

ความสัมพันธ์ระหว่างสารพิษเชื้อราอ็อคราท็อกซินเอตคั่ง
ในไตกับพยาธิสภาพที่ไตของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง



นาย ศุภวัฒน์ โปธิมงคลกุล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข

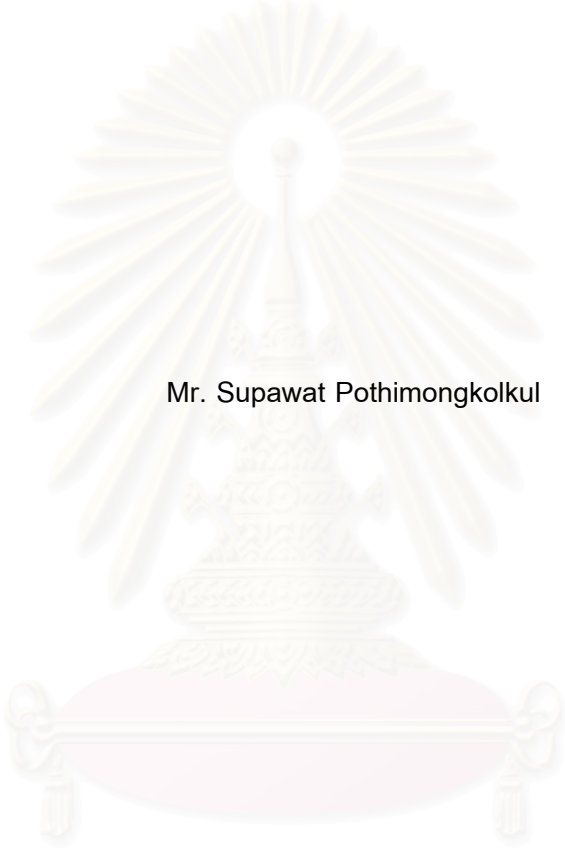
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-2547-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE RELATIONSHIP BETWEEN OCHRATOXIN A RESIDUE IN KIDNEYS AND
NEPHROPATHIC LESIONS IN CANINE CHRONIC RENAL FAILURE



Mr. Supawat Pothimongkolkul

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Public Health

Department of Veterinary Public Health

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

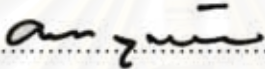
Academic Year 2006

ISBN 974-14-2547-3

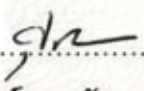
Copyright of Chulalongkorn University

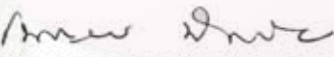
หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างสารพิษเชื้อราอ็อกราท็อกซินเอตคั่ง ในไตกับพยาธิสภาพที่ไตของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง
โดย	นายศุภวัฒน์ โพธิมงคลกุล
สาขาวิชา	สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เบญจมาศ บัทมาลัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. อัจฉริยา ไชละสูต

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.......... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรถนพ คุณาวงษ์กฤต)

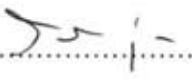
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.......... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ)

.......... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เบญจมาศ บัทมาลัย)

.......... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. อัจฉริยา ไชละสูต)

.......... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุณิสร์ ดำรงค์วัฒนา)

.......... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. รสมา กุศลสุนทรธรรม)

ศุภวัฒน์ โพธิมงคลกุล : ความสัมพันธ์ระหว่างสารพิษเชื้อราอ็อคราท็อกซินเอคคัง ในไตกับพยาธิสภาพที่ไตของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง. (THE RELATIONSHIP BETWEEN OCHRATOXIN A RESIDUE IN KIDNEYS AND NEPHROPATHIC LESIONS IN CANINE CHRONIC RENAL FAILURE) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.สพ.ญ.ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย; รศ.สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไสละสุด; 71 หน้า. ISBN 974-14-2547-3

Ochratoxin A (OTA) เป็นสารพิษจากเชื้อราที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อรา *Aspergillus ochraceus* และ *Penicillium verrucosum* สารพิษนี้สามารถปนเปื้อนได้ในเมล็ดธัญพืช ผลองุ่นแห้ง เมล็ดกาแฟ และตกค้างในเนื้อเยื่อสัตว์ นอกจากนี้ยังมีความเป็นพิษที่ร้ายแรงต่อเนื้อเยื่อไตของคนและสัตว์ เมื่อปี 2547 เกิดโรคไตในสุนัขเพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่าปกติที่ประเทศไต้หวันและไทย จากประวัติสุนัขกลุ่มนี้กินอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดที่ผลิตจากโรงงานอาหารสัตว์แห่งหนึ่งในประเทศไทยและมีรายงานการตรวจพบสารพิษ OTA และ citrinin ในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารเม็ดสำเร็จรูป จึงตั้งข้อสันนิษฐานได้ว่า สารพิษ OTA และ / citrinin อาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคไต อย่างไรก็ตาม ไม่ปรากฏหลักฐานการตรวจพบสารพิษดังกล่าวในอาหารสำเร็จรูปในชุดที่ให้สุนัขป่วยกลุ่มดังกล่าวกิน และในช่วงเวลานั้นหน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ติดตามเก็บตัวอย่างไตจากสุนัขที่ป่วยตายด้วยโรคไตวายเรื้อรังมีประวัติการกินอาหารสำเร็จรูปเพื่อนำมาศึกษาลักษณะรอยโรคทางพยาธิวิทยา และปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจหาระดับการตกค้างของ OTA ในไตของสุนัขด้วยเทคนิค HPLC ดังนั้น จึงมีแนวคิดที่จะนำเทคนิค HPLC ดังกล่าวมาตรวจหาระดับการตกค้างของ OTA ในไตของสุนัขและศึกษาพยาธิสภาพของไตเพื่อเป็นการยืนยันการได้รับสัมผัส OTA การศึกษานี้เก็บตัวอย่างไตจากสุนัขที่ป่วยตายด้วยโรคไตวายเรื้อรังจำนวน 50 ตัว และแบ่งเนื้อไตดังกล่าวออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปศึกษาตามกระบวนการทางพยาธิวิทยา ส่วนที่สองนำไปตรวจหาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการตกค้างกับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาพบว่า รอยโรคทางพยาธิวิทยาเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยคือ contracted kidney, necrotic plaque, pale in color, renal swollen and congestion, renal infarction และ renal calculi ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่เด่นชัดคือ tubulonecrosis, interstitial nephritis, tubulonephrosis และ glomerulonephritis ผลการตรวจหาระดับการตกค้างของ OTA ด้วย HPLC พบการตกค้างของ OTA ในไตของสุนัข จำนวน 4 ตัว จากทั้งหมด 50 ตัว ปริมาณการตกค้างอยู่ในระดับ 0.04-0.21 ng/g (วิธีการนี้มีอัตราการคืนกลับของสารเท่ากับ 81.43% ค่า LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.04 ng/g และ 0.14 ng/g ตามลำดับ) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตกค้างของ OTA กับระดับความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า มีเพียงรอยโรค glomerulonephritis เท่านั้นที่มีความรุนแรงของรอยโรคเพิ่มขึ้นตามระดับการตกค้างของ OTA ที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่า $r^2 = 0.8$ จากผลการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่า มีสุนัขจำนวน 4 ตัวที่ได้รับสัมผัสสารพิษ OTA จากสุนัขที่นำมาศึกษาทั้งหมด 50 ตัว

ภาควิชา สัตวแพทยสาธารณสุข
สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....ศุภวัฒน์ โพธิมงคลกุล
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....Ben Jone
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4675578531 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEY WORD : OCHRATOXIN A / DOGS KIDNEYS / NEPHROPATHY

SUPAWAT POTHIMONGKOLKUL : THE RELATIONSHIP BETWEEN OCHRATOXIN A RESIDUE IN KIDNEYS AND NEPHROPATHIC LESIONS IN CANINE CHRONIC RENAL FAILURE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF BENJAMAS PATTAMALAI, D.V.M., Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC.PROF ACHARIYA SAILASUTA, D.V.M., Ph.D. 71 PP. ISBN : 974-14-2547-3

Ochratoxin A is a mycotoxin produced by the fungal, *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus ochraceus*. It can often be found in cereals, dried grapes, coffee beans and certain meat products. OTA is nephrotoxic to human and animals. In 2004, there were reports on nephrotic diseases in groups of dogs in Taiwan and Thailand; the dogs had a history of eating dried dog food produced by one manufacturer in Thailand and after that was found contaminated in raw materials used as ingredients of dog food and it was assumed that the disease was probably caused by either one or both of mycotoxins ochratoxin A and / citrinin. However, there was no direct evidence showed that the mycotoxins were found in the same batch of the dog food eaten by those dogs. Since then, the pathological unit of the Department of Veterinary Pathology at Chulalongkorn University had collected kidneys from dogs died from chronic renal failure for pathological examinations. Recently, the HPLC methods for analysis of OTA residues in pig kidneys have been well-developed. Therefore, using such technique for analysis of OTA residue in dog kidneys together with pathological examinations of those kidneys should confirm the exposure of those dogs to OTA. In this study, the kidneys collected from 50 dogs died from chronic renal failure were separated into two sets, one set was examined for pathological changes and the other was for analysis of OTA using HPLC technique, and, then the relationship between the pathological lesion and OTA residues were determined. The macroscopic findings showed that contracted kidney, necrotic plaque, pale in color, renal swollen and congestion, renal infarction and renal calculi were major lesions seen in those kidneys respectively, and the histopathological findings examinations showed that tubulonecrosis, tubulonephrosis, interstitial nephritis and glomerulonephritis were major lesions respectively. The HPLC analytical results showed that OTA residues were found in kidneys of four dogs at the level of 0.04-0.21 ng/g (the method has % recovery rate = 81.43 %, LOD = 0.04 ng/g and LOQ = 0.14 ng/g). Only the severity of glomerulonephritis and the levels of OTA residues were found to be related ($r^2 = 0.8$). These findings suggested that 4 out of 50 dogs had been exposed to ochratoxin A.

Department of Veterinary Public Health

Field of Study Veterinary Public Health

Academic Year. 2006

Student's signature..... *Supawat Pothimongkol*

Advisor's signature..... *Benjamas Pattamalai*

Co-advisor's signature..... *A. S.*

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.สพ.ญ.ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.สพ.ญ.ดร. อัจฉริยา ไสละสูต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ซึ่งกรุณาให้ความรู้ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอบพระคุณกองทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย

ขอบคุณ คุณเบญจรัตน์ วงศาวิภาส และ น.สพ. ชัยเทพ พูลเขตต์ ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่อง HPLC

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ชาย พี่สาว และเพื่อน ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจเสมอมา



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตการวิจัย.....	3
คำถามงานวิจัย.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
ลำดับขั้นตอนของการเสนอผลการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
โครงสร้างสารพิษ OTA.....	5
การดูดซึมของสารพิษ OTA.....	6
การแพร่กระจายของสารพิษ OTA.....	7
การขับออกของสารพิษ OTA.....	7
การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษ OTA ภายในร่างกาย.....	7
การศึกษาความเป็นพิษของสารพิษ OTA.....	7
การปนเปื้อนของเชื้อราที่ผลิตสารพิษ OTA ในวัตถุดิบ ธัญพืช อาหาร- - และ เนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ.....	10
ภาวะไตวายและสาเหตุของการเกิดโรคไตวายในสุนัข.....	10
การเสียหายของเซลล์เยื่อบุท่อไต.....	11
สารพิษเชื้อรากับการเกิดโรคไตวายในสุนัข.....	12

บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย	
	อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	17
	วิธีดำเนินการทดลอง.....	19
บทที่ 4	ผลการทดลอง	
	การศึกษาที่ 1.....	27
	การทดลองที่ 1 ผลการตรวจรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา (Macroscopic findings) ในไตของสุนัขที่ศึกษา.....	27
	การทดลองที่ 2 ผลการตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathological findings) ในไตของสุนัขที่ศึกษา.....	31
	การศึกษาที่ 2.....	36
	การทดลองที่ 3 การยืนยันความเชื่อมั่นของวิธีวิเคราะห์.....	36
	การทดลองที่ 4 การตรวจหาระดับการตกค้างของ OTA ในเนื้อเยื่อไต ของสุนัขที่ศึกษา.....	42
	การศึกษาที่ 3.....	44
บทที่ 5	อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	
	อภิปรายผลการทดลอง.....	48
	สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	49
	รายการอ้างอิง.....	52
	ภาคผนวก.....	58
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	71

ตารางที่	หน้า
1. ค่า LD ₅₀ ของสัตว์แต่ละชนิดที่ได้รับสารพิษ OTA ทางปาก.....	8
2. ระดับการตกค้างของ OTA ในวัตถุดิบ วัตถุดิบ อาหารและเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ.....	10
3. รอยโรคทางมหัพยาธิวิทยา (Macroscopic findings) ของไตในสุนัขกลุ่มศึกษา.....	28
4. รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (Microscopic findings) ของไตในสุนัขกลุ่มศึกษา.....	32
5. พื้นที่ใต้ peak, SD และ %CV ของสารละลายมาตรฐาน OTA.....	38
6. ผลการวิเคราะห์ Intraday และ interday precision ของสารละลายมาตรฐาน OTA.....	39
7. ผลการวิเคราะห์หาอัตราความคืนกลับสารของสารพิษเชื้อรา OTA.....	41
8. ผลการวิเคราะห์ Intraday และ interday precision ของการหาอัตราความคืนกลับสาร	42
9. การวิเคราะห์ระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตสุนัขกลุ่มศึกษา	
ที่พบการตกค้างของ OTA.....	42
10. ตัวอย่างไตสุนัขที่ตรวจพบการตกค้างของสารพิษ OTA	
และระดับความรุนแรงของรอยโรคทางมหัพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาชนิดต่างๆ	46

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1. ลักษณะโครงสร้างของสารพิษ ochratoxins และอนุพันธ์ชนิดต่างๆ	6
2. ลักษณะรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา (Macroscopic findings) ของไตสุนัขที่ศึกษา...	30
3. รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่เซลล์เยื่อบุท่อไตของสุนัข.....	34
4. รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของ glomerulus ในไตสุนัข.....	35
5. chromatogram peak ของสารละลายมาตรฐาน OTA ที่ใช้ mobile phase เป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ.....	37
6. กราฟมาตรฐานของ OTA แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area เฉลี่ย กับความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐาน OTA (ng/ml).....	38
7. กราฟมาตรฐาน OTA	43
8. chromatogram peak ของ 5P357R (Negative control).....	43
9. chromatogram peak ของ 4P552N.....	43
10. chromatogram peak ของ 5P215D.....	43
11. chromatogram ของ 5P255L.....	43
12. chromatogram peak ของ 5P320N.....	43
13. รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของไตสุนัขกลุ่มศึกษาที่ตรวจพบการตกค้าง ของสารพิษ OTA.....	47

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Ochratoxins เป็นสารพิษจากเชื้อราที่ได้จากขบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อรา *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium verrucosum* ฯลฯ (Abramson *et al.*, 1980) ในธรรมชาติพบได้ 3 ชนิด ได้แก่ ochratoxin A, ochratoxin B และ ochratoxin C แต่ชนิดที่มีความรุนแรงและพบได้มากที่สุดคือ ochratoxin A (OTA) สารพิษสามารถปนเปื้อนได้ในธัญพืชหลายชนิด เช่น เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดคาแฟ ฯลฯ (JECFA, 2001) จากข้อมูลโดยการรวบรวมและประเมินของสถาบันวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency of Research on Cancer; IARC, 1993) พบว่า สารพิษเชื้อรา OTA จัดเป็นสารก่อมะเร็งสำหรับมนุษย์ในกลุ่ม 2B นอกจากนี้ยังเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ (Mutagen) สารกดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive) สารก่อความผิดปกติต่อทารก (Teratogen) และ สารก่อความเป็นพิษที่ไต (Nephrotoxic) ตกค้างได้ในอวัยวะภายใน ได้แก่ ไต ตับ กล้ามเนื้อและไขมัน ตามลำดับ (IARC, 1993)

สารพิษ OTA มีความเป็นพิษที่ร้ายแรงต่อเนื้อเยื่อไตมากที่สุดโดยความเป็นพิษนี้เกิดได้ในสัตว์หลายชนิด เช่น สุกร ไก่ และสุนัข (Harwig *et al.*, 1983) นอกจากนี้ยังเป็นที่เข้าใจว่า ochratoxin A อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคไตในคนผิวขาวแถบคาบสมุทรบอลข่าน คือ โรค balkan endemic nephropathy (BEN) (Creppy *et al.*, 1993)

Szczecz และคณะ (1973a,b) ทำการศึกษาถึงความเป็นพิษของ OTA ต่อไตในสุนัขสายพันธุ์บีเกิ้ล โดยให้สุนัขกินอาหารที่ผสม OTA หรือ ป้อน OTA เข้าทางปาก พบว่า สุนัขมีอาการ กินน้ำมาก-ปัสสาวะมาก เกร็ง และแห้งน้ำ เมื่อสัตว์ตายรอยโรคทางพยาธิวิทยาพบจุดเลือดออกและบวม น้ำที่ ม้าม ต่อมทอนซิล ลำไส้เล็กและไต ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา พบว่ามีการเสื่อมสภาพของเซลล์เยื่อบุท่อไตและมีผลึกสะสมอยู่ในท่อไต ในประเทศไทยเมื่อต้นปี พ.ศ. 2547 มีรายงานข่าวหนังสือพิมพ์กล่าวว่า “อาหารสุนัขชนิดเม็ดทำให้สุนัขป่วยเป็นโรคไต” โดยแหล่งข่าวอ้างถึงการเกิดโรคไตในสุนัขที่ประเทศไต้หวัน ซึ่งสุนัขกลุ่มนี้กินอาหารเม็ดที่ผลิตขึ้นจากประเทศไทย¹ และมีรายงาน

¹ไทยโพสต์, อาหาร..., 9 มีนาคม 2547 หน้า 3

การตรวจพบสารพิษเชื้อรา OTA และ citrinin ในข้าวและข้าวโพด ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารเม็ดที่ผลิตขึ้นในประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงสุนัขในประเทศไทยที่เสียชีวิตด้วยโรคไตโดยไม่ทราบสาเหตุ จากการศึกษาประวัติพบว่า สุนัขกินอาหารเม็ดและมีอาการกินน้ำมาก-ปัสสาวะมาก เกิร์ง และแห้งน้ำ ต่อมาหน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ติดตามเก็บตัวอย่างไตจากสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรังมาตรวจตามกระบวนการทางพยาธิวิทยา พบรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่ไตคือ ไตหดตัว แข็ง ผิวขรุขระ และมีนิวสัสมอยูภายในกรวยไต ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา พบการเสื่อมของเซลล์เยื่อบุท่อไตและมีผลึกสะสมอยู่ภายในท่อไตซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสารพิษบางชนิด เช่น OTA (Szczzech *et al.*, 1973a ; Szczzech *et al.*, 1973b) หรือ citrinin (Kitchen *et al.*, 1977b) หรือโลหะหนัก ได้แก่ปรอท ตะกั่ว และทองแดง ฯลฯ (Larry and Denise, 2000)

ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นร่วมกับรายงานการตรวจพบ OTA ในวัตถุดิบที่ใช้ทำอาหารเม็ดของสุนัขในช่วงที่มีรายงานโรคนี้เกิดขึ้น ทำให้มีข้อสันนิษฐานได้ว่า OTA อาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคไตในสุนัขครั้งนี้ และปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจหาระดับการตกค้างของ OTA ในไตของสุนัขด้วย HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะ และความน่าเชื่อถือสูง (Monaci *et al.*, 2004) ดังนั้นการศึกษานี้ จึงมีแนวคิดที่จะนำเทคนิคการตรวจหาระดับการตกค้างของ OTA ในไตของสุนัขป่วยด้วยกลุ่มอาการของโรคไตวายเรื้อรัง และศึกษาทางพยาธิสภาพของไต จากนั้นวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างไตที่ตรวจพบการตกค้างของ OTA กับพยาธิสภาพที่ไตของสุนัขที่ป่วยเป็นโรคไตวายเรื้อรังเพื่อเป็นหลักฐานในการยืนยันการได้รับ OTA ตามธรรมชาติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1 อธิบายรอยโรคทางมหายาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของสุนัขที่ป่วยตายด้วยโรคไตวายเรื้อรัง
- 2.2 ตรวจหาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตของสุนัขที่ตายด้วยโรคไตวายเรื้อรังในระหว่าง มกราคม ถึง ธันวาคม 2548
- 2.3 หาความสัมพันธ์ระหว่างการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตกับการเกิดพยาธิสภาพที่ไตจากโรคไตวายเรื้อรังในสุนัขที่นำมาตรวจตั้งแต่ มกราคม ถึง ธันวาคม 2548

3. ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้า (Prospective study) โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตและข้อมูลทางคลินิกจากซากสุนัขที่ป่วยตายด้วยโรคไตวายเรื้อรังตั้งแต่เดือน มกราคม ถึง ธันวาคม 2548 จากห้องชันสูตรซาก หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การศึกษานี้ประกอบด้วย การตรวจรอยโรคทางมหายาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของไต การยืนยันความเชื่อมั่นของวิธีวิเคราะห์และตรวจหาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตจากสุนัขที่ป่วยเป็นโรคไตวายเรื้อรัง การศึกษาความสัมพันธ์กันระหว่างการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตกับการเกิดพยาธิสภาพที่ไตในสุนัขที่ตายด้วยโรคไตวายเรื้อรัง

4. คำถามงานวิจัย

- งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาตัวอย่างจากไตสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรังตั้งแต่ มกราคม ถึง ธันวาคม 2548 และผลการวิจัยจะตอบคำถามดังต่อไปนี้
- 4.1 ลักษณะของรอยโรคทางมหายาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของไตสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรังในช่วงเวลาดังกล่าวมีพยาธิสภาพเป็นอย่างไร
 - 4.2 มีการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรังหรือไม่
 - 4.3 ความสัมพันธ์กันระหว่างการตกค้างของสารพิษ OTA กับการเกิดพยาธิสภาพที่ไตจากโรคไตวายเรื้อรังในสุนัขเป็นอย่างไร

5. ข้อจำกัดของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีข้อจำกัดในการติดตามข้อมูลสัตว์ป่วยและไม่สามารถเก็บตัวอย่างอาหารที่สัตว์ป่วยกินมาตรวจวิเคราะห์ได้

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

6.1 นำเทคนิค high performance liquid chromatography มาประยุกต์ใช้ตรวจหาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตสุนัขเพื่อช่วยยืนยันการได้รับสัมผัส

6.2 ทราบถึงลักษณะและระดับความรุนแรงของรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา (Macroscopic findings) และจุลพยาธิวิทยา (Histopathological findings) ในไตของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง

6.3 ทราบถึงความสัมพันธ์ของสารพิษ OTA ตกค้างกับการเกิดพยาธิสภาพที่ไตจากโรคไตวายเรื้อรังในสุนัข

6.4 นำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการวินิจฉัยโรค ochratoxicosis เพื่อวางมาตรการป้องกันการสัมผัสสารพิษ OTA

7. วิธีดำเนินการวิจัย

ระยะเวลาการดำเนินงานตั้งแต่ เดือนกันยายน พ.ศ. 2547 จนถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2549

แผนการดำเนินงาน	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	กย- -ธค 47	มค 48	กพ 48	มีค 48	เมษ 48	พค 48	มิย 48	กค 48	สค 48	กย- -ธค 48	มค 49	กพ 49	มีค 49
ทบทวนเอกสาร													
วางแผนงานวิจัย													
ดำเนินการทดลอง													
วิเคราะห์และแปลผล													
เขียนรายงาน													

8. ลำดับขั้นตอนของการเสนอผลการวิจัย

ประกอบด้วย ผลการตรวจรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาของไต (Macroscopic findings) ผลการตรวจรอยโรคและระดับความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของไต (Histopathological findings) การยืนยันความเชื่อมั่นของวิธีวิเคราะห์ การตรวจหาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการตกค้างของสารพิษ OTA กับการเกิดพยาธิสภาพที่ไตจากโรคไตวายเรื้อรังในสุนัข

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

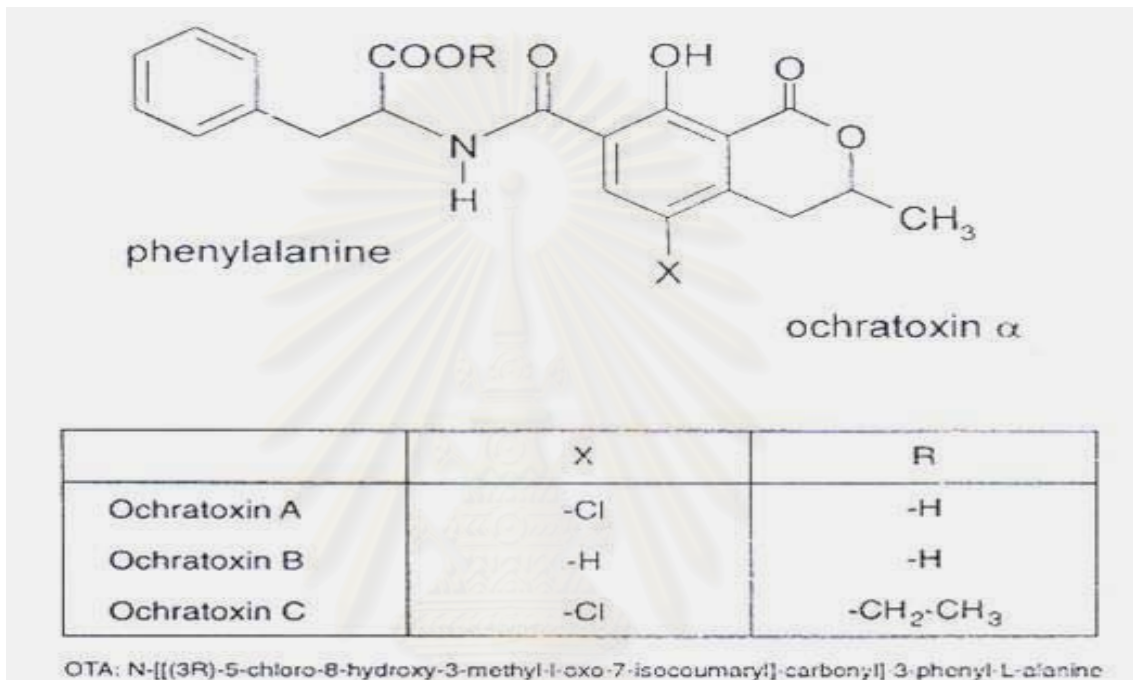
สารพิษเชื้อรา Ochratoxins เป็นสารพิษจากเชื้อราที่เกิดจากขบวนการเมตาบอลิซึมของ *Aspergillus ochraceus* , *Penicillium verrucosum* (Abramson et al., 1980) ในธรรมชาติพบได้ 3 ชนิด ได้แก่ ochratoxin A, ochratoxin B และ ochratoxin C ชนิดที่มีความเป็นพิษมากที่สุดคือ ochratoxin A (OTA) พบครั้งแรกในช่วงกลางทศวรรษที่ 1960 ในประเทศแอฟริกาใต้ จากการศึกษาการตรวจหาสารพิษเชื้อราชนิดใหม่ในห้องทดลอง (Van der Merwe et al., 1965) สารพิษชนิดนี้พบได้ใน เมล็ดธัญพืช (ข้าวโพด ถั่วเหลือง ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวเจ้า) เนื้อสุกร เมล็ดกาแฟ เบียร์ ไวน์ น้ำผลไม้ และนม (Pitt, 2000) นอกจากนี้ ยังเป็นที่เข้าใจว่า OTA อาจทำให้เกิดโรคไตในคนผิวขาวแถบคาบสมุทรบอลข่านคือ โรค balkan endemic nephropathy (BEN) (Creppy et al., 1993) โดยมีรายงานครั้งแรก ในปี 1950 ที่ประเทศบัลแกเรีย พบผู้ป่วยที่เป็นโรคไตแบบ chronic interstitial nephritis ต่อมามีการตรวจพบ OTA ในอาหารและธัญพืช ในแถบนั้น นอกจากนี้ยังเกิดโรคไตในสุกรด้วย (Piotr et al., 1984)

เชื้อรา *Aspergillus ochraceus* เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 8 - 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อรานี้พบได้มากในภูมิอากาศเขตร้อนและปนเปื้อนได้ในอาหารหรือธัญพืชที่ถูกเก็บไว้นานๆ เช่น อาหารรมควัน อาหารตากแห้ง เมล็ดธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากเมล็ดธัญพืช ส่วนธรรมชาติและนิเวศวิทยาของ *Penicillium verrucosum* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 0 - 31 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อรานี้พบได้มากในภูมิอากาศเขตหนาว และปนเปื้อนได้ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ชีส ผลิตภัณฑ์จากพืชและธัญพืช (Pitt and Hocking, 1997)

โครงสร้างสารพิษ OTA

สารพิษเชื้อรา ochratoxins มีโครงสร้างโมเลกุลที่ประกอบด้วย สารประกอบ phenylalanine ยึดเกาะกับสารประกอบ isocoumarin ring ด้วย amide bond (NH group) (รูปที่ 1) เมื่อแยกสารประกอบทั้งสองออก จะได้สารประกอบ ochratoxin-alfa และสารประกอบ phenylalanine ซึ่ง ochratoxin-alfa ไม่ทำให้เกิดพิษ ochratoxins มีความทนทานต่อการ hydrolysis จาก carboxypeptidase A ได้สูง โครงสร้างโมเลกุลจึงแยกออกจากกันได้ยาก (Chu et al., 1972) ข้อแตกต่างทางโครงสร้างของ ochratoxin A, B และ C สังเกตได้ที่ตำแหน่ง C อะตอมที่

5 ของ isocoumarin ring โดยตำแหน่งดังกล่าวของ ochratoxin A, B และ C จะมี -Cl, -H และ -Cl อะตอมเกาะอยู่ ตามลำดับ ส่วนที่ตำแหน่ง carboxyl group บน phenylalanine โมเลกุลของ ochratoxin A และ B นั้น จะมี -H อะตอมเกาะอยู่ (Chu *et al.*, 1972) สารพิษนี้ ไม่มีสีและมีลักษณะเป็นผลึก ซึ่งเกิดจากการตกผลึกของส่วนที่เป็น benzene ring และมีจุดเดือดที่ 90 องศาเซลเซียส (Krogh, 1987)



รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของสารพิษ ochratoxins และอนุพันธ์ต่างๆ (ที่มา Petzinger and Ziegler, 2000)

การดูดซึมของสารพิษ OTA

การศึกษาในหนู rat พบว่า สารพิษสามารถดูดซึมได้ดีที่สุดในทางเดินอาหาร (Gastrointestinal tract) บริเวณลำไส้ส่วน proximal jejunum ในรูปของ lipid-soluble และ non-ionized ซึ่งแปรสภาพไปตาม pH โดย OTA ในรูปดังกล่าว สามารถต้านทานกับความเข้มข้นของสารต่างๆ และ pH ที่ผิวของเยื่อของลำไส้ส่วน jejunum ได้ (Kumagai and Aibera, 1982; Kumagai, 1988) เปอร์เซ็นต์การดูดซึมของสารพิษ OTA ในรูป lipid-soluble และ non-ionized พบว่า สุนัขดูดซึมได้ 66% หนู rat 56% กระต่าย 56% และ ไก่ 40% (Suzuki *et al.*, 1977; Galtier *et al.*, 1981)

การแพร่กระจายของสารพิษ OTA

การศึกษาในลิง *vervet* โดยฉีดสารพิษเข้าทางเส้นเลือดดำ พบว่า เมื่อ OTA เข้าสู่กระแสเลือดแล้วนั้น จะจับกับ serum albumin เนื่องจากสารพิษนี้มีความชอบที่จะจับกับ serum albumin และยังคงถูกดูดกลับได้ที่ไต เป็นผลทำให้สารพิษอยู่ในร่างกายได้นานและมีค่าครึ่งชีวิตที่ยาวนาน (Jung *et al.*, 2001; Maria *et al.*, 2000) ค่าครึ่งชีวิตของ OTA ในคน คือ 840 ชั่วโมง สุกกร 72 - 120 ชั่วโมง (Galtier *et al.*, 1981; Mortensen *et al.*, 1983) โค 77 ชั่วโมง (Sreemanarayana *et al.*, 1988) และไก่ 4.1 ชั่วโมง (Hagelberg *et al.*, 1989) นอกจากนี้ มีรายงานว่า สารพิษ OTA จะสะสมอยู่มากที่ ไต รองลงมา คือ ตับ กล้ามเนื้อ และไขมัน ตามลำดับ (Harwig *et al.*, 1983)

การขับออกของสารพิษ OTA

ศึกษาในหนู *Rat* โดยให้สารพิษทางปาก พบว่า สารเมตะบอไลต์หลักที่ถูกขับออกทางปัสสาวะ ได้แก่ ochratoxin-alfa 25-27%, OTA ที่ถูกขับออกโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 6% และ 4R-OH-OTA epimers 1-1.5% ตามลำดับ ochratoxin-alfa และ 4R-OH-OTA ไม่ถูกดูดกลับที่ไต นอกจากนี้ ochratoxin alfa สามารถถูกขับออกทางอุจจาระได้ด้วย (Storen *et al.*, 1982)

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษ OTA ภายในร่างกาย

จากการทดลองในหนู *rat* พบว่า สารพิษถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและถูกลดความเป็นพิษได้โดยเอนไซม์ carboxypeptidase A จากแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่บริเวณไส้ติ่ง (Galtier, 1978) นอกจากนี้การศึกษานี้ยังทดลองโดยใช้เอนไซม์ cytochrome P450 และเอนไซม์ชนิดอื่นๆ จากตับของหนู *rat* ได้แก่ peroxidase และ GSH transferase พบว่า สารพิษถูกเมตาบอไลต์เพียงเล็กน้อยโดยเอนไซม์เหล่านี้ จึงทำให้สารพิษคงตัวอยู่ในร่างกายได้นาน (Jean *et al.*, 2001) การศึกษาเกี่ยวกับการ hydrolysis ของ ochratoxins โดยเอนไซม์ carboxypeptidase A ทำการทดลองในหลอดทดลอง พบว่า ochratoxins และอนุพันธ์ ถูก hydrolysis ได้น้อยโดยเอนไซม์ carboxypeptidase A เนื่องจาก Arg-145 บน active site ของเอนไซม์ carboxypeptidase A ขัดขวางปฏิกิริยา Ionic ของ carboxyl group ของ OTA ทำให้ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารพิษ ochratoxin A เกิดขึ้นได้น้อยลง (Maria *et al.*, 2001)

การศึกษาความเป็นพิษของสารพิษ OTA

การศึกษาความไวของการเกิดพิษ เมื่อให้สารพิษทางปากในสัตว์หลายชนิด พบว่า สุนัขมีความไวต่อการเกิดพิษมากที่สุด โดยค่า LD₅₀ ของสุนัขมีค่าเท่ากับ 0.2 mg/kg น้ำหนักตัว ความไวต่อการเกิดพิษในสัตว์ชนิดอื่นที่รองลงมา คือ สุกกร ไก่ หนู *rat* แรกเกิด หนู *rat* และ หนู *mouse* ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า LD₅₀ ของสัตว์แต่ละชนิดที่ได้รับสารพิษ OTA ทางปาก (Harwig *et al.*, 1983)

ชนิดสัตว์	LD ₅₀ oral route (mg/kg/bw)
สุนัข	0.2
สุกร	1.0
ไก่	3.3
หนู rat แรกเกิด	3.9
หนู rat	20-30
หนู mouse	48-58

สารพิษ OTA นอกจากจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิด ความเป็นพิษที่ไต (Nephrotoxic) แล้ว จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า OTA ยังทำให้เกิดความผิดปกติของทารกแรกคลอด (Teratogen) เป็นสารก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) และเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) (Stoev, 1998) จากรายงานผลของการเกิดมะเร็งโดยสถาบันวิจัยมะเร็งนานาชาติ พบว่า OTA เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 2B คือ เป็นสารที่มีแนวโน้มที่ทำให้เกิดมะเร็งในคนได้ (IARC, 1993)

การศึกษาถึงฤทธิ์ก่อมะเร็งของ OTA ในสัตว์ฟันแทะ พบว่า อวัยวะเป้าหมายที่เกิดมะเร็งคือ ไต รองลงมาคือ ตับ และจากการศึกษาในหนู mice โดยการเลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม OTA ขนาด 5.6 mg/kg น้ำหนักตัว ต่อวัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 44 สัปดาห์พบว่า หนู mice เป็นมะเร็งที่ไตทั้งหมด (Kanisawa and Suzuki, 1978) การศึกษาในหนู rat โดย National Toxicology Program (1989) พบว่า การเกิด renal adenoma ในหนู rat เพศผู้แปรผันตามปริมาณการได้รับสารพิษ OTA ส่วนในคนนั้นมีข้อสันนิษฐานว่า OTA มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งที่ท่อทางเดินปัสสาวะ (Creppy *et al.*, 1993)

การศึกษาถึงความเป็นพิษต่อไตของ OTA ในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่า ไตเป็นอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญที่สุดของสารพิษนี้ โดยส่วนมากพบความเสียหายที่ตำแหน่ง S2 และ S3 ของ proximal convoluted tubule ของไต (Jung and Endou, 1989) และในสุกรนั้นสารพิษ OTA เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความเป็นพิษที่ไตรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่ไตมีลักษณะสีซีด ฟ้าม และขยายขนาด รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบ tubular degeneration, fibrosis และnephritis (Rutqvist *et al.*, 1978) นอกจากนี้มีรายงานความเป็นพิษของ OTA ต่อไตในประชากรชนบทของประเทศบัลแกเรีย บอสเนียและเฮอร์เซโกวีนา โครเอเชีย เซอเบีย โรมาเนียและสโลวาเนีย (คาบสมุทรบอลข่าน) (JECFA, 2001) โดยเรียกโรคนี้ว่า balkan endemic nephropathy (BEN) ซึ่งพบในผู้ป่วยที่กินธัญพืชและอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารพิษ OTA รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่

ไตของผู้ป่วยพบ ไตหดตัวเล็กลง ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบ tubular degeneration, interstitial nephritis, fibrosis และ hyaline cast ที่บริเวณ proximal tubule ของไต (Vukelic *et al.*, 1991)

กลไกการออกฤทธิ์ของ OTA ที่ไต มี 3 ประการ คือ

1. ผลต่อการเกิด Oxidative stress จากการทดลองในหลอดทดลองโดยให้สารพิษ OTA แก่ เอนไซม์ cytochrome P450 ซึ่งอยู่ในรูป oxidized ที่มี Fe^{3+} เป็นองค์ประกอบ จะจับกับ OTA ได้เป็น $OTA-Fe^{3+}$ complex จากนั้น จะรับอิเล็กตรอนจาก NADPH cytochrome P450 reductase ทำให้กลายเป็น $OTA-Fe^{2+}$ สารประกอบในรูปนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน หลังจากที่เกิดปฏิกิริยาแล้ว ออกซิเจนจะทำปฏิกิริยากับ polyunsaturated fatty acid แบบ radical chain เกิด autolipid peroxidation ผลิตภัณฑ์ส่วนหนึ่งที่ได้เป็น free radical ทำให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress (ภาวะความเสียหายของเซลล์เนื่องจากผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของออกซิเจน) (Baudrimont *et al.*, 1997)

2. ยับยั้งการสร้างโปรตีน จะยับยั้งการสร้างโปรตีนโดยแข่งขันกับ phenylalanine ในการจับกับเอนไซม์ tRNA synthetase ที่ตำแหน่งของ phenylalanine ในปฏิกิริยา Phe-tRNA amino acylation ทำให้การสร้างโปรตีนลดลง (Dirheimer and Creppy, 1991; Luhe *et al.*, 2003)

3. ยับยั้งการหายใจไมโทคอนเดรีย เมื่อเซลล์ได้รับ OTA จะมีการลดลงของ pH และเพิ่มการสร้าง proton และมีภาวะกระตุ้น Na-H exchange เหนียวนำไปเกิด hyperpolarization ของผนังไมโทคอนเดรีย ยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation ทำให้การสร้าง ATP ลดลง (Jung and Endou, 1989)

ความเป็นพิษของ OTA ในการเป็นสารกดภูมิคุ้มกัน จากการศึกษานินหนู mice, หนู rat, และไก่ โดยให้สารพิษ OTA ในปริมาณที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0.5-80 mg/kg น้ำหนักตัว พบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (National Toxicology Program, 1989) เช่น เกิดภาวะเนื้อตายของม้ามและต่อมน้ำเหลือง (Kanisawa *et al.*, 1978) นอกจากนี้ การให้สารพิษ OTA ในปริมาณต่ำๆ จะมีผลต่อเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ การลดจำนวนของ lymphocyte ในหนู mice ที่ได้รับสารพิษผสมในอาหาร ความเข้มข้น 2.6 mg/kg อาหาร ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 90 วัน ซึ่งสภาวะดังกล่าว ทำให้ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ และ CD8+ ลดจำนวนลง แต่สารพิษในระดับนี้ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่ชัดเจนของอวัยวะภายใน (Thuvander *et al.*, 1995)

การปนเปื้อนของเชื้อราที่ผลิตสารพิษ OTA ในวัตถุดิบ ธัญพืช อาหารและเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ

เชื้อรา *Penicillium verrucosum* มักพบได้มากในเมล็ดธัญพืชชนิดต่าง ๆ เช่น เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวบาร์เลย์ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์เช่น เบคอนรมควัน ปลาแซลมอนรมควัน เชื้อราที่เจริญเติบโตได้ดีในภูมิอากาศที่เย็นและในเขตอบอุ่น เช่น ยุโรปตอนเหนือและแคนาดา ส่วนเชื้อรา *Aspergillus ochraceus* เจริญเติบโตได้ดีในเขตภูมิอากาศร้อนชื้น ปนเปื้อนได้มากในอาหารที่อบแห้งและอาหารที่ถูกเก็บไว้นานๆ เช่น อาหารรมควัน ปลาตากแห้ง ซีอิ๊ว เมล็ดถั่ว เมล็ดข้าว เมล็ดกาแฟ เมล็ดข้าวโพด เมล็ดพริกไทย ลูกเกด เมล็ดกาแฟและธัญพืช ฯลฯ (JECFA, 2001) นอกจากนี้ การปนเปื้อนของสารพิษ OTA พบได้มากที่สุด ในอาหารแห้ง ธัญพืช เมล็ดกาแฟ เมล็ดโกโก้ น้ำองุ่น ไวน์ เมล็ดธัญพืช เนื้อสุกร เบียร์และเนื้อไก่ ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงระดับการปนเปื้อนของ OTA ในวัตถุดิบ ธัญพืช อาหารและเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ (ดัดแปลงจาก JECFA, 2001)

ประเภทอาหาร	ระดับการปนเปื้อน ($\mu\text{g} / \text{kg}$)
อาหารแห้ง	2.20
ธัญพืช	0.94
เมล็ดกาแฟ	0.76
เมล็ดโกโก้	0.55
น้ำองุ่น	0.39
ไวน์	0.32
เมล็ดธัญพืช	0.19
เนื้อสุกร	0.17
เบียร์	0.023
เนื้อไก่	0.014

ภาวะไตวายและสาเหตุของการเกิดโรคไตวายในสุนัข

การเกิดโรคไตในสุนัขเกี่ยวข้องกับภาวะไตวายซึ่งภาวะไตวายนี้อาจทำให้โครงสร้างส่วนหนึ่งส่วนใดหรือทั้งหมดของไต ได้แก่ glomerulus, proximal and distal convoluted tubules และ

collecting duct เกิดการเสียหายและสูญเสียหน้าที่ซึ่งจะกลับคืนสู่สภาวะปกติเมื่อกำจัดสาเหตุออกไปได้ทันทีแต่ถ้าไม่สามารถกำจัดสาเหตุเหล่านั้นออกไปได้โครงสร้างไตจะถูกทำลายทั้งหมดภาวะไตวายแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. ภาวะไตวายแบบเฉียบพลัน (Acute renal failure) สัตว์จะแสดงอาการอย่างรวดเร็ว ไม่เกิน 1 สัปดาห์ โดยการถ่ายปัสสาวะน้อย (oliguria) หรือไม่ถ่ายปัสสาวะ (anuria) และภาวะ azotemia อาการเหล่านี้จะสามารถคืนสู่สภาวะเดิมได้ถ้าสาเหตุถูกกำจัดออกไป (Thomas *et al.*, 1997)
2. ภาวะไตวายแบบเรื้อรัง (Chronic renal failure) เกิดขึ้นเนื่องจากการเสียหายของเนื้อเยื่อไตเป็นระยะเวลานานมากกว่า 1 สัปดาห์ มักพบอาการ กินน้ำมาก (Polydipsia) ปัสสาวะมาก (Polyuria) แห่งน้ำ ปากเป็นแผลหลุม สัตว์ที่เป็นโรคไตวายเรื้อรัง ส่วนใหญ่เนื้อเยื่อไตที่เสียหายจะไม่สามารถกลับคืนสู่สภาวะปกติได้และมักพบกลุ่มอาการ uremia (William and McDonald, 1995)

สาเหตุของการเกิดโรคไตวาย เกิดจาก 3 สาเหตุหลัก คือ

1. ภาวะการขาดเลือด (Renal ischemia) เกิดเนื่องจากการอุดตันของก้อนเลือดภายในเส้นเลือดที่มาเลี้ยงไต ความสามารถในการกรองของโกลเมอรูลัสลดลงและความดันเลือดลดต่ำลงอย่างรุนแรง ทำให้เส้นเลือดที่ไตเกิดการหดตัว (Renal constriction) เป็นผลทำให้อัตราการไหลของเลือดลดลง (Renal blood flow) และเกิดภาวะการขาดเลือดตามมา รอยโรคที่ตรวจได้ด้วยตาเปล่าจะพบบริเวณสีแดงและซีดคล้ายรูปลิ้มที่ผิวไตด้านนอก (Renal cortex) รอยโรคทางจุลพยาธิพบเนื้อตายแบบแข็งตัว (Coagulative necrosis) ซึ่งล้อมรอบด้วยบริเวณคั่งเลือดและเลือดออก
2. การเสียหายที่โครงสร้างไตจากการติดเชื้อจุลชีพ เช่น แบคทีเรีย (Streptococcosis) ไวรัส (Infectious Canine Hepatitis) และ ปรสิต (Ehrlichiosis, Babesiosis และ Dirofilaria) หรือความเป็นพิษจากสารเคมี เช่น สารพิษจากเชื้อรา (OTA และ Citrinin) ยา (Gentamycin, Kanamycin, Amikacin, Neomycin) พืช (Oxalate) และโลหะหนัก (ตะกั่ว, อาร์เซนิก, แคดเมียม) เป็นต้น
3. การอุดตันการไหลของน้ำปัสสาวะบริเวณท่อไตและท่อปัสสาวะ จากก้อนเนื้องอกหรือก้อนนิ่วทำให้ไม่สามารถขับน้ำปัสสาวะได้ทำให้เกิดการคั่งของน้ำปัสสาวะในไต สัตว์จะปัสสาวะไม่ได้ทำให้เกิดการไหลกลับของปัสสาวะและติดเชื้อแทรกซ้อนตามมา (Smith *et al.*, 1972; William and McDonald, 1995)

การเสียหายของเซลล์เยื่อท่อไต

การเสียหายของเซลล์เยื่อท่อไตและเนื้อเยื่อข้างเคียง มักมีความสัมพันธ์กันซึ่งเรียกว่า Tubulointerstitial disease มีสาเหตุจาก

1. การขาดเลือดไปหล่อเลี้ยง (อัตราการไหลของเลือดที่ลดลง ความดันเลือดลดต่ำลงอย่างรุนแรง ความสามารถในการกรองของโกลเมอรูลัสลดลง)
2. การได้รับสารพิษที่เป็นพิษต่อไต เช่น สารพิษจากโลหะหนัก (ปรอท ตะกั่ว ทองแดง อาร์เซนิก และ แคดเมียม) สารพิษจากยา (ยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside ยาต้านเชื้อรา ยาต้านมะเร็ง cisplatin) สารพิษจากพืช (สาร oxalate ในพืช) การได้รับวิตามินดีมากเกินไป สารพิษจากเชื้อรา (สารพิษ OTA และ citrinin)

เมื่อเกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไต หน่วยไตที่เหลือจะมีการปรับตัวโดยเกิดการขยายตัวออก ส่วนท่อไตก็จะมีการปรับตัวโดยขยายขนาดขึ้นและเกิดภาวะ การบวมตัวของเซลล์ (Swollen and hydropic degeneration) ซึ่งเกิดจากภาวะไม่ไตคองเดรียได้รับความเสียหาย ต่อมา ความเสียหายของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตจะพัฒนาไปเป็นฟองอากาศภายในเซลล์เยื่อหุ้มท่อไต (Tubular vacuolation) เนื่องจาก การคงอยู่ของ Na^+ และ น้ำ ภายในเซลล์ ถ้ากำจัดสาเหตุออกไปได้เซลล์เยื่อหุ้มท่อไตจะมีการปรับตัวโดยมีการขยายขนาดของท่อไต (Tubular dilatation) แต่ถ้าสาเหตุยังไม่ถูกกำจัดออกไปจะเกิดการตายของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไต (Tubulonecrosis) (William and Mc donald, 1995; Wander and Colin, 1998)

สารพิษเชื้อรากับการเกิดโรคไตวายในสุนัข

มีรายงานการศึกษาถึงความเป็นพิษที่ไตของสารพิษเชื้อราบางชนิด ได้แก่ OTA และ citrinin ในสุนัขโดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ก) การศึกษาทางพยาธิคลินิกและพยาธิสภาพที่ไตในสุนัขที่ได้รับสารพิษ OTA

Szczzech และคณะ (1973a,b) ทำการศึกษาถึงความเป็นพิษของสารพิษเชื้อรา OTA ในสุนัขสายพันธุ์บีเกิ้ล เพศผู้ จำนวน 23 ตัว อายุ 8-9 สัปดาห์ แบ่งออกเป็น 9 กลุ่ม กลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดลอง 8 กลุ่ม สุนัขทดลองกลุ่มที่ 1-5 ให้กินอาหารที่ผสมสารพิษ OTA ความเข้มข้น 0.1-7.8 mg/kg น้ำหนักตัว ส่วนสุนัขทดลองกลุ่มที่ 6-8 ป้อนสารพิษ OTA ทางปากในระดับความเข้มข้น 0.2-3.0 mg/kg น้ำหนักตัว เจาะเลือดในสุนัขทุกกลุ่มจาก external jugular vein ทุกๆ 2 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน นำเลือดที่ได้จากสุนัขในกลุ่มที่ 3-8 ไปตรวจวิเคราะห์ค่าเคมีโลหิตและทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะจากสุนัขในกลุ่มดังกล่าวด้วย ต่อมาวิเคราะห์ค่าเคมีโลหิตของ alkaline phosphatase ในซีรัมและในปัสสาวะจากกลุ่มที่ 3-8 และกลุ่มที่ 7-8 ตามลำดับ ค่าเคมีโลหิตของ lactate dehydrogenase (LDH) ในซีรัมและในปัสสาวะจากกลุ่มที่ 5-7 และกลุ่มที่ 7 ตามลำดับ ค่าเคมีโลหิตของ aspartate aminotransferase (AST) ในซีรัมจากกลุ่มที่ 3-7 ค่าเคมีโลหิตของ Blood urea nitrogen (BUN) ในซีรัมจากกลุ่มที่ 4-7 ส่วนกลุ่มที่ 8 ให้วิเคราะห์ค่าเคมีโลหิตของ aspartate

aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), Blood urea nitrogen (BUN) และ alkaline phosphatase (AP) จากซีรัม ผลการตรวจจากซีรัมไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าเอนไซม์ AST, ALT, BUN และ AP ในสุนัขทดลองกลุ่มที่ 3-8 ส่วนผลการตรวจหาเอนไซม์จากปัสสาวะพบการเปลี่ยนแปลงของค่าเอนไซม์ LDH เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในกลุ่มทดลองที่ 7

ผลการตรวจอาการความผิดปกติของสุนัข พบว่า เมื่อสุนัขได้รับสารพิษในระดับที่ทำให้เกิดพิษ สุนัขจะแสดงอาการ ซึม เบื่ออาหาร น้ำหนักลดลง กินน้ำมาก ปัสสาวะมาก เหงื่อ ชัก เมื่อสุนัขถึงแก่ความตายจากความเป็นพิษของสารพิษจะตรวจพบรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา (Macroscopic findings) ที่อวัยวะภายในได้แก่ ม้าม ต่อมทอนซิล และลำไส้เล็ก เกิดภาวะ edema, hemorrhage และ necrosis ส่วนไตมีลักษณะซีดและขยายตัวออกเล็กน้อย การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathological findings) ที่เด่นชัดนั้นพบได้ทั่วไป คือ เกิดการตายของเซลล์เยื่อบุท่อ proximal convoluted tubules และมีการหลุดลอกของ tubular basement membrane นอกจากนี้ยังพบ hyaline cast ภายใน proximal convoluted tubules

ข) การศึกษาถึงความเป็นพิษของ Citrinin และพยาธิสภาพที่ไตของสุนัขที่ได้รับสารพิษ Citrinin

citrinin เป็นสารพิษเชื้อราที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อรา *Penicillium citrinum* และออกฤทธิ์ที่ไต (Harwig *et al.*, 1979) จากการศึกษาความเป็นพิษในหลอดทดลองของ citrinin ร่วมกับ OTA โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด พบว่า citrinin มีความเป็นพิษน้อยกว่า OTA (Kitabatake *et al.*, 1993)

Carlton และ คณะ (1974) ศึกษาถึงความเป็นพิษของสารพิษ citrinin ในสุนัขสายพันธุ์ บีเกิ้ล โดยแบ่งกลุ่มทดลอง เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรก ให้กินอาหารที่ผสมสารพิษ citrinin ลงในอาหาร กลุ่มที่สอง ฉีดสารพิษเข้าช่องท้อง และ กลุ่มที่สาม ป้อนสารพิษเข้าปาก โดยกลุ่มที่สองและสามนั้น ได้รับสารพิษ ขนาด 2.5, 5, 20 และ 40 mg/kg น้ำหนักตัว ผลปรากฏว่า สุนัขกลุ่มแรกที่กินอาหารผสมสารพิษ และสุนัขในกลุ่มที่สองและสาม ที่ได้รับสารพิษขนาด 20 และ 40 mg/kg น้ำหนักตัว เกิดรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่ไต คือ ไตซีด ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ไต คือ มีการเสื่อมและตายของเซลล์เยื่อบุของ distal convoluted tubules และ collecting duct

ค) การศึกษาถึงความเป็นพิษของ OTA ร่วมกับ Citrinin และพยาธิสภาพที่ไตของสุนัขที่ได้รับสารพิษ OTA ร่วมกับ Citrinin

Kitchen และคณะ (1977b) ศึกษาพยาธิวิทยาที่ไตของสุนัขสายพันธุ์บีเกิ้ลที่ได้รับสารพิษ OTA ร่วมกับ citrinin จำนวน 23 ตัว อายุ 10 สัปดาห์ แบ่งสุนัขเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มควบคุมฉีด ethanol เพียงอย่างเดียว เข้าทางช่องท้อง กลุ่มที่ 1 และ 2 ให้ citrinin ฉีดเข้าช่องท้อง ขนาด 5

และ 10 mg/kg น้ำหนักตัว ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 และ 4 ให้ OTA ป้อนทางปาก ขนาด 0.1 และ 0.2 mg/kg น้ำหนักตัว ตามลำดับ กลุ่มที่ 5 ให้ OTA ทางปาก ขนาด 0.2 mg/kg น้ำหนักตัว ร่วมกับการฉีด citrinin เข้าทางช่องท้อง ขนาด 10 mg/kg น้ำหนักตัว และ กลุ่มที่ 6 ให้ OTA ทางปาก ขนาด 0.1 mg/kg น้ำหนักตัว ร่วมกับการฉีด citrinin เข้าทางช่องท้อง ขนาด 5 mg/kg น้ำหนักตัว ตามลำดับ เมื่อสัตว์ตาย ตรวจพบรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา คือ ไตซีด (Pale in color) และลำไส้กลืนกัน (Intussusception) ที่ส่วนของ ileocolic junction หรือส่วนท้ายของ ileum ในสุนัขกลุ่มที่ได้รับ citrinin 10 mg/kg น้ำหนักตัว เพียงอย่างเดียว หรือกลุ่มที่ได้รับ citrinin 10 mg/kg น้ำหนักตัว ร่วมกับ OTA 0.2 mg/kg น้ำหนักตัว ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ไต พบลักษณะของเซลล์เยื่อบุเสื่อมและตายที่บริเวณ proximal convoluted tubules ในสุนัขกลุ่มที่ได้รับ OTA ขนาด 0.2 mg/kg น้ำหนักตัว เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบการเสื่อมและตายของเซลล์เยื่อบุบริเวณ distal convoluted tubules และ collecting tubules ในสุนัขกลุ่มที่ได้รับ citrinin ขนาด 10 mg/kg น้ำหนักตัว เพียงอย่างเดียว ส่วนสุนัขกลุ่มที่ได้รับ citrinin 10 mg/kg น้ำหนักตัว ร่วมกับ OTA 0.2 mg/kg น้ำหนักตัว พบการเสื่อมและตายของเซลล์เยื่อบุ proximal, distal convoluted tubules และ collecting duct

ง) การศึกษาการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตและอาหารสำเร็จรูปของสุนัข

Razzazi และ คณะ (2001) ทำการสำรวจการตกค้างของสารพิษ OTA ในอาหารเม็ดและอาหารกระป๋องของแมวและสุนัขและการตกค้างของสารพิษ OTA ในไตของแมวและสุนัข โดยเก็บตัวอย่างอาหารเม็ดชนิดเม็ด จำนวน 8 ตัวอย่าง และชนิดกระป๋อง จำนวน 20 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างอาหารสุนัขชนิดเม็ด จำนวน 2 ตัวอย่าง และชนิดกระป๋อง จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างอาหารทั้งหมดเก็บมาจากซูเปอร์มาร์เก็ตในประเทศโปแลนด์และออสเตรีย ส่วนตัวอย่างไตแมว จำนวน 26 ตัวอย่าง และไตสุนัข จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้จากการผ่าซาก จากสถาบันพยาธิวิทยาแห่งหนึ่ง ซึ่งสุนัขและแมวเหล่านี้ไม่ได้กินอาหารตัวอย่างชุดเดียวกับที่เก็บมาตรวจด้วย ตรวจหาระดับการตกค้างของ OTA ในเนื้อเยื่อไตและอาหารที่เก็บมาตรวจด้วยเทคนิค HPLC ผลปรากฏว่า พบการตกค้างของสารพิษ OTA ในอาหารสำเร็จรูปของสุนัขและแมว คิดเป็น 60 % ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ระดับการตกค้างของ OTA มีอยู่ในระดับที่ต่ำมาก คือ น้อยกว่า 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ อาหาร และอาหารเม็ดเพียง 2 ตัวอย่างเท่านั้น ที่พบการตกค้างอยู่ในระดับสูง คือ 13.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ อาหาร ส่วนการตกค้างของสารพิษ OTA ในไตแมว พบการตกค้างในไต จำนวน 16 ตัวอย่างจากทั้งหมด 26 ตัวอย่าง ระดับการตกค้างของสารพิษอยู่ในช่วง 0.1-1.63 $\mu\text{g}/\text{kg}$ น้ำหนักไต และมีไตแมว จำนวน 10 ตัวอย่าง ที่มี OTA น้อยกว่า 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ น้ำหนักไต ส่วนไตสุนัข พบการตกค้างของ OTA จำนวน 2 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ระดับการตกค้างของสารพิษ อยู่ในช่วง 0.26-0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ น้ำหนักไต จากผล

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ยังสรุปไม่ได้ว่าการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตกับการกินอาหารสำเร็จรูปที่มีการปนเปื้อนมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ เนื่องจากสุนัขและแมวเหล่านั้นไม่ได้กินอาหารชุดที่นำมาตรวจ

จ) รายงานการเกิดโรคไตในสุนัขของประเทศไทย

ในช่วงปลายปี 2547 ถึงปี 2548 มีรายงานการเกิดโรคไตของสุนัขเพิ่มสูงขึ้นในประเทศไทยและประเทศไต้หวันซึ่งสุนัขเหล่านี้มีประวัติการกินอาหารเม็ดยี่ห้อหนึ่งที่เกิดผลิตในประเทศไทย จากการศึกษาหาสาเหตุจากผู้ที่เกี่ยวข้องพบว่ามีสารพิษเชื้อรา Ochratoxin A และ Citrinin ในข้าวและข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสุนัขยี่ห้อดังกล่าว และในช่วงเวลาเดียวกันนี้หน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ติดตามศึกษาพยาธิสภาพของไตในสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง โดยสุนัขส่วนใหญ่มีประวัติการกินอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ด จากนั้นนำมาศึกษารอยโรคทางพยาธิวิทยา ผลการตรวจพบรอยโรคทางพยาธิวิทยา คือ contracted kidney และรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา คือ tubulonecrosis และพบการสะสมของ cast อยู่ภายในท่อไต ทางหน่วยพยาธิวิทยาจึงตั้งข้อสันนิษฐานว่า Ochratoxin A และ/ Citrinin อาจเป็นสาเหตุสำคัญของโรคไตในสุนัขเหล่านี้ อย่างไรก็ตามไม่พบรายงานการตรวจหาปริมาณการปนเปื้อนของสารพิษเชื้อราทั้งสองชนิดในอาหารที่ใช้เลี้ยงสุนัขป่วยกลุ่มนี้โดยตรง

ฉ) การตรวจหาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography; HPLC

OTA เป็นสารพิษที่ละลายน้ำหรือเมทานอลได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด มีความเป็นประจุเล็กน้อย สามารถจับเกาะได้ดีกับโปรตีนชนิดอัลบูมินในซีรัม (Marquardt and Frohlich, 1992) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า OTA ถูกสกัดออกจากเนื้อเยื่อและเลือดได้ดีด้วยสารละลาย chloroform หลังจากการปรับสภาพตัวอย่างให้เป็นกรด (pH = 2.5) (Valenta, 1998) ต่อมา Monaci และคณะ (2004) พัฒนาวิธีการสกัดสารพิษ OTA ออกจากเนื้อเยื่อไตสุกรโดยใช้สารละลาย ethyl acetate ในการสกัดและใช้วิธีการสกัดแบบของเหลว (Liquid liquid partition) วัดระดับการตกค้างของสารพิษด้วยเครื่อง fluorescence detector โดยใช้เทคนิค HPLC วิธีการสกัดดังกล่าวให้อัตราการคืนกลับสารเท่ากับ 86 % และปริมาณของสารที่ต่ำที่สุดที่เครื่อง fluorescence detector ตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) มีค่าเท่ากับ 0.14 ng/g ส่วนปริมาณสารที่ต่ำที่สุดที่ตรวจวัดได้โดยมีความถูกต้องและแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทางสถิติ (Limit of quantitation; LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.52 ng/g ผู้ศึกษาสรุปว่า การสกัดสารพิษ OTA โดยใช้วิธี liquid liquid partition เป็นวิธีที่ดี เนื่องจาก สามารถสกัดสารพิษออกและให้อัตราการคืนกลับของสาร (Recovery rate) สูงถึง 86 % และสารละลาย ethyl acetate ที่ใช้ในการสกัดมีราคาถูก มีความเป็นพิษต่ำ ปลอดภัยต่อคนและ

สิ่งแวดล้อม จึงนำวิธีและเทคนิคการตรวจดังกล่าวมาใช้ตรวจหาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตสุกรได้

ในปัจจุบันการตรวจหาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อและเลือดจากสัตว์ นิยมใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำและความน่าเชื่อถือได้สูงในการแยกสาร ใช้เครื่องตรวจวัดแบบ fluorescence detector ที่มีช่วงความยาวคลื่น 330-460 nm และใช้คอลัมน์แบบ reverse-phase extraction column (C_{18} column) (Enwisle *et al.*, 1997) เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้นิยมใช้ได้แก่ สารละลาย acetonitrile ร่วมกับ acetic acid หรือสารละลาย methanol ร่วมกับ acetic acid (อ้างอิงโดย Valenta, 1998)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 สัตว์ทดลองที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1.1 ซากสุนัขจากห้องชันสูตรซาก หน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 50 ตัว ไม่จำกัด พันธุ์ เพศ อายุ น้ำหนักโดยมีอาการทางคลินิกหรือรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาหรือจุลพยาธิวิทยาของไตวายเรื้อรัง ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึง ธันวาคม 2548

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.2.1 สารมาตรฐาน Ochratoxin A (Sigma Chemical. USA)

3.1.2.2 Glacial acetic acid (Carlo Erba, Italy)

3.1.2.3 Ortho phosphoric acid 85 % (Carlo Erba, Italy)

3.1.2.4 Acetonitrile (HPLC grade) (Lab Scan, Ireland)

3.1.2.5 Methanol (HPLC grade) (Lab Scan, Ireland)

3.1.2.6 Methanol (Analytical reagent grade) (Lab Scan, Ireland)

3.1.2.7 Methanol (Analytical reagent grade) (Merck, Germany)

3.1.2.8 Sodium hydrogen carbonate (Merck, Germany)

3.1.2.9 Liquid paraffin (Richard-Allan Scientific, Germany)

3.1.2.10 Xylene (Merck, Germany)

3.1.2.11 สีย้อม Hematoxilin & Eosin (Merck, Germany)

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.3.1 กรวยแก้ว

3.1.3.2 กระจกชั่งตวงขนาด 10 ml

3.1.3.3 กระจกตวง ขนาด 500 ml

3.1.3.4 Volumetric flasks ขนาด 5, 10, 25 และ 1000 ml

3.1.3.5 ปีกเกอร์ขนาด 50, 100 และ 250 ml

3.1.3.6 หลอดทดลอง ขนาด 2 ml

- 3.1.3.7 Centrifuge tube ชนิดแก้ว ขนาด 15 ml
- 3.1.3.8 Centrifuge tube ชนิดพลาสติก ขนาด 50 ml
- 3.1.3.9 HPLC column C₁₈ ODS 2 Spherisorb® 4.6 x 250 ml (Water, USA)
- 3.1.3.10 HPLC vial ขนาด 2 ml
- 3.1.3.11 Micropipette พร้อม tips ขนาด 20, 200, 1000 และ 5000 µl
- 3.1.3.12 Pasteur pipettes
- 3.1.3.13 RC- Syringe membrane filter เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 13 ml ขนาดกรอง 0.45 µm (Chromtech, USA)
- 3.1.3.14 Mobile phase membrane filter เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 ml ขนาดกรอง 0.45 µm (Sartorius, Germany)
- 3.1.3.15 Cassette สำหรับใส่ชิ้นเนื้อ
- 3.1.3.16 Jar สำหรับย้อมสี
- 3.1.3.17 กระจกสไลด์
- 3.1.3.18 แผ่นปิดกระจกสไลด์
- 3.1.4 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย
 - 3.1.4.1 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler, Germany)
 - 3.1.4.2 Centrifuge ZK364 (Hermle, Germany)
 - 3.1.4.3 High performance liquid chromatography CLASS LC-10 พร้อม Fluorescence detector รุ่น RF-10 AXL, ระบบประมวลผล CBM-10A, SIL-10A autoinjector, LC- 10 LC dual pump, Degasser DGU-12A (Shimadzu, Japan)
 - 3.1.4.6 Homogenizer POLYTRON 3000 (Kinematica AG, Switzerland)
 - 3.1.4.7 pH meter (Hanna instruments, Singapore)
 - 3.1.4.8 Sonicator TRANSSONIC 460/H (Elma, Germany)
 - 3.1.4.9 Vortex mixer genie 2 (Scientific industries, USA)
 - 3.1.4.10 เครื่องตัดชิ้นเนื้อ Mitotome (Leica instrument, Germany)
 - 3.1.4.11 กล้องจุลทรรศน์แบบแสงสว่าง (Olympus, Japan)

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

การดำเนินงานวิจัย ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน คือ

การศึกษาที่ 1 การศึกษารอยโรคทางพยาธิวิทยาของไต

การศึกษาที่ 2 การยืนยันความเชื่อมั่นของวิธีวิเคราะห์และการตรวจหาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ด้วย HPLC

การศึกษาที่ 3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตกค้างของสารพิษ OTA กับการเกิดพยาธิสภาพที่ไตในสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง

การศึกษาที่ 1 การศึกษารอยโรคทางพยาธิวิทยาของไต

แบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน คือ

การทดลองที่ 1 การตรวจรอยโรคทางมหัพยาธิวิทยา (Macroscopic findings)

1.1 เก็บตัวอย่างไตจากซากสุนัขที่ป่วยเป็นโรคไตวายเรื้อรังจากห้องชันสูตรซาก หน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีเกณฑ์การพิจารณาอาการดังต่อไปนี้ คือ ซึม แห้งน้ำ เบื่ออาหาร อาเจียน ปากเจ็บ เกร็ง ชัก ค่า creatinine > 1.5 IU และ BUN > 30 mg/dl (David *et al.*, 2000) หรือพบรอยโรคทางมหัพยาธิวิทยาชนิดไตหดตัว (contracted kidneys) หรือพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาชนิด interstitial nephritis โดยเก็บตัวอย่างแบบไปข้างหน้า (prospective) จำนวน 50 ตัวอย่าง ตั้งแต่ มกราคม ถึง ธันวาคม 2548

1.2 รวบรวมข้อมูลประวัติสัตว์ป่วย ได้แก่ พันธุ์ เพศ อายุ น้ำหนัก สภาพซาก (Stage of carcass) และความสมบูรณ์ซาก (Nutritional stage) ต่อมาทำการชันสูตรซากเพื่อเก็บตัวอย่าง (อัศจรรย์า และคณะ, 2547) สังเกตและจดบันทึกรอยโรคทางมหัพยาธิวิทยาที่ไต (Smith *et al.*, 1972)

แบ่งกลุ่มรอยโรคเป็น 7 ชนิด คือ

1.2.1 Contracted kidney ไตมีลักษณะหดตัว ผิวขรุขระและขนาดเล็กกว่าปกติ

1.2.2 Necrotic foci/plaque พบจุดเนื้อตายสีขาวหรือห่อมนเนื้อตายที่ผิวไต

1.2.3 Swollen and congestion ไตขยายขนาด บวม อาจพบการคั่งของเลือดหรือน้ำ

1.2.4 Pale in color ไตมีสีซีด

1.2.5 Renal calculi พบก้อนนิ่วสะสมที่กรวยไต

1.2.6 Renal infarction ห่อมนเนื้อตายบริเวณชั้นผิวด้านนอกของไตมีลักษณะเป็นลิ่มสีเข้ม

1.2.7 รอยโรคแบบอื่นๆ เช่น จุดเลือดออก หนองคั่งที่กรวยไต
จากนั้น ตัดเก็บเนื้อไตจากไตทั้งสองข้างตรงบริเวณที่มีรอยโรคให้เป็นรูปสามเหลี่ยมประกอบด้วย
ส่วนของ cortex และ medulla ให้มีน้ำหนักรวมกันประมาณ 50 g แล้วแบ่งเนื้อไตออกเป็น 2 ส่วน
ส่วนที่หนึ่งบรรจุในถุงพลาสติกมัดปากถุงให้แน่นและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อ
นำมาสกัดและวิเคราะห์หาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA อีกส่วนหนึ่งเก็บใส่ในขวดที่มี
บัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 % เพื่อนำไปศึกษาตามกระบวนการทางจุลพยาธิวิทยา

การทดลองที่ 2 การตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathological findings)

2.1 ชิ้นเนื้อไตที่มีรอยโรคจากส่วนที่เก็บอยู่ในบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 % นำมาตัดแต่ง
เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดของชิ้นเนื้อประมาณ 1x1x0.5 cm. แล้วเก็บรักษาไว้ในน้ำยาบัฟเฟอร์
ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 % อีกครั้งเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นเนื้อไปดำเนินการตาม
ขั้นตอนทางจุลพยาธิวิทยา ซึ่งเริ่มจากการล้างน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินออกด้วยน้ำเปล่า
(Washing) โดยปล่อยให้ให้น้ำไหลผ่านชิ้นเนื้อประมาณ ½ ชั่วโมง ต่อมาดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ โดย
แช่ชิ้นเนื้อผ่านลงในเมทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 30, 40, 60 % และ absolute alcohol
ตามลำดับ (ความเข้มข้นละ 40 นาที) จากนั้นทำให้ชิ้นเนื้อใส (Clearing) ด้วยไซลีนอีก 40 นาที
ต่อมาให้แช่ชิ้นเนื้อลงในพาราฟินซึ่งเนื้อเยื่อจะถูกฝังอยู่ในบล็อกพาราฟินนี้ จากนั้นตัดชิ้นเนื้อให้มี
ความหนา 4-5 μm ก่อนที่จะย้อมสีชิ้นเนื้อให้ผ่านขั้นตอนการละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ
(Deparaffinization) โดยใช้ไซลีนเติมน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (Rehydration) และแช่ใน absolute alcohol
จาก 95, 85 และ 70 %ตามลำดับ แล้วทำการย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยสี Hematoxylin and eosin (H&E
stain) หรือสีพิเศษอื่นๆ เช่น Congo red, PAS เป็นต้น (Luna, 1964)

2.2 นำชิ้นเนื้อเยื่อไตที่ย้อมสีแล้วไปตรวจดูลักษณะรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์
แบบแสงสว่าง แบ่งรอยโรคเป็น 4 ประเภท (Smith *et al.*, 1972) ดังนี้

2.2.1 Tubulonephrosis in proximal and distal convoluted tubule คือ การเสื่อมของเซลล์
เยื่อบุท่อไตส่วน proximal และ distal ซึ่งจะพบการสะสมของผลึก/โปรตีนภายในท่อไต (Tubular
cast) เซลล์เยื่อบุท่อไตขยายตัว (Tubular dilatation) ช่องว่างในเซลล์เยื่อบุท่อไต (Vacuolation of
tubular epithelium)

2.2.2 Tubulonecrosis in proximal and distal convoluted tubule คือ การลอกหลุดและตาย
ของเซลล์เยื่อบุท่อไตส่วน proximal และ distal จะพบนิวเคลียสของเซลล์ท่อไตหดตัวกันแน่นเป็น
สีเข้ม (Karyopyknosis) นิวเคลียสแตกตัว (Karyorrhexis) หรือนิวเคลียสสลายตัว (Karyolysis)
และพบการสะสมของแคลเซียมที่ฐานของเซลล์เยื่อบุท่อไต (Calcium deposit)

2.3.3 Glomerulonephritis คือ การอักเสบของโกลเมอรูลัสซึ่งพบได้หลายแบบ เช่น การอักเสบแบบ proliferative glomerulonephritis พบการงอกขยายของ endothelium และ mesangial cell การอักเสบแบบ membranous glomerulonephritis พบการหนาตัวของผนังหลอดเลือดใน glomerulus การอักเสบแบบ membranoproliferative glomerulonephritis หรือ amyloidonephrosis พบการงอกขยายของ endothelium, mesangial cell และการหนาตัวของผนัง glomerulus และ การอักเสบแบบ glomerulosclerosis พบการแทรกตัวของ fibrous tissue ภายใน glomerulus

2.2.4 Interstitial nephritis คือ การอักเสบของเนื้อเยื่อระหว่างท่อไต มีการแทรกตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte และ plasma cell ร่วมกับการแทรกตัวของเส้นใยคอลลาเจน

เกณฑ์การให้คะแนนรอยโรค Tubulonephrosis และ Tubulonecrosis (Uehara *et al.*, 1994) มีดังนี้

<u>No remarkable lesion</u>	(-)	ไม่พบรอยโรคและความเสียหายของท่อไต
<u>Mild</u>	(+)	พบการเสื่อม/ตายของท่อไต พบ cast ภายในท่อไต
<u>Moderate</u>	(++)	พบการเสื่อม/ตายของท่อไต พบ cast ภายในท่อไตมากขึ้น
<u>Severe</u>	(+++)	พบการเสื่อม/ตายของท่อไต ท่อไตฝ่อและโครงสร้างท่อไตถูกทำลาย

เกณฑ์การให้คะแนนรอยโรค Glomerulonephritis (Codner *et al.*, 1992) มีดังนี้

<u>No remarkable lesion</u>	(-)	ไม่พบรอยโรค
<u>Mild</u>	(+)	พบรอยโรคและโกลเมอรูลัสผิดปกติเล็กน้อย
<u>Moderate</u>	(++)	ผนังหลอดเลือดภายในโกลเมอรูลัสหดตัวบางส่วน
<u>Severe</u>	(+++)	ผนังหลอดเลือดภายในโกลเมอรูลัสหดตัวทั้งหมดและมีการแทรกตัวของเส้นใยโปรตีน

เกณฑ์การให้คะแนนรอยโรค Interstitial nephritis (Codner *et al.*, 1992) มีดังนี้

<u>No remarkable lesion</u>	(-)	ไม่พบรอยโรค
<u>Mild</u>	(+)	มีการสะสมของเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่รอบๆท่อไตเล็กน้อย
<u>Moderate</u>	(++)	มีการสะสมของเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่รอบๆท่อไตปานกลาง
<u>Severe</u>	(+++)	มีการสะสมของเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือเส้นใยคอลลาเจนที่รอบๆท่อไตมาก

การศึกษาที่ 2

การยืนยันความเชื่อมั่นของวิธีวิเคราะห์และการตรวจหาในระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ด้วย HPLC

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ

การทดลองที่ 3 การยืนยันความเชื่อมั่นของวิธีวิเคราะห์

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

ใช้ตัวอย่างของสารละลายมาตรฐาน OTA (Sigma, USA), acetonitrile (HPLC grade), methanol (HPLC grade), 1% acetic acid, 0.5 mol / L NaHCO₃, ethyl acetate, 1 mol / L H₃PO₄, 7 mol / L H₃PO₄, Distill H₂O (HPLC grade)

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)

สารละลายมาตรฐาน OTA เตรียมขึ้นจากสารละลายใน methanol ระดับ HPLC grade ได้เป็นสารละลายมาตรฐาน OTA ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำสารละลายมาตรฐาน ทำให้เป็น working solution ความเข้มข้น 0.1 µg/ml สารละลายที่เตรียมได้เก็บไว้ในภาชนะที่บดแสง แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิไม่เกิน 0° C

3.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

เตรียมสารละลาย OTA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 4 ความเข้มข้น ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณหาสมการเส้นตรงของกราฟด้วย linear least square equation จากนั้น คำนวณหาสัมประสิทธิ์ของการกระจายของข้อมูล (%CV) เพื่อประเมินความแม่นยำของผู้ทำการทดลองในวันนั้น (Intraday precision) และทำการวิเคราะห์เช่นนี้ซ้ำกัน 2 วัน เพื่อประเมินความแม่นยำของผู้ทำการทดลองระหว่างวัน (Interday precision) นอกจากนี้ให้คำนวณหาค่า limit of detection (LOD) และ ค่า limit of quantitation (LOQ)

$$\text{สมการเส้นตรง } y = ax + b$$

y = พื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน

x = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

a = ความชันของกราฟมาตรฐาน

b = จุดตัดของกราฟบนแกน y

เปอร์เซ็นต์ CV, Intraday และ Interday precision

$$\text{เปอร์เซ็นต์ CV} = \frac{\text{Standard deviation} \times 100}{\text{Mean}}$$

โดย Standard deviation (SD) ของแต่ละตัวอย่างได้มาจากการคำนวณด้วยโปรแกรม Excel® (Microsoft, USA)

$$\begin{aligned} \text{Intraday precision} &= \text{เปอร์เซ็นต์ CV ของตัวอย่างในแต่ละวัน} \\ \text{Interday precision} &= \text{เปอร์เซ็นต์ CV ของตัวอย่างระหว่างวัน} \end{aligned}$$

การคำนวณหาค่า limit of detection (LOD) และค่า limit of quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์ (Ambruster et al., 1994)

$$\text{LOD} = 3.3\delta / S$$

δ = จุดตัดแกน y ของสมการเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน

S = ค่าความชันของสมการเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน

$$\text{LOQ} = 10\delta / S$$

δ = จุดตัดแกน y ของสมการเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน

S = ค่าความชันของสมการเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน

การเปลี่ยนหน่วยความเข้มข้นของ OTA จาก ng/ml เป็น ng/g

อธิบายที่มาของสูตร

จากค่าความเข้มข้นของ OTA ที่คำนวณได้ในตอนแรกมีหน่วยเป็น ng/ml มีหมายความว่า

ในสารละลายปริมาตร	1000	µl	จะมี OTA อยู่	x	ng
ถ้าฉีดสารละลายเข้า HPLC เพียง	20	µl	จะมี OTA อยู่	0.02x	ng
ตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาตร	150	µl	จะมาจากเนื้อไต	2.5	g
ถ้าฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC เพียง	20	µl	จะมาจากเนื้อไต	0.33	g
ดังนั้น เนื้อไต	0.33	g	จะมี OTA	0.02x	ng
แต่ถ้ามีเนื้อไต	1	g	จะมี OTA	0.02x / 0.33	ng/g

(เมื่อ x คือ ค่า LOD หรือ LOQ ที่มีหน่วยเป็น ng/ml)

$$\text{LOD หรือ LOQ (ng/g)} = \text{ค่า LOD หรือ LOQ (ng/ml)} \times 0.02 / 0.33$$

4. การหาอัตราการคืนกลับของสาร (Recovery rate)

เติมสารละลาย OTA ความเข้มข้น 1 ng/g น้ำหนักไต ลงในตัวอย่างไตที่บดและปรับให้เป็นกรดแล้ว และแบ่งเนื้อไตดังกล่าวลงในหลอดทดลอง จำนวน 5 หลอด แต่ละหลอดมีเนื้อไตหนัก 2.5 g ทำการสกัดตัวอย่างดังกล่าว จากนั้น นำตัวอย่างที่สกัดแล้ว ฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาระดับการตกค้าง และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาอัตราการคืนกลับของสารในแต่ละหลอด ต่อมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราการคืนกลับของสาร จากนั้น นำค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้ในวันนั้นไปคำนวณหาสัมประสิทธิ์ของการกระจายของข้อมูล (%CV) เพื่อประเมินความแม่นยำของผู้ทำการทดลองในวันนั้น (Intraday precision) ทำการวิเคราะห์เช่นนี้ซ้ำกัน 3 วัน (15 ซ้ำ) เพื่อประเมินความแม่นยำของผู้ทำการทดลองระหว่างวัน (Interday precision)

อัตราการคืนกลับของสาร (Recovery rate)

$$\text{Recovery} = (\text{Fa} - \text{Fb}) \times 100 / \text{Fc}$$

Fa คือ ปริมาณของ OTA ในตัวอย่างที่เติม standard ที่ได้จากการวิเคราะห์

Fb คือ ปริมาณของ OTA ในตัวอย่างที่ไม่เติม standard ที่ได้จากการวิเคราะห์

Fc คือ ปริมาณของสารมาตรฐาน OTA ที่เติมลงในตัวอย่าง

การทดลองที่ 4 การตรวจหาระดับการตกค้างของ OTA ในเนื้อเยื่อไตสุ่นัข ด้วย HPLC

1. ตัวอย่างไต

นำตัวอย่างไตสุ่นัขที่แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน -20 องศาเซลเซียส จำนวน 50 ตัวอย่าง มาสกัดและตรวจหาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ตามวิธีของ Monaci และคณะ (2004)

2. ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

- 2.1 นำตัวอย่างไตที่ได้ทั้งหมดไปบดด้วยเครื่องปั่นจนละเอียด (Blender)
- 2.2 ตักเนื้อไตออกมา น้ำหนัก 20 g ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 ml
- 2.3 นำตัวอย่างไปบดด้วยเครื่อง Homogenizer ประมาณ 1 นาที
- 2.4 เติม 1M phosphoric acid ($1M H_3PO_4$) ปริมาตร 6 ml ลงในตัวอย่าง 20 g แล้วนำไปบดอย่างละเอียดอีกครั้ง ด้วยเครื่อง homogenizer
- 2.5 เนื้อไตที่บดละเอียดแล้วนำไปปรับให้เป็นกรด ($pH = 2.5$) ด้วย 7M phosphoric acid ($7M H_3PO_4$)
- 2.6 ตักตัวอย่างออกมา น้ำหนัก 2.5 g ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 ml
- 2.7 เติมสารละลาย ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$) ปริมาตร 5 ml ลงในหลอดตัวอย่าง
- 2.8 เขย่าตัวอย่างในหลอดให้เข้ากัน ด้วยเครื่อง vortex mixer ทุกๆ 5 นาที จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 1 นาที
- 2.9 นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 2500 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- 2.10 เมื่อปั่นเสร็จ ให้นำของเหลวส่วนบนที่ใส่ลงในหลอด centrifuge ที่มีปริมาตร 15 ml แล้วทำขั้นตอนที่ 7-8 ซ้ำอีกครั้ง
- 2.11 นำของเหลวในขั้นตอนที่ 10 มารวมกับของเหลวส่วนบนที่ทำซ้ำ
- 2.12 นำของเหลวที่ได้ไประเหยด้วยก๊าซไนโตรเจนในตู้ดูดควัน ให้เหลือของเหลวเพียง 3 ml
- 2.13 เติม 0.5 M/L โซเดียมไบคาร์บอเนต ($0.5M/L NaHCO_3$ $pH = 8.4$) ปริมาตร 3 ml ลงในตัวอย่าง แล้วเขย่าให้เข้ากัน
- 2.14 พักไว้จนของเหลวแยกเป็น 2 ชั้นชัดเจน
- 2.15 นำของเหลวส่วนบนทิ้งไปแล้วนำของเหลวส่วนล่างมาใช้
- 2.16 ปรับให้เป็นกรด ($pH = 2.5$) ด้วย 7M phosphoric acid ($7M H_3PO_4$)
- 2.17 นำไปไล่ก๊าซออกด้วยเครื่อง sonicator ประมาณ 10 วินาที
- 2.18 นำตัวอย่างสารละลายที่ได้ไปกรองผ่าน RC- Syringe membrane filter
- 2.19 สกัดซ้ำอีกครั้งโดยเติม ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$) ปริมาตร 3 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

2.20 พักไว้จนของเหลวแยกเป็น 2 ชั้น แล้วดูดเอาของเหลวส่วนบนด้วย pasteur pipette ไปใส่ลงในหลอด centrifuge ปริมาตร 15 ml แล้วนำของเหลวดังกล่าวไปเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน

2.21 เติม mobile phase ลงในหลอดตัวอย่าง ปริมาตร 150 μ l เพื่อละลายตะกอน

2.22 บรรจุของเหลวที่ได้ลงในหลอดขนาดเล็ก (Insert tube) ที่เตรียมไว้แล้วนำหลอดดังกล่าวไปบรรจุไว้ใน HPLC vial ปิดฝาให้แน่น

2.23 ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 μ l

การคำนวณหาระดับการตกค้างของสารพิษเชื้อรา OTA ในเนื้อเยื่อไตสุนัข

peak area ของสาร OTA ที่พบในตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Class-LC software (Shimadzu, Japan) นำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสาร OTA ต่อน้ำหนักไต

$$\text{ระดับการตกค้างของ OTA ที่ตรวจพบ (ng / g)} = 0.003 \times C_F \times W_H$$

C_F = ค่าความเข้มข้นที่อ่านได้จากตัวอย่างเมื่อเทียบกับ standard curve (ng/ml)

W_H = น้ำหนักของตัวอย่างหลัง homogenize (g)

การศึกษาที่ 3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตกค้างของสารพิษ OTA กับการเกิดพยาธิสภาพที่ไตในสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง

ก) จำแนกผลการศึกษาที่ได้จากการศึกษาที่ 1 และ 2 ออกเป็น 4 กลุ่ม โดยใช้รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาตามสมมุติฐานดังนี้

1. กลุ่มที่พบการตกค้างของ OTA และมีรอยโรค
2. กลุ่มที่พบการตกค้างของ OTA และไม่มีรอยโรค
3. กลุ่มที่ไม่พบการตกค้างของ OTA และมีรอยโรค
4. กลุ่มที่ไม่พบการตกค้างของ OTA และไม่มีรอยโรค

ข) ในแต่ละกลุ่มพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของรอยโรคในแต่ละชนิดกับระดับการตกค้างของ OTA ที่ตรวจพบ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาที่ 1 การศึกษารอยโรคทางพยาธิวิทยา

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ผลการตรวจรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา (Macroscopic findings) ในไตวายเรื้อรังของสุนัขที่ศึกษา

ผลการตรวจรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา (Macroscopic findings) ที่ไตของสุนัขที่มีกลุ่มอาการของโรคไตวายเรื้อรัง จำนวนทั้งหมด 50 ตัว จำแนกรอยโรคทางพยาธิสภาพของไต (Smith *et al.*, 1972) แบ่งรอยโรคที่พบ ได้แก่ contracted kidney, necrotic plaque, pale in color, renal swollen and congestion, renal infarction, renal calculi และรอยโรคอื่นๆ พบว่ารอยโรค contracted kidney คิดเป็น 66% (33/50) necrotic plaque คิดเป็น 44% (22/50) pale in color คิดเป็น 36% (18/50) renal swollen and congestion คิดเป็น 10% (5/50) renal infarction คิดเป็น 10% (5/50) renal calculi คิดเป็น 8% (4/50) และมีรอยโรคอื่นๆ คิดเป็น 14% (7/50) ได้แก่ petechial hemorrhage คิดเป็น 4% (2/50), pyelonephritis คิดเป็น 4% (2/50), ecchymotic hemorrhage คิดเป็น 2% (1/50), purulent exudates in the renal pelvis คิดเป็น 2% (1/50) และ hydronephrosis คิดเป็น 2% (1/50) นอกจากนี้ในตัวอย่างไตเดียวกันพบรอยโรคได้มากกว่า 1 ชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 (รูปที่ 2)

ตารางที่ 3 รอยโรคทางมหาพยาธิวิทยาของไตวายเรื้อรังในสุนัขกลุ่มศึกษา จำนวน 50 ตัว*

	Contracted kidney ¹	necrotic plaque ²	Pale ³	Swollen ⁴	Infarction ⁵	Calculi ⁶	Others ⁷
4P462L	/	/					
4P473N	/						
4P534C	/	/					
4P536C		/					
4P552N	/		/				
4P576C	/	/				/	
4P581C	/						
5P059W		/					
5P113L	/						
5P116C	/	/	/				
5P139R		/					
5P151A	/		/				
5P153A	/	/					
5P166W	/		/				
5P179L	/	/	/				
5P190A	/	/					
5P215D	/	/					
5P224S	/	/			/		
5P247W	/	/			/		
5P251L		/		/	/		
5P255L	/					/	
5P257L	/						
5P273R	/						/
5P276D			/				
5P283D	/		/				/
5P293N	/		/				
5P299S	/		/				
5P302A	/				/		
5P306A			/				/
5P312A			/				
5P313A			/			/	/
5P320N		/	/				

ตารางที่ 3 รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาของไตวายเรื้อรังในสุนัขกลุ่มศึกษา จำนวน 50 ตัว* (ต่อ)

	Contracted kidney ¹	necrotic plaque ²	Pale ³	Swollen ⁴	Infarction ⁵	Calculi ⁶	Others ⁷
5P321N	/	/					
5P324W				/			/
5P327W			/				
5P344D	/	/					
5P354R				/		/	
5P360R	/						
5P372N		/		/			
5P406A	/		/				
5P414D				/			
5P461D	/	/					
5P462D					/		
5P468D	/	/					
5P472D	/		/				/
5P504L	/	/					
5P505L	/	/					
5P517A			/				
5P532N	/						
6P003N			/				/
	66%(33/50)	44%(22/50)	36% (18/50)	10% (5/50)	10%(5/50)	8% (4/50)	14%(7/50)

1 Contracted kidney = irregular surface and fibrous tissue deposit

2 Necrotic plaque = white spot foci or white radial streak or white plaque on the renal surface

3 Pale in color

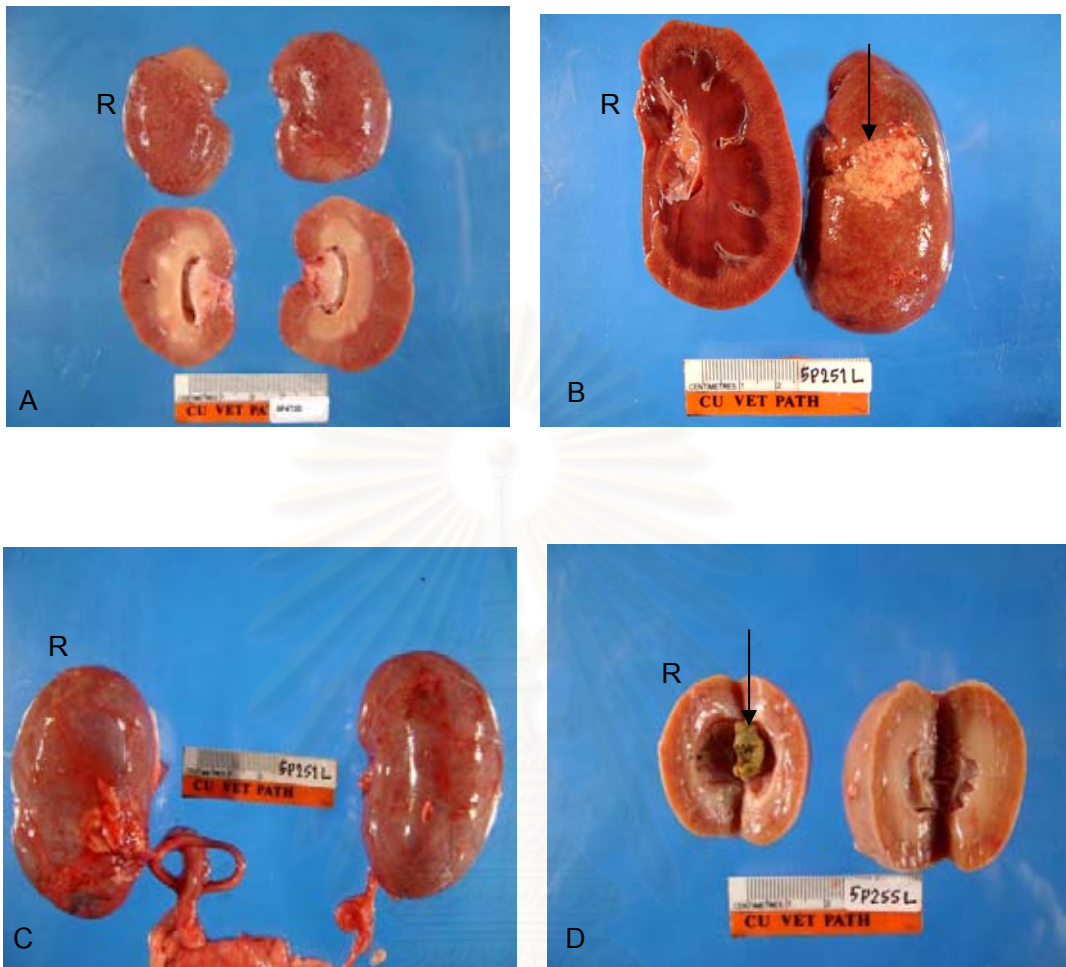
4 Renal swollen and congestion

5 Infarction = necrotic area in the renal cortex

6 Renal calculi = sand or stone calculi

7 Other = ecchymotic hemorrhage, purulent exudates in renal pelvis and hydronephrosis

* 1 ตัวอย่างพบรอยโรคได้มากกว่า 1 ชนิด



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แสดงรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาของไตสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรังในกลุ่มที่ศึกษา

- (A) Contracted kidney (5P472D) ไตหดตัว ผิวขรุขระและมีสีซีด
- (B) Necrotic plaque (ลูกศร)(5P251L) หย่อมเนื้อตายสีขาว
- (C) Renal congestion (5P251L) ไตมีสีแดงคล้ำกว่าปกติ
- (D) Renal calculi (5P255L) พบก้อนนิ่วภายในกรวยไต

การทดลองที่ 2 ผลการตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในไตของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง ในกลุ่มศึกษา จำนวน 50 ตัวอย่าง

ผลการตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของไตในสุนัขที่ศึกษา จำนวนทั้งหมด 50 ตัว จำแนกรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (Smith *et al.*, 1972) เป็น 4 ชนิด คือ tubulonecrosis, interstitial nephritis, tubulonephrosis และ glomerulonephritis แบ่งระดับความรุนแรงของรอยโรคเป็น 4 ระดับ คือ ไม่พบรอยโรค (-) พบรอยโรคระดับอ่อน (+) พบรอยโรคระดับปานกลาง (++) และพบรอยโรคระดับรุนแรง (+++) ดังนี้ 1) tubulonecrosis จำนวน 98% (49/50) พบความรุนแรงในระดับ (+) จำนวน 20% (10/50) ระดับ (++) จำนวน 36% (18/50) ระดับ (+++) จำนวน 42% (21/50) และระดับ (-) จำนวน 2% (1/50) 2) interstitial nephritis จำนวน 80% (40/50) พบความรุนแรงในระดับ (+) จำนวน 32% (16/50) ระดับ (++) จำนวน 34% (17/50) ระดับ (+++) จำนวน 14% (7/50) และระดับ (-) จำนวน 22% (11/50) 3) tubulonephrosis จำนวน 74% (37/50) พบความรุนแรงในระดับ (+) จำนวน 56% (28/50) ระดับ (++) จำนวน 18% (9/50) ระดับ (+++) จำนวน 0% (0/50) และระดับ (-) จำนวน 26% (13/50) 4) glomerulonephritis จำนวน 52% (26/50) พบความรุนแรงในระดับ (+) จำนวน 10% (5/50) ระดับ (++) จำนวน 20% (10/50) ระดับ (+++) จำนวน 22% (11/50) และระดับ (-) จำนวน 48% (24/50) นอกจากนี้ในตัวอย่างเดียวกันพบรอยโรคได้มากกว่า 1 ชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 (รูปที่ 3 และ 4)

ตารางที่ 4 แสดงชนิดและระดับความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของไตวายเรื้อรังในสุนัขกลุ่ม
ศึกษา จำนวน 50 ตัว*

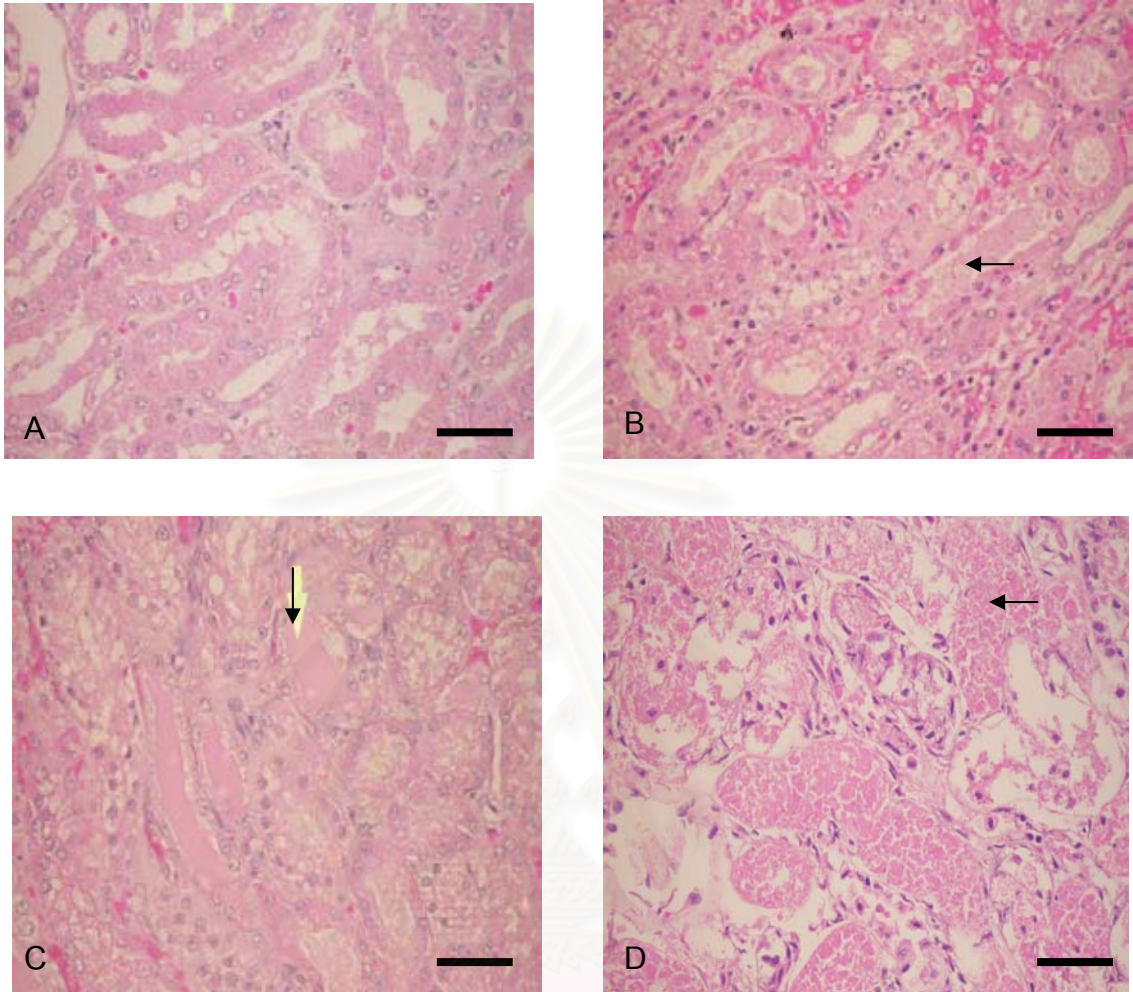
Access. No	การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของไต															
	Tubulonecrosis				Interstitial nephritis				Tubulonephrosis				Glomerulonephritis			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
4P462L				/				/				/				/
4P473N			/				/				/				/	
4P534C			/				/				/				/	
4P536C				/			/				/				/	
4P552N				/			/				/				/	
4P576C				/			/				/				/	
4P581C			/		/		/		/		/		/		/	
5P059W				/			/				/				/	
5P113L		/				/				/					/	
5P116C		/				/				/					/	
5P139R		/				/				/				/		
5P151A				/			/				/				/	
5P153A				/			/				/				/	
5P166W				/			/				/				/	
5P179L				/			/				/				/	
5P190A		/				/					/			/		
5P215D				/			/				/				/	
5P224S		/				/					/				/	
5P247W		/				/					/				/	
5P251L				/			/				/				/	
5P255L				/			/				/				/	
5P257L		/				/					/				/	
5P273R				/			/				/				/	
5P276D				/			/				/				/	
5P283D		/					/				/				/	
5P293N		/				/					/				/	
5P299S		/					/				/				/	
5P302A				/			/				/				/	
5P306A				/			/				/				/	
5P312A				/		/					/				/	
5P313A		/				/					/				/	

ตารางที่ 4 แสดงชนิดและระดับความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของไตวายเรื้อรังในสุนัข
กลุ่มศึกษา จำนวน 50 ตัว* (ต่อ)

Access. No	การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของไต															
	Tubulonecrosis				Interstitial nephritis				Tubulonephrosis				Glomerulonephritis			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
5P320N				/				/			/					/
5P321N			/		/						/					/
5P324W			/			/				/						/
5P327W			/					/		/					/	
5P344D			/		/					/				/		
5P354R		/					/		/					/		
5P360R			/		/						/					/
5P372N			/				/		/					/		
5P406A			/				/			/				/		
5P414D				/			/			/				/		
5P461D			/		/						/			/		
5P462D				/	/						/			/		
5P468D		/					/			/				/		
5P472D				/		/				/				/		/
5P504L	/					/			/					/		
5P505L				/			/		/					/		/
5P517A				/		/				/				/		
5P532N		/				/			/					/		
6P003N			/			/				/				/		
	1/50	10/50	18/50	21/50	10/50	16/50	17/50	7/50	13/50	28/50	9/50	0/50	24/50	5/50	10/50	11/50
	49/50 (98%)				40/50 (80%)				37/50 (74%)				26/50 (52%)			

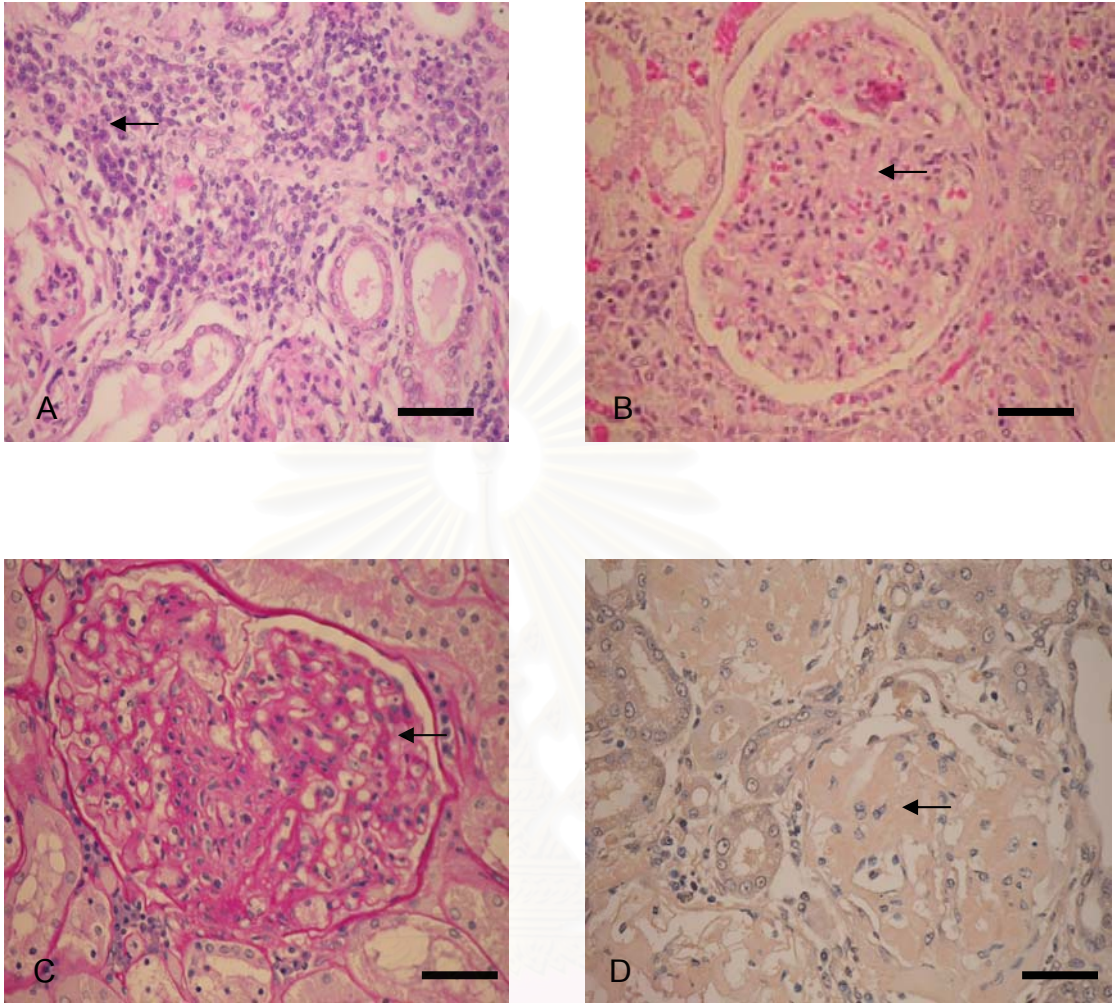
- (-) = no remarkable lesion
 (+) = mild degree
 (++) = moderate degree
 (+++) = severe degree

* ไต 1 ตัวอย่างพบรอยโรคได้มากกว่า 1 ชนิด



รูปที่ 3 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของไตในสุนัขกลุ่มศึกษา (H&E stain) (bar = 10 µm)

- A) เซลล์เยื่อบุท่อไตส่วน proximal และ distal convoluted tubules ที่ไม่พบรอยโรค (-) (5P419L)
- B) tubulonephrosis ระดับอ่อน (+) พบ cast จำนวนเล็กน้อย ที่ proximal and distal convoluted tubules (ลูกศร) (5P113L)
- C) Tubulonephrosis ระดับปานกลาง (++) พบ cast จำนวนปานกลาง ที่ proximal and distal convoluted tubules (ลูกศร) (5P360R)
- D) Tubulonecrosis ระดับรุนแรง (+++) พบการเสียหายของโครงสร้างเซลล์เยื่อบุท่อไตและมีการสะสมของ cast จำนวนมาก ที่ proximal and distal convoluted tubules (ลูกศร) (5P320N)



รูปที่ 4 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของไตสุนัขกลุ่มศึกษา (bar = 10 μ m)

A) Interstitial nephritis ระดับรุนแรง (+++) พบการแทรกตัวของ lymphocyte, plasma cells และ เส้นใยคอลลาเจน บริเวณช่องว่างระหว่างท่อไตจำนวนมาก (ลูกศร) (5P327W) (H&E stain)

B) Glomerulonephritis ชนิด proliferative ระดับรุนแรง (+++) พบการเพิ่มจำนวนของ endothelium, mesangial cells และ การแทรกตัวของเส้นใยโปรตีน (ลูกศร) (5P251L) (H&E stain)

C) Glomerulonephritis ชนิด membranous proliferative หรือ Amyloidosis ระดับปานกลาง (++) พบผนัง endothelium cells หนาตัวขึ้นและการเพิ่มจำนวนของ mesangial cells พบการสะสมของสารอมัยลอยด์ติดสีชมพูแดง (ลูกศร) (5P327W) (PAS stain)

D) Glomerulonephritis ชนิด membranous proliferative หรือ Amyloidosis ระดับรุนแรง (+++) พบการสะสมของสารอมัยลอยด์ติดสีแดงปนส้ม (ลูกศร) (5P324W) (Congo red stain)

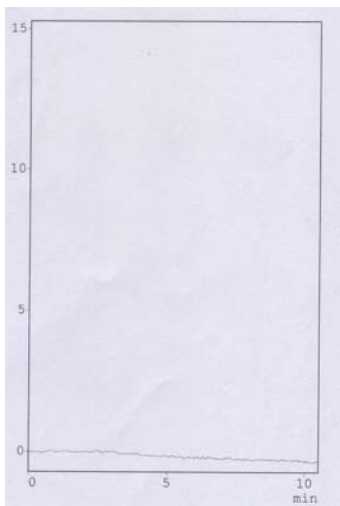
การศึกษาที่ 2 การตรวจหาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง คือ

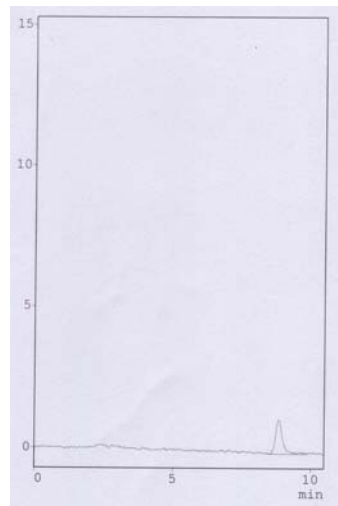
การทดลองที่ 3 การยืนยันความเชื่อมั่นของวิธีวิเคราะห์

1. การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

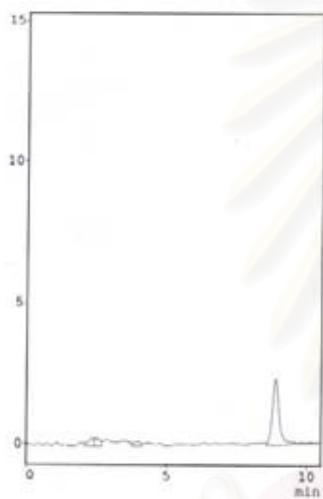
ทำการทดลองโดยนำสารละลายมาตรฐาน ochratoxin A ที่ความเข้มข้นต่างๆ 4 ระดับ คือ 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 ng/ml มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 1% acetic acid in 99% acetonitrile : 1% acetic acid in 99% water อัตราส่วน 50:50 แบบ binary gradient อัตราการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 ml/min และใช้เครื่องตรวจวัดแบบ fluorescence detector ที่ emission wave length เท่ากับ 334 nm excitation wave length เท่ากับ 460 nm ทำการฉีด 4 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตรการฉีดของสารละลายมาตรฐาน OTA ในแต่ละความเข้มข้น เท่ากับ 20 μ l พบว่า ระยะเวลาที่เฟสเคลื่อนที่พาสารละลายมาตรฐาน OTA เคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ (Retention time) นาน 9.320-9.385 min โดยสารละลายมาตรฐาน OTA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 ng/ml มีค่าพื้นที่ใต้ peak โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0, 20363, 38856 และ 75919 ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉลี่ย (Standard deviation; SD) มีค่าเท่ากับ 0, 171.4, 1234.7 และ 979.2 ตามลำดับ ส่วนสัมประสิทธิ์การกระจายของข้อมูลเฉลี่ย (Coefficient of variant; %CV) มีค่าเท่ากับ 0%, 0.8%, 3.1%, 1.2% ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ng/ml มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและสัมประสิทธิ์การกระจายของข้อมูลมากที่สุด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5 (รูปที่ 5)



(A)



(B)



(C)



(D)

รูปที่ 5 chromatogram peak ของสารละลายมาตรฐาน OTA ที่ใช้ mobile phase เป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ (ng/ml)

(A) chromatogram peak ของสารละลายมาตรฐาน OTA ความเข้มข้น 0.5 ng/ml

(B) chromatogram peak ของสารละลายมาตรฐาน OTA ความเข้มข้น 1.0 ng/ml

(C) chromatogram peak ของสารละลายมาตรฐาน OTA ความเข้มข้น 2.0 ng/ml

(D) chromatogram peak ของสารละลายมาตรฐาน OTA ความเข้มข้น 4.0 ng/ml

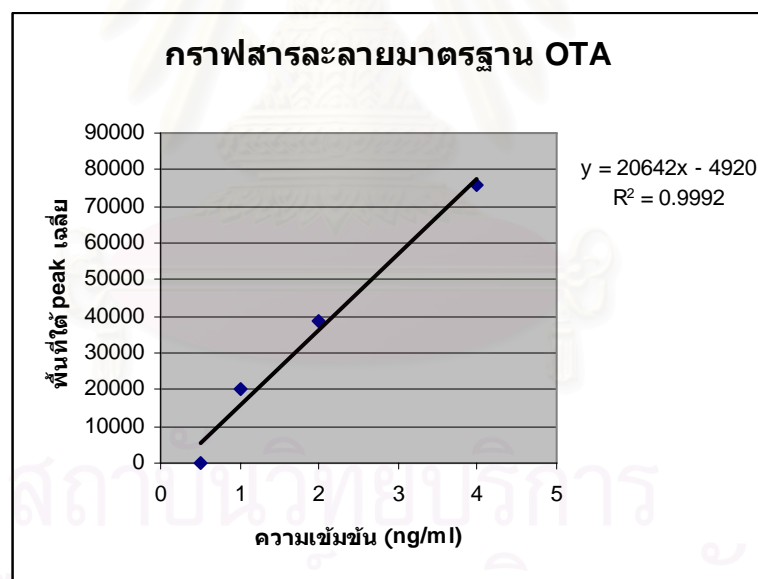
ตารางที่ 5 พื้นที่ใต้ peak, SD และ %CV ของสารละลายมาตรฐาน OTA

ความเข้มข้น (ng/ml)	พื้นที่ใต้ peak ของการวิเคราะห์				ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4			
0.5	--*	--*	--*	--*	--**	--**	--**
1.0	20604	20270	20148	20431	20363	171.4	0.8
2.0	37948	38969	37681	40826	38856	1234.7	3.1
4.0	76308	74440	75793	77136	75919	979.2	1.2

* ผลการวิเคราะห์ไม่ปรากฏ peak

** ไม่สามารถคำนวณได้

เมื่อนำ peak area เฉลี่ยของ OTA มาสร้างกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์กับความเข้มข้นทั้ง 4 ด้วยวิธี linear least square method พบว่า ได้สมการเส้นตรงเป็น $Y = 20642X - 4920$ และมีค่า R-square เป็น 0.9992 ดังแสดงไว้ใน รูปที่ 6



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานของ OTA แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area เฉลี่ยกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน OTA (ng/ml)

จากการวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธีด้วย %CV เพื่อหา intraday และ interday precision โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 4 ng/ml พบว่า ค่า interday precision ของความเข้มข้น 2 ng/ml มีค่า%CV เท่ากับ 3.1 % ส่วนความเข้มข้น 4 ng/ml มีค่า %CV เท่ากับ 1.8 % ค่า intraday precision ที่ระดับความเข้มข้น 2 ng/ml ในวันที่ 1 และ 2 มี

ค่า% CV เท่ากับ 3.1 % และ 2.9 % ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 4 ng/ml ในวันที่ 1 และ 2 มีค่า %CV เท่ากับ 1.2 % และ 1.1 % ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ Intraday และ interday precision ของสารละลายมาตรฐาน OTA

ความเข้มข้น ng/ml	Interday %CV = SD/X *100	Intraday (%CV)	
		วันที่ 1	วันที่ 2
2	3.1	3.1	2.9
4	1.8	1.2	1.1

การคำนวณหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของสารละลายมาตรฐาน OTA

จาก LOD = $3.3\sigma / S$
 แทนค่า $3.3 \times 4920 / 20642$
 เพราะฉะนั้น LOD = 0.78 ng/ml
 จาก LOQ = $10\sigma / S$
 แทนค่า $10 \times 4920 / 20642$
 เพราะฉะนั้น LOQ = 2.38 ng/ml

* แต่ค่า LOD และ LOQ ที่ได้มามีหน่วยความเข้มข้นเป็นน้ำหนักโดยปริมาตร (ng/ml) ต้องปรับหน่วยเป็นน้ำหนักโดยน้ำหนัก (ng/g) ดังนั้น (อ้างอิงที่มาของสูตรจากหน้า 24)

$$\text{LOD หรือ LOQ (ng/g)} = \text{ค่า LOD หรือ LOQ (ng/ml)} \times 0.02 / 0.33$$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า LOD} &= 0.78 \times 0.02/0.33 \\ &= 0.04 \text{ ng/g} \\ \text{LOQ} &= 2.38 \times 0.02/0.33 \\ &= 0.14 \text{ ng/g} \end{aligned}$$

ดังนั้น ค่า limit of detection (LOD) และ ค่า limit of quantitation (LOQ) ในการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ 0.04 และ 0.14 ng/g ตามลำดับ

2. การหาอัตราการคืนกลับของสาร (Recovery rate)

การวิเคราะห์หาอัตราการคืนกลับของสารในตัวอย่างที่ทำการเติมสารละลายมาตรฐาน OTA (Spiking sample) ความเข้มข้น 1 ng/g ลงในเนื้อไก่ที่บดอย่างละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน และปรับให้เป็นกรดที่ pH = 2.5 ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างในแต่ละวันๆ ละ 5 ซ้ำ และทำเช่นนี้ 3 วัน (รวมทั้งหมด 15 ซ้ำ) อัตราการคืนกลับของสารที่ได้ในวันแรกของหลอดทดลองที่ 1 ถึงหลอดทดลองที่ 5 มีค่าเท่ากับ 83%, 86%, 87%, 87% และ 76% ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 84% และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) เท่ากับ 4.16 ส่วนสัมประสิทธิ์ของการกระจายของข้อมูล (Coefficient of variant; %CV) หรือ ค่าความเชื่อมั่นในวันนั้น (Intraday precision) มีค่าเท่ากับ 4.7 % ส่วนวันที่สองอัตราการคืนกลับของสารในหลอดทดลองที่ 1 ถึงหลอดทดลองที่ 5 มีค่าเท่ากับ 83.2%, 92%, 92%, 35% และ 87% ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 78% และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) เท่ากับ 21.6 ส่วนสัมประสิทธิ์ของการกระจายของข้อมูล (Coefficient of variant; %CV) หรือ ค่าความเชื่อมั่นในวันนั้น (Intraday precision) มีค่าเท่ากับ 27.6 % และในวันที่สามอัตราการคืนกลับของสารในหลอดทดลองที่ 1 ถึงหลอดทดลองที่ 5 มีค่าเท่ากับ 86%, 90%, 82%, 81% และ 74% ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 83% และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) เท่ากับ 5.35 ส่วนสัมประสิทธิ์ของการกระจายของข้อมูล (Coefficient of variant; %CV) หรือ ค่าความเชื่อมั่นในวันนั้น (Intraday precision) มีค่าเท่ากับ 6.4 % อัตราการคืนกลับสารเฉลี่ยทั้งสามวัน มีค่าเท่ากับ 81.43% ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉลี่ยทั้งสามวัน มีค่าเท่ากับ 13.30 และสัมประสิทธิ์การกระจายของข้อมูลเฉลี่ยทั้งสามวัน มีค่าเท่ากับ 16.30 % ดังแสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์หาอัตราการคืนกลับสารของสารพิษเชื้อรา OTA

ครั้งที่	หลอดทดลองที่	%การคืนกลับสาร	%การคืนกลับสารเฉลี่ย	
			%±SD	% CV =SD/X *100
1	1	83	84%±4.16	4.70%
	2	86		
	3	87		
	4	87		
	5	76		
2	1	83.2	78%±21.60	27.60%
	2	92		
	3	92		
	4	35		
	5	87		
3	1	86	83%±5.35	6.40%
	2	90		
	3	82		
	4	81		
	5	74		
ผลเฉลี่ยรวม			81.43±13.30	16.30

จากการวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธีด้วย %CV เพื่อหา intraday และ interday precision ของอัตราการคืนกลับสาร พบว่า intraday precision ในครั้งที่ 1, 2 และ 3 มีค่า %CV เท่ากับ 4.70, 27.60 และ 6.40 % ตามลำดับ ส่วน interday precision ในครั้งที่ 1, 2 และ 3 มีค่า %CV เท่ากับ 19.50, 19.80 และ 5.85% ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ Intraday และ interday precision ของการหาอัตราสารคืนกลับสาร

	%CV=SD/X*100		%CV=SD/X *100
Interday(1)	19.50	Intraday(1)	4.70
		Intraday(2)	27.60
Interday(2)	19.80	Intraday(2)	27.60
		Intraday(3)	6.40
Interday(3)	5.85	Intraday(1)	4.70
		Intraday(3)	6.40

การทดลองที่ 4 การตรวจหาระดับการตกค้างของ OTA ในเนื้อเยื่อไตของสุนัขที่ศึกษา

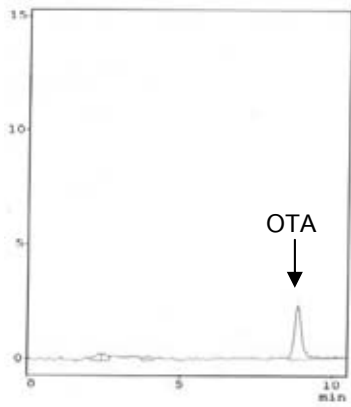
จากการตรวจวิเคราะห์ระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตของสุนัข จำนวนทั้งหมด 50 ตัว พบว่า มีการตกค้างของ OTA อยู่ในเนื้อเยื่อไต จำนวน 4 ตัว คือ ตัวอย่างรหัส 4P552N, 5P215D, 5P255L และ 5P320N โดยมีระดับการตกค้างของ OTA เท่ากับ 0.07, 0.21, 0.10 และ 0.04 ng/g ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตสุนัขกลุ่มศึกษาที่พบการตกค้างของ OTA จำนวน 4 ตัว

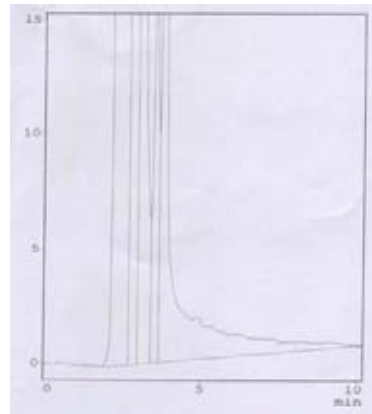
รหัสตัวอย่าง Access No.	Retention time (min)	สกัดครั้งที่ 1 (ng/g)	สกัดครั้งที่ 2 (ng/g)	ค่าเฉลี่ย (ng/g)
4P552N	8.87	0.06	0.08	0.07
5P215D	8.81	0.11	0.31	0.21
5P255L	8.84	0.08	0.12	0.10
5P320N	8.88	0.04	_*	_**

_* ปริมาณของตัวอย่างไม่เพียงพอในการวิเคราะห์ซ้ำ

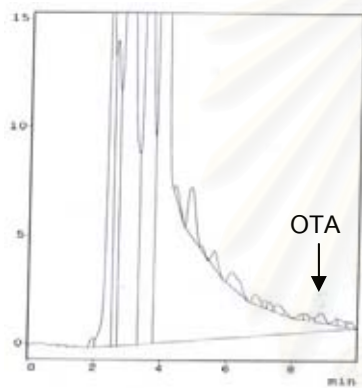
_** ไม่สามารถหาค่าเฉลี่ยได้



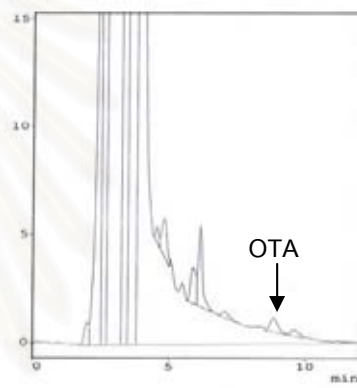
รูปที่ 7 กราฟมาตรฐาน OTA



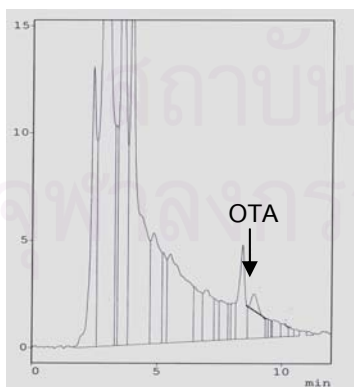
รูปที่ 8 chromatogram peak ของ 5P357R
(Negative control)



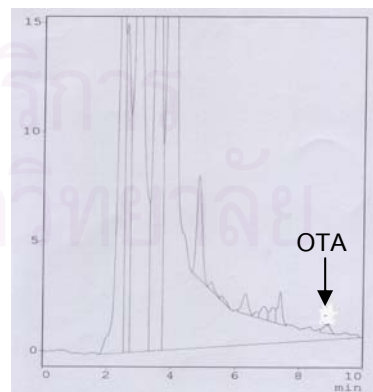
รูปที่ 9 chromatogram peak ของ 4P552N
retention time 8.87 min



รูปที่ 10 chromatogram peak ของ 5P215D
retention time 8.81 min



รูปที่ 11 chromatogram ของ 5P255L
Retention time 8.84 min



รูปที่ 12 chromatogram peak ของ 5P320N
retention time 8.88 min

การศึกษาที่ 3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตกค้างของสารพิษ OTA กับพยาธิสภาพที่ไตในสุนัขกลุ่มศึกษาที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง

ความสัมพันธ์ระหว่างสุนัขที่ตรวจพบการตกค้างของสารพิษเชื้อราอ็อกคราโทกซินเอกับพยาธิสภาพที่ไตของสุนัขเหล่านั้นที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง พบว่า ระดับการตกค้างของ OTA มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของรอยโรคชนิด glomerulonephritis อย่างสูง ($r^2 = 0.8$) สุนัขตัวอย่าง 4P552N มีการตกค้างของ OTA อยู่ในระดับ 0.07 ng/g น้ำหนักไต รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่ไตคือ contracted kidney และ pale รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ได้แก่ tubulonecrosis และ tubulonephrosis ที่ proximal และ distal convoluted tubules และ interstitial nephritis อยู่ในระดับ (+++), (+) และ (++) ตามลำดับ สุนัขตัวอย่าง 5P215D มีการตกค้างของ OTA อยู่ในระดับ 0.21 ng/g น้ำหนักไต รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่ไตคือ contracted kidney และ necrotic plaque พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ได้แก่ tubulonecrosis และ tubulonephrosis ที่ proximal และ distal convoluted tubules, glomerulonephritis และ interstitial nephritis อยู่ในระดับ (+++), (+), (++) และ (++) ตามลำดับ สุนัขตัวอย่าง 5P255L มีการตกค้างของ OTA อยู่ในระดับ 0.10 ng/g น้ำหนักไต รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่ไตคือ contracted kidney และ renal calculi รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ได้แก่ tubulonecrosis และ tubulonephrosis ที่ proximal และ distal convoluted tubules, interstitial nephritis และ glomerulonephritis อยู่ในระดับ (+++), (+), (+) และ (++) ตามลำดับ สุนัขตัวอย่าง 5P320N มีการตกค้างของ OTA อยู่ในระดับ 0.04 ng/g น้ำหนักไต พบรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่ไตคือ pale และ necrotic plaque พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของ tubulonecrosis และ tubulonephrosis ที่ proximal และ distal convoluted tubules และ interstitial nephritis อยู่ในระดับ (+++), (+) และ (++) ตามลำดับ ในสุนัขทั้ง 4 ตัวที่พบการตกค้างของสารพิษ OTA รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่พบมากที่สุดคือ contracted kidney, pale in color, necrotic plaque และ renal calculi จำนวน 75% (3/4), 50% (2/4) 50%(2/4) และ 25%(1/4) ตามลำดับ ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบมากที่สุด คือ tubulonecrosis, tubulonephrosis, interstitial nephritis และ glomerulonephritis จำนวน 100% (4/4), 100% (4/4), 100%(4/4) และ 50%(2/4) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ามี ความสัมพันธ์กันระหว่างระดับการตกค้างของ OTA กับระดับความรุนแรงของรอยโรคชนิด glomerulonephritis ($r^2 = 0.8$) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 10 (รูปที่ 13)

ในสุนัขที่ตรวจไม่พบการตกค้างของสารพิษเชื้อราอ็อกคราโทกซินเอกับพยาธิสภาพที่ไตของสุนัขเหล่านั้นที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง มีจำนวน 46 ตัว จากทั้งหมด 50 ตัว รอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่พบได้ คือ contracted kidney, necrotic plaque, pale in color, renal swollen, renal infarction, renal calculi และอื่นๆ จำนวน 63% (29/46), 43% (20/46), 35% (16/46), 20%

(9/46), 11% (5/46), 7% (3/46) และ 15% (7/46) ตามลำดับ ส่วนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบได้ คือ tubulonecrosis, interstitial nephritis, tubulonephrosis และ glomerulonephritis จำนวน 98% (45/46), 78% (36/46), 71% (33/46) และ 50% (23/46) ตามลำดับ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ตัวอย่างไตสุนัขที่ตรวจพบการตกค้างของสารพิษ OTA และความรุนแรงของรอยโรคทางพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาในระดับต่างๆ จำนวน 4 ตัวอย่าง

Access No	Macroscopic lesions				Microscopic lesions				OTA analysis (ng/g)
	Contracted Kidneys	Pale	Necrotic plaque	Renal calculi	Tubulo necrosis	Tubulo-nephrosis	Interstitial-nephritis	Glomerulo-Nephritis*	
4P552N	/	/			+++	+	++	-	0.07
5P215D	/		/		+++	+	++	++	0.21
5P255L	/			/	+++	+	+	++	0.10
5P320N		/	/		+++	+	++	-	0.04
	3/4 (75%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	1/4 (25%)	4/4(100%)	4/4(100%)	4/4(100%)	2/4(50%)	

- no remarkable lesion

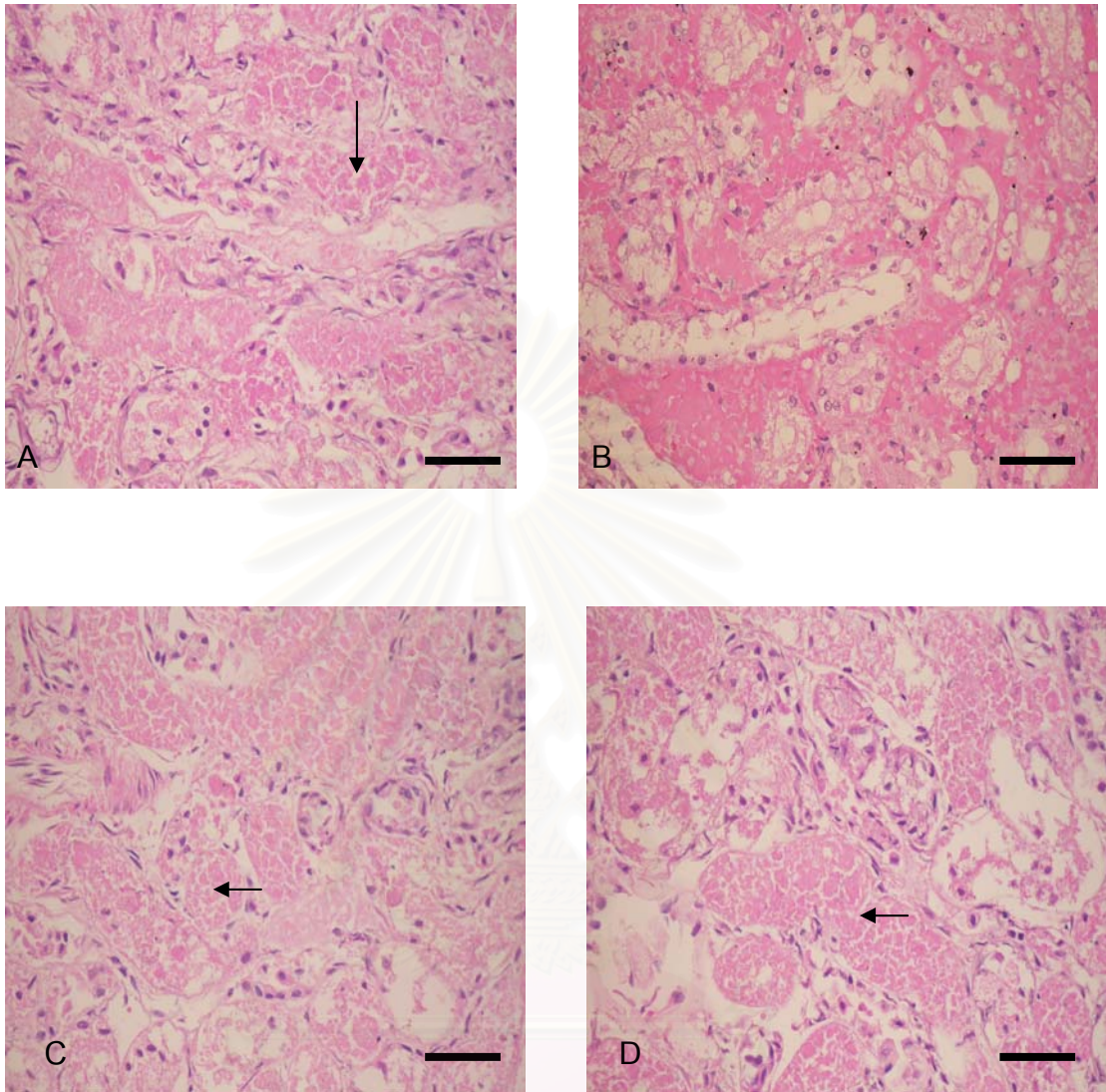
+ mild degree

++ moderate degree

+++ severe degree

* $r^2 = 0.8$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของไตสุนัขกลุ่มศึกษาที่ตรวจพบการตกค้างของสารพิษ OTA (H&E) (bar = 10 μ m)

(A-D) Tubulonecrosis ระดับรุนแรง (+++) พบการสะสมของ cast ภายในช่องว่างของท่อไต (ลูกศร) และโครงสร้างของเซลล์เยื่อบุท่อไตเสียหายทั้งหมดจากตัวอย่างไต 4P552N, 5P215D, 5P255L และ 5P320N ตามลำดับ

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษารอยโรคทางพยาธิวิทยาของสุนัขกลุ่มศึกษาที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรัง จำนวน 50 ตัว แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 การศึกษารอยโรคทางพยาธิวิทยาพบรอยโรคเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยคือ contracted kidney, necrotic plaque, pale in color, renal swollen and congestion, renal infarction และ renal calculi ส่วนขั้นตอนที่ 2 เป็นการศึกษารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยคือ tubulonecrosis, interstitial nephritis, tubulonephrosis และ glomerulonephritis ซึ่ง Smith และคณะ (1972) ได้อธิบายไว้ว่า ไตที่มีรอยโรคทางพยาธิวิทยาแบบ contracted kidney และ/หรือ มีรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาแบบ interstitial nephritis ที่พบการแทรกตัวของ collagen และ/หรือ fibroblast เป็นลักษณะรอยโรคที่บ่งชี้ถึงความเสียหายของไตอย่างเรื้อรัง

การตรวจหาระดับการตกค้างของ OTA ในเนื้อเยื่อไตของสุนัขกลุ่มศึกษาด้วยเทคนิค HPLC แบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 เป็นการยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องมือและความเชื่อมั่นของผู้วิเคราะห์ เมื่อนำ area peak เฉลี่ยของสารละลายมาตรฐาน OTA จำนวน 2 ความเข้มข้น (2 และ 4 ng/ml) มาคำนวณหา %CV เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องมือพบว่า ค่า %CV ที่ได้จากทั้ง 2 ความเข้มข้นมีค่าน้อยกว่า 15% ซึ่งอยู่ในระดับที่ยอมรับได้และสอดคล้องกับรายงานของ Armbruster และคณะ (1994) การยืนยันความเชื่อมั่นของผู้วิเคราะห์ทำได้โดยการหาอัตราการคืนกลับสาร (Recovery rate) ซึ่งการศึกษานี้มีค่าเท่ากับ 81.43 % อยู่ในระดับที่ยอมรับได้และมีค่าที่ใกล้เคียงกับรายงานของ Monaci และคณะ (2004) นอกจากนี้ peak ของสารพิษ OTA แยกออกจาก peak ของสารประกอบอื่นได้อย่างสมบูรณ์สอดคล้องกับรายงานของ Monaci และ คณะ (2004) ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์หาระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในเนื้อเยื่อไตของสุนัขกลุ่มศึกษาจำนวนทั้งหมด 50 ตัว ผลปรากฏว่า พบการตกค้างของสารพิษ OTA ในไตของสุนัขจำนวน 4 ตัว และปริมาณการตกค้างอยู่ในระดับ 0.04 ถึง 0.21 ng/g ซึ่งเป็นระดับที่ใกล้เคียงกับที่ตรวจพบในรายงานของ Razzazi และคณะ (2001) การพบการตกค้างของ OTA ในไตนี้แสดงว่า สุนัขทั้ง 4 ตัวนี้เคยได้รับสัมผัสกับ OTA มาก่อนขณะที่ยังมีชีวิตอยู่

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตกค้างของ OTA กับระดับความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า มีเพียงรอยโรค glomerulonephritis เท่านั้นที่มีความรุนแรงของรอยโรคเพิ่มขึ้นตามระดับการตกค้างของ OTA ที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่า r^2 เท่ากับ 0.8 และเมื่อนำผลการตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของสุนัขกลุ่มศึกษาทั้ง 4 ตัว (4/50) ที่พบการตกค้างของ OTA ไปเปรียบเทียบกับรายงานของ Kitchen และคณะ (1977b) ที่ศึกษาถึงความเป็นพิษของ OTA กับรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในท่อไตของสุนัขทดลองโดยแบ่งสุนัขทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) ได้รับ OTA เพียงอย่างเดียว 2) ได้รับ Citrinin เพียงอย่างเดียว และ 3) ได้รับ OTA ร่วมกับ Citrinin พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของท่อไตที่เด่นชัดในสุนัขทดลองแต่ละกลุ่มเรียงตามลำดับ คือ Tubulonephrosis, Tubulonecrosis และ Tubulonecrosis ร่วมกับ Tubulonecrosis พบว่า สุนัขทั้ง 4 ตัวนี้มีรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่เด่นชัดและมีความรุนแรงมากที่สุด คือ Tubulonecrosis ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kitchen และคณะ (1977b) ที่ให้สุนัขทดลองได้รับสารพิษ Citrinin เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้มีรายงานการปนเปื้อนของสารพิษ OTA และ Citrinin ในข้าวและข้าวโพดซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารสำเร็จรูปในประเทศไทย ดังนั้น สุนัขทั้ง 4 ตัวที่ตรวจพบการตกค้างของ OTA น่าจะได้รับสัมผัสสารพิษ OTA และ/ หรือ Citrinin ร่วมกันไป ส่วนสุนัขกลุ่มศึกษา จำนวน 46 ตัว (46/50) ที่ตรวจไม่พบการตกค้างของ OTA มีรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่เด่นชัดคือ Tubulonecrosis และ Tubulonephrosis และรอยโรคดังกล่าวในสุนัขกลุ่มนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Kitchen และคณะ (1977b) ที่ให้สุนัขทดลองได้รับ OTA และ/หรือ Citrinin จึงมีความเป็นไปได้ว่าสุนัขในกลุ่มศึกษานี้ อาจเคยได้รับสัมผัสสารพิษ OTA และ/หรือ Citrinin มาก่อน แต่การตรวจไม่พบ OTA ในครั้งนี้ อาจเนื่องจากสารพิษได้ถูกเมตาบอไลต์และถูกกำจัดออกไปจนไม่สามารถตรวจพบระดับการตกค้างของสารพิษได้ ซึ่ง Kuiper-Goodman และ Scott (1989) ได้อธิบายไว้ว่า การที่จะตรวจพบการตกค้างของสารพิษนั้นๆ ในเนื้อเยื่อสัตว์ขึ้นอยู่กับ ปริมาณ ระยะเวลาและกระบวนการเมตาบอไลต์ของสารพิษชนิดนั้นๆ ในเนื้อเยื่อ

นอกจากนี้มีความเป็นไปได้ว่าโรคไตที่เกิดขึ้นกับสุนัขในกลุ่มนี้อาจเกิดได้จากสาเหตุอื่น เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเลปโตสไปโรซิส (*Leptospira interrogans serova canicola and icterohemorrhagiae*) การติดเชื้อ adenovirus (Infectious Canine Hepatitis) การติดเชื้อปรสิต (Dirofilariasis และ Ehrlichiosis) ความเป็นพิษจากสารเคมี เช่น สารพิษเชื้อรา (Ochratoxin A และ Citrinin) ความเป็นพิษจากยา (Cephalosporin, Sulfonamide และ Aminoglycoside) ความเป็นพิษจากโลหะหนัก (Cadmium, Copper และ Lead) และภาวะการป่วยเรื้อรังที่เหน็ดเหนื่อยทำให้เกิด Autoimmune formation complex (Hildebrandt *et al.*, 1973; William and Mcdonald, 1995; Thomas *et al.*, 1997; Wander and Colin, 1998) เป็นต้น ถึงแม้ว่ารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของสุนัขทั้งสองกลุ่มศึกษาจะสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (Kitchen *et al.*, 1977b) แต่ก็ตั้ง

ข้อสังเกตได้ว่า รอยโรคทางพยาธิวิทยาแบบลำไส้กลืนกัน (Intussusception) ที่พบในสุนัขทดลอง (Carlton *et al.*, 1974; Kitchen *et al.*, 1977b) ไม่พบในสุนัขกลุ่มศึกษาครั้งนี้

การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของค่าเคมีโลหิตที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของไต (Blood urea nitrogen; BUN, Creatinine) กับระดับการตกค้างของ OTA ในสุนัขกลุ่มศึกษาทั้ง 4 ตัวที่พบการตกค้างของสารพิษ OTA พบว่า ค่า BUN และ ค่า Creatinine ในสุนัขกลุ่มนี้จะเพิ่มสูงขึ้นตามระดับการตกค้างของ OTA ที่เพิ่มขึ้น (ภาคผนวกที่ 3 หน้า 66) โดยมีค่า r^2 ของค่า BUN และ Creatinine เท่ากับ 0.8 และ 0.7 ตามลำดับ แต่ค่า BUN และ Creatinine ที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าค่าปกติ (ค่าปกติของ BUN < 30 mg/dl, Creatinine < 1.5 IU) ในสุนัขกลุ่มศึกษาทั้ง 4 ตัวนี้ไม่สอดคล้องกับค่า BUN และ Creatinine ของสุนัขทดลองที่ได้รับสารพิษ OTA โดย Szczech และคณะ (1973a) ซึ่งมีค่าดังกล่าวอยู่ในระดับที่ปกติ

5.2 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสุนัขที่ป่วยด้วยโรคไตวายเรื้อรังในกลุ่มศึกษาตั้งแต่ มกราคม 2548 - ธันวาคม 2548

1. วิธีการสกัดสารพิษ OTA แบบ Liquid liquid partition และเทคนิคการตรวจหาระดับการตกค้างของ OTA ด้วย HPLC ที่ใช้ในสุกรสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในสุนัขได้เพราะมีค่าความเชื่อมั่นของเครื่องมือและความสามารถของผู้วิเคราะห์ที่อยู่ในระดับที่ยอมรับได้
2. การตรวจพบสารพิษ OTA ในสุนัขกลุ่มศึกษาจำนวน 4 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 50 ตัวอย่างเป็นการยืนยันว่าสุนัขทั้ง 4 ตัวนี้ได้รับสัมผัสสารพิษดังกล่าวตามธรรมชาติและสารพิษ OTA เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังในครั้งนี้ ซึ่งสุนัขกลุ่มนี้ได้รับสัมผัสสารพิษ OTA มาจากการกินอาหารที่มีการปนเปื้อน

การศึกษาครั้งนี้เป็นการยืนยันการได้รับสัมผัสสารพิษ OTA มาจากการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารพิษเชื้อราดังกล่าวในห่วงโซ่อาหารของสุนัขจากกรณีศึกษาที่มีโรคไตวายเพิ่มมากขึ้นในช่วงปี 2548 ดังนั้นเพื่อลดความเสี่ยงของสุนัขในการได้รับสัมผัสสารพิษเชื้อราจากอาหารที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ จึงมีแนวทางการเฝ้าระวังและป้องกันดังนี้ คือ ผู้ผลิตอาหารจะต้องคำนึงถึงคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารโดยป้องกันมิให้เกิดความชื้นและเก็บรักษาวัตถุดิบในที่อุณหภูมิพอเหมาะ ไม่เก็บวัตถุดิบไว้นานเกิน เลือกว่าวัตถุดิบในการผลิตอาหารที่มีคุณภาพดีจากแหล่งที่เชื่อถือได้ตลอดจนสุ่มตรวจหาการปนเปื้อนสารพิษเชื้อราในวัตถุดิบเป็นประจำ เป็นต้น นอกจากนี้เจ้าของสุนัขควรเลือกซื้ออาหารสำเร็จรูปจากผลิตภัณฑ์ที่เชื่อถือได้ เมื่อเปิดถุงผลิตภัณฑ์อาหารแล้วควรมัดปากถุงให้แน่นเพื่อป้องกันอาหารไม่ให้ชื้นซึ่งจะทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดี และถ้า

แหล่งวัตถุดิบที่ใช้ผลิตอาหารสุนัขมีการปนเปื้อนของสารพิษเชื้อรา OTA แล้วนำวัตถุดิบจากแหล่งดังกล่าวไปใช้ในการผลิตอาหารสุกร จะมีผลทำให้คนได้รับสัมผัสสารพิษนี้จากการบริโภคเนื้อหรือผลิตภัณฑ์จากสุกรที่มีการตกค้างของสารพิษ OTA ได้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

อัจฉริยา ไศละสูต, อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ และ สมพร เตชะงามสุวรรณ. 2547. การชันสูตรซากสัตว์. กรุงเทพฯ. ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลปอยท์กราฟฟิค. หน้า 59-60, 71.

ภาษาอังกฤษ

Abramson, D., Simha, R.N. and Mills, J.T. 1980. Mycotoxin storage and odor formation in moist cereal grain during granam storage. *Cereal. Chem.* 57: 346-351.

Armbruster, D.A., M.D. Tillman. and L. M. Hubbs. 1994. Limit of detection (LOD) / Limited of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clinical. Chem.* 40: 1233-1238.

Baudrimont, I., Abouandjivo, R. and Creppy, E.E. 1997. Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in vero cells in culture by several agents. *Chem. Boil. Inter.* 104: 29-40.

Carlton, W.W., Sansing, G. and Szczech, M. 1974. Citrinin mycotoxin in beagle dogs. *Food and Cosmet Toxicol.* 12: 479-484.

Chu, F.S., Noh, I. and Chang, C.C. 1972. Structural requirements for ochratoxin intoxication. *Life. Sci. Part I, II:* 503-508.

Codner, E.C., Saunders, G.K., Smith, C.A., Robertson, J.L., Martin. R.A. and Troy, G.C. 1992. Investigation of glomerular lesion in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *Am. J. Vet. Res.* 53: 2286-2291.

Creppy, E.E., Castegnaro, M. and Dirheimer, G. 1993. Human ochratoxicosis and its pathologies. In *Proceeding of International symposium: Human ochratoxicosis and associated pathologies in africa and developing country.* Bordeaux France. Vol 231. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext.

David, J., Polzin, C.A., Osborne, F.J. and Sheri, R. 2000. *Veterinary internal medicine (vol.2)* 5nd. Saunders company. Philadephia. U.S.A.: 1634-1662.

- Dirheimer, G. and Creppy, E.E. 1991. Mechanism of action of ochratoxin A. *IARC.Sci._Publ.* 115: 171-186.
- Entwisle, A.C., Jogensen, K., William,A.C. and Boenke, P.J., Farmell. 1997. *Food. Addit. Contam.* 14: 223.
- Galtier, P. 1978. Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology-ochratoxin A. *Vet. Sci. Commun.* 1: 349-358.
- Galtier, P., Alvineric, M. And Charpenteau, J.L. 1981. The phamacokinetic profiles of ochratoxin A in pig, rabbits and chickens. *Food. Cosmet. Toxicol.* 19: 735-738.
- Gautier, J.C., Holzheuser, D., Markovic, J., Gremaud, E., Schilter, B. and Turesky, R.J. 2001. Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free. Radic. Boil. Med.* 30: 1089-1098.
- Hagelberg, S., Hult, K. and Funchs, R. 1989. Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J. Appl. Toxicol.* 9: 91-96.
- Harwig, J., Scott, P.M., Stolz, D.R. and Blanchfield, B.J. 1979. Toxin of molds from decaying tomato fruit. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 267-274.
- Harwig, J., Kuiper-Goodman, T. and Scott, P.M. 1983. Microbial food toxicant: ochratoxins. In: Rechcigl, M., ed., *Hand book of foodborne diseases of biological origin*, Boca Raton, FL: CRC press: 193-238.
- Hildebrandt, P.K., Huxol, D.L., Walker, J.S., Nims, R.M., Taylor, R. and Andrews., M. 1973. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). *Am. J. Vet. Res.* 34: 1309-1320.
- IARC. 1993. Ochratoxin A. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human: some naturally occurring substance, Food items and constituents, Heterocyclic aromatic amines and mycotoxin.* 56: 26-32.
- Isabelle, B., Branko, S., Colette, Y., Anne-Marie B., Sebastien Dano-Djedje, A., Pieter. S. and Creppy, E. 2001. Aspartame prevents the karyomegaly induced by ochratoxin A in rat kidney. *Arch. Toxicol.* 75: 176-183.
- Jean, C.G., Janique, R., Dieter , H., Welti, J.M., Eric, G.F., Peter, G. and Robert J. T. 2001. Metabolism of ochratoxin A : Absence of formation of genotoxic derivative by human and rat engymes. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 34-45.

- JECFA. 2001. Joint FAO/WHO expert committee on food additives, Ochratoxin A, in Safety evaluation of Certain mycotoxins in Food, Series 47, IPCS, Geneva, World Health Organization, 281-416: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmonal/v47jeo4.html> [2002, March 29]
- Jung, K.Y. and Endou, H. 1989. Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content. II. Intranephron site ochratoxin A nephrotoxicity. *Toxicol. Apply. Pharmacol.* 100: 383-390.
- Jung, K.Y., Takeda, M., Kim, D.K., Tojo, A., Narikawa, S., Yoo, B.S., Hosoyamada, M., Cha, S.H., Sekine, T. and Endou, H. 2001. Characterization of ochratoxin A transport by human organic anion transporters. *Life. Sci.* 69: 2123-2135.
- Kanisawa, M. and Suzuki, S. 1978. Induction renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A (A mycotoxin). *Gann.* 69: 599-600.
- Kanisawa, M., Suzuki, S., Kozuka, Y. and Yamazaki, M. 1978. Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin A in rats. I. Acute oral toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 42: 55-64.
- Kitabatake, N., Doi, E. and Trivedi, AB. 1993. Toxicity evaluation of the mycotoxins, citrinin and ochratoxin A using animal cell lines. *Comp. Biochem. Physiol.* 105(3): 429-433.
- Kitchen, D.N., Carlton, W.W. and Tuite, C. 1977a. Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs. *Vet. Pathol.* 14: 154-172.
- Kitchen, D.N., Carlton, W.W. and Tuite, C. 1977b. Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs. *Vet. Pathol.* 14: 261-272.
- Krogh, P. 1987. *Mycotoxins in food.* London. Academic Press Limited. 97.
- Kuiper-Goodman, T. and Scott, P.M. 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 2: 179-248.
- Kumagai, S. and Aibara, K. 1982. Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 64: 94-102.
- Kumagai, S. 1988. Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats. *Food. Chem. Toxicol.* 26: 753-758.
- Larry, D.C. and Denise A. 2000. *Urinary system. Veterinary internal medicine* 5th ed. Philadelphia. U.S.A. Saunders Company. 1616.

- Luhe, A., Hildebrand, H., Bach, U., Dingermann, T. and Ahr, H.J. 2003. A new approach to studying ochratoxin A (OTA) – induced nephrotoxicity: expression profiling in vivo and in vitro employing cDNA microassays. *Toxicol. Sci.* 73(2): 315-328.
- Luna, L.G. 1964. Manual of histologic staining method of the Armed Forces. Institute of pathology ^{3rd} edition. U.S.A. McGraw-Hill, Inc. 12-20, 32-45, 153-154.
- Magan, N. and Olsen, M. 2004. Ochratoxin A. Mycotoxin in food . Cambridge. England. Woodhead publishing limited. 420.
- Maria A. Stander., Thalma W. Nieuwoudt., Pieter S. Steyn., Gordon S. Shephard., Edmond E. Creppy. and Vikash, S. 2000. Toxicokinetics of ochratoxin A in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Arch. Toxicol.* 75: 262-269.
- Maria A. Stander., Pieter S. Steyn., Francois, H., van der, W. and Barry E. Payne. 2001. A kinetic study into the hydrolysis of ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 302-304.
- Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70(12): 3968.
- Monaci, L., Tantillo, G. and Palmisano, F. 2004. Determination of ochratoxin A in pig tissues by liquid-liquid extraction and clean up and high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 1777-1782.
- Mortensen, H.P., Hald, B. and Madsen, A. 1983. Feeding experiment with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs; Ochratoxin in pig food. *Acta. Agric. Scand.* 33: 235-239.
- National Toxicology Program. 1989. Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in F344 rats (Gavage studies). NIH publication No. 89-2813, Research triangle park, NC, US Department of health and human services, National institute of health
- Pascale, M. and Viscoti, A. 2001. Rapid method for the determine of ochratoxin A in urine by immunoaffinity column cleanup and high performance liquid chromatography. *Mycopathologia.* 152: 91-95.
- Petzinger, E. and Ziegler, K. 2000. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 23: 91-98.

- Piotr, G., Karl, H., Jadwiga, grabariewiez-szczesna, J.C., Karl, K., and Kazimierz, S. 1984. Mycotoxic porcine nephropathy and spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidneys and blood of Polish swine. *Applied Environ. Microbiol.* June: 1210-1212.
- Pitt, J.I., and Hocking, A.D. 1997. *Fungi and food spoilage*, 2nd ED., Gaithersburg, MD. Aspen Publishers.
- Pitt, J.I. 2000. Toxicogenic fungi : which are important. *Med. Mycol.* 38 (Suppl1): 17.
- Razzazi, E., Bohm, J., Grajewski, J., Szczepaniak, K., Kibber-Heiss, J. and Iben, C.H. Residue of ochratoxin A in pet foods, canine and feline kidneys. 2001. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr(Berl)*. 85: 212-16.
- Rutqvist, L., Bjorklund, N.E., Hult, E. H. and Coulsson, B. 1978. Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs. *Applied Environ. Microbiol.* Dec: 920-925.
- Smith, H.A., Jones, T.M., and Hunt, D.C. 1972. *The urinary system. Veterinary pathology* 4th ed. Philadelphia. U.S.A. Lea and Febiger company. 1250-1298.
- Sreemannarayana, O., Frohlich, A.A., Vitti, T.G., Marquardt, R.R. and Abramson, D. 1988. Studies of the tolerance and deposition of ochratoxin A in young calves. *Anim. Sci.* 66: 1703-1711.
- Stoev, S.D. 1998. The role of ochratoxin A as a possible cause of Balkan endemic nephropathy and its risk evaluate. *Vet. Hum. Toxicol.* 40: 352-360.
- Storen, O., Holm, H. and Stamer, F.C. 1982. Metabolism of ochratoxin A by rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 785-789.
- Suzuki, S., Satoh, T. and Yamazaki, M. 1977. The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 27: 735-744.
- Szczzech, G.M., Carton, W.W. and Tuttle, J. 1973a. Ochratoxicosis in beagle dogs. *Vet. Pathol.* 10: 135-154.
- Szczzech, G.M., Carton, W.W., and Tuttle, J. 1973b. Ochratoxicosis in beagle dogs. *Vet. Pathol.* 10: 219-231.
- Thomas, C.J., Ranald, D. and Narval, W.K. 1997. *Urinary system. Veterinary pathology* 6th ed. U.S.A. William and Wilkins company. 1116-1128.
- Thuvander, A., Breitholtz-Emanuelsson, A. and Olsen, M. 1995. Effect of ochratoxin A on the mouse immune system after subchronic exposure. *Food. Chem. Toxicol.* 33: 1005-10.

- Trivedi, A.B., Hirota, M., Doi, E. and Kitabatake, N. 1993. Formation of new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water. J. Chem. Soc. Perkin. Trans I: 2167-2171.
- Uehara, Y., Takada, S., Hirawa, N., Kawabata, Y., Oshima, N., Numabe, A., Ishimitsu, T., Goto, A., Yagi, S. and Omata, M. 1994. Vasoconstrictors and renal protection induced by B1-selective adrenoceptor antagonist Bisoprolol. J. Cardiovas. Pharmacol. 23: 897-906.
- Valenta, H. 1998. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. J. Chrom A. 815. 75-92.
- Van der Merwe, K.I., Steyn, P.S. and Fourie, L. 1965. Mycotoxins. Part II. The Constitution of ochratoxin A, B and C metabolites of *aspergillus ochraceus*. J. Chem. Soc. 7081-7088.
- Vukelic, M., Sostaric, B., and Fuchs, R. 1991. Some pathomorphological features and Bulkan endemic nephropathy in Croatia in Castegnoro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch, H. Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumors. IARC. Scientific. Publication No. 115. Lyon, IARC Press, 37-42.
- Walter, S.D. and Carlos, T.M. 1979. The Urinary system. Color atlas of textbook of histopathology 6th ed. Chicago. U.S.A. Year book medical publisher. Inc. 161-167.
- Wander, M.H. and Colin, G.R. 1998. Fundamental of toxicologic pathology. Academic press (Harcourt brance company). U.S.A.166-178.
- William, W.C. and Mcdonald, M.G. 1995. The urinary system. Special veterinary pathology. Missouri. U.S.A. Mosby Year Book Incorporation. 209-299.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 1 การย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อไตแบบต่างๆ

ก. การย้อมด้วยสี Hematoxylin และ eosin stain (Luna, 1964)

1. ส่วนประกอบของสีเมเยอร์ฮีมาทอกซิลิน (Mayer's hematoxylin)

Hematoxylin crystal	1.0	gm
Sterile water	1000.0	ml
Sodium iodate	0.2	gm
Potassium alum	50.0	ml
Citric acid	1.0	gm
Chloral hydrate	50.0	gm

2. ส่วนประกอบของสีอีโอซิน (Eosin)

1% Stock alcoholic eosin		
Eosin Y, Water soluble	1.0	gm
Distilled water	20.0	ml
Alcohol 95%	80.0	ml

วิธีการย้อมสี Hematoxylin and eosin (H&E stain)

1. แช่ชิ้นเนื้อลงใน xylene I และ xylene II นานอย่างละ 5 นาที
2. จากนั้นแช่ชิ้นเนื้อลงใน absolute alcohol นาน 2 นาที
3. แช่ชิ้นเนื้อลงใน 95% alcohol นาน 2 นาที
4. แช่ชิ้นเนื้อลงใน 70% alcohol นาน 2 นาที
5. ล้างผ่านน้ำประปาแบบไหลเอื่อย นาน 1 นาที
6. ย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี hematoxylin นาน 5 นาที
7. ล้างผ่านน้ำประปาแบบไหลเอื่อย นาน 1 นาที
8. จุ่มชิ้นเนื้อลงใน 1% acid alcohol แบบเร็วๆ 1-2 ครั้ง
9. ล้างผ่านน้ำประปาแบบไหลเอื่อย นาน 1 นาที
10. แช่ชิ้นเนื้อลงใน lithium carbonate ประมาณ 1 นาที
11. ล้างผ่านน้ำประปาแบบไหลเอื่อย นาน 1 นาที
12. ย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี eosin นาน 2 นาที
13. จุ่มชิ้นเนื้อลงใน 70% alcohol แบบเร็วๆ 2-3 ครั้ง
14. แช่ชิ้นเนื้อลงใน 95% alcohol I และ II นานอย่างละ 2 นาที
15. แช่ชิ้นเนื้อลงใน absolute alcohol I และ II นานอย่างละ 2 นาที

16. แช่ชิ้นเนื้อลงใน xylene I, II และ III นาน อย่างละ 5 นาที
17. ปิดแผ่นสไลด์ด้วย cover glass แล้ว mount ติดด้วยน้ำยา permount



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๗. การย้อมสีของโกเรด โดยเทคนิคของเบนโฮลด์ (Bennhold 's Method for Amyloid ; Congo Red)(Luna, 1964)

ส่วนประกอบของสี Congo red

1. 1% Congo red solution
 - Congo red 1.0 gm
 - Distilled water 100.0 ml
2. 1% NaOH
 - NaOH 1.0 gm
 - Distilled water 100.0 ml
3. Mayer's hematoxylin solution

วิธีการย้อมสีชนิด Bennhold's (Congo red) สำหรับตัวอย่างไตที่เกิดการเสื่อมแบบ Amyloidosis

1. ละลายพาราฟินด้วย xylene I, xylene II, absolute ethanol I, absolute ethanol II, 95% ethanol และ 70% ethanol นาน 10,10,2,2,2 และ 2 นาที ตามลำดับ
2. ล้างน้ำประปาแบบไหลเฉื่อยนาน 5 นาที
3. จุ่มสไลด์ลงในน้ำกลั่น I, II และ III นานอย่างละ 3 นาที ตามลำดับ
4. จุ่มสไลด์ลงใน Mayer's hematoxylin solution นาน 6 นาที
5. ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 3. อีกครั้ง
6. นำสไลด์จากขั้นตอนที่ 5. จุ่มลงใน NaCl นาน 20 นาที
7. จุ่มสไลด์ลงในสี Congo red นาน 30 นาที
8. ใช้น้ำออกด้วย 95% alcohol , absolute ethanol I และ absolute ethanol II นานอย่างละ 2 นาที
9. ทำขึ้นเนื้อให้ใสด้วย xylene I, II และ III นานอย่างละ 2 นาที
10. ปิดสไลด์ด้วย cover glass และเชื่อมด้วยน้ำยา permount พักไว้ 1 วัน

ค. การย้อมด้วยสี Periodic acid-Schiff Stain (PAS Stain) (Luna, 1964)

ส่วนประกอบของสี PAS

1. Periodic acid
 - Periodic acid 0.6 ml
 - Distilled water 100.0 ml
 - Nitric acid (Conc) 0.3 ml
2. Schiff's reagent
 - Basic fuchsin 1.0 g
 - Sterile water 85.0 ml
 - Sodium metabisulfite 1.9 g
 - Hydrochloric acid 15.0 ml

วิธีการย้อมสีด้วย Periodic acid-Schiff Stain

1. ล้างพาราฟินออกด้วย xylene I, xylene II, absolute ethanol I, absolute ethanol II, 95% ethanol และ 70% ethanol นาน 10,10,2,2,2 และ 2 นาที ตามลำดับ
2. จากนั้นให้ผ่านน้ำไหลเอื่อยเป็นเวลา 5 นาที
3. จุ่มสไลด์ลงใน periodic acid นาน 5 นาที
4. ล้างน้ำประปาแบบน้ำไหลเอื่อยนาน 5 นาที
5. จุ่มสไลด์ลงใน Schiff's reagent นาน 30 นาที
6. จุ่มสารละลาย sulfate 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
7. ล้างน้ำประปาแบบน้ำไหลเอื่อยนาน 5 นาที
8. จุ่มสไลด์ลงใน Mayer's hematoxylin solution นาน 6 นาที แล้วล้างน้ำประปาแบบน้ำไหลเอื่อยนาน 5 นาที
9. ขจัดน้ำออกด้วย 95% alcohol , absolute ethanol I และ absolute ethanol II นานอย่างละ 2 นาที
10. ทำขึ้นเนื้อให้ใสด้วย xylene I, II และ III นานอย่างละ 5 นาที
11. ปิดสไลด์ด้วย cover glass และเชื่อมด้วยน้ำยา permount พักไว้ 1 วัน

ภาคผนวกที่ 2 ระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในสุนัขกลุ่มศึกษา จำนวน 50 ตัว

Accession No.	น้ำหนักเนื้อไต (g)	ฉีดครั้งที่ 1 (ng/g)	ฉีดครั้งที่ 2 (ng/g)	ค่าเฉลี่ย (ng/g)
4P462L	37.64	* —	* —	*** —
4P473N	49.70	* —	* —	*** —
4P534C	52.41	* —	* —	*** —
4P536C	46.69	* —	* —	*** —
4P552N	55.01	0.06	0.08	0.07
4P576C	63.59	* —	* —	*** —
4P581C	56.72	* —	* —	*** —
5P059W	28.32	* —	** —	*** —
5P113L	14.10	* —	** —	*** —
5P116C	42.21	* —	** —	*** —
5P139R	34.44	* —	** —	*** —
5P151A	30.78	* —	* —	*** —
5P153A	30.71	* —	* —	*** —
5P166W	27.98	* —	* —	*** —
5P179L	30.73	* —	** —	*** —
5P190A	57.10	* —	* —	*** —
5P215D	94.20	0.11	0.31	0.21
5P224S	26.30	* —	* —	*** —
5P247W	16.42	* —	* —	*** —
5P251L	63.72	* —	** —	*** —
5P255L	29.42	0.08	0.12	0.10
5P257L	21.11	* —	* —	*** —
5P273R	30.98	* —	* —	*** —
5P276D	55.97	* —	* —	*** —

ภาคผนวกที่ 2 ระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในสุนัขกลุ่มศึกษา จำนวน 50 ตัว (ต่อ)

Accession No.	น้ำหนักเนื้อไต (g)	ฉีดครั้งที่ 1 (ng/g)	ฉีดครั้งที่ 2 (ng/g)	ค่าเฉลี่ย (ng/g)
5P283D	11.52	*	**	***
5P293N	45.18	*	**	***
5P299S	30.01	*	**	***
5P302A	18.15	*	**	***
5P306A	38.06	*	**	***
5P312A	21.13	*	*	***
5P313A	15.50	*	*	***
5P32ON	20.21	0.04	**	***
5P321N	22.01	*	*	***
5P324W	17.71	*	*	***
5P327W	32.20	*	*	***
5P344D	67.01	*	*	***
5P354R	22.10	*	*	***
5P360R	52.33	*	*	***
5P372N	71.42	*	*	***
5P406A	45.05	*	*	***
5P414D	42.01	*	*	***
5P461D	18.71	*	*	***
5P462D	11.98	*	**	***
5P468D	18.02	*	*	***
5P472D	21.78	*	*	***
5P504L	19.97	*	*	***
5P505L	20.03	*	*	***
5P517A	35.00	*	*	***

ภาคผนวกที่ 2 ระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในสุนัขกลุ่มศึกษา จำนวน 50 ตัว (ต่อ)

Accession No.	น้ำหนักเนื้อไต (g)	ฉีดครั้งที่ 1 (ng/g)	ฉีดครั้งที่ 2 (ng/g)	ค่าเฉลี่ย (ng/g)
5P532N	30.14	—*	—**	—***
6P003N	38.21	—*	—**	—***

—* ฉีดครั้งที่ 1 ตรวจไม่พบการตกค้าง

—** ฉีดครั้งที่ 2 ตรวจไม่พบการตกค้าง

—*** ไม่สามารถหาค่าเฉลี่ยได้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 3 ระดับการตกค้างของสารพิษ OTA ในสุนัขกลุ่มศึกษาจำนวน 4 ตัว
กับค่าเคมีโลหิตที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของไต

Access No.	ระดับการตกค้าง (ng/g)	BUN ¹ (mg/dl)	Creatinine ² (IU)
4P552N	0.07	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ
5P215D	0.21	946.0	14.70
5P255L	0.10	85.5	7.79
5P320N	0.04	> 300	10.0

¹BUN (หน่วย: mg/dl) = ค่ายูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือดบ่งบอกสภาพการทำงานที่ปกติ / ผิดปกติ
ของไตซึ่งค่าปกติของ BUN มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 mg/dl

²Creatinine (หน่วย: IU) = ค่าเอนไซม์ Creatinine ในกระแสเลือดบ่งบอกสภาพการทำงานที่ปกติ /
ผิดปกติของไตซึ่งค่าปกติของ Creatinine มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1.5 IU

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 4 ประวัติสุนัขกลุ่มศึกษา จำนวนทั้งหมด 50 ตัว จากหน่วยพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Access No	พันธุ์	เพศ	อายุ	ประวัติ
4P462L	ผสม	เมีย	10 ปี	ไตวาย ผลตรวจเลือดพบว่า BUN ³ =116, Creatinine ⁴ =15.6, AST ² =167, AP ¹ =19,870
4P473N	ผสม	เมีย	11-12 ปี	เป็นโรคไต รักษาอย่างต่อเนื่อง มีโลหิตจางรุนแรง เกิดเลือดต่ำ
4P534C	ผสม	ผู้	ไม่ระบุอายุ	เจ็บปวดท้อง เกร็ง กินน้ำมาก ปัสสาวะมาก ตาย
4P536C	ผสม	เมีย	4 ปี	ซึม เบื่ออาหาร ซีด แห้งน้ำมาก อาเจียนมีสีเหลืองปน
4P552N	เยอรมัน เชพเพอร์ดี	ผู้	3 ปี	เป็นโรคไตวายเรื้อรัง รักษามาตลอด อาเจียนสีเหลือง ท้องเสีย ชัก-เกร็ง
4P576C	ผสม	ผู้	8 ปี	อาเจียนสีเหลือง เดินสองหลังปิด ซึม เบื่ออาหาร ป่วยมานานแล้ว
4P581C	ผสม	ผู้	14 ปี	เป็นต่อหิน ขนร่วงที่ท้อง พบค่าไตสูง BUN=34,Creatinine=2.2
5P059W	ผสม	ผู้	4 ปี	รักษาจากคลินิกเฉพาะทาง ค่าไตสูงมาก
5P113L	มินเจอร์	ผู้	15 ปี	รักษาจากคลินิกเฉพาะทาง มีปัญหา ตับ ไต โลหิตจาง
5P116C	ผสม	ผู้	7 ปี	รักษาที่คลินิกเอกชนมา 1 ปี กินอาหารเม็ดมาตลอด
5P139R	ผสม	เมีย	10 ปี	ซึม เบื่ออาหาร ใจแห้งๆ โลหิตจาง ค่าการทำงานของไตสูง BUN=95,Creatinine=3.4
5P151A	ชิทสุ	ผู้	ไม่ระบุอายุ	รักษาโรคไตมานาน 1-2 เดือน ซีด ชัก
5P153A	บางแก้ว	เมีย	2 ปี	ตรวจพบว่าเป็นโรคไต กินอาหารสำเร็จรูปชนิด A โลหิตจาง ซีด
5P166W	ผสม	ผู้	12 ปี	อาเจียน ท้องเสีย พบค่าไตสูง BUN=72,Creatinine=12
5P179L	พุดเดิ้ล	เมีย	10 ปี	รักษาที่คลินิกเอกชนมานาน พบค่าไตสูง(BUN=258.8, Creatinine=5.8) โลหิตจาง เลือดมีความเป็นกรดสูง
5P190A	พุดเดิ้ล	ผู้	4-5 ปี	ซีด ตัวเหลือง ไม่ทราบประวัติอย่างอื่น
5P215D	บูลด็อก	เมีย	1 ปี	รักษาที่คลินิกเอกชน อาเจียน ท้องเสีย อุจจาระสีคล้ำ ชัก พบค่าไตสูง BUN=946, Creatinine=14.7

ภาคผนวกที่ 4 ประวัติสุนัขกลุ่มศึกษา จำนวนทั้งหมด 50 ตัว จากหน่วยพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ต่อ)

Access No	พันธุ์	เพศ	อายุ	ประวัติ
5P224S	อิงลิช ค็อกเกอร์	ผู้	7 ปี	อาเจียน ตรวจเลือดพบภาวะความเป็นกรดสูง
5P247W	ผสม	เมีย	10 ปี	ขาดน้ำ อาเจียน ค่าตับและไตสูง โลหิตจาง และมีเม็ดเลือดขาวสูง นอกจากนี้ยังพบค่าโพแทสเซียมสูง
5P251L	ดัลเมเซียน	เมีย	7 ปี	มีอาการอาเจียน ค่าไตสูง รักษาแบบพยุงอาการมาตลอด
5P255L	เซทเทิล ซีพด็อก	ผู้	11 ปี	เป็นโรคไตมานาน 2 เดือน ค่าไตล่าสุด BUN ³ =85.5, Creatinine ⁴ =7.79 พบนิ่วก้อนเล็กๆที่ไตด้านขวาจากภาพถ่ายทางรังสี
5P257L	พูตเดิ้ล	ผู้	8 ปี	ทางคลินิกเฉพาะทางจู่ฟาย แจ้งว่าเป็นโรคไตและมีเม็ดเลือดขาวสูง ถ่ายภาพรังสีพบ urethral and prostatic calculi รักษามานานแล้ว ปัสสาวะลำบากมาก
5P273R	ผสม	ผู้	7 ปี	มีปัญหาพยาธิเม็ดเลือด ค่าตับและไตสูง รักษามานาน 3 เดือน
5P276D	ลาบราดอร์	เมีย	2 ปี	ซึม เบื่ออาหาร อาเจียน ผลตรวจเลือดพบค่าไตสูงมาก และพบพยาธิเม็ดเลือดชนิด <i>E.canis</i>
5P283D	มินเจอร์	ผู้	8 ปี	ซึม ไม่กินอาหารมา 1 สัปดาห์ อุจจาระเหลว ซีด เกร็ง มีกลิ่นปาก
5P293N	เซา-เซา	ผู้	5 ปี	ถ่ายเป็นเลือดสด มีแผลหลุมที่ช่องปากและลิ้น
5P299S	ผสม	เมีย	10 ปี	ซึม เบื่ออาหาร ซีด ปากเจ็บมีแผลที่ช่องปาก ชัก เกร็ง
5P302A	พูตเดิ้ล	ผู้	14 ปี	สุนัขป่วยเรื้อรังด้วยโรคไต ซึม เบื่ออาหาร ตรวจเลือดพบค่าไตสูง และ พบพยาธิเม็ดเลือดชนิด <i>E.canis</i>
5P306A	เยอรมัน เชพเพิร์ด	ผู้	7 ปี	ทำการรักษาโรคไตที่คลินิกเฉพาะทาง และกินอาหารเม็ดชนิด A
5P312A	ปอม เมอเรเนียน	ผู้	6 ปี	อาเจียน เหยียดเกร็ง แห้งน้ำ พบว่าค่าไตสูง BUN=54, Creatinine=2.1
5P313A	ผสม	เมีย	9 ปี	ซึม ไม่กินอาหาร เยื่อเมือกซีด อาเจียนเป็นสีเหลือง
5P320N	ปอม เมอเรเนียน	เมีย	9 ปี	อาเจียนถ่ายเหลว ป่วยด้วยโรคอื่นและรักษาที่คลินิกเอกชนมานาน ตรวจเลือดพบค่าไตสูง BUN>300, Creatinine=10 กินอาหารเม็ดชนิด A มาตลอด
5P321N	ดัลเมเซียน	ผู้	10 ปี	ซึม เบื่ออาหาร แห้งน้ำ ปากเจ็บ พบ spondylosis ที่ T8-9, L1-2, L4-6, L7-51

ภาคผนวกที่ 4 ประวัติสุนัขกลุ่มศึกษา จำนวนทั้งหมด 50 ตัว จากหน่วยพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ต่อ)

Access No	พันธุ์	เพศ	อายุ	ประวัติ
5P324W	มินเจอร์	เมีย	14 ปี	ชัก เป็นโรคไตวายเรื้อรังมานานแล้ว Creatinine =9.4
5P327W	ผสม	ผู้	4 ปี	มีอาการซึมไม่กินอาหาร ผลเลือดพบ BUN =118, Creatinine =8.4 ป่วยมานาน
5P344D	ร็อตไวเลอร์	ผู้	3-4 ปี	ตรวจเลือดที่คลินิกเอกชนมากระยะหนึ่ง พบค่าไตสูง สุนัขไม่ปัสสาวะ ให้การรักษาโดยใช้สารน้ำ และยาปฏิชีวนะ ปรับสมดุลกรด-ด่าง ยาห้ามเลือด ยาขับปัสสาวะ
5P354R	ผสม	ผู้	10-11 ปี	ก่อนหน้าปรกติทุกอย่าง กินอาหารได้ ตื่นเข้ามาพบนอนหมดแรง ตัวร้อน
5P360R	ผสม	เมีย	2 ปี	หอบและอุณหภูมิต่ำในร่างกายต่ำ อาเจียนมาประมาณ 1 สัปดาห์ ร่างกายขาดน้ำ กัดกรง น้ำลายฟุ้งปาก BUN=148, Creatinine=7.4
5P372N	ผสม	ไม่ระบุเพศ	ไม่ระบุอายุ	มาด้วยอาการชักรกระดูก ถ่ายเหลว อาเจียน ปอดชื้น อุณหภูมิสูง ผลเลือด BUN=56, Creatinine=2.2
5P406A	พุดเดิ้ล	เมีย	13 ปี	ป่วยเป็นโรคไต dehydrate 10% ปากเจ็บ uremia สุนัขมีอาการป่วยมาก BUN=200, Creatinine=8.8
5P414D	โกลเด้นรีทรีฟเวอร์	ผู้	4 ปี	อาเจียน เบื่ออาหาร ผลเลือด BUN=8, Creatinine=7
5P461D	ผสม	เมีย	14 ปี	มีก้อนเนื้ออกที่เต้านม ได้ทำการผ่าตัดก้อนเนื้อที่เต้านมออก ก่อนผ่าตัดผลเลือดพบเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 24% หลังผ่าตัดเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 13%
5P462D	ผสม	เมีย	2 ปี	สุนัขอาเจียน ปากเจ็บ ถ่ายเหลวมีเลือดปน รักษาที่คลินิกเอกชน ผลเลือดพบ BUN=81, Creatinine=2.3
5P468D	ผสม	เมีย	10 ปี	ทานยาโรคหัวใจ (สงสัยเป็นพยาธิหัวใจ) และมีปัญหาโรคไตร่วมด้วย นอนตะแคง ซึม เบื่ออาหาร
5P472D	ผสม	ไม่ระบุเพศ	8 ปี	ซึม, อาเจียน, เหงือกซีด, dehydration 7% ผลเลือด BUN=185, Creatinine=2.5
5P504L	โกลเด้นรีทรีฟเวอร์	เมีย	5 ปี	เสียชีวิตตั้งแต่อยู่ที่บ้าน ก่อนหน้านั้นไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ เลี้ยงตัวเดียวในบ้าน ฉีดวัคซีนครบทุกปี
5P505L	ผสม	ผู้	8 ปี	ช่วงเข้ามีอาการซึม กลางคืนมีอาการเหี่ยยง เก้ง อาเจียน ชัก และหมดสติไป

ภาคผนวกที่ 4 ประวัติสุนัขกลุ่มศึกษา จำนวนทั้งหมด 50 ตัว จากหน่วยพยาธิวิทยา
 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ต่อ)

Access No	พันธุ์	เพศ	อายุ	ประวัติ
5P517A	ผสม	ผู้	10 ปี	หอบมาก BUN=320.5, Creatinine =26.75, AP ¹ =626 ผล blood gas พบ metabolic acidosis, hyperkalemia, ปัสสาวะไม่ออก อาเจียน
5P532N	พุดเดิ้ล	เมีย	7 ปี	รักษาเรื่องกระเพาะปัสสาวะอักเสบมา 3 เดือน สังเกตดูเหงื่อซึม มีแผลหลุมที่ใต้ลิ้น dehydration 6 %
6P003N	ผสม	ผู้	11 ปี	ค่าเลือดต่างๆ ได้แก่ Hb ⁵ =7, Hct ⁶ =24, WBC ⁷ =14,790, ALT ² =103, BUN=283, Creatinine =19

¹AP = ค่าเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในกระแสเลือด บ่งบอกสภาพการทำงานของปกติ / ผิดปกติของตับ (U/L)

²ALT = ค่า Alanine aminotransferase ในกระแสเลือด บ่งบอกสภาพการทำงานของปกติ / ผิดปกติของตับ (U/L)

³BUN = ค่ายูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือด บ่งบอกสภาพการทำงานของปกติ / ผิดปกติของไต (mg/dl)

⁴Creatinine = ค่าเอนไซม์ Creatinine ในกระแสเลือด บ่งบอกสภาพการทำงานของปกติ / ผิดปกติของไต (Unit; IU)

⁵Hb = ค่าความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง (gm%)

⁶Hct = ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%)

⁷WBC = ค่าเม็ดเลือดขาว (cells/mm³)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 บริการ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสัตวแพทย์ ศุภวัฒน์ โพธิมงคลกุล เกิดวันที่ 29 มิถุนายน 2519 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อปีการศึกษา 2543 และทำการศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2546

ปัจจุบันทำงานที่ ฝ่ายระบาดวิทยาโรคสัตว์ติดคน กองสัตวแพทยสาธารณสุข สำนักอนามัย กรุงเทพมหานครและประกอบธุรกิจส่วนตัวที่กรุงเทพฯ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย