay for direct identification of pure cultures of aflatoxin producing *A. flavus* were tested and accomplished using the primer set given in Table 3. The reaction condition was optimized at 65°C for 60 min. The addition of calcein fluorescent reagent before the LAMP reaction enhanced the determination of a positive result. Calcein is a colorimetric indicator which the color gradually changes from orange to yellow or green color. Thus, instead of inspection the white turbidity resulted from magnesium pyrophosphate accumulation, the clear difference color between positive and negative reactions to the LAMP results in end point analysis could successfully make a distinction between infected samples and negative ones. Interestingly, LAMP can produce reliable product even under lower DNA concentration (10^{-6} dilution or more).

Maize is prone to infection by *A. flavus* and contamination with aflatoxins (Medina, 2004). The samples of naturally contaminated maize feed were analyzed during the current study. All samples were collected from various livestock farms and tested for the presence of the four AFB1 biosynthesis genes using LAMP

and multiplex PCR together with data on presence or absence of AFB1 by HPLC in corresponding samples. Results given in Table 4 showed aflatoxin producing *A. flavus* was presented in 18 out of 50 samples (36%). Thirty-two of the samples (64%) were found to be uninfected. The samples that showed positive by LAMP also showed positive by multiplex PCR, indicating 100% specificity when compare LAMP to multiplex PCR. The results from this study showed that LAMP tested in both pure cultures and in naturally contaminated maize samples can be complete within 60 min with about 0.0089 ng/µl DNA concentration while multiplex PCR needed at least 3 hr with about 89 pg/µl DNA concentration to complete the reaction. In Addition, when assessing LAMP results with the HPLC–based aflatoxin analysis results using Pearson's correlation coefficient, there was a significant correlation between the two methods (r= 0.83, P<0.05) which suggested that positive maize samples were likely to be a high- risk feed. The study by Abdel-Hadi *et al*. (2010) also showed that there was a good correlation between the expression of aflatoxin biosynthetic genes and AFB1 production and the study by Priyanka *et al*. (2012) showed that the aflatoxin biosynthetic gene (Nor1) detection matched with the HPLC analysis unequivocally. However, it was observed that four maize samples (D4, E1, G1, L2) with the presence of the complete set of four genes did not produce AFB1. It is likely that environmental factors including temperature, pH and water stress condition have a significant impact on AFB1 biosynthetic gene expression and aflatoxin production in maize (Medina *et al*., 2014).

The two assays, LAMP and multiplex PCR, had enough potential to make differentiation and detect infected samples. Other recent studies using LAMP also showed it to be more effective than multiplex PCR in detecting fungi in contamination of agricultural crops (Jiufeng *et al*., 2010; Adb-Elsalam *et al*., 2011; Ghosh *et al*., 2015). The results of this study suggested that LAMP technique, without the dedicated equipment like multiplex PCR and the need to confirm amplification products, proved to be much more useful as some factors including time, safety, cost and sensitivity were taken into account. It also suggested that LAMP can be used as an alternative method for the detection of AFB1 producing *A. flavus* in maize feed. It may become a promising tool in the prediction of a potential aflatoxin risk at an early stage in various types of food and feed sample.

Acknowledgements

We are thankful for technical assistance and some advices from Assoc. Prof. Dr. Apisit Eiamnor from national science and

technology development agency (NSTDA) and Miss Thanida Sihapandit from Faculty of Science, Mahidol University. Thanks to parasitology section, NIAH for thermal cycler and gel electrophoresis service supplied.

References

Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Bruguera, M.T. and Cabanes, F.J. 1988. Comparison of some screening methods for aflatoxigenic moulds. *Mycopathologia.* 104: 75–79.

Abdel-Hadi, A., Carter, D. and Magan, N. 2010. Temporal monitoring of the Nor1 (aflD) gene of *Aspergillus flavus* in relation to aflatoxin B1 production during storage of peanuts under different water activity levels. *J. Appl. Microbiol.* 109(6): 1914-1922.

Abd El-Salam, M.H., Hippen, A.R., El-Shafie, K., Assem, F.M., Abbas, H., Abd El-Aziz, M., Sharaf, O. and El-Aassar, M. 2011. Preparation and properties of probiotic concentrated yoghurt (labneh) fortified with conjugated linoleic acid. *J. Food Sci. Tech*. 46(10): 2103-2110.

AflaTest Instruction Manual. 1999. Aflatest Fluorometer Procedure for Corn, Milo, Grains and Feeds (0-300 ppb, 0.2 gram sample equivalent). Vicam, L.P. 313 Pleasant Street Watertown, MA 02472 U.S.A: 34-35.

Bennett, J.W. and Christensen, S.B. 1983. New perspectives on aflatoxin biosynthesis. *Adv. Appl. Microbiol*. 29: 53-92.

Bennett, J.W. and Papa, K.E. 1988. The aflatoxigenic *Aspergillus* spp. *Adv. Plant Pathol*. 6: 263-280.

Criseo, G., Bagnara, A. and Bisignano, G. 2001. Differentiation of aflatoxin producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. Department of Microbiological, Genetic and Molecular Sciences, Messina, Italy. *Lett. Appl. Microbiol*. 33: 291-295.

Espada, Y., Domingo, M., Gomez, J. and Calvo, M.A. 1992. Pathological lesions following an experimental intoxication with aflatoxin B1 in broiler chickens. *Res. Vet. Sci*. 53: 275-279.

Faber, P., Geisen, R. and Holzapfel, W.H. 1997. Detection of aflatoxinogenic fungi in figs by a PCR reaction. *Int. J. Food Microbial*. 36: 215–220.

Fink-Gremmels, J. 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit. Contam*. 25(2): 172-180.

Gieson, R. 1998. PCR methods for the detection of mycotoxin producing fungi. In Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A. and Elander, R.P. (eds). *Applications of PCR in mycology.* Wallingford - CAB international. P. 243-266.

Ghosh, M., Bhadra, S., Adegoke, A., Bandyopadhyay, M. and Mukherjee, A. 2015. MWCNT uptake in *Allium cepa* root cells induces cytotoxic and genotoxic responses and results in DNA hyper-methylation. *Mutat. Res.* 774: 49–58.

Glass, N.L. and Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from *Filamentous Ascomycetes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(4): 1323–1330.

Gqaleni, N., Smith, J.E. and Lacey, J. 1996. Co-production of aflatoxins and cyclopiazonic acid in isolates of *Aspergillus flavus*. *Food Addit. Contam*. 13(6): 677-685.

Hamed, K., Abbas, R.M., Zablotowicz, M.A., Weaver, B.W., Horn, W.X. and Shie, W.T. 2004. Comparison of cultural and analytical methods for determination of aflatoxin production by Mississippi Delta *Aspergillus* isolates. *Can. J. Microbiol.* 50: 193-199.

Harvey, R.B., Kubena, L.F. and Huff, W. E. 1989. Effects of aflatoxin, deoxynivalenol, and their combinations in the diets of growing pigs. *Am. J. Vet. Res.* 50: 602-608.

Haugland, R.A., Brinkman, N. and Vesper, S.J. 2002. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *J. Microbiol. Methods.* 50: 319–323.

Hong, S.G., Cramer, R.A., Lawrence, C.B. and Pryor, B.M. 2005. Alt a 1 allergen homologs from Alternaria and related texa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genet. Biol*. 42: 119-129.

Horn, B.W. and Dorner, J.W. 1999. Regional difference in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4): 1444-1449.

Hussein, H.S. and Brasel, J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167: 101-134.

Ikadai, H., Tanaka, H., Shibahara, N., Matsuu, A., Uechi, M., Itoh, N., Oshiro, S., Kudo, N., Igarachi, I. and Oyamada, T. 2004. Molecular evidence of infections with *Babesia gibsoni* parasites in Japan and evaluation of the diagnostic potential of a loop-mediated isothermal amplification method. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2465-2469.

Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., Nanba, D., Higashiyama, S.,

Hori, M., Klagsbrun, M, and Mekada, E. 2003. Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 3221–3226

Jiufeng, S., Najafzadeh, M.J., Vicente, V., Xi, L. and de Hoog, G.S. 2010. Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by *Fonsecaea* Agents of chromoblastomycosis. *J. Microbiol. Methods*. 80: 19-24.

Klich, M.A. and Pitt, J.I. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. 91(1): 99-108.

Kuboki, N., Inouc, N., Sakurai, T., Di Cello, F., Grab, D.J., Suzuki, H., Sugimoto, C., Igarashi, I. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5517-5524.

Levin, R.E. 2012. PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *Int. J. Food Microbiol.* 156: 1-6.

Lindemann, M.D., Blodgett, D.J., Kornegay, E.T. and Schurig, G.G. 1993. Potential ameliorators of aflatoxicosis in weaning growing swine. *J. Anim. Sci.* 71: 171-178.

Masclaux, F., Gueho, E., Hoog, G.S.D. and Christien, R. 1995. Phylogenetic relationships of human pathogenic *Clasdosporium (Xylohypha)* species inferred from partial LS rRNA sequences. *J. Med. Vet. Mycol*. 33: 327-338.

Medina, A., Rodriguez, A., and Magan, N. 2014. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Front. Microbiol*. 5: 348.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. and Notomi, T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 150-154.

Nagamine, K., Hase, T. and Notomi, T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell Probe.* 16: 223–229.

Niessen, L., Luo, J., Denschlag, C. and Vogel, R.F. 2013. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. *Food Microbiol.* 36(2): 191–206.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K, Amino, N. and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 15:28 (12): E63.

Peterson S.W., Vega, F.E., Posada, F. and Nagai, C. 2005. *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic

relationship to *P. fellutanum, P. thiersii and P. brocae*on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. *Mycologia*. 97: 659–666.

Priyanka, S.R., Ramana, M.V., Balakrishna, K., Murali, H.S. and Batra, H.V. 2012. A novel non radioactive PCR- DNA Probes for detection of Aflatoxins producing *Aspergillus* species from major crops grown in India. *Adv. Microbiol.* 2: 577-586.

Rahimi, P., Sharifnabi, B. and Bahar, M. 2008. Detection of aflatoxin in *Aspergillus* species isolated from pistachio in Iran. *Phytopathology.* 156: 15–20.

Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R.M., Lima, N. and Venancio, A. 2007. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol. A Mendez–Vilas (ed).* 527-534.

Shapira, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A. and Salomon, R. 1996. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Appl. Environ Microbiol.* 62: 3270-3273.

Squire, R.A. 1981. Ranking animal carcinogens-a proposed regulatory approach. *Science.* 214: 877-880.

Varga, J., Frisvad, J.C. and Samson, R.A. 2011. The new aflatoxin producing species, and overview of *Aspergillus* section *Flavi. Stud. Mycol*. 69(1): 57-80.

Wacoo, A.P., Wendiro, D., Vuzi, P.C. and Hawumba, J.F. 2014. Methods for detection of aflatoxins in agricultural food crops. *J. Appl. Chem*. 2014(Article ID 706291): 1-15.

Yin, H., Chu, A., Li, W., Wang, B., Shelton, F. and Otero, F. 2009. Lipid G-protein-coupled receptor ligand identification using β-arrestin PathHunter™ assay. *J. Biol. Chem*. 284: 12328–12338.

Yu, J., Whitelaw, C.A., Nierman, W.C., Bhatnagar, D. and Cleveland, T.E. 2004. *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. *FEMS Microbiol. Lett.* 237: 333-340.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* p. 315-322.

Zhang, Y, Fu., P., Li, J., Jiang, F., Li, J. and Wu, W. 2011. Development of loop-mediated isothermal amplification method for visualization detection of the highly virulent strains of porcine reproductive and respiratory syndrome

virus (PRRSV) in China. *Afr. J. Biotechnol.* 10(6): 13278-13283.

Zhou, S., Han, S., Shi, J., Wu, J., Yuan, X., Cong, X., Xu, S., Wu, X., Li, J. and Wang, J. 2011. Loop-mediated isothermal amplification for detection of porcine circovirus type 2. *Virol. J.* 8: 497-501.

Zhuang, L., Gong, J., Li, Q., Zhu, C., Yu, Y., Dou, X., Liu, X., Xu, B. and Wang, C. 2014. Detection of *Salmonella* spp. by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting bcfD gene. *Lett. Appl. Microbiol*. 59(6): 658-664.

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

เนื้องอกชนิดมาสท์เซลล์ในผิวหนังสุนัข: การวินิจฉัยและการพยากรณ์โรค

อารยา สืบขำเพชร[1,#]

[1]ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร กรุงเทพฯ 10530

บทคัดย่อ: Mast cell tumor เป็นเนื้องอกที่พบได้บ่อยในผิวหนังของสุนัข ลักษณะที่ปรากฏและพฤติกรรมของเนื้องอกมีความแปรผันจึงทำให้ยากต่อการรักษา การวินิจฉัย mast cell tumor ด้วยการตรวจเซลล์และลักษณะทางจุลพยาธิวิทยานั้นทำได้โดยการตรวจดูลักษณะรูปร่างและการติดสีของเซลล์เป็นหลัก นอกจากนี้การย้อมเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคฮีสโตเคมีชนิดต่างๆ ยังสามารถให้ข้อมูลในการตรวจวินิจฉัยเพิ่มขึ้นด้วย โดยย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีพิเศษและการทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีของเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจง อย่างไรก็ตามเนื้องอกที่มีพัฒนาการของเซลล์น้อยมากนั้นยังยากต่อการจำแนกชนิดของเซลล์ และมักทำให้เกิดความสับสนกับเนื้องอกในกลุ่ม round cell tumor ชนิดอื่นที่มีรูปร่างคล้ายกัน การวินิจฉัยจึงอาจผิดพลาดได้ เทคนิคทางอิมมูโนฮีสโตเคมีซึ่งใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์หรือตัวบ่งชี้ต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบจึงถูกนำมาใช้เพื่อประกอบการวินิจฉัยและการพยากรณ์โรคเนื้องอก บทความนี้ทบทวนลักษณะ mast cell tumor ในผิวหนังสุนัข รวมทั้งการย้อมเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคฮีสโตเคมีและอิมมูโนฮีสโตเคมีชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยและการพยากรณ์โรค ซึ่งเมื่อนำมาประกอบกับข้อมูลทางคลินิกและตัวบ่งชี้อื่นๆ จะช่วยให้การวินิจฉัยและพยากรณ์โรคมีความแม่นยำมากขึ้น ส่งผลต่อการวางแผนการรักษาและการเฝ้าระวังโรคที่มีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: เนื้องอกชนิดมาสท์เซลล์ ฮีสโตเคมี อิมมูโนฮีสโตเคมี การวินิจฉัยโรค ตัวบ่งชี้การพยากรณ์โรค สุนัข

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2559. 11(2): 159-176.

E-mail address: saraya@mut.ac.th

Canine cutaneous mast cell tumor: diagnosis and prognosis

Araya Suebkhampet[1,#]

[1]Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Bangkok 10530, THAILAND

Abstract: Mast cell tumors are the most common skin tumors of dog. Their appearance and biological behavior are variable, leading to frequent failure in treatment. Most mast cell tumors are routinely diagnosed by cytological and histological examination base on their morphological and staining characteristics. Others histochemical staining can give more information about their specific staining and enzyme activity. However, poorly differentiated mast cell tumors can be confused with other round cell tumors. Misdiagnosis and failure to identify the tumors might be circumstance. Immunohistochemistry has been used as an adjunct in the diagnosis and prognosis of neoplasms, including mast cell tumors. This article reviews the features of canine cutaneous mast cell tumors, as well as various histochemical and immunohistochemical stains used for their capability to diagnosis and prognosis. Together with clinical information and other prognostic indicators, these will support treatment planning and tumor monitoring properly.

Keywords: Mast cell tumor, Histochemistry, Immunohistochemistry, Diagnosis, Prognostic indicator**,** Canine

[#]Corresponding author

E-mail address: saraya@mut.ac.th

J. Mahanakorn Vet. Med. 2016. 11(2): 159-176.

บทนำ

Mast cell จัดเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในร่างกายโดยเฉพาะบริเวณรอบๆ หลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง เส้นประสาท ระบบขับถ่ายปัสสาวะและสืบพันธุ์ ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ และผิวหนัง ซึ่งเป็นบริเวณรอยต่อกับสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกาย (Abraham and Malaviya, 1997; Metcalfe, 1997) ในสุนัขพบมากในผิวหนัง ปอด ระบบทางเดินอาหารและตับ (O' Keefe, 1990) mast cell กำเนิดมาจาก CD34 progenitor cells ในไขกระดูก เมื่อถูกปล่อยจากไขกระดูกออกมาสู่เนื้อเยื่อแล้วจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มวัย (Kitamura and Fujita,1989) เซลล์มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการ

อักเสบ กลไกการป้องกันตัวของร่างกายโดยเฉพาะการแพ้ (allergy) และภาวะภูมิแพ้ (anaphylaxis) ซึ่งภาวะดังกล่าวเกิดจากฤทธิ์ของสารที่บรรจุอยู่ในแกรนูลของ mast cell ได้แก่ ฮีสตามีน เฮปาริน ซีโรโทนิน proteases ไซโตไคน์ eosinophilic chemotactic factor และ เมตาโบไลท์ของ arachidonic acid (Prussin and Metcalfe, 2003) เซลล์จะถูกกระตุ้นให้หลั่งสารจากปัจจัยต่างๆ อาทิ ความร้อน บาดแผล สารพิษ หรือกลไกในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น การจับกันระหว่าง antigen-specific IgE กับ IgE receptor ที่ผิวของ mast cell เป็นต้น (Beaven and Metzger, 1993) เมื่อย้อม mast cell ด้วยสี Romanowsky หรือ Toluidine blue แกรนูลของเซลล์จะติดสีม่วง (metachromasia) เนื่องจากปฏิกิริยาของสีที่เข้าไปจับกับเฮปารินซึ่งเป็น proteoglycan ที่พบมากในแกรนูลของ mast cell (Huntley, 1992; **Bancroft and Gamble, 2008**) mast cell ในสุนัขแบ่งเป็น 3 ชนิดย่อย ตามเอ็นไซม์ chymase และ tryptase ซึ่งพบจำเพาะในแกรนูลของ mast cell เท่านั้น ได้แก่ ชนิดที่แกรนูลบรรจุ chymase เพียงอย่างเดียว ชนิดที่แกรนูลบรรจุ tryptase เพียงอย่างเดียว และชนิดที่แกรนูลบรรจุทั้ง chymase และ tryptase ซึ่ง mast cell ชนิดสุดท้ายนั้นพบบ่อยที่สุดในผิวหนังสุนัข (Kube et al., 1998) โดยบทบาทของ chymase และ tryptase นั้นเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) ของเนื้องอก (de Souza Junior, 2015) ซึ่งมีผลต่อการเติบโตและการพัฒนาของเนื้องอก

Mast cell tumor หรือ mastocytoma จัดอยู่ในกลุ่มของ round cell tumor เป็นเนื้องอกที่พบได้ ประมาณร้อยละ 7-25 ของเนื้องงอกผิวหนังสุนัข และพบได้ทุกตำแหน่งของผิวหนัง อย่างไรก็ตามสามารถพบเนื้องอกชนิดนี้ได้ในลำไส้ ตับ และม้ามด้วย แต่มีอุบัติการณ์ที่น้อยกว่า อีกชนิดหนึ่งคือ mast cell leukemia ซึ่งเป็นกรณีที่พบเกิดขึ้นน้อยมาก (Dorn et al., 1968; Pakhrin et al., 2007) โดยความเสี่ยงของการเกิดเนื้องอกจะเพิ่มขึ้นในสุนัขสูงอายุเฉลี่ยประมาณ 8 ปี นอกจากนี้พันธุ์สุนัขยังเป็นปัจจัยโน้มนำให้เกิดอุบัติการณ์ของเนื้องอกเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งพบได้บ่อยในพันธุ์บ๊อกเซอร์ บอสตันเทอร์เรีย บลูด็อก ลาบราดอร์ โกลเด้นรีทรีฟเวอร์ ชาไป่ ปั๊ก อย่างไรก็ตามเพศของสุนัขไม่มีความเกี่ยวข้องกับอุบัติการณ์ของการเกิดเนื้องอก (Goldschmidt and Shofer, 1992) ลักษณะทางชีววิทยาของโรคเนื้องอก mast cell มีความแปรผันค่อนข้างสูง ราวร้อยละ 50 เป็นชนิดเนื้อร้าย ซึ่งอัตราการกลับมาเป็นซ้ำ และ/หรือแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงสูงถึงร้อยละ 80 (Simoes et al.,1994) mast cell tumor อาจเป็นสาเหตุให้สัตว์เสียชีวิตได้เนื่องจากความผิดปกติอันเป็นผลกระทบจากปฏิกิริยาของเนื้องอก (paraneoplastic disorder) ได้แก่ ภาวะภูมิแพ้แบบ anaphylaxis หรือเกิดแผลหลุมและแผลทะลุในกระเพาะอาหารและลำไส้ ซึ่งผลต่อระบบทางเดินอาหารพบได้ถึงร้อยละ 80 ของสุนัขที่เป็น mast cell tumor ซึ่งเกิดจากฤทธิ์ของฮิสตามีนที่หลั่งมาจากเซลล์เนื้องอก (Howard et al.,1969) อย่างไรก็ตามอาการรุนแรงที่อาจทำให้ถึงแก่ชีวิตนั้นมักพบในรายที่เป็นเนื้อร้าย ลักษณะของ mast cell tumor ที่ผิวหนังเริ่มต้นมักพบเป็นก้อนเดี่ยว ค่อนข้างนุ่ม มักไม่แข็งเป็นไตและยึดติดแน่น low-grade tumor มีการเจริญเติบโตช้า หากทิ้งไว้นานอาจพัฒนาเป็นเนื้องอกที่มีความร้ายแรงมากขึ้น อาจพบแผลหลุมร่วมกับการอักเสบบวมแดงของเนื้องอกและเนื้อเยื่อบริเวณ

รอบๆ หากเป็นระยะที่มีแพร่การกระจายแล้ว ก้อนเนื้องอกจะโตเร็วและขนาดใหญ่ขึ้น มีขอบเขตไม่ชัดเจน อาจพบตุ่มเล็กๆ กระจายที่ผิวหนังรอบๆ ก้อนเนื้องอกขนาดใหญ่ บางรายพบมีเลือดไหลออกมาจากก้อนเนื้อเหล่านั้น (Dobson and Scase, 2007) การรักษาโดยการผ่าตัดโดยทั่วไปจะต้องตัดห่างจากก้อนเนื้ออย่างน้อย 3 เซนติเมตร และพิจารณารักษาด้วยเคมีบำบัด หรือฉายรังสีร่วมด้วย ในกรณีที่การพยากรณ์โรคไม่ดี (Misdrop, 2004)

การวินิจฉัย mast cell tumor ที่ผิวหนังสุนัขนั้นนอกจากการตรวจร่างกายทางคลินิกแล้ว ยังต้องอาศัยการตรวจเซลล์หรือเนื้อเยื่อทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย เพื่อวินิจฉัยแยกจากเนื้องอกผิวหนังชนิดอื่นโดยเฉพาะเนื้องอกในกลุ่ม round cell tumor อาทิ lymphoma, plasmacytoma, melanoma, histiocytoma และ transmission venereal tumor (TVT) ซึ่งมีรูปร่างของเซลล์คล้ายคลึงกัน (Duncan and Prasse, 1979) และช่วยในการแยกกลุ่มของเนื้องอกว่าเป็นเนื้องอกธรรมดา (benign tumor) หรือเนื้องอกร้าย (malignant tumor) ซึ่งเรียกอีกอย่างหนึ่งว่ามะเร็ง (cancer) ผลการตรวจดังกล่าวมีความสำคัญต่อการวางแผนการรักษาและการพยากรณ์โรค เพื่อประกอบการตัดสินใจของนายสัตวแพทย์ผู้ทำการรักษาในการเลือกแนวทางการรักษาที่เหมาะสม การตรวจวินิจฉัยเซลล์หรือเนื้อเยื่อทางห้องปฏิบัติการในเบื้องต้นมี 2 วิธี ได้แก่ การตรวจทางเซลล์วิทยา (cytological examination) และการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological examination) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน แต่วิธีการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาจะให้ข้อมูลในการวินิจฉัยที่สมบูรณ์มากกว่า สามารถพยากรณ์โรคและตรวจการแพร่กระจายของเนื้องอกได้ อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยโรคเนื้องอกต่างๆ โดยอาศัยการตรวจทั้ง 2 วิธีดังกล่าว รวมทั้งการย้อมสีพิเศษ (special stain) ในบางกรณีก็ไม่สามารถจำแนกชนิดของเซลล์ได้อย่างแน่ชัด เช่น เนื้องอกที่มีพัฒนาการต่ำ (poorly differentiated tumor) เป็นต้น จึงได้มีการใช้เทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมี (immunohistochemistry) มาช่วยในการตรวจวินิจฉัย โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเซลล์เนื้องอก นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบตัวบ่งชี้ (indicator) ในการพยากรณ์โรคได้ด้วย บทความนี้ได้ทบทวนแนวทางการวินิจฉัยและการพยากรณ์โรค mast cell tumor ในผิวหนังสุนัขที่มีการใช้ในปัจจุบัน

พยาธิกำเนิดของ mast cell tumor

สาเหตุของการเกิด mast cell tumor ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อาจเกิดจากสาเหตุหลายอย่างร่วมกัน (multi-factorial) เช่นเดียวกับการเกิดเนื้องอกชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามมีข้อมูลสนับสนุนว่าพันธุกรรมมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด mast cell tumor (Dobson and Scase, 2007) จากการศึกษาโดย London *et al.* (1996) พบว่า stem cell factor receptor (KIT) มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิด mast cell tumor ในสุนัข KIT จัดเป็น surface growth factor receptor ที่ปรากฏอยู่บน haematopoietic cell และ mast cell ซึ่งถอดรหัสมาจาก proto-oncogene *c-kit* (Galli *et al*., 1994) โมเลกุลประกอบด้วย extracellular ligand-binding, transmembrane region และ cytoplasmic tail ซึ่งมี tyrosine kinase activity การกระตุ้น KIT signal transduction pathway ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวน การเจริญเต็มวัย

(maturation) การเคลื่อนตัว (migration) และการอยู่รอดของ haematopoietic stem cells และ mast cell (Linnekin *et al.*, 1997; Serve *et al.,* 1995) ลิแกนต์ของ KIT คือ stem cell factor เป็นที่รู้จักในนาม steel factor หรือ mast cell growth factor (Nocka *et al.,* 1990) จากการศึกษาโดยนักวิจัยหลายท่านพบการแสดงออก (expression) ของ KIT ทั้งใน mast cell ปกติและ mast cell tumor ของสุนัข แต่จะพบมากขึ้นใน mast cell tumor ชนิด poorly differentiated (London *et al*., 1996; Morini *et al*., 2004; Webster *et al*., 2006a; Kiupel *et al*., 2004) การแสดงออกของ KIT ใน mast cell ปกติ และ mast cell tumor ในสุนัขที่มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของ *c-kit* นั้นมีความแตกต่างกัน โดยจะพบการแสดงออกของ KIT บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และในไซโทพลาซึม ตามลำดับ โดยการแสดงออกของ KIT ในไซโทพลาซึมนั้นพบว่ามีสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคทางคลินิกต่ำ (Webster *et al*., 2007) มีรายงานการศึกษาต่างๆ แสดงให้เห็นว่า mast cell tumor ในสุนัขที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ *c-kit* พบประมาณร้อยละ 15 ถึง 40 และมีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญกับการเป็นเนื้องอกที่มีความร้ายแรงมากขึ้น การกลายพันธุ์เกิดได้หลากหลายรูปแบบโดยเฉพาะที่ axon 11 รวมทั้ง point mutation ต่างๆ และ tandem duplication ในบริเวณ juxtamembrane coding region (Downing *et al*., 2002; Zemke *et al*., 2002; Jones *et al*., 2004; Riva *et al*., 2005; Webster *et al*., 2006b) แต่ไม่พบที่บริเวณอื่น ซึ่งต่างจากในเนื้องอก mast cell ในคนที่มักพบการกลายพันธุ์ที่ c-kit kinase region (Furitsu *et al*., 1993) จากการศึกษาโดย Gleixner *et al*. (2007) ซึ่งทดสอบใช้ยาที่ออกฤทธิ์เฉพาะต่อ KIT tyrosine receptor ต่อเซลล์ไลน์ของ mast cell tumor ของสุนัขและ mast cell จากเนื้องอก พบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ทดสอบได้ แม้ว่า mast cell tumor มากกว่าร้อยละ 60 ที่นำมาศึกษาดังกล่าวได้รับการพิสูจน์แล้วว่าไม่มีการกลายพันธุ์ของ *c-kit* แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของ *c-kit* มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญหรือพัฒนาของเนื้องอก mast cell เพียงบางส่วน แต่การกลายพันธุ์ของยีนในส่วนอื่นๆ มีแนวโน้มว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเริ่มต้น (initiation) และการพัฒนาของ mast cell tumor ส่วนใหญ่ (Welle *et al*., 2008)

การตรวจทางเซลล์วิทยา

การตรวจทางเซลล์วิทยาเป็นการตรวจวินิจฉัยในเบื้องต้น โดยการเก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อนเนื้องอกด้วยการเจาะดูด (fine-needle aspirates: FNAs) หรือกดส่วนของก้อนเนื้องอกลงบนแผ่นสไลด์นำมาตรึงสภาพและย้อมสีเพื่อตรวจทางเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด และมีความปลอดภัยสามารถวินิจฉัยเซลล์ที่มีเอกลักษณ์ได้ สีที่ใช้ย้อม mast cell มีหลายชนิด เช่น Toluidine blue สีในกลุ่ม Romanowsky-type stain หรือ New methylene blue

Toluidine blue เป็นสีย้อมในกลุ่ม thiazine ซึ่งมีคุณสมบัติไปจับเฉพาะกับส่วนประกอบของเนื้อเยื่อที่เป็นกรด ได้แก่ ซัลเฟต คาร์บอกซิเลท phosphate radical ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ (Epstein *et al*., 1992) จัดเป็นสีที่เป็นตัวเลือกที่ดีในการตรวจวินิจฉัย mast cell โดยแกรนูลของ mast cell ย้อมติดสีน้ำเงินในเนื้องอกที่มีพัฒนาการใกล้เคียงกับเซลล์ปกติ (well-differentiated

tumor) ส่วนแกรนูลขนาดเล็กละเอียดซึ่งมักพบในเซลล์ของ mast cell tumor ในเกรดที่สูงขึ้นย้อมติดสีม่วง (Simoes and Schoning, 1994) มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบการย้อมสี 4 ชนิดเพื่อตรวจหา mast cell ซึ่งเก็บจาก bronchoalveolar lavage fluid ของม้าซึ่งเป็นโรคระบบทางเดินหายใจ พบว่าบางครั้งสี toluidine blue ย้อมติดสีม่วงในส่วนของแกรนูลในแมคโครฟาจได้ด้วยซึ่งอาจทำให้วินิจฉัยผิดพลาดได้ อย่างไรก็ตามสามารถแยกความแตกต่างของเซลล์ได้โดยแกรนูลของเซลล์แมคโครฟาจจะมีขนาดใหญ่กว่าและพบแวคิวโอลในไซโทพลาซึม (Leclere *et al*., 2006)

สีย้อมในกลุ่ม Romanowsky-type stain มีหลายชนิด ได้แก่ Wright's stain, Giemsa's stain, Wright-Giemsa stain, Wright-Leishman stain, May-Grünwald Giemsa stain และ Diff-Quick เป็นต้น ซึ่งจะย้อมติดแกรนูลของ mast cell เป็นม่วงน้ำเงินหรือม่วง (O'Keefe, 1990) mast cell ที่ตรวจทางเซลล์วิทยาส่วนใหญ่สามารถวินิจฉัยได้ไม่ยากนักโดยเซลล์มีรูปร่างกลม ไซโทพลาซึมปริมาณปานกลาง แกรนูลที่ย้อมติดสีมีจำนวนและขนาดต่างๆ กัน นิวเคลียสกลม บางครั้งนิวเคลียสอาจถูกบดบังด้วยแกรนูลซึ่งติดสีเข้ม อาจพบเซลล์ชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น อีโอซิโนฟิล นิวโทรฟิว ลิมโฟไซต์ หรือเซลล์รูปกระสวยซึ่งอาจเป็นไฟโบรบลาส อย่างไรก็ตามพบว่ามี mast cell บางส่วนที่แกรนูลย้อมไม่ติดสี Diff-Quick ซึ่งอาจพบได้ในการย้อมเซลล์เนื้องอกที่มีพัฒนาการต่ำ เซลล์มีแกรนูลปริมาณไม่มาก กรณีนี้ควรเพิ่มเวลาในการตรึงสภาพเซลล์ หรือใช้สี Giemsa, Wright-Giemsa stain หรือ Toluidine blue ในการย้อมเซลล์แทนซึ่งให้ผลการย้อมแกรนูลที่เห็นได้ชัดเจนมากขึ้น (London and Segun, 2003) นอกจากสีดังกล่าวแล้วยังมีสีชนิดอื่นๆ เช่น Panoptic stain ซึ่งมีส่วนผสมของ Romanowsky stain (azure B) กับสีย้อมตัวอื่น ได้แก่ hematoxylin และ phloxine B ซึ่งช่วยปรับปรุงการติดสีแกรนูลในไซโตพลาสซึมและส่วนประกอบอื่นๆ ของเซลล์ให้ดีขึ้น มีวิธีการย้อมที่ทำได้รวดเร็วและราคาถูก (Kurz and Wittekind, 2001) แกรนูลของ mast cell ย้อมติดสีม่วง (metachromasia) เมื่อย้อมด้วยสีชนิดนี้ (Strefezzi et al., 2009) การใช้สีในกลุ่ม Romanowsky-type stain มีข้อได้เปรียบตรงที่สีย้อมติดเซลล์เม็ดเลือดในตัวอย่างด้วยซึ่งจะช่วยในการแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดเพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการตรวจวินิจฉัย นอกจากนี้ยังมีสีและวิธีการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทางฮีสโตเคมีอีกหลายชนิด ดังสรุปไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการทำสอบได้ การติดสีส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับปริมาณเฮปารินหรือสารประกอบ glycosminoglycans (GAGs) ชนิดอื่นๆ (Walls *et al*., 1990) รวมทั้ง esterase เอ็นไซม์ที่บรรจุอยู่ภายในแกรนูลของ mast cell (Leader, 1979) จากการศึกษาโดย Simoes and Schoning (1994) พบว่าการย้อมเนื้อเยื่อ mast cell tumor ด้วย toluidine blue, Luna's method, alcian blue, Safarin O, Unna's method และ Geimsa ให้ผลการติดสีดีใน mast cell ปกติและ mast cell ที่มีพัฒนาการใกล้เคียงเซลล์ปกติ

การตรวจวินิจฉัยเนื้องอกทางเซลล์วิทยานั้นหากไม่พบเซลล์เนื้องอกก็ไม่อาจสรุปว่าสัตว์ป่วยไม่เป็นเนื้องอกเพราะตัวอย่างเซลล์ที่เก็บมานั้นอาจไม่ได้เก็บเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย ซึ่งขึ้นกับตำแหน่งและวิธีการเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ต้องใช้ความชำนาญและประสบการณ์ของผู้ตรวจในการจำแนกชนิดของเซลล์ด้วย การตรวจทางเซลล์วิทยาส่วนใหญ่สามารถ

วินิจฉัยโรค mast cell tumor ในสุนัขได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการประเมินการรักษาในเบื้องต้น จากการศึกษาย้อนหลังโดย Duncan and Prasse (1979) พบว่าผลการตรวจวินิจฉัย mast cell tumor ด้วยเซลล์วิทยาและจุลพยาธิวิทยานั้นมีความสอดคล้องกันค่อนข้างมากคิดเป็นร้อยละ 94 ของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา การตรวจทางเซลล์วิทยานั้นควรทำก่อนการผ่าตัดเนื้องอกผิวหนังในครั้งแรก เพื่อช่วยในการประเมินความกว้างของแผลผ่าตัดให้เหมาะสมกับเกรดของเนื้องอกในเบื้องต้น แม้ว่าในบางกรณีวิธีนี้จะสามารถระบุ degree of differentiation ของเนื้องอกได้ แต่ไม่สามารถบอกความรุนแรงหรือเกรดของมะเร็งได้ครอบคลุม ดังนั้นควรส่งตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาควบคู่ไปด้วย (Dobson and Scase, 2007)

ตารางที่ 1 ชนิดสีย้อม mast cell และผลการติดสีแกรนูล

สีย้อมหรือปฏิกิริยาเคมี	**ผลลัพธ์**
Toluidine blue	สีน้ำเงินหรือสีม่วง
Romanowsky-type stain (Wright's stain, Giemsa's stain, Wright-Giemsa stain, Wright-Leishman stain, May-Grünwald Giemsa stain และ Diff-Quick)	สีน้ำเงิน-ม่วงน้ำเงิน-ม่วง
Alcian blue	เขียวอมน้ำเงิน (bluish-green)
Azure A	สีแดง
Panoptic stain	สีม่วง
Thionine	สีน้ำเงินหรือสีแดง
Csaba's alcian blue safranin	สีม่วง-แดง
Aldehyde fuchsin	สีเหลือง-น้ำตาล
PAS	ไม่แน่นอน (variable)
Luna's method	สีม่วง
Unna's method	สีน้ำเงินเข้มหรือสีม่วงเข้ม
Safranin O	สีน้ำตาลแดง (brick red)
Chloracetate esterase reaction (fast blue RR)	สีน้ำเงินเข้ม
Chloracetate esterase reaction (pararosanilin)	สีชมพูเข้ม-แดง
Avidin peroxidase	สีส้มแดง
WGA, Con-A	สีแดง-ส้ม

ที่มา: Bancroft and Gamble, 2008; Kurz and Wittekind, 2001; Simoes and Schoning, 1994.

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาเป็นวิธีที่สามารถบอกระดับความรุนแรงของเนื้องอกได้โดยดูจากพัฒนาการของเซลล์ (cellular differentiation) การวินิจฉัย mast cell tumor ทางจุลพยาธิวิทยาในผิวหนังสุนัขส่วนใหญ่มักไม่ซับซ้อน เนื้องอกเป็นชนิดที่ไม่มีแคปซูลหุ้มแทรกอยู่ในชั้นหนังแท้ (dermis) หรือชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) รูปร่างของเซลล์เนื้องอกขึ้นกับระดับพัฒนาการของเซลล์ อย่างไรก็ตามเซลล์เนื้องอกส่วนใหญ่มักมีขอบเขตชัดเจน นิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์ แต่ละเซลล์บรรจุแกรนูลในปริมาณที่แตกต่างกัน เซลล์ที่มีพัฒนาการใกล้เคียงกับเซลล์ปกติพบว่าแกรนูลติดสีม่วง (basophilic) ส่วนเซลล์ในระยะ intermediate หรือ มีพัฒนาการน้อยแกรนูลจะติดสีจางลง เมื่อย้อมด้วย hematoxylin และ eosin (Simoes and Schoning, 1994) เมื่อย้อมด้วย toluidine blue จะติดสีคล้ายกับที่ได้กล่าวมาแล้วในการย้อมด้วยวิธีเซลล์วินิจฉัย อาจพบเส้นใยคอลลาเจนในสโตรมา (stroma) ปริมาณน้อยจนถึงมาก บางครั้งอาจพบการบวมน้ำหรือ hyalinization ของคอลลาเจน จำนวนอีโอซิโนฟิลที่พบผันแปรในแต่ละเนื้องอกซึ่งอาจพบกระจายทั่วไปหรืออยู่รวมกลุ่ม การจำแนก mast cell tumor ตามเกณฑ์ของ Patnaik *et al*. (1984) ได้แก่ เกรด I (well-differentiated tumor) เซลล์มีพัฒนาการใกล้เคียงกับเซลล์ปกติ เกรด II (moderately-differentiated tumor เซลล์มีพัฒนาการบางส่วนต่างจากเซลล์ปกติ และเกรด III (poorly-differentiated tumor) เซลล์ส่วนใหญ่มีพัฒนาการต่ำ (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถใช้เกณฑ์นี้เป็นบรรทัดฐานในการแบ่งระยะของ mast cell tumor ทางจุลพยาธิวิทยาได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากการแบ่งเกรดเนื้องอกตามเกณฑ์ดังกล่าวมาจากการศึกษาย้อนหลังซึ่งมีจำนวนกลุ่มตัวอย่างไม่มากนัก นอกจากนี้มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่านักพยาธิวิทยาอาจให้การวินิจฉัยที่แตกต่างกันจากการตรวจเนื้องอกเดียวกันด้วยเกณฑ์เดียวกันขึ้นกับประสบการณ์ของแต่ละบุคคลซึ่งมักเกิดในกรณีวินิจฉัยเนื้องอกเกรด II (Northrup *et al.*, 2005; Strefezzi *et al.*, 2003; Kiupel *et al.*, 2005) นอกจากนี้ mast cell tumor เกรด III ซึ่งยากต่อการจำแนกชนิดของเซลล์ หรือการตรึงสภาพเนื้อเยื่อที่ไม่ดีพออาจทำให้เกิดความสับสนต่อการวินิจฉัยแยกจาก round cell tumor ชนิดอื่น (Jackson, 1994) การย้อมเนื้อเยื่อ mast cell tumor ด้วยสีย้อมพิเศษให้ผลการย้อมที่ชัดเจนในกลุ่มเซลล์มีพัฒนาการใกล้เคียงกับเซลล์ปกติแต่ไม่สามารถใช้ได้ในกรณีที่เซลล์ส่วนใหญ่มีพัฒนาการต่ำ ซึ่งผลการย้อมมักติดสีจางลงหรือไม่ติดสีเลย (Simoes and Schoning, 1994) เนื่องจากเนื้องอกดังกล่าวมีสารในแกรนูลปริมาณน้อยหรือไม่พบเลย สารที่เป็นองค์ประกอบหลักในแกรนูลคือเฮปารินซึ่งมักเป็นตัวทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสีย้อมโดยส่วนใหญ่ (Walls *et al*., 1990) จากข้อจำกัดดังกล่าวจึงได้มีการใช้เทคนิคทางอิมมูโนฮีสโตเคมีเข้ามาประกอบในการยืนยันการตรวจวินิจฉัย mast cell tumor รวมถึงการพยากรณ์โรค แนวโน้มการตอบสนองต่อการรักษา และพฤติกรรมของเนื้องอก (Fernandez *et al.*, 2005)

ตารางที่ 2 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ mast cell tumor ตามเกณฑ์ของ Patnaik *et al*. (1984)

ลักษณะที่พบ	เกรด I	เกรด II	เกรด III
ตำแหน่งที่พบ	ชั้นหนังแท้	ชั้นหนังแท้ และชั้นใต้ผิวหนัง	ชั้นหนังแท้ ชั้นใต้ผิวหนัง และเนื้อเยื่อข้างเคียง
ความหนาแน่น	น้อย	ปานกลาง – มาก	มาก
การกระจายตัวของเซลล์	เซลล์เรียงเป็นแถว หรือเป็นกลุ่มเล็กๆ อยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจน ขอบเขตเนื้องอกค่อนข้างชัด	เซลล์รวมเป็นกลุ่มอยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจน ขอบเขตเนื้องอกไม่ค่อยชัดเจน อาจพบการบวมน้ำหรือ hyalinization ของคอลลาเจน	เซลล์เรียงเป็นแผ่นอยู่รวมกันจำนวนมาก ขอบเขตเนื้องอกไม่ชัดเจน พบการบวมน้ำหรือ hyalinization ของคอลลาเจน พบการบวมน้ำเลือดออก และเซลล์ตาย อาจพบแผลหลุม
ภาวะหลากรูป (pleomorphism)	ต่ำ	ปานกลาง	สูง
รูปร่างเซลล์	รูปร่างกลม เห็นขอบเซลล์ชัดเจน แกรนูลในไซโทพลาซึมมีขนาดกลาง เซลล์เนื้องอกส่วนใหญ่มีรูปร่างแบบเดียวกัน	รูปร่างกลม หรือรี เซลล์ส่วนใหญ่ยังเห็นขอบเขตชัดเจน แกรนูลในไซโทพลาซึมเล็กละเอียด อาจไม่พบแกรนูลในบางเซลล์ เซลล์รูปกระสวย และ giant mast cell กระจัดกระจาย	รูปร่างหลากหลาย มีขนาดกลาง เซลล์กลม รี รูปกระสวย และ giant mast cell เห็นขอบเซลล์ไม่ชัดเจน แกรนูลในไซโทพลาซึมเล็กละเอียดมีปริมาณน้อยหรือไม่พบแกรนูลเลย
นิวเคลียส และ นิวคลีโอลัส	นิวเคลียสกลม มีโครมาทินอยู่กันแน่น ไม่พบนิวคลีโอลัส	นิวเคลียสกลมหรือเป็นรอยหยัก โครมาทินกระจายตัว พบนิวคลีโอลัส 1 อัน บางเซลล์มี 2 นิวเคลียส	นิวเคลียสเป็นรอยหยัก ลักษณะใสคล้ายถุงน้ำ (vesiculated nuclei) โครมาทินกระจายตัว พบนิวคลีโอลัส 1-2 อัน พบเซลล์ 2 นิวเคลียส หรือหลายนิวเคลียสกระจายในเนื้องอก
Giant mast cell	พบน้อยมากหรือไม่พบเลย	พบกระจาย	พบจำนวนมาก
การบวมน้ำและเนื้อตาย	พบน้อย	พบกระจาย	พบทั่วไป
Mitosis/HPF	ไม่พบ	0-2	3-6

อิมมูโนฮีสโตเคมี

อิมมูโนฮีสโตเคมีเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้เพื่อประกอบการตรวจวินิจฉัยและการพยากรณ์โรคเนื้องอกชนิดต่างๆ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแอนติเจนของเซลล์ หรือตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคเป็นตัวทดสอบ จากการศึกษาโดย Kiupel *et al*. (2004) พบว่า anti-KIT และ anti-tryptase หรือ anti-chymase ช่วยในการวินิจฉัย mast cell

tumor เกรด III ได้ สอดคล้องกับการศึกษาโดย Fernandez *et al*. (2005) ซึ่งรายงานว่าการทดสอบด้วย anti-tryptase และ chymase activity สามารถนำมาใช้ร่วมกันในการวินิจฉัย mast cell tumor โดยพบว่า mast cell tumor จะให้ผลบวกทั้ง tryptase antigen และ chymase activity ซึ่งบ่งบอกได้ว่าทั้ง 2 วิธีนี้มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน และผลการทดสอบทั้ง 2 วิธีดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผลตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในระดับดีถึงดีเยี่ยม (kappa 0.56-1.00 ที่ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95) กล่าวคือให้ผลบวกต่อการทดสอบ mast cell เกรด I, II และ III เท่ากับร้อยเปอร์เซ็นต์ (7/7) ร้อยละ 85.7 (6/7) และร้อยละ 42.9 (3/7) ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังมี mast cell tumor เกรด II และ III บางส่วนซึ่งให้ผลลบต่อการทดสอบนี้ ซึ่งกลุ่มผู้วิจัยสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากความผิดพลาดบางประการในการทดสอบหรือผลการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาที่นำมาเปรียบเทียบนั้นอาจมีความคลาดเคลื่อน และเป็นไปได้ว่า mast cell ที่ให้ผลลบดังกล่าวอาจยังอยู่ในระยะที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงจึงมีการสร้างสารดังกล่าวสะสมในแกรนูลในปริมาณไม่มากพอต่อการทดสอบ กรณีดังกล่าวจึงควรติดตามข้อมูลทางคลินิกร่วมด้วยเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัย นอกจากนี้การศึกษาดังกล่าวยังพบว่ามี mast cell tumor เกรด III จำนวน 1 ตัวอย่าง ให้ผลลบต่อ tryptase antigen และ chymase activity แต่ให้บวกต่อการย้อม toluidine blue (จำเพาะต่อเฮปาริน) ดังนั้นจึงยังไม่สามารถตัดเนื้องอกที่ให้ผลลบต่อการทดสอบด้วยวิธีทั้งสองนี้ออกไปได้ว่าไม่ใช่ mast cell tumor และควรพิจารณาผลการตรวจอื่นๆ มาประกอบกัน อาจต้องใช้แอนติบอดีหลายตัวในการทดสอบแล้วตัด poorly differentiated ของ round cell tumor ชนิดอื่นออกไปซึ่งเป็นวิธีพิสูจน์ทางอ้อม

รายงานการศึกษาต่างๆ แสดงให้เห็นว่า mast cell tumor ในสุนัขที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ *c-kit* (proto-oncogene) มีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญกับการเป็นเนื้องอกในเกรดที่สูงขึ้น (Downing *et al*., 2002; Zemke *et al*., 2002; Webster *et al*., 2006b) และการกลายพันธุ์ดังกล่าวทำให้การแสดงออกของ KIT ซึ่งเป็น stem cell factor receptor เบี่ยงเบนไป โดยใน mast cell ปกติพบการแสดงออกของ KIT บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ แต่ mast cell ของเนื้องอกที่กลายพันธุ์นั้นพบการแสดงออกของ KIT ในไซโทพลาซึม โดยเฉพาะบริเวณรอบๆ นิวเคลียส (Webster *et al*., 2006a) เนื่องจากการการแบ่งเกรดเนื้องอกตามเกณฑ์ของ Patnaik *et al*. (1984) อาจมีความแตกต่างกันระหว่างนักพยาธิวิทยาแต่ละคนดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาเกณฑ์ขึ้นใหม่โดย Kiupel *et al*. (2011) ซึ่งแบ่งประเภทการพยากรณ์โรค mast cell tumor ตามรูปแบบการแสดงออกของ KIT ที่ปรากฏใน mast cell เป็น 3 แบบ ได้แก่ พบที่เยื่อหุ้มเซลล์ พบกระจายในไซโทพลาซึม และพบรวมกันในบางจุดในไซโทพลาซึม ซึ่งรูปแบบการแสดงออกของ KIT นี้มีความสัมพันธ์กันกับความรุนแรงของเนื้องอก โดยเนื้องอกที่พบการกระจายตัวของ KIT ในไซโทพลาซึมมีการพยากรณ์โรคไม่ดี (Webster *et al*., 2004) ดังนั้นการใช้เทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมีมาตรวจสอบการแสดงออกของ KIT ที่เบี่ยงเบนไปจากปกติจึงเป็นแนวทางเสริมในการวินิจฉัย mast cell tumor เกรด II และ III ได้

เนื่องจากเนื้องอกเกิดจากการแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ จึงได้มีการทดสอบเพื่อประเมิน

การเพิ่มจำนวนของเซลล์ แล้วนำข้อมูลมาใช้ในการพยากรณ์พฤติกรรมของเนื้องอกชนิดต่างๆ กันอย่างกว้างขวาง (Welle *et al*., 2008) ในทางสัตวแพทย์วิธีการทดสอบที่ใช้โดยทั่วไป ได้แก่ การย้อม argyrophilic nucleolar organizing region (AgNORs) การย้อมอิมมูโนฮีสโตเคมีของ proliferating cell nuclear antigen (PCNA) และ Ki67 ซึ่งมีการศึกษาตัวบ่งชี้ดังกล่าวใน mast cell tumor ของสุนัขเช่นกัน (Welle *et al*., 2008; Roels *et al*., 1999)

AgNORs เป็นบริเวณในนิวเคลียสที่เป็นที่จับกับโปรตีน เช่น nucleolin และ nucleoplasmin ซึ่งเกี่ยวข้องกับการถอดรหัสของ ribosomal RNA (Derenzini, 2003) มักใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับ tumor kinetic และ metabolic activity โดยบริเวณ AgNORs สามารถจับกับโมเลกุลของเงิน (silver) ซึ่งมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อย้อมเนื้อเยื่อด้วย silver-based histochemical stain จำนวนของ AgNORs ต่อนิวเคลียสเป็นสัดส่วนกับอัตราการเจริญเติบโตของเนื้องอก (Ogura *et al*., 1992; Trere *et al*., 1997) และจำนวนที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับอัตราการตาย การกลับมาเกิดซ้ำและการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่น (Simoes *et al*., 1994; Scase *et al*., 2006)

PCNA เป็นหน่วยย่อยของ DNA polymerase ซึ่งเป็นปัจจัยช่วยในขบวนการ replication และการซ่อมแซม DNA และใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรค การปรากฏของ PCNA มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายของสุนัขที่เป็น mast cell tumor ที่ผิวหนัง (Simoes *et al*., 1994; Scase *et al*., 2006)

Ki67 เป็นโปรตีนในนิวเคลียสที่พบปรากฏในระหว่าง active phase ในวัฏจักรของเซลล์ Ki67 มีความสัมพันธ์อย่างสูงต่อการพยากรณ์โรค จัดเป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคที่ไม่ขึ้นกับเกรดของเนื้องอก (independent prognostic factor) จึงจัดเป็นตัวบ่งชี้ที่ไม่มีอคติ (objective prognosis) (Scase *et al*., 2006; Webster *et al*., 2007) Ki67 เป็นตัวบ่งชี้เชิงปริมาณที่มีความแม่นยำในการพยากรณ์พฤติกรรมของ mast cell tumor สูงเช่นเดียวกับ AgNORs การแสดงออกของ KIT ในเซลล์ของ mast cell tumor ต่างไปจากเซลล์ปกติ มีความสัมพันธ์กันกับการแสดงออกของ AgNORs และ Ki67 ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของตัวบ่งชี้ทั้ง 3 จึงมีการพยากรณ์โรคไม่ดี ผู้เขียนบางท่านใช้อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ในการแยก mast cell tumor เกรด II เป็น 2 กลุ่มย่อยซึ่งมีความแตกต่างของช่วงเวลารอดชีวิต (survival time) เป็นอย่างมาก (Webster *et al*., 2007) จากข้อมูลที่ได้มีการศึกษากับมาอย่างต่อเนื่องจึงได้มีการแนะนำแนวทางในการวินิจฉัย mast cell tumor ในสัตว์ว่าให้พิจารณาวิเคราะห์โปรตีน Ki67 ร่วมกับตัวบ่งชี้การพยากรณ์โรคตัวอื่น อาทิ เกรดทางจุลพยาธิวิทยาและรูปแบบการแสดงออกของ KITการประเมินการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยใช้อิมมูโนฮีสโตเคมี สามารถนำมาสัมพันธ์กับความไวต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัด เนื่องจากยาเคมีบำบัดมีผลต่อเซลล์ที่มีการแบ่งตัว (Webster *et al*., 2007)

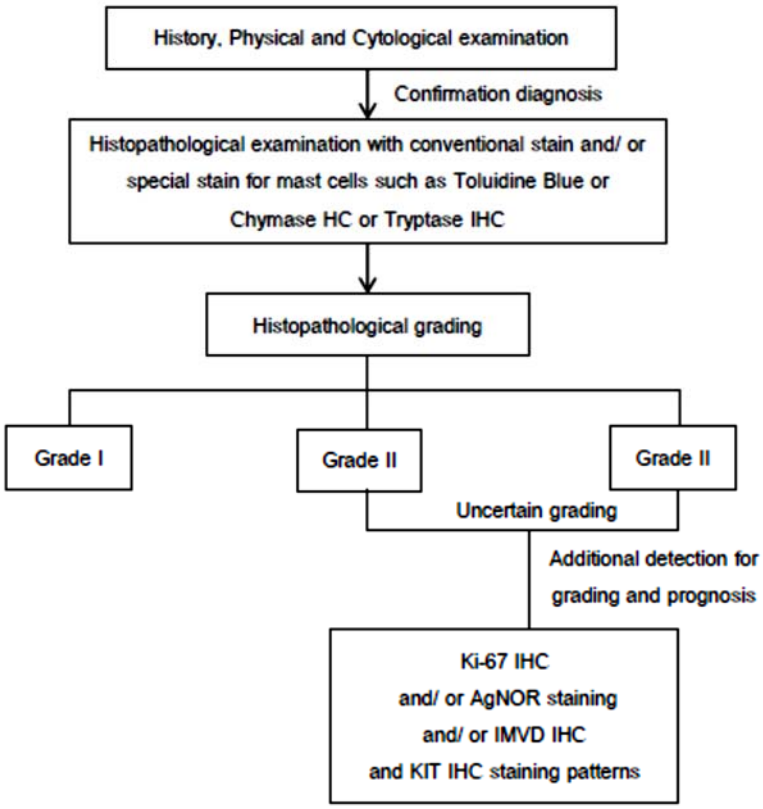
ความหนาแน่นของหลอดเลือดขนาดเล็กในเนื้องอก (Intratumoral microvessel density: IMVD) เป็นตัวบ่งชี้เกี่ยวกับการสร้างหลอดเลือด ซึ่งทดสอบได้โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ von Willebrand factor บนเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด IMVD สามารถนำมาใช้เป็นปัจจัยในการพยากรณ์โรค mast cell tumor ในผิวหนังสุนัขในช่วงหลังการผ่าตัด (Preziosi *et al*., 2004.)

Dos Santos Costa Poggiani *et al*. (2012) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลทางคลินิก การเพิ่มจำนวนเซลล์ (ได้แก่ Ki67 expression และ mitotic index) IMVD และ apoptotic index กับ histological grade และรูปแบบการแสดงออกของ KIT (KIT pattern) ของ mast cell tumor ที่ผิวหนังสุนัข พบว่า histological grade มีความสัมพันธ์กับ IMVD การพบแผลหลุมและจำนวนของเนื้องอก ส่วนการเพิ่มการแสดงออกของ Ki67 และ mitotic index สัมพันธ์กับ KIT staining pattern ที่ปรากฏในไซโทพลาซึม และhistological grade มีความสัมพันธ์กับ mitotic index จากการศึกษาดังกล่าวผู้วิจัยได้เสนอว่าการตรวจวินิจฉัย mast cell tumor ในผิวหนังสุนัขควรประเมินจากผลตรวจ histological grade ร่วมกับตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคตัวอื่นๆ เช่น รูปแบบการแสดงออกของ KIT ที่ปรากฏในไซโทพลาซึม IMVDA การเพิ่มจำนวนเซลล์ การพบแผลหลุมและจำนวนเนื้องอก การกลับมาเป็นซ้ำ และการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น การตรวจสอบตัวบ่งชี้อาทิ Ki67 หรือ KIT staining pattern ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมีอาจเป็นทางเลือกในการพยากรณ์โรคได้เร็วขึ้นในกรณีที่การวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาว่าเป็น mast cell tumor อย่างไรก็ตามอาจมีข้อจำกัดบางประการเนื่องจากอาจไม่ได้เก็บส่วนของเซลล์ที่เป็นเป้าหมายมาตรวจ

ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมีมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงซึ่งในทางปฏิบัติอาจไม่ได้ใช้วิธีนี้ตรวจสอบตัวบ่งชี้ต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วได้ทั้งหมด จึงขึ้นกับดุลยพินิจของนายสัตวแพทย์ในการเลือกวิธีที่เหมาะสม โดยพิจารณาใช้ข้อมูลด้านอื่นประกอบ ได้แก่ ข้อมูลทางคลินิก (พันธุ์ อายุ ตำแหน่งที่พบ ขนาดและจำนวนของเนื้องอก การกลับมาเป็นซ้ำ) เกรดเนื้องอกจากผลตรวจทางจุลพยาธิวิทยา mitotic index การแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น และผลตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ

สรุป

Mast cell tumor ในผิวหนังสุนัขมีลักษณะและพฤติกรรมของเนื้องอกมีความผันแปรค่อนข้างสูง ทำให้ยากต่อการวินิจฉัยและการรักษา การตรวจวินิจฉัยและการพยากรณ์โรคที่แม่นยำย่อมเป็นประโยชน์ต่อการเลือกวิธีการรักษาที่เหมาะสม การวินิจฉัยโดยทั่วไปใช้ข้อมูลประวัติ ผลการตรวจทางคลินิก และลักษณะทางกายภาพของก้อนเนื้องอกร่วมกับการตรวจทางเซลล์วิทยาและจุลพยาธิวิทยาซึ่งจะทำให้ทราบชนิดและเกรดของเนื้องอก การตรวจเพิ่มเติมอื่นๆ เช่น Ki67 expression AgNORs count ค่า IMVD รวมทั้ง KIT และ tryptase staining pattern ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความสัมพันธ์กับ mast cell tumor ที่มีพัฒนาการต่ำ สามารถช่วยวินิจฉัยและพยากรณ์โรคให้มีความแม่นยำมากขึ้น โดยใช้เทคนิคการย้อมเนื้อเยื่อด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี และ/หรือฮีสโตเคมีมาใช้ในการทดสอบ จากข้อมูลข้างต้นจึงสรุปแนวทางในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรค mast cell tumor ในผิวหนังสุนัข ดังแสดงในแผนภาพที่ 1 ทั้งนี้การจะเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นกับความพร้อมของห้องปฏิบัติการ ความชำนาญและประสบการณ์ของบุคลากรที่เกี่ยวข้องในการตรวจวินิจฉัยด้วย การศึกษาวิจัยในอนาคตยังต้องการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับ mast cell tumor ในด้านพฤติกรรมของเนื้องอก กระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ และ multidrug resistance-associated protein ซึ่งอาจนำมาสู่การพยากรณ์พัฒนาการของ



แผนภาพที่ 1 สรุปแนวทางการวินิจฉัยและพยากรณ์โรค mast cell tumor ในผิวหนังสุนัข HC = histochemistry, IHC = immunohistochemistry, IMVD = Intratumoral microvessel density

เนื้องอก หรือการใช้เคมีบำบัดในการรักษาให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. ทนงศักดิ์ มะมม และ อ.น.สพ.ดร.หัสดินทร์ บุญศรีโรจน์ สังกัดภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ที่ให้ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะในการจัดต้นฉบับจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Abraham, S.N. and Malaviya, R. 1997. Mast cells in infection and immunity. *Infect. Immun*. 65: 3501-3508.

Bancroft, J. and Gamble, M. 2008. Theory and Practice of Histological Techniques. 6th ed. Churchill Livingstone/Elsevier, Philadelphia. 725 p.

Beaven, M.A. and Metzger, H. 1993. Signal transduction by Fc receptors: the Fc epsilon RI case. *Immunol. Today* 14(5): 222-226.

De Souza Junior, D.A., Santana, A.C., da Silva, E.Z., Oliver, C. and Jamur, M.C. 2015. The Role of Mast Cell Specific Chymases and Tryptases in Tumor Angiogenesis *Biomed. Res. Int*. 1-13.

Derenzini, M. 2003. The AgNORs. *Micron* 31: 117–120.

Dopson, J.M. and Scase, T.J. 2007. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *J. Small Anim. Pract.* 48: 424-431.

Dorn, C.R., Taylor, D.O., Schneider, R., Hibbard, H.H. and Klauber, M.R. 1968. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa counties, California II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda Country. *J. of the National Cancer Institute* 40: 307-318.

Dos Santos Costa Poggiani, S., Terra, E.M., Neto, R.T., Costa, M.T. and Amorim, R.F. 2012. Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Biologic Behavior and Its Correlation with Prognostic Indicators. *Open J. Vet. Med.* 2: 255-261.

Downing, S. Chien, M.B., Kass, P.H., Moore, P.E. and London, C.A. 2002. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 63: 1718–1723.

Duncan, J.R. and Prasse, K.W. 1979. Cytology of canine cutaneous round cell tumors. *Vet. Pathol.* 16: 673-679.

Epstein, J.B., Scully, C. and Spinelli, J. 1992. Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. J Oral Pathol Med. 21:160–163.

Fernandez, N.J., West, K.H., Jackson, M.L. and Kidney, B.A. 2005. Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. *Vet. Pathol.* 42: 437–445.

Furitsu, T., Tsujimura, T. and Tono, T. 1993. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J. Clin. Invest.* 92: 1736–1744.

Galli, S.J., Zsebo, K.M. and Geissler, E.N. 1994. The kit-ligand, stem-cell factor. *Adv. in Immunol*. 55:1-96.

Gleixner, K.V., Rebuzzi, L., Mayerhofer, M., Gruze, A., Hadzijusufivic, E., Sonneck, K., Vales, A., Kneidinger, M., Samorapoomichit, P., Thaiwong, T., Pickl, W.F., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Sillaber, C., Willmann, M. and Valent, P. 2007. Synergistic antiproliferative effects of KIT tyrosine kinase inhibitors on neoplastic canine mast cells. *Exp. Hematol*. 35: 1510–1521.

Goldschmidt, M.H. and Shofer, F.S. 1992. Skin tumours of the cat and dog. Pergamon press. Oxford, NY, USA. 316p.

Howard, E.B., Sawa, T.R., Nielsen, S.W. and Kenyon, A.J. 1969. Mastocytoma and gastroduodenal ulceration. *Pathol. Vet.* 6:146-158.

Huntley, JF. 1992. Mast cells and basophils: a review of their heterogeneity and function. *J.Comp. Pathol.* 107(4): 349-372.

Jackson, D. 1994. The cytology of the contagious (venereal) tumor of dog. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 20:433-442.

Jones, C.L., Grahn, R.A., Chien, M.B., Lyons, L.A. and London, C.A. 2004. Detection of c-kit mutations in canine mast cell tumors using fluorescent poly acrylamide gel electrophoresis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 95–100.

Kitamura, Y. and Fujita, J. 1989. Regulation of mast cell differentiation. *Bioessays* 10: 193–196.

Kiupel, M., Webster, J.D., Bailey, K.L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C.J., Fitzgerald, S.D., Gamble, D., Ginn, P.E., Goldschmidt,, M.H., Hendrick, M.J., Howerth, E.W., Janovitz, E.B., Langohr, I., Lenz, S.D., Lipscomb, T.P., Miller, M.A., Misdorp, W., Moroff, S., Mullaney, T.P., Neyens, I., O'Toole, D., Ramos-Vara, J., Scase, T.J., Schulman, F.Y., Sledge, D., Smedley, R.C., Smith, K., Snyder, P.W., Southorn, E., Stedman, N.L., Steficek, B.A., Stromberg, P.C., Valli, V.E., Weisbrode, S.E., Yager, J., Heller, J. and Miller, R. 2011. Proposal of a Two-Tier Histologic Grading Sys- tem for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Vet. Pathol*. 48(1) 147-155.

Kiupel, M., Webster, J.D., Kaneene, J.B., Miller, R. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2004. The use of KITand tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 41: 371–377.

Kiupel, M., Webster, J.D., Miller, R.A. and Kaneene, J.B. 2005. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. *J. Vet. Med. A*. 52: 280-286.

Kube, P., Audige, L., Kuther, K. and Welle, M. 1998. Distribution, Density and Heterogeneity of Canine Mast Cells and Influence of Fixation Techniques Histochem. Cell Biol. 110 (2): 129-135.

Kurz, H. and Wittekind, D. 2001. A new panoptic stain for developmental biology - The mouse placenta paradigm. *Annual of Anat.* 183: 437-441.

Leclere, M., Desnoyers, M., Beauchamp, G. and Lavoie, J.P. 2006. Comparison of Four Staining Methods for Detection of Mast Cells in Equine Bronchoalveolar Lavage Fluid. *J. Vet. Intern. Med.* 20:377–381.

Leder, L.D. 1979. The chloroacetate esterase reaction. A usefulmeans of histological diagnosis of hematological disorders

from paraffin sections of the skin. *Anim. J. Dermatopathol.* 1:39-42.

Linnekin, D., DeBerry, C.S and Mou, S. 1997. Lyn associates with the Juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in haemopoietic cell and normal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 272: 27450-27455.

London, C.A., Kisseberth, W.C., Galli, S.J., Geissler, E.N. and Helfand, S.C. 1996 Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine MCTs. *J. Comp. Pathol.* 115: 399-414.

London, C.A. and Segun, B. 2003. Mast cell tumors in the dog. *Vet Clin. North Am. Small An. Pract.* 33: 473-489.

Metcalfe, D.D., Baram, D. and Mekori, Y.A. 1997. Mast cells. *Physiol. Rev*. 77: 1033-1079.

Misdrop, W. 2004. Mast cells and canine mast cell tumuors. *A review Vet. Q.* 26:156-169.

Morini, M., Bettini, G., Preziosi, R. and Mandrioli, L. 2004. C-kit gene product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections. *J. Histochem. Cytochem.* 52: 705–708.

Nocka, K., Buck, J., Levi, E. and Besmer, P. 1990. Candidate ligand for the c-kit transmembrane kinaseb receptor: KL, a fibroblast derived growth factor stimulates mast cells and erythroid progenitors *Embo. J.* 9: 3287-3294.

Northrup, N.C., Howerth, E.W., Harmon, B.G., Brown, C.A., Carmicheal, K.P., Garcia, A.P., Latimer, K.S., Munday, J.S., Rakich, P.M., Richey, L.J., Stedman, N.L. and Gieger, T.L. 2005. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 561-564.

Ogura, S., Abe, S., Sukoh, N, Kunikane, H., Nakajima, I., Inoue, K. and Kawakami, Y. 1992. Correlation between nucleolar organizer regions visualized by silver staining and the growth rate in lung adenocarcinoma. *Cancer* 70: 63–68.

O'Keefe, D.A. 1990. Canine mast cell tumors. *Vet. Clin. N. Am.-Small* 20:1105-1115.

Pakhrin, B., Kang, M.S., Bae, I.H., Park, M.S., You, M.H., Kim, J.H., Yoon, B.I., Choi, Y.K. and Kim, D.Y. 2007. Retrospective study of canine cutaneous tumors in Korea. *J. Vet. Sci.* 8(3): 229-236.

Patnaik, A.K., Ehler, W.J. and Macwem, E.G. 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet. Pathol.* 21: 469-474.

Preziosi, R., Sarli, G. and Paltrinieri, M. 2004. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumours of the dog. *J. Comp Pathol*. 130(2-3): 143-151.

Prussin, C. and Metcalfe, D.D. 2003. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111(2 Suppl): 486-494.

Riva, F., Brizzola, S., Stefanello, D., Crema, S. and Turin, L. 2005. A study of mutations in the c-kit gene of 32 dogs with mastocytoma. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 385–388.

Roels, S., Tilmant, K. and Ducatelle, R. 1999. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *J. Comp. Patholo.* 121: 13–24.

Scase, T.J., Edwards, D., Miller, J. Henley, W., Smith, K., Blunden, A. and Murphy, S. 2006. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J. Vet. Intern Med.* 20: 151-158.

Serve, H., Yee, N.S., Stella, G., Sepplorenzino, L., Tan, J.C. and Besmer, P. 1995. Differential roles of PI3-Kinase and KIT tyrosine-821 in KIT receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *Embo. J.* 14: 473-483.

Simoes, J.P. and Schoning, P. 1994. Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 458-465.

Simoes, J.P., Schoning, P. and Butine, M. 1994. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet. Pathol.* 31: 637-647.

Strefezzi, R.F., Kleeb, S.R., Xavier, J.G. and Catão-Dias J.L. 2009. Prognostic indicators for mast cell tumors. *Braz. J. Vet. Pathol.* 2(2): 110-121.

Strefezzi, R.F.S., Xavier, J.G. and Catao-Dias, J.L. 2003. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 40: 268-275.

Trere, D., Pession, A., Montanaro, L., Chieco, P. and Derenzini, M. 1997. AgNOR protein expression and tumor growth rate of human carcinoma xenografts growing subcutaneously in nude mice. European *J. Histochem*. 41(2): 153–154.

Walls, A.F., Jones, D.B., Williams, J.H., Church, M.K. and Holgate, S.T. 1990. Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. *J Pathol.* 162: 119-126.

Webster, J.D., Kiupel, M., Kaneene, J.B., Miller, R. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2004. The Use of KIT and tryptase epression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors, *Vet. Pathol.* 41(3): 371-377.

Webster, J.D., Kiupel, M. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2006a. Evaluation of the

kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer* 6: 85.

Webster, J.D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Kaneene, J.B., Miller, R., Resau, J.H. and Kiupel, M. 2006b. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 8: 104–111.

Webster, J.D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R.A., Kaneene, J.B. and Kiupel, M. 2007. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet. Pathol*. 44: 298–308.

Welle, M.M., Rohrer, B.C, Howard, J. and Rufenacht, S. 2008. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Vet. Dermatol.* 19: 321-339.

Zemke, D., Yamini, B. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2002. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet. Pathol.* 39: 529–35.

JMVM
JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

ISSN: 1905-7571