สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 2

# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 เชื้อรา *Fusarium*

Alexopoulos และคณะ (1996) จัดจำแนกรา *Fusarium* ให้อยู่ใน Kingdom Fungi Division Deuteromycota ซึ่งเป็น anamorph ของราใน Division Ascomycota Seifert (2000) กล่าวว่า เดิม *Fusarium* spp. อยู่ใน Class Deuteromycetes แต่ปัจจุบัน ให้อยู่ใน Class Hyphomycetes เป็น anomorph ของรา Ascomycetes Order Hypocreales เชื้อรากลุ่มนี้ส่วนใหญ่เจริญเป็นอิสระ ( saprobe ) ในดิน เศษซากพืช หรือ วัสดุอื่น ๆ มีบางชนิดที่เป็นปาราสิตที่ทำให้เกิดโรคในพืชและสัตว์รวมถึงมนุษย์

Barron (1971 ) รายงานลักษณะสำคัญของเชื้อรา *Fusarium* ดังนี้ คือ ราอาจสร้างหรือไม่สร้าง sporodochium phialide (sporogenous cell) เกิดโดยตรงบน vegetative hyphae หรือเกิดบน conidiophore conidiophore อาจเกิดเดี่ยว เป็นกลุ่ม หรือแตกกิ่งก้าน phialide มีลักษณะเรียว บางครั้งมี apical collarette phialospore มี 2 แบบ ได้แก่ macrospore ขนาดใหญ่ มีหนึ่งหรือหลาย septate รูปร่างเรียวยาว (elongate cylindric) อาจมีลักษณะโค้ง (curve) มักมีรูปร่างแบบเรือ (boat-shaped) ไม่มีสี มี foot cell บริเวณที่ติดกับ phialide microspore มีขนาดเล็ก ไม่มีผนังกั้นหรือมีหนึ่ง septate รูปร่างกลมรี (ovoid) หรือ cylindric เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ หรือเกิดรวมกันเป็นกลุ่ม (spore balls) ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกรานี้ ได้แก่ phragmospore (macroconidium) รูปร่าง boat-shaped ไม่มีสี (hyaline) และมี foot cell ที่เห็นเด่นชัด ซึ่งจะมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของรา

*Fusarium* เป็นเชื้อราที่มีการเปลี่ยนแปลงมาก การย้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (artificial media) เพียง 1-2 ครั้ง อาจพบว่าขนาดและรูปร่างของสปอร์ตลอดจนจำนวนผนังกั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม รวมทั้งลักษณะการเจริญบนอาหารสังเคราะห์ บางชนิดอาจสูญเสียความสามารถในการสร้าง macrospore จึงต้องใช้อาหารพิเศษในการเก็บรักษารานี้ (Gams *et al.*,1987) *Fusarium* มีการเปลี่ยนแปลงได้มาก เนื่องจากลักษณะทางพันธุ์กรรม และการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมที่ราเจริญอยู่ ทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) เปลี่ยนแปลงไปได้ โดยเฉพาะลักษณะของ macroconidia ที่ใช้สำหรับแยกชนิดของ *Fusarium* ทุกครั้งที่จะทำการจำแนกควรเริ่มจากการเพาะเลี้ยง single conidia เพราะ

แต่ละ conidium จะมีลักษณะ single genotype ถ้าเกิดการผ่าเหล่า (mutation) ขึ้นลักษณะโคโลนีที่เห็นก็จะเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อนั้นเอง เพื่อลด phenotypic variation ที่อาจเกิดขึ้น จึงควรทำงานทุกขั้นตอนตามวิธีการมาตรฐาน เพื่อให้ทำการจำแนกชนิดได้ง่าย และสะดวกต่อการศึกษาทาง taxonomy กล่าวคือ ควรใช้ single-spore method หรือ hyphal tip method ในการถ่ายเชื้อ หลีกเลี่ยงการใช้สารอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรดที่สามารถนำไปใช้ได้มากอยู่สูง ควรทำการย้ายเชื้อ (subculturing) ให้น้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ (Nelson *et al.*,1983)

Nelson และคณะ (1983) รายงานว่า microconidia และmacroconidia ที่เจริญใน aerial mycelium จะเป็นแบบ monophialides หรือ polyphialides microconidia จะเกิดขึ้นใน aerial mycelium macroconidia เกิดขึ้นได้ทั้งใน aerial mycelium และ sporodochia macroconidia ที่เกิดขึ้นใน sporodochia จะเกิดบน monophialides ลักษณะของ macroconidia ที่เกิดขึ้นใน sporodochia จะเป็น central characteristic feature ของเชื้อราชนิดนี้ เชื้อส่วนใหญ่สามารถสร้าง sporodochia ได้อย่างเร็วและจำนวนมากบน carnation leaf agar ภายในเวลา 10-14 วัน macroconidia ที่ได้นี้จะมีขนาดที่สม่ำเสมอ ควรใช้ macroconidiaที่สร้างใน sporodochia ในการอธิบายลักษณะของเชื้อรา เว้นเสียแต่ว่าเชื้อรานั้นไม่สร้าง sporodochia มีแต่การสร้าง microconidia บน aerial mycelium เท่านั้น microconidia มักมี 0-3 septate และมีขนาดเล็กกว่า macroconidia ลักษณะสำคัญของ microconidia ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ การพบหรือไม่พบ microconidia ลักษณะที่เป็น chain หรือ false head เกิดบน monophialides หรือ polyphialides ลักษณะของ polyphialides คือ เซลล์ที่มีมากกว่า 1 ช่อง (pore) มักล้อมรอบด้วย collarette ซึ่งทำให้เห็นชัดเจนขึ้น ถ้าพบช่องเปิดเพียงช่องเดียวลักษณะนั้นเรียกว่า monophialide ผนังกั้น (septum) ที่เห็นระหว่าง 2 ช่องเปิดที่มีการแตกกิ่งก้านไม่ใช่ polyphialide *Fusarium* spp. บางชนิดจะสร้าง monophialide ที่แตกกิ่งก้านทันทีที่เลยช่องเปิดไปก่อนสร้างผนังกั้น อาจทำให้เข้าใจผิดได้ว่าเป็น polyphialide การพบ polyphialide เป็นลักษณะที่ใช้แยกชนิดของ *Fusarium* spp. โดยให้ความสำคัญรองจาก macroconidia แต่อย่างไรก็ดีเนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้ผ่าเหล่า (mutant) ได้ง่ายมาก เมื่อผ่าเหล่าแล้วการสร้างสปอร์จะลดน้อยลงทำให้พบ polyphialide ได้ยากขึ้น ใน pionnotal mutants มีการสร้าง aerial mycelium ลดลง จึงทำให้พบ polyphialide ได้ยาก โดยปกติมีการสร้าง chlamydospore ในบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่วิธีการกระตุ้น (induce) ให้เชื้อราสร้างโครงสร้างดังกล่าวทำได้โดย ตัดอาหาร Potato dextrose agar ที่มีเชื้อราเจริญอยู่วางลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว chlamydospore ของราบางชนิดอาจเกิดขึ้นภายใน 7 วัน

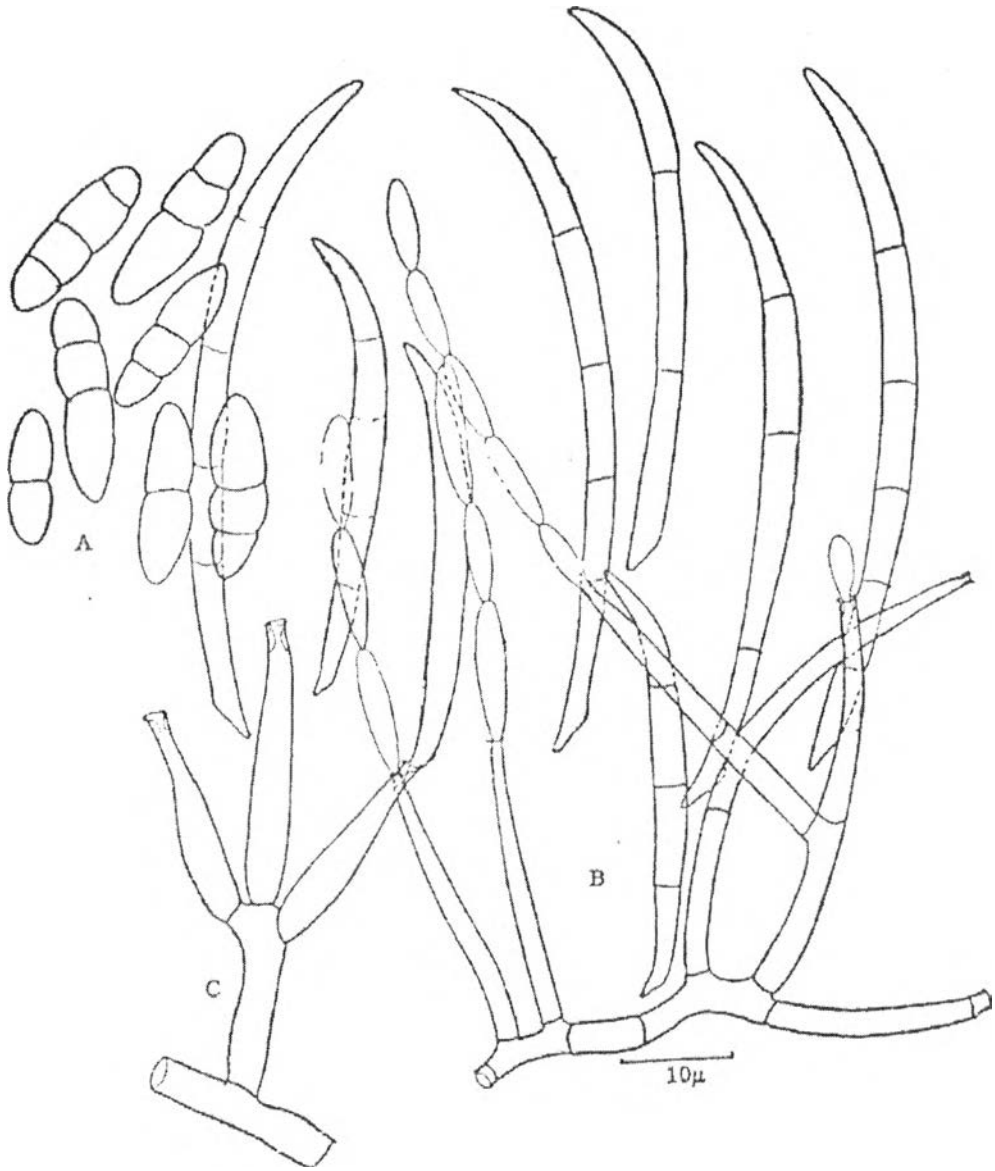
เชื้อรา *Fusarium* ส่วนใหญ่จะสร้าง macroconidia และ sporodochia sporodochia มักจะเกิดการผ่าเหล่าทั้งในธรรมชาติและในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพ (pathogenic isolates) เมื่อผ่าเหล่าแล้วความรุนแรง (virulence) ในการทำให้เกิดโรคจะลดลงหรือสูญเสียความสามารถในการสร้างสารพิษ จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า mutation sequence ไม่สามารถทำให้กลับคืนมาเป็นสภาพเดิมได้ sporodochia จะผ่าเหล่าไปได้ 2 แบบ คือ แบบที่สร้าง aerial mycelium เพิ่มขึ้น มี macroconidia ลดลง เรียกว่า mycelial type และแบบที่สร้าง aerial mycelium น้อยลง หรือไม่สร้างเลย แต่มี macroconidia มีมากขึ้น เรียกว่า pionnotal type ใน mycelial typeมักไม่พบ sclerotia, sporodochia และ pigmentation ดังนั้น โคโลนี mutant เหล่านี้มักมีสีขาวและมีรูปร่างไม่แน่นอน ไม่สร้าง macroconidia ยังผลให้ทำการจำแนกชนิดของเชื้อราเป็นไปได้ยาก ใน pionnotal type จะพบ macroconidia เกิดบน monophialides ที่ไม่แตกแขนงอยู่เป็นกลุ่มบนผิวของโคโลนี โคโลนีจะมีลักษณะเป็นเงาและเปียก มักมีสีเข้มกว่าsporodochial type macroconidia จะยาวและบางกว่าหรือสั้นกว่าเชื้อราตัวเริ่มต้น

Booth (1971 ) ได้จำแนกเชื้อ *Fusarium* ออกเป็น 12 section 51 species ต่อมา Nelson และคณะ ( 1983 ) ได้จำแนกเชื้อ *Fusarium* ออกเป็น 12 section 46 species ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เพาะเลี้ยง (cultural characteristics) macroconidia จาก sporodochia microconidia จาก aerial mycelium (รูปภาพที่ 1) conidiophores sporodochia และchlamydospores การแยกชนิดของ *Fusarium* ใช้ลักษณะของเชื้อราที่เจริญบน potato dextrose agar slant อายุ 10 -14 วัน รวมทั้งลักษณะของ conidia, conidiophore และ chlamydosporeบน carnation leaf agar อายุ10-14วัน การพบหรือไม่พบ microconidia สามารถดูได้จากทั้งบน carnation leaf agar และ potato dextrose agar โดยเฉพาะใน Section *Sporotrichiella* นั้น chlamydospore เกิดช้ามาก อาจต้องใช้เวลามากกว่าหนึ่งเดือนในการตรวจหา chlamydospore ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดดังกล่าว

เชื้อรา *Fusarium* spp. สามารสร้างสารพิษได้หลายชนิดในเชื้อราเดียวกันดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 นอกจากนี้ *F. graminearum* ยังสามารถสร้างสารพิษ apotrichothecene, 3-deoxysambucinol, calonectrin, Isotrichodermin, dihydroxycalonectric และ aurofusarin ได้ ( Greenhalgh *et al.*,1988; Dvorska, 2000 ) นอกจากนี้ สารพิษ Vorrucarins, roridins, satratoxins, baccharins และ fusarenone - X สามารถสร้างโดยเชื้อรา *Fusarium* แต่ไม่มีการระบุชื่อชนิดของเชื้อรา ( Lesson *et al.*,1995 )

**ตารางที่ 1** เชื้อรา *Fusarium* จัดจำแนกเป็น Section และ Species ต่าง ๆ ( Nelson *et al.*,1983)

| Section | Species | |
|---|---|---|
| 1. *Eupionnotes* | *F. aquaeductuum* | *F. merismoides* |
| | *F. dimerum* | |
| 2. *Spicarıodes* | *F. decemcellulare* | |
| 3. *Arachnites* | *F. nivale* | *F. poae* |
| | *F. tricinctum* | |
| 4. *Sporotrichiella* | *F. sporotrichioides* | *F. chlamydosporum* |
| 5. *Roseum* | *F. graminum* | *F. avenoceum* |
| 6. *Arthrosporiella* | *F. semitectum* | *F. camptoceras* |
| 7. *Gibbosum* | *F. equiseti* | *F. scirpi* |
| | *F. acuminatum* | *F. longipes* |
| 8. *Discolor* | *F. heterosporum* | *F. reticulatum* |
| | *F. sambicinum* | *F. culmorum* |
| | *F. graminearum* | *F. crookwellense* |
| 9. *Lateritium* | *F. lateritium* | |
| 10. *Liseola* | *F. moniliforme* | *F. proliferatum* |
| | *F. subglutinans* | *F. anthophilium* |
| 11. *Eleguns* | *F. oxysporum* | |
| 12. *Martiella and Ventricosum* | *F. solani* | |




**รูปภาพที่ 1** ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Fusarium moniliforme (Gibberella fujikuroi)* Booth,1971.

A. ascospores; B. microconidia and conidiophores;

C. macroconidia and conidiophores

**ตารางที่ 2** เชื้อรา *Fusarium* species ที่สามารถสร้างสารพิษในกลุ่มต่าง ๆ

| สารพิษ / เชื้อรา | T-2 toxin | Ht-2 toxin | Monoacetoxyscirpenol (MAS) | Diacetoxyscirpenol ( DAS ) | Nivalenol ( NIV ) | Deoxynivalenol ( DON ) | 3-acetyldeoxynivalenol ADON ) | Zearalenone | Fusarochromanone | Fumonisin | Moniliform | Fusarin C | Fusaproliferin ( FP ) | Wanmannin | Butenolide (BUT ) | Sambucinol, Sambucoin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 ) *F. anthophlilum* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 ) *F. avenaceum* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 ) *F. crookwellene* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 ) *F. culmorum* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 ) *F. diamini* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 ) *F. equiseti* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 ) *F. fujikuroi* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 ) *F. graminearum* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 ) *F. moliniforme* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 ) *F. napiform* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 ) *F. nivale* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 ) *F. nygamai* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 ) *F. oxysporum* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 ) *F. poae* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 ) *F. proliferatum* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 16 ) *F. roseum* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 ) *F. sacchari* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 ) *F. sambucinum* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 ) *F. solani* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 ) *F. sporotrichoides* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 ) *F. subglutinans* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 22 ) *F. sulphureum* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 23 ) *F. tricinctum* | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24 ) *F. verticilliodes* | | | | | | | | | | | | | | | | |

**ตารางที่** 2 (ต่อ) เชื้อรา *Fusarium* species ที่สามารถสร้างสารพิษในกลุ่มต่าง ๆ (เอกสารอ้างอิง)

| ชื่อเชื้อรา | เอกสารอ้างอิงของตารางที่ 2 |
|---|---|
| 1 ) *F. anthophlilum* | Nelson *et al.* (1992). |
| 2 ) *F. avenaceum* | Thrane (1988). |
| 3 ) *F. crookwellene* | Greenhalgh *et al.* (1988); Thrane (1988). |
| 4 ) *F. culmorum* | Greenhalgh *et al.* (1988); Lacey (1988); Sniders (1988); Thrane and Lund (1988); Thrane (1988). |
| 5 ) *F. diamini* | Nelson *et al.* (1992). |
| 6 ) *F. equiseti* | Mirocha *et al.* (1988); Rabie , *et al.* (1982); Thrane (1988). |
| 7 ) *F. fujikuroi* | Ledoux *et al.* (1995). |
| 8 ) *F. graminearum* | Pathre *et al.* (1986); Greenhalgh *et al.*(1988); Mirocha *et al.*(1988); Betina (1984); Sniders (1998); Thrane (1988). |
| 9 ) *F. moliniforme* | Steyn and Vleggaar (1988); Smith and Sonsadias (1993); Vesonder and Golinski (1989); Rabie *et al.*(1982); Betina (1984). |
| 10 ) *F. napiform* | Nelson *et al.* (1992). |
| 11 ) *F. nivale* | Betina (1984); Smith and Moss (1985). |
| 12 ) *F. nygamai* | Thiel and Marasas (1992). |
| 13 ) *F. oxysporum* | Mirocha *et al.* (1988); Thrane (1989); Rabie *et al.* (1982); Betina (1984). |
| 14 ) *F. poae* | Leeson *et al.* (1995); Joffe and Yagen (1978); Thrane and Lund (1988); Thrane (1988). |
| 15 ) *F. proliferatum* | Nagaraj (1994); Ross *et al.* (1990); Rabie *et al.* (1982). |
| 16 ) *F. roseum* | Thrane (1988); Speers *et al.*(1977); Betina (1984). |
| 17 ) *F. sacchari* | Thrane (1989). |
| 18 ) *F. sambucinum* | Mirocha *et al.* (1988), |
| 19 ) *F. solani* | Thrane (1989). |
| 20 )*F.sporotrichoides* | Greenhalgh *et al.*(1988); Leeson *et al.*(1995); Joffe and Yagen (1978); Betina (1984); Thrane (1988); Thrane and Lund (1988). |
| 21 ) *F. subglutinans* | Hong anf Ji-lun (1988). |
| 22 ) *F. sulphureum* | Leeson *et al.* (1995); Speers *et al.*(1978). |
| 23 ) *F. tricinctum* | Leeson *et al.* (1995); Speers *et al.*(1973); Betina (1984); Thrane (1988). |
| 24 ) *F. verticilliodes* | Thrane (1989). |

Norred (1993) รายงานว่า *F. moniliforme* ที่เลี้ยงบนข้าวโพดสามารถสร้างสารพิษ fumonisin B1 (FB1) ได้ถึง 6.4 gm/kg corn *F. nygamai* สร้าง FB1 ได้มากกว่า 7,000 ppm และถ้าเลี้ยง *F. moniliforme* MRC 826 ที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 13 สัปดาห์ สามารถตรวจพบ FB1 >179 mg/kg ถึงแม้ว่าจะสามารถผลิต FB1 ได้ในห้องทดลองในปริมาณสูง แต่การแยกให้บริสุทธิ์ และการเตรียม FB1 บริสุทธิ์จะใช้เวลามากและสิ้นเปลืองแรงงาน ต้องการขั้นตอนทาง chromatographic หลายชนิดและใช้ตัวทำละลายจำนวนมาก

Smith และคณะ(1985) รายงานว่า ในประเทศญี่ปุ่น พบคนที่มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เมื่อรับประทานข้าวหรือข้าวสาลีที่มีเชื้อรา *Fusarium* ปนเปื้อน เชื้อรา *F. sporotrichiella* ทำให้เกิดโรค alimentary toxic aleukia ในประเทศจีน รัสเซีย และเกาหลีเหนือ มีรายงานผู้ป่วยเป็นโรค endemic osteoathritis ที่เรียกว่า Kaschin-Beck มีสาเหตุมาจากการบริโภคข้าวโพดที่มีเชื้อรา *Fusarium* ปนเปื้อน เชื้อรา *Fusarium* ที่สร้าง Zearalenone ทำให้เกิด Oestrogenic syndrome ในสุกร และการเป็นหมันในโค จากรายงานสรุปของ USDA (1990) กล่าวว่าสารพิษ fumonisin เป็นสาเหตุของ leukoencephalomalacia ในม้า porcine pulmonary edema ในสุกร และ hepatocarcinogenic liver tumor ในหนูแรท Bermudez และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของ fumonisin ในลูกเป็ด พบว่าเป็ดไวต่อสารพิษนี้กว่าไก่ และไก่งวง โดยที่ลูกเป็ดมีอาการและรอยโรคคล้ายคลึงกับที่พบในไก่ คือเกิดโรคในตับและระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติ

Norred (1993) ได้ให้ไก่กินอาหารที่มี *F. moniliforme* culture material 5 หรือ 25% เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าปฏิกิริยาของ agglutinin กับเม็ดเลือดแดงของแกะลดลง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึง peritoneal macrophages ที่ได้รับ FB1 ขนาด 0.5 µg/ml พบว่าเกิด cytotoxicity ซึ่งได้แก่ blebbing, nuclear disintegration และสารคัดหลั่งของ cytolytic factor เพิ่มขึ้น แสดงว่า FB1 ทำให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันถูกกดได้

Chu และคณะ (1995) ทดลองให้ไก่พันธุ์ Leghorn และไก่เนื้อกิน *F. oxysporum* culture material 0 ถึง 50% ของอาหาร *F. equiseti* culture meterial 4% ซึ่งเป็น TD-inducing agent และ tetramethylthiuram disulfide (Thiram) ในขนาด 35 ppm พบว่า *F. oxysporum* ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวของไก่พันธุ์ Leghorn และไก่เนื้อ แต่ Thiram ทำให้น้ำหนักตัวลดลงมากกว่า 17% ทั้งสามการทดลองไม่สามารถทำให้ไก่พันธุ์ Leghorn เกิด tibial dyscondroplasia ได้ แต่ก่อให้เกิดการตอบสนองของการทดสอบ interdigital cutaneous response to phytohemgglutinin-P ลดลง ในไก่เนื้อเพศเมียจะพบทั้งการทดสอบ cell-

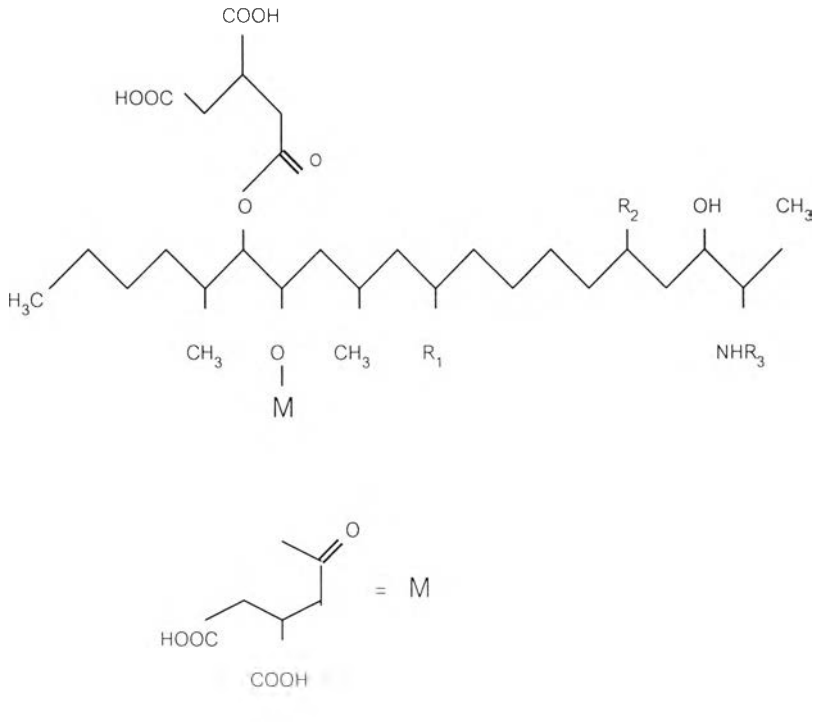
mediated cutaneous response to phytohemagglutinin-P ลดลง และอุบัติการณ์ของ tibial dyschondroplasia เพิ่มขึ้น การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า ทั้งสามการทดลองมีรอยโรค dyschondroplasia แบบเดียวกัน Chu และคณะ (1996) ได้ศึกษา tibial dyschondroplasia ในไก่เนื้อ โดยให้ไก่กิน cultural materials ของ *F. oxysporum* ในขนาด 0%, 30% และ 50% ของอาหารหลังจากเลี้ยงไก่เนื้อเป็นเวลา 21 วัน พบว่า เมื่อค่าคะแนนความรุนแรงของ tibial dyschondroplasia เพิ่มจาก 1 (สุขภาพสมบูรณ์) เป็น 2 3 และ 4 glucosamine จะเพิ่ม 10%, 33% และ 57% galactosamine จะเพิ่ม 9% 13% และ 48% ตามลำดับ ทั้ง glucosamine และ galactosamine เป็นส่วนประกอบของ plasma glycosaminoglycans (GAGs) ซึ่งเป็นองค์ประกอบคาร์โบไฮเดรทที่สำคัญของ proteoglycan proteoglycan จะเป็นส่วนหนึ่งของ extracellular matrix ของ growth plate count lope และ connective tissue อื่น ๆ ดังนั้นการเพิ่มของ serum GAGs จึงสัมพันธ์กับความรุนแรงของ tibial dyschondroplasia

## 2.2 สารพิษ Fumonisin

Leeson และ คณะ (1995) กล่าวว่า fumonisins เป็นสารพิษจากเชื้อรา ชนิดล่าสุดที่ค้นพบ สร้างขึ้นโดย *Fusarium moniliforme* fumonisin B1 (FB1) เป็นสารพิษชนิดที่มีความเป็นพิษสูงและเชื้อรา *F.moniliforme* สร้างได้มากที่สุด fumonisin ก่อให้เกิดโรค leucoencephalomalacia ในม้า และ porcine pulmonary edema ในสุกร ธัญพืชที่พบสารพิษ fumonisin คือ ข้าวโพด และ อาหารที่มีส่วนประกอบจากข้าวโพด กลไกของสารพิษ fumonisin จะมีผลรบกวนการสังเคราะห์ sphingolipid มีผลทำให้ระดับของ sphinganine และ sphingosine ในซีรั่มเพิ่มขึ้น ขณะที่ sphingolipid ในซีรั่มลดลง

fumonisin เป็นสารมีขั้วชนิดแข็งแรง (strongly polar compound) ละลายน้ำได้ดี ละลายใน acetonitrile-water หรือ methanol ได้ดีกว่าในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ การ hydrolysis สารพิษนี้ด้วยความร้อน และ 6 M HCl หรือ 0.05-2 M KOH จะทำให้เกิด tricarballylic acid (1, 2, 3-propanetricarboxylic acid) fumonisin จัดเป็นสารพิษจากเชื้อราที่ละลายในน้ำได้ ประกอบด้วย Fumonisin A1 A2 B1 B2 B3 และ B4 (รูปภาพที่ 2) FB1 พบมากที่สุดในกลุ่ม fumonisin ทั้งหมด รองลงมาคือ FB2 ในการศึกษาสารพิษ Fumonisin ในยุคแรก ๆ พบว่าสารพิษนี้สร้างจากเชื้อ *Fusarium moniliforme* หลังจากนั้นจึงพบได้จากเชื้อราอื่น ๆ เช่น *F. proliferatum* (Ross *et al.*,1992), *F. anthophilum, F. diamini, F. napiforme* (Nelson *et al.*,1992) และล่าสุดพบว่า *Alternaria* spp.ก็สามารถสร้างสารพิษนี้ได้ (Chen *et al.*,1992)

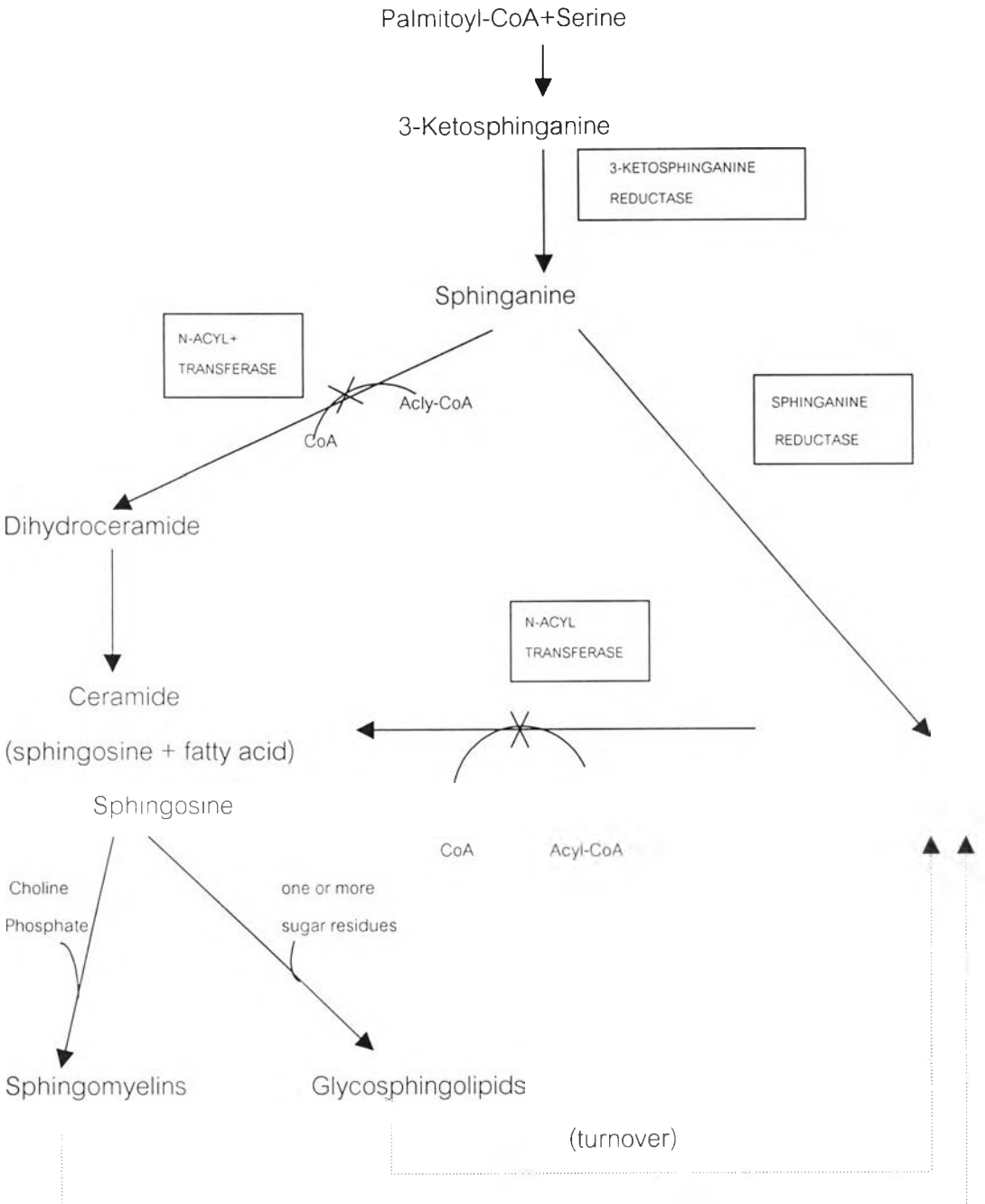
การศึกษาของ Wang และคณะ (1991) สรุปว่า FB1 อาจรบกวน biosynthesis ของ sphingolipids หรือ sphingosine เนื่องจาก polyhydric alcohol moiety ของ FB1 มีความคล้ายคลึงกันกับ complex amino alcohol sphingosine ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของ sphingolipid (รูปที่ 3) sphingosine จะถูกสร้างใน endoplasmic reticulum โดยการรวมตัวของ palmitoyl-CoA กับ กรดอมิโน serine ทำให้เกิด 3-ketosphinganine ที่จะถูก reduce ไปเป็น sphinganine และกลายเป็น sphingosine ในที่สุด ceramide ได้มาจากการรวมตัวกันของ free fatty acid หรือ acyl-CoA กับ sphingosine glycolipid รวมตัวกับ ceramine และ sugar residue จะได้เป็น glycoshingolipid ซึ่งเป็น glycolipid ที่มี sphingosine-fatty acid combination




| Fumonisin | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ |
|---|---|---|---|
| B1 | OH | OH | H |
| B2 | H | OH | H |
| B3 | OH | H | H |
| B4 | H | H | H |
| A1 | OH | OH | $CH_2CO$ |
| A2 | H | OH | $CH_2CO$ |

**รูปภาพที่ 2** โครงสร้างพื้นฐาน (back bone) ของ fumonisin และตารางแสดงโครงสร้างของ fumonisin แต่ละชนิด (Leeson *et al.*,1995)

**รูปภาพที่ 3** โครงสร้างของ fumonisins B1 และ B2, sphingosine และ sphinganine (Leeson *et al.*,1995)




X : pathways considered to be blocked by fumonisins

**รูปภาพที่** 4 กลไกการยับยั้งขบวนการสังเคราะห์ sphingolipid โดยสารพิษ fumonisins. (Leeson *et al.*,1995)

( ceramide ) รวมกับ sugar residue sphingomyelin ( คือ phosphosphingolipid ที่มีองค์ประกอบเป็น fatty acid, phosphate, choline และ sphingosine ) จะเกิดขึ้นเมื่อ ceramide ทำปฏิกิริยากับ CDP-choline หรือ phosphatidylcholine sphingolipids(phosphosphingolipids และ glycosphingolipids) มีความสำคัญสำหรับความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ (cell membrane integrity),การสื่อสารระหว่างเซลล์ (intercellular communication) contact and physiological activity จะพบ sphingolipids เป็นจำนวนมากในสมองและเนื้อเยื่อประสาท glycosphingolipid galactosyl-ceramide เป็นไขมันที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของ myelin ซึ่งเป็นผนังของ oligodendrocytes และ schwann cell ในระบบประสาท (central and peripheral nervous system) โครงสร้างพื้นฐานของการยับยั้งเอ็นไซม์ sphinganine และ sphingosine-N-acyltransferases (รูปภาพที่ 4) ยังไม่ทราบแน่นอน คาดว่าความคล้ายกันของ fumonisin กับ long-chain (sphingoid) base ทำให้ร่างกายคิดว่าเป็น substrate (transition state หรือ product analogs) ของ sphingosine หรือ sphinganine-N-acetyltransferase

การศึกษาความเป็นพิษในยุคแรก ๆ เริ่มโดยใช้ *F. moliniforme* culture material (FMC) เป็นแหล่งของสารพิษ อาหารสัตว์ที่ใช้ทดลองจะได้จากวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ไม่มีการปนเปื้อนมาผสมกับ FMC ที่รู้ระดับ fumonisin ที่แน่นอน การเตรียม FMC ทำโดย บ่ม fumonisin-producing *F. moniliforme* fungi strain ในข้าวโพดปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ (Weibking *et al.*, 1993) หลังจากนั้นจึงเอาข้าวโพดมาปั่นกับ organic solvent (acetone: chloroform 75:25) กรอง แล้วทิ้ง solvent ไป solid residue ที่ได้นำไปสกัดอีกครั้งด้วย solvent เดิม กรอง ทำให้แห้ง แล้วบดจนเป็นผงละเอียด นำผงที่ได้ไปวัดประมาณสารพิษแล้วนำไปใช้ในงานทดลอง ปริมาณ FB1 ที่ได้จาก FMC ค่อนข้างต่ำ คือ ประมาณ 2 mg/gm (0.2%) ต่อ FMC ทั้งหมด หรือน้อยกว่า ดังนั้นเพื่อที่จะได้ระดับความเข้มข้นของสารพิษเพียงพอ ส่วนใหญ่จึงต้องใช้ FMC มากกว่า 10% ของสูตรอาหาร เนื่องจากปริมาณ FB1 มีเพียง 0.2% ใน FMC ฉะนั้นอาจมี unknown *Fusarium* metabolites เจือปนใน FMC ทำให้เกิดมี confounding effect ได้ (Weibking *et al*, 1993) Norred และคณะ (1993 )พบ unidentified cytotoxic water soluble metabolites ใน *F. moliniforme* culture สารประกอบเหล่านี้จะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้พบอาการ และรอยโรคหลากหลายมากในไก่ที่ได้รับอาหารที่มี FMC

Prathapkumar และคณะ (1997) ได้ศึกษาไก่ไข่ 2 ฝูง ที่มีอาการ black sticky diarrhea อัตราการกินอาหารลดลง ไข่และน้ำหนักตัวลดลงมาก ต่อมามีอาการ

ขากระเผลกและ ตายประมาณ 10% ผลผลิตไข่ลดลง 20% เมื่อผ่าซากพบตับมีสีเหลือง และมี peripheral congestion มีจุดเลือดออกเล็กน้อยในกระเพาะบด และมีการสะสมน้ำมากในลำไส้ เมื่อให้อาหารชุดใหม่ ไก่ก็มีอาการดีขึ้น จึงนำอาหารที่ไก่กินไปตรวจพบว่ามี FB1 8.5 mg/kg และ aflatoxin B1 0.1 mg/kg เมื่อนำอาหารไปแยกเชื้อพบเชื้อรา *F. moniliforme* ที่สร้าง FB1 ได้ เมื่อทดลองให้อาหารที่มี FB1 8.5 mg/kg กับลูกไก่ตัวผู้อายุ 1 วัน เป็นเวลานาน 15 วัน พบว่าไก่มีอาการท้องเสียหลังกินอาหารนี้ 4 วัน น้ำหนักตัวลดลง และ 2 ใน 6 ตัว ตาย ระหว่างทดลอง และเมื่อทดลองให้อาหารที่มี FB1 8 และ 16 mg/kg กับไก่ไข่อายุ 72 สัปดาห์ เป็นเวลานาน 30 วัน ก็มีอาการท้องเสีย พบไก่ตาย 1 ตัว จาก 24 ตัว ไม่พบการลดลงของน้ำหนักตัว ผลผลิตไข่ หรือขนาดไข่

อาหารไก่ที่มีเชื้อรา *Fusarium* ปนเปื้อนในระดับสูง จะมีผลกับการกินอาหารของไก่ ไก่จะมีอาการท้องเสีย ขาอ่อนเปลี้ย และผลผลิตต่ำ มีรายงานว่า *Fusarium* spp. ทำให้เกิด tibial dyschondroplasia ในไก่เนื้อ (Walser *et al.*, 1980) อัตราการฟักออกของไข่ในไก่แม่พันธุ์จะลดลง (Leeson *et al.*, 985) นอกจากนี้สารพิษจาก *Fusarium moniliforme* ปริมาณสูงกว่า 100mg / kgfeed จะมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ (Ledoux *et al.*,1992) Jordan (1996) รายงานว่าหรือสรุปว่า *Fusarium moniliforme* จะสร้างสารพิษได้หลายชนิด เช่น fusarochomanone ($TDP_1$) ถ้าไก่เนื้อกินในระดับ 20 ppm จะเกิด leg deformities และ tibial dyschondroplasia ถ้าไก่เนื้อกิน moniliformin ในระดับ 100 ppm จะมีอัตราการกินอาหาร น้ำหนักตัวลดลง และพบ acute myocardial necrosis ซึ่งอาจแสดงอาการรุนแรงถึงตายได้ถ้าไก่เนื้อกิน fumonisin ในปริมาณ 250 ppm จะทำให้อัตราการกินอาหาร และน้ำหนักตัวลดลง

Brown และคณะ (1992) พบว่า ถ้าให้ไก่เนื้อกิน *F. moniliforme* ที่มี FB1 ขนาด 300 mg/kg feed นาน 2 สัปดาห์ จะทำให้น้ำหนักตัวลดลง 19% น้ำหนักตับจะเพิ่มขึ้น 30% และพบรอยโรค multifoci hepatic necrosis, biliary hyperplasia, muscle necrosis, intestinal globlet cell hyperplasia และ ricket Ledoux (1992) พบว่า ถ้าเลี้ยงไก่เนื้อนาน 21 วัน ด้วย FB1 ขนาด 0 100 200 300 400 mg/kg feed อัตราการเจริญเติบโตของไก่จะลดลง โดยแปรผันตามจำนวนสารพิษที่เพิ่มขึ้น ตับ กระเพาะแท้ และกระเพาะบดมีขนาดใหญ่ขึ้น ไก่มีอาการท้องเสีย มี thymic cortical atrophy, multifocal hepatic necrosis, biliary hyperplasia และ ricket ในไก่ที่ได้รับ FB1 ขนาด 200 หรือ 300 ppm เมื่อให้ FB1ในระดับสูง ค่า serum calcium, cholesterol, aspatate aminotransferase จะเพิ่มขึ้น Weibking และคณะ (1993) เลี้ยงลูกไก่อายุ 1 วัน ด้วยอาหารผสม FCM ที่มี FB1ปริมาณ 525 ppm นาน 3

สัปดาห์ พบว่าไก่ที่ได้รับ FB1 ปริมาณ 450 และ 525 ppm มีน้ำหนักตัวและการกินอาหารลดลงอย่างชัดเจน น้ำหนักตับและไตเพิ่มขึ้น mean cell hemoglobin concentrations (MCHC) เพิ่มขึ้น รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาจะพบในตับไก่ที่ได้รับ FCM 225 ppm FB1 ขึ้นไป โดยพบหย่อมเนื้อตายของเซลล์ตับ (isolated foci of hepatic necrosis) การเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับระดับปานกลาง (moderate diffuse hepatocellular hyperplasia) และการเพิ่มขึ้นของท่อน้ำดีระดับต่ำ (biliary hyperplasia) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าไก่ที่ได้รับอาหารที่มี FB1 มี serum free sphinganine level ในระดับสูงกว่าอย่างเห็นได้ชัด และ sphinganine:sphingosine ratio สูงขึ้นด้วย เนื่องจากสมมุติฐานของกลไกการออกฤทธิ์ของ fumonisin คือ การยับยั้ง sphingolipid biosynthesis Weibking และคณะ (1993) คาดว่าอาหารที่มี FB1 ที่ได้จาก FMC ในปริมาณ 75 ppm จะเป็นพิษต่อลูกไก่เนื้อ

Javed และคณะ (1993) เลี้ยงไก่ด้วยอาหารที่มี FB1 บริสุทธิ์ (pure) 125-274 ppm นาน 14 วัน พบว่าสารพิษทำให้เกิดอาการแบบ dose-responsive clinical sign ไก่มีน้ำหนักตัวลดลงและมีอัตราตาย ในการทดลองนี้ พบว่าลูกไก่อายุ 1 วันจะไวต่อ FB1 และ FB2 ที่ได้จาก *F. proliferatum* culture material มากกว่าไก่อายุ 7 หรือ 14 วัน โดยพบการตายเฉียบพลัน (acute death) ที่คล้าย spiking mortality syndrome ในไก่กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มี *F. proliferatum* culture material ที่มี FB1, FB2 และ moniliformin Henry และ Wyatt (1994) ได้ศึกษาความเป็นพิษของ FB1 บริสุทธิ์ และได้ผลแตกต่างออกไป กล่าวคือ เมื่อเลี้ยงไก่อายุ 1 วัน ด้วยอาหารที่มี FB1 ระดับ 0 20 40 หรือ 80 ppm นาน 21 วัน พบว่าน้ำหนักตัวของไก่ ความสามารถในการกินอาหาร หรือความต้องการน้ำดื่มไม่เปลี่ยนแปลง ไม่มีความแตกต่างกันของน้ำหนักของตับ ม้าม ไต หรือ ต่อม เบอร์ซ่าระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง แต่พบว่า liver lipid ของไก่ที่รับ FB1 มีระดับต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ liver sphinganine และ spinganine / sphingosine ratio มีระดับสูงในกลุ่มทดลอง ดังนั้นจึงสรุปว่าอาหารที่มี FB1 ขนาด 80 ppm ไม่มีผลต่อ performance ของไก่เนื้อ

Espada และคณะ (1994) ทำการศึกษาผลความเป็นพิษของ FB1 ในไก่โดยแบ่งเป็น 3 งานทดลอง คือ ให้ไก่เนื้ออายุ 2 วัน กินอาหารที่มี pure FB1 10 mg /kg feed นาน 6 วัน ได้ทำการผ่าซากไก่ทดลองบางตัว เมื่อครบ 6 วัน ที่เหลือเลี้ยงต่อไปด้วยอาหารไม่มีสารพิษนาน 5 สัปดาห์ ก่อนนำไปผ่าซาก งานทดลองอีก 2 แบบ คือ เลี้ยงไก่อายุ 2 วันด้วยอาหารระยะแรกที่เตรียมจาก *Fusarium moniliforme* culture material ที่มีปริมาณ FB1 30 mg/kg feed นาน 2 สัปดาห์ และอีกกลุ่มหนึ่งได้รับ FB1 ขนาด 300 mg/kg feed นาน 8 วัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พบว่าไก่ที่ได้รับสารพิษจะมีอาการท้องเสีย น้ำหนักตัวลดลง น้ำหนักของอวัยวะ ได้แก่ ตับ ม้าม และ ต่อมเบอร์ซ่า มีน้ำหนักลดลง น้ำหนักสัมพัทธ์ของตับเพิ่มขึ้น แต่น้ำหนักสัมพัทธ์ของม้ามลดลง triglycerides, uric acid และ alkaline phosphatase ลดลง แต่มีการเพิ่มขึ้นของระดับ gamma glutamyl transferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, creatine kinase และ cholesterol จากผลการศึกษานี้สรุปว่า pure FB1 (10 mg/kg) และ FB1 จาก FMC ( 30 mg/kg feed) มีพิษต่อลูกไก่อายุน้อย Espada และคณะ (1997)ยังได้ศึกษาข้อมูลของ plasma protein และ coagulation modification เพิ่มเติม โดยมีการออกแบบงานทดลองเหมือนเดิม พบว่าในไก่ที่ได้รับสารพิษ มี prothrombin time ลดลง plasma fibrinogen เพิ่มขึ้น (ไม่รวมกลุ่มที่ได้รับ FB1 30 mg/kg feed จาก FMC) และ antithrombin III activity ก็เพิ่มขึ้น serum albumin ลดลง ขณะที่ serum globulin เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ FMC กลุ่มที่รอให้มีการฟื้นตัวโดยการได้รับอาหารไม่มีสารพิษนาน 5 สัปดาห์ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ hemeostasis หรือ serum protein เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการศึกษานี้จึงสรุปว่า pure FB1 (10 mg/kg) และ FB1 จาก FMC (30 mg/kg feed) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ hemeostasis และ serum protein ในลูกไก่อายุน้อย

Li และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลของ FB1 ต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคของไก่เนื้อ โดยให้ไก่อายุ 1 วัน ได้รับอาหารที่มี FB1 0 50 100 หรือ 200 mg FB1/kg feed การทดลองแรกให้ไก่กินอาหาร 3 สัปดาห์ แล้วฉีดเชื้อ *E. coli* $4.6 \times 10^6$ เข้าเส้นเลือดดำในวันที่ 21 เก็บตัวอย่างเลือด 60 120 และ 180 นาทีหลังฉีดเชื้อ เก็บตัวอย่างตับ ม้าม และปอด 180 นาทีหลังฉีดเชื้อ พบว่า ไก่ที่ได้รับ 200 mg FB1/kg feed มีจำนวนแบคทีเรียสูงมากในตัวอย่างเลือด ม้าม และ ตับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การทดลองที่ 2 ให้ไก่กินอาหาร 4 สัปดาห์ ฉีดวัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อตาย 0.5 ml ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ของการทดลอง ตรวจระดับภูมิคุ้มกันโรค 7 วันหลังให้วัคซีนแต่ละครั้ง พบว่าภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลหลังวัคซีนครั้งที่ 2 ในกลุ่มที่ให้ 200 mg FB1/kg feed ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมมาก การทดลองที่ 3 พบว่าการตอบสนองต่อ mitogen โดยดูจาก cell proliferation ในตัวสัตว์ (*in vivo*) จะต่ำในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มี FB1 200 mg/kg feed ในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า cell ที่ได้รับ FB1 2.5 µg /ml มี cell proliferation ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ฉะนั้นจึงสรุปว่า FB1 มีผลกดภูมิคุ้มกันโรค (immunosuppression) ในไก่เนื้อตัวผู้ เมื่อมีสารพิษในระดับ 200 mg FB1/kg feed FB1 สามารถทำให้เกิด immune function ผิดปกติได้ อาจเพราะเกิดการรบกวน sphingolipid biosynthesis ก่อให้เกิด depletion ของ complex sphingolipids และสะสม free sphinganine และ sphingosine การยับยั้ง sphingolipid synthesis ของ FB1 จะสัมพันธ์กับการกด cell proliferation

sphingolipid breakdown product เป็น anti-proliferative และ tumor-suppressor lipids สามารถยับยั้ง humoral และ cell -mediated immune responses แต่อย่างไรก็ดีขนาดของ FB1 ที่ใช้ในการทดลองนี้สูงถึง 5 เท่าของระดับสารพิษที่พบในธรรมชาติ (ปกติ พบ 0.1-10 mg/kg) ดังนั้น FB1 ไม่น่าจะเป็นสาเหตุเบื้องต้นของการรบกวนระบบภูมิคุ้มกันโรคในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ การที่มี FB1 ร่วมกับสิ่งเหนี่ยวนำความเครียด (stressor) อื่น ๆ ที่เกิดจากขบวนการการเลี้ยงไก่ หรือการมี FB1 ร่วมกับสารพิษจากเชื้อราตัวอื่น อาจทำให้มีผลเสริมฤทธิ์กันจนมีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันโรค

Wu และคณะ (1995) ทำการศึกษาผลของ FB1 ต่อ chondrocytes ที่แยกมาจาก epiphyseal growth plate และต่อการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ พบว่า viability ของ chondrocyte ลดลงหลังได้รับ FB1 24 ชั่วโมง half lethal concentration ของ FB1 คือ 250 μm FB1 ปริมาณ 25 μm สามารถยับยั้งการใหญ่ขึ้นของขนาดเซลล์ อาหารที่มี fumonisin ปริมาณ 55 และ 110 ppm ทำให้น้ำหนักตัวลดลง เพิ่มน้ำหนักตับ และลดประสิทธิภาพการใช้อาหาร แต่ไม่พบลักษณะ ท้องเสีย และ bone malformation จึงสรุปได้ว่าตัว FB1 ไม่สามารถก่อให้เกิด skeletal problem

## 2.3 สารพิษ Moniliformin

Moniliformin (Sodium or potassium salt of 1-hydroxyl-cyclobut-1-ene-3, 4-dione) เป็น plant growth regulator และ phytotoxin เป็นสารพิษผลิตขึ้นโดยเชื้อรา *F. moniliforme F. acuminatum F. avenaceum F. concolor F. equiseti F. oxyspcrum F. proliferatum* และ *F. semitectum* (Rabie *et al.*,1982) Moniliformin เป็นพิษกับไก่สูงมาก พบว่ามีการตายเฉียบพลัน โดยไม่มีรอยโรค ในไก่เนื้อที่ได้รับ fumonisin และ moniliformin จาก *F. proliferatum* culture material โดยพบว่า moniliformin ที่ระดับ 27 ppm ทำให้ไก่ตายถึง 40% แต่ที่ระดับ 16 ppm พบว่าไม่มีผลต่อไก่เนื้อ (Javed *et al.*,1993) Burmeister และคณะ (1979) ได้ศึกษา *F. moniliforme* NRRL 6322 พบว่าสามารถสร้างสารพิษ moniliformin ได้ 600 mg/ข้าวโพดบด 1 กก. เมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปทดลองกับไข่ฟัก พบว่า มีค่า LD50 คือ 2.8 µg/ฟอง และ 5.4 mg/kg bw. ของลูกไก่อายุ 1 วัน

Allen และคณะ(1981) ได้ให้ไก่ได้รับอาหารที่มีเชื้อรา *Fusarium moniliforme* strain NRRL 6322 (M) ในขนาด 8 16 และ 64 mg/kg feed ตั้งแต่อายุ 1-21 วัน พบว่าไก่ที่ได้รับ M 16 mg/kg feed ไม่ได้รับผลเสียจากอาหาร ไก่ที่ได้รับ M 64 mg/kg feed มีน้ำหนักตัวและการกินอาหารลดลง ไก่ 3 ใน 10 ตัวที่ได้รับ M 64 mg/kg feed ตายระหว่างการทดลองโดยไม่พบรอยโรค LD50 ของไก่ตัวเมียอายุ 7 สัปดาห์ที่ได้รับ pure moniliformin ทางเส้นเลือด คือ ขนาด $1.38 \pm 0.35$ mg/kg bw. ระยะเวลาที่รับสารพิษจนตายเฉลี่ย 65 นาที โดยมีอาการกล้ามเนื้อไม่สัมพันธ์กัน tachynea ตั้งแต่อาการปานกลางถึงรุนแรง หายใจลำบาก โคม่า ดิ้นทุรนทุรายก่อนตาย และตายในที่สุด

Kriek และ คณะ (1977) สันนิษฐานว่า moniliformin ทำให้เกิดการเสื่อมของกล้ามเนื้อหัวใจชนิดเฉียบพลัน โดยกดขบวนการขนส่งพลังงานผ่านเยื่อบุเซลล์ (energy-driven transmenbrane transport) ทำให้เกิดการขัดขวาง (disturbance) ของการควบคุมสมดุลย์ของน้ำ (intracellular osmoregulation) และเกิดการบวมน้ำในเซลล์อย่างรุนแรง (severe intracellular edema) ตามมา Thiel (1978) พบว่า moniliformin จะยับยั้ง mitochondrial pyruvate และ $\alpha$- ketoglutarate oxidations ร่วมกับ reduction of oxidative phosphoeylation (เช่น adenosine triphosphate production) ดังนั้น moniliformin คือ ตัวยับยั้งของ pyruvate dehydrogenase enzyme complex Gatheriole และคณะ (1986) แสดงให้เห็นว่า moniliformin สามารถยับยั้ง isolated bovine pyruvate dehydrogenase complex (PDH) thiamine

pyrophosphate เป็น cofactor ของ PDH ดังนั้น PDH เป็น molecular basis ที่ทำให้เกิด additive หรือ synergistic interaction ระหว่าง moniliformin และ anti-thiamine factor

มีการใช้ electrocardiography ศึกษาถึง acute cardiotropic effect ของ moniliformin กับไก่เมื่ออายุ 3 สัปดาห์ พบว่าเมื่อวางยาสลบด้วย pentobarbital sodium 40 mg/kg bw โดยการฉีดเข้ากล้าม แล้วฉีด moniliformin ขนาด 1 mg/kg bw เข้าเส้นเลือด พบว่า electrocardiogram มีการเปลี่ยนแปลงภายใน 50 นาที ไก่ 3 ใน 7 ตัวที่ได้รับ moniliformin ตายในเวลา 50 นาทีหลังฉีดสารพิษ moniliformin ทำให้เกิด bradycardia ภายใน 15 นาทีหลังฉีดสารพิษ ไก่ที่ได้รับสารพิษมี P-R, Q-T และ S-T interval ยาวกว่ากลุ่มควบคุมตลอดเวลา 50 นาทีที่ทำการสังเกต ฉะนั้นสรุปได้ว่า สาเหตุเบื้องต้นที่ moniliformin ทำให้ไก่ตาย คือ การเกิดหัวใจล้มเหลว (cardiac failure) (Nagaraj, 1995)

Ledoux และคณะ (1995) เลี้ยงไก่อายุ 1 วัน เป็นเวลานาน 21 วัน โดยให้อาหารซึ่งมี *Fusarium fujikuroi* M-1214 culture material (MCM) ปนในอาหาร 0 0.24 0.48 0.72 0.96 1.44 1.92 2.40 และ 2.88% คิดเป็น 0 25 50 75 100 150 200 250 และ 300 mg /kg feed พบว่า มีอัตราตายที่เด่นชัดในกลุ่มที่กิน MCM ขนาด 200 250 และ 300 mg/kg feed ไก่ที่ได้รับ MCM ขนาด 100 mg /kg feed กินอาหารลดลง น้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุม น้ำหนักหัวใจเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ MCM ขนาด 50 mg /kg feed น้ำหนักตับเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ MCM 100 mg /kg feed รอยโรคที่พบคือ หัวใจโตและมีการขยายของหัวใจห้องล่างขวา (cardiomegaly with dilation of the right ventricle) ไก่ที่ได้รับ MCM มากกว่า 75 และ 200 mg /kg feed พบรอยโรค คือนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโต และมีรูปร่างต่างๆ (large and variably shaped cardiomyocyte nuclei) และ การหายไปของลายขวางทั้งหมด (generalized loss of cardiomyocyte cross striation)

Li และคณะ (2000) ได้ทำการทดลองในไก่เนื้อโดยมีการออกแบบเหมือน Li และ คณะ (1999) แต่เปลี่ยนจาก fumonisin มาเป็น moniliformin พบว่าในไก่เนื้อที่ได้รับอาหารที่มี moniliformin 75 และ 100 mg/kg feed มีเชื้อ *E. coli* ในกระแสเลือด ตับ และม้าม มากกว่าในกลุ่มควบคุม ไก่เนื้อที่ได้รับ moniliformin 100 mg/kg feed มีภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลหลังการทำวัคซีนครั้งที่ 2 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม การศึกษา cell proliferation แบบ *in vivo* ไม่พบความแตกต่างกันในกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม แต่แบบ *in vitro* พบว่า lymphocyte proliferation ลดลงสัมพันธ์กับการเพิ่มระดับความเข้มข้นของ moniliformin ทั้งสามการทดลอง

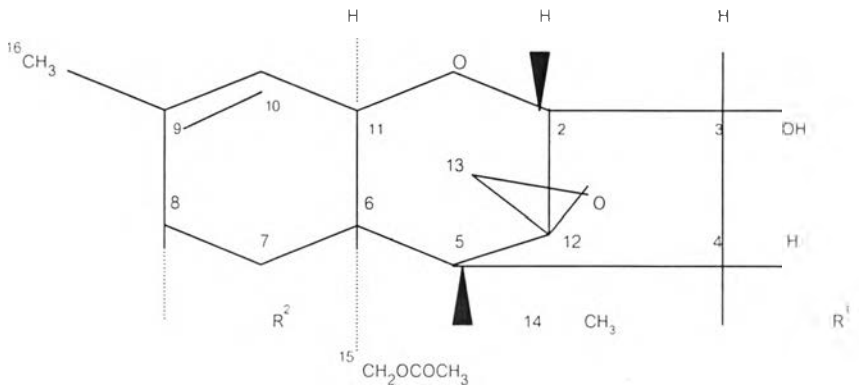
ไก่ที่ได้รับ moniliformin 100 mg/kg feed กินอาหารน้อยกว่า และน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มควบคุม จึงสรุปว่า moniliformin มีผลต่อ performance และ immune response เมื่อไก่ได้รับในระดับ 75 mg/kg feed

## 2.4 สารพิษกลุ่ม Trichothecenes

Trichothecenes (TCT) เป็นชื่อของสารพิษจากเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่มีจำนวนมากกว่า 100 ชนิด TCT แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ macrocyclic และ nonmacrocyclic สารพิษของกลุ่ม macrocyclicTCT (เช่น verrucarins, roridins, satratoxin และ baccharins) ยังไม่ได้รับการศึกษาในไก่ ตรงข้ามกับ non-macrocyclic ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ type A เช่น T-2 toxin HT-2 toxin และ diacetoxyscirpenol(DAS) มีความเป็นพิษต่อไก่มากกว่า type B เช่น fusarenone-X, deoxynivalenol (DON) และ nivalenol (NIV) (Leeson *et al.*, 1995) ความเป็นพิษของสารพิษ trichothecenes ขึ้นอยู่กับความเสถียรของ epoxide ring สารพิษนี้ไม่เสื่อมสลายแม้เก็บไว้เป็นเวลานาน หรือในอุณหภูมิหุงต้มธรรมดา (Hoerr,1997)

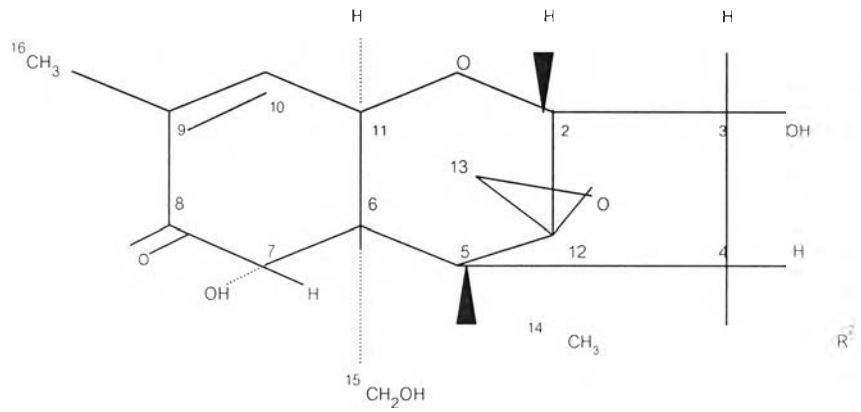
ในระดับเซลล์ผลส่วนใหญ่ของTCT คือ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) และการรบกวนการสังเคราะห์ DNAและRNA TCT ยังมีผลต่อเซลล์เดี่ยว ๆ เช่น ผนังลำไส้ ผิวหนัง และ lymphoid and erythroid cell ทำให้เกิดการตายอย่างกว้างขวาง (extensive necrosis) ของเยื่อบุช่องปากและผิวหนังที่สัมผัส สารพิษเกิดผลอย่างรุนแรงต่อทางเดินอาหาร ลดการทำงานของไขกระดูกและระบบภูมิคุ้มกันโรค อาการและพยาธิสภาพจะแปรผันตามอวัยวะที่ได้รับสารพิษ แผลในปากที่เกิดขึ้นในไก่มีลักษณะเฉพาะ คือ circumscribed proliferative yellowish caseous plagues ที่มุมปาก ลิ้น เยื่อบุ hard palate และขอบจงอยปาก ความรุนแรงของรอยโรคเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่กินอาหารซึ่งมีสารพิษและระดับของสารพิษในอาหาร ในไก่เนื้อจะพบว่าการเจริญเติบโตลดลง ขนผิดปกติ ต่อมเบอร์ซ่า (bursa of fabricious) มีขนาดลดลง ในไก่ไข่จะพบแผลในปาก ลดการกินอาหาร ผลผลิตไข่ลด และคุณภาพเปลือกไข่ (Leeson *et al.*,1995)

โครงสร้างทางเคมีของ TCT เป็น tetracycline sesquiterpene nucleus with a characteristic epoxide ring (Hoerr,1997) หรือ 12, 13-epoxytrichothecene skeleton ดังที่แสดงไว้ในรูปภาพที่ 5 และ 6 สารพิษในกลุ่ม trichothecens แต่ละตัวจะแตกต่างกันที่ side chain ที่มาต่อกับ skeleton นี้ สารพิษตัวสำคัญที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ คือ T-2 toxin, HT-2 toxin,15-monoacetoxyscirpenol (15-MAS) เชื้อรา *Fusarium* spp. ชนิดต่าง ๆ ที่สามารถสร้าง trichothecenes ได้แสดงไว้ในตาราง ที่ 2 สามารถแบ่ง TCT ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยแบ่งจากการมี macrocyclic ring ระหว่าง C-4 และ C-15 macrocyclic TCT จะมี ester หรือ ether-ester bridge เชื่อมที่ C-4 และ C-15 ขณะที่ non-macrocyclic TCT ไม่มี ring นี้ (Leeson *et al.*,1995)




**รูปภาพที่** 5 โครงสร้างทางเคมีของ trichothecenes type A ( Leeson *et al.*,1995 )

| Compound | $R^1$ | $R^2$ |
|---|---|---|
| T-2 toxin | $OCOCH_3$ | $OCOCH_2CH\ (CH_3)_2$ |
| HT-2 toxin | OH | $OCOCH_2CH\ (CH_3)_2$ |
| Neosolaniol (NEO) | $OCOCH_3$ | OH |
| 8-Acetylneosolaniol (8-AC-NEO) | $OCOCH_3$ | $OCOCH_3$ |
| 4-Deacetylneosolaniol (4-DN) | OH | OH |
| 4, 15-Diacetoxyscirpenol (DAS) | $OCOCH_3$ | H |
| 15-Monoacatoxyscirpenol (15-MAS) | OH | H |




**รูปภาพที่** 6 โครงสร้างทางเคมีของ trichothecenes type B (Leeson *et al.*,1995)

| Compound | $R^1$ | $R^2$ |
|---|---|---|
| Nivalenol (NIV) | OH | OH |
| 4-Acetylnivalenol (Fusarenone-X) | OH | $OCOCH_3$ |
| Deoxynivalenol (DON) | OH | H |
| 3-Acetyldeoxynivalenol (3-Ac-DON) | $OCOCH_3$ | H |

TCT ยังแบ่งกลุ่ม ได้จาก thin layer chromatography เนื่องจากความสามารถเรืองแสงได้ของ macrocyclic TCT ภายใต้แสง UV ขณะที่ non-macrocyclic TCT ไม่สามารถเรืองแสงได้ non-macrocyclic TCT แบ่งออกเป็น type A และ type B type B TCT จะมี conjugated carbonyl group ที่ตำแหน่ง C8 ในขณะที่ type A ไม่มี type A TCT ประกอบด้วย T-2 toxin (3 ∝ -hydroxy-4β, 15-diacetoxy-8 ∝ -isovaleroxy-12, 13-epoxytrichothec-9-ene) and their derivative และ scirpene group เช่น scirpentriol, mono-, di-, และ tri-acetoxyscirpenols type A TCT ที่พบในธรรมชาติ ได้แก่ T-2 toxin, HT-2 toxin และ DAS type B TCT ที่พบในธรรมชาติ คือ fusarenone - X, DON และ NIV macrocyclic TCT ที่พบในธรรมชาติกลุ่มที่สำคัญ คือ verrucarins, rorid, satrotoxins และ baccharins

TCT จะพบในกระแสเลือดภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากให้กิน ผิวหนังและไขมันใต้ผิวหนังเป็นแหล่งสะสมของสารพิษทำให้การดูดซึมช้าลง ลด metabolism และการขับออกของสารพิษ ไก่จะดูดซึม T-2 toxin ได้สูงกว่า DON T-2 toxin จึงมีความเป็นพิษต่อไก่สูงกว่า DON มีการทดลองในไก่เมื่ออายุ 6 สัปดาห์ พบว่าถ้าให้ไก่กิน T-2 toxin สารพิษและ metabolite ของสารพิษจะเคลื่อนเข้าสู่อวัยวะอย่างรวดเร็ว และมีระดับสูงสุดภายใน 4 ชั่วโมง ยกเว้นกล้ามเนื้อ ผิวหนังและน้ำดีจะระดับสูงสุดภายใน 12 ชั่วโมง สารพิษสามารถพบทั่วร่างกายภายใน 24 ชั่วโมงจะพบ T-2 toxin สูงสุดในเนื้อเยื่อ และของเหลวที่เกี่ยวข้องกับการขับสารพิษออกจากร่างกาย โดยเฉพาะในน้ำดี ถุงน้ำดี ตับ ไต และ ลำไส้ T-2 toxin และสาร metabolite ของมันจะไม่มีการสะสมในร่างกาย พบว่าถ้าให้สารพิษ เพียงครั้งเดียวจะตรวจพบสารพิษในตับ ไต และกล้ามเนื้อหลังให้สารพิษ 6 และ 12 ชั่วโมง และปริมาณสารพิษจะลดลงเกือบตรวจไม่พบใน 24 ชั่วโมง ไม่พบสารพิษในเลือด สมอง และไขมันเมื่อ 48 ชั่วโมง (Chi *et al.*, 1978)

TCT ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ของสัตว์ โดยไปทำปฏิกิริยากับ functional molecules and subcellular organelles ของเซลล์ การยับยั้งปฐมภูมิ คือ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน การยับยั้งทุติยภูมิ คือ รบกวนการสังเคราะห์ DNA และ RNA กลไกของความเป็นพิษมุ่งไปที่ protein and macromolecular synthesis การทำงานของผนังเซลล์ enzyme activity และ immune function โดยรบกวน DNA replication phase (S phase) ทุกขั้นตอนของขบวนการ translation เช่น initiation elongation หรือ termination จะถูกรบกวนด้วยสารพิษตัวนี้ได้ทั้งหมด ดังนั้นถ้าแบ่งกลุ่ม trichothecenes ตามคุณสมบัติความเป็นพิษ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มที่เป็น initiation inhibitors ได้แก่ scirpentriol, T-2 toxin, DAS

NIV, 4-Ac-NIV, HT-2 toxin และ fusarenone - X กลุ่มที่เป็นตัวยับยั้งขั้นตอน elangation หรือ termination ได้แก่ trichodermin, crotocin, DON และ verrucarol นอกจากนี้มันยังรบกวน ribosomal enzyme peptidyl transferase ซึ่งเป็น integral part ของ 60 S ribosomal subunit (Leeson *et al.*,1995)

เมื่อให้ T-2 toxin ขนาด 0.2 mg/kg ในอาหารกับไก่อายุ 42 วัน นาน 9 วัน เพื่อศึกษาผลของสารพิษนี้ต่อ lipid peroxidation และ activity ของ glutathione redox system (จำนวนของ reduced and oxidised glutathione และ activity ของ glutathione peroxidase) ในเลือด และตับ พบว่า malondialdehyde ในพลาสม่าของไก่เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด ใน RBC hemolysate เพิ่มขึ้นไม่มากนัก ในตับจะพบ malondialdehyde ในระดับสูงขึ้นด้วย reduced glutathione content ใน RBC hemolysate ลดลงเล็กน้อย oxidised glutathione content พบว่าเพิ่มขึ้นในพลาสมาและ ตับ แต่ activity ของ glutathione peroxidase ไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากการทดลองนี้พบว่าในเนื้อเยื่อที่ต่างกัน T-2 toxin จะมีผลต่อ oxidative effect ต่างกัน ถ้ามีการได้รับสารพิษสะสมเป็นเวลานานอาจเกิดการรบกวน glutathione redox system อย่างรุนแรง (Mezes *et al.*,1998)

Wyatt และคณะ (1973) ทดลองผสม T-2 toxin ในขนาด 0 1 2 4 8 และ 16 μg/g ในอาหารกับไก่อายุ 1 วัน เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตลดลงอย่างเห็นได้ชัดที่สารพิษขนาด 4 8 และ 16 μg/g แต่ feed conversion ratio ไม่เปลี่ยนแปลง น้ำหนักสัมพัทธ์ (Relative weight) ของม้ามและต่อมเบอร์ซ่าลดลง น้ำหนักสัมพัทธ์ของตับอ่อนและกระเพาะแท้เพิ่มขึ้น ขณะที่น้ำหนักสัมพัทธ์ของตับไม่เปลี่ยนแปลง แต่ liver hematoma ที่พบจะแปรผันตามขนาดของสารพิษที่ได้รับการตรวจทางเคมีเลือด พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่า hemoglobin, total serum protein, total serum cholesterol, total serum lipid, plasma glucose, plasma uric acid และ acid phosphatase

ผลของ T-2 toxin ต่อค่าเอ็นไซม์ในเลือดของไก่พบ aspartate amino transaminase, alanine aminotransaminase และ lactate dehydrogenase เพิ่มขึ้น ส่วน uric acid และ alkaline phosphatase ลดลง (Pearson,1978) นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ prothrombin time เพิ่มขึ้น เนื่องจาก T-2 toxin จะไปมีผลต่อ coagulation factor VII, prothrombin และ fibrinogen (Doerr *et al.*,1974)

ผลของ TCT ต่อไก่เนื้อแสดงไว้ในตารางที่ 3 ผลปฐมภูมิของ T-2 toxin จะเริ่มจากการอักเสบในช่องปากจนกระทั่งเกิดเนื้อตาย (necrosis) และมีการติดเชื้อแบคทีเรียตามมา ในการเลี้ยงไก่อายุ 1 วัน นาน 3 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่มี T-2 toxin (0 1 2 4 8 และ 16 ppm) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในลักษณะแปรผันตามขนาดสารพิษ (dose-related fashion) ตั้งแต่ 4 ppm ขึ้นไป แต่ประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่เปลี่ยนแปลง น้ำหนักสัมพัทธ์ของตับไม่เปลี่ยนแปลง แต่การเกิด liver hematoma แปรผันตามขนาดของสารพิษที่ไก่ได้รับ ลักษณะขนที่ผิดปกติจะพบในไก่ที่กินอาหารที่มีสารพิษในระดับ 4 ppm ขึ้นไป เมื่อไก่อายุได้ 1 สัปดาห์จะเริ่มพบแผลในปากลักษณะเป็น caseous yellow-white plague เมื่ออายุ 2 สัปดาห์ แผลจะมีขนาดใหญ่ขึ้น และกินลึกเข้าไปใน lingual papillae ที่ปลายลิ้น เมื่ออายุ 3 สัปดาห์ แผลจะใหญ่ขึ้นอีกโดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับสารพิษสูงจนไม่สามารถปิดปากได้ (Lesson *et al.*,1995)

T-2 toxin ทำให้เกิด pyknotic nuclei ใน lymphoid follicles ของต่อมเบอร์ซ่า เมื่อเลี้ยงไก่เนื้อด้วยอาหารที่มี T-2 toxin 8 ppm ตั้งแต่อายุ 1-21 วัน (Kubena *et al.*,1990) เมื่อให้ T-2 toxin ขนาด 2.5 mg/kg หรือ DAS 2.7 mg/kg ครั้งเดียวในไก่เมื่ออายุ 7 วัน พบว่าต่อมไทมัสมีเนื้อตาย ภายใน 6 ชั่วโมงหลังให้สารพิษในไก่ที่ได้รับ T-2 toxin โดยที่ส่น medulla จะมีรอยโรคที่รุนแรงกว่าไกที่ได้รับ DAS เนื้อตายร่วมกับการหายไปของลิมโฟไซต์เกิดขึ้นทั้งในส่วน cortex และ medulla ต่อมเบอร์ซ่ามีรอยโรคการเกิดเนื้อตายของ follicular epithelium และ follicle แต่เขตแบ่ง cortex และ medulla ปกติ เนื้อตายของไขกระดูกใน erythroid and granulocytic regions เริ่มเห็นหลังให้สารพิษ 6 ชั่วโมง และรอยโรครุนแรงขึ้นหลัง 24 ชั่วโมง รอยโรคของตับที่ได้รับ T-2 toxin จะรุนแรงกว่าตับที่ได้รับ DAS โดยพบว่าหลังให้สารพิษ 1 ชั่วโมง จะพบเนื้อตายแบบแข็งตัวกระจายเป็นย่อมทั่วไป ส่วนใหญ่จะพบในบริเวณ portal กระเพาะแท้จะพบรอยโรคเนื้อตายของเยื่อบุชั้นผิว (superficial epithelium) และการลอกหลุดเยื่อบุจากรอยพับของเยื่อเมือก (mucosal fold) รอยโรคของขนจะพบหลังรับสารพิษ 12-24 ชั่วโมง โดยพบเนื้อตายของเยื่อบุขนชั้นนอกในฐานขน และชั้นฐานของ ramus และส่วน barb ridge (Hoerr *et al.*,1981) เมื่อให้ T-2 toxin ขนาด 1.5-3.0 mg/kg หรือ DAS ขนาด 2.5-3.5 mg/kg โดยป้อนเข้ากระเพาะพักของไก่อายุ 7 วัน เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ พบว่าไก่บางตัวขาดน้ำ ผอมและตาย น้ำหนักตัวและค่าอัดแน่นเม็ดเลือดลดลง พบรอยโรคในอวัยวะต่าง ๆ ดังนี้ คือ เนื้อตาย และการลดลงของเนื้อเยื่อระบบน้ำเหลือง และระบบสร้างเลือด (hematopoietic tissue) เนื้อตายของเซลล์ตับ ท่อน้ำดี เยื่อบุทางเดินอาหาร และรากขน (Hortt *et al.*,1982b,c) T-2 toxin จะสร้างความเสียหายต่อเนื้อเยื่อของระบบ lymphocytic และ hematopoietic ได้มากกว่า DAS

**ตารางที่** 3 ผลของสารพิษ trichothecenes ในอาหารต่อไก่เนื้อ (Leeson *et al.*,1995)

| สารพิษ | ระดับสารพิษในอาหาร (มก./กก.) | ระยะเวลาที่ได้รับอาหาร | ผลที่เกิดขึ้น |
|---|---|---|---|
| T-2 toxin | 4 | 3 สัปดาห์ | อัตราการเจริญเติบโตลดลง |
| | 4 | 1 สัปดาห์ | แผลในปาก |
| | 4 | 3 สัปดาห์ | รบกวนระบบประสาท น้ำหนักตัวลด สภาพขนผิดปกติ hepatic hematoma |
| | 16 | 3 สัปดาห์ | Bursa of Fabricious มีขนาดเล็กลง |
| | 0.4 | 7 สัปดาห์ | แผลในปาก |
| | 1-8 | 3 สัปดาห์ | แผลในปาก ลดการกินอาหาร น้ำหนักลด |
| | 8-16 | 11 วัน | น้ำหนักตัวลด มีแผลในปาก |
| | 4-10 | 3 สัปดาห์ | oral meiosis ลดการกินอาหาร |
| | 50-300 | 3 สัปดาห์ | nematocrit ลดลง lymphoid atrophy โลหิตจาง |
| DAS | 5 | 3 สัปดาห์ | แผลในปาก ลดการกิน น้ำหนักตัวลด |
| | 1-2 | 3 สัปดาห์ | แผลในปาก อัตราการเจริญเติบโตลดลง |
| | 4-16 | 3 สัปดาห์ | แผลในปาก อัตราการเจริญเติบโตลดลง |
| TAS | 4-8 | 3 สัปดาห์ | แผลในปาก อัตราการเจริญเติบโตลดลง |
| MAS | 2-5 | 3 สัปดาห์ | แผลในปาก อัตราการเจริญเติบโตลดลง |
| STO | 2-4 | 3 สัปดาห์ | แผลในปาก อัตราการเจริญเติบโตลดลง |
| DON | 1.87 | 4 สัปดาห์ | ไม่พบความผิดปกติ |
| | 116 | 5 วัน | อัตราการเจริญเติบโตลด ลดการกิน |
| | 16 | 3 สัปดาห์ | น้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการใช้อาหารลด |

**หมายเหตุ** :

DAS = diacetoxyscirpinol, TAS = acetoxyscirpinol, MAS =monoacetoxyscirpinol

STO = scirpinol, DON = deoxynivalenol

จากการทดลองของ Hoerr และคณะ (1992a) โดยเลี้ยงไก่กระทงอายุ 7 วัน เป็นเวลานาน 17 วัน ด้วยอาหารที่มี *Fusarium* culture material 1 5 10% ซึ่งมี T-2 toxin 5 ppm NEO 0.5 ppm และ อาจมี fungal metabolite ตัวอื่น ๆ ด้วย พบว่าครึ่งหนึ่งของไก่ที่กิน fungal culture ในระดับสูงจะตายภายใน 17 วัน โดยมีอาการขาดน้ำ พบเนื้อตาย และการหายไปของเนื้อเยื่อ lymphocytic and hematopoietic มีเนื้อตายของระบบ hepatobiliary, gastroenteric mucosa, feather epidermis และ renal tubular epithelium ไก่ที่มีชีวิตรอดจะตัวเล็ก และโลหิตจางไก่ดังกล่าวจะพบการฝ่อลีบของเนื้อเยื่อระบบน้ำเหลือง การลดลงของเซลล์ในไขกระดูก การตายของเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนปาก และกระเพาะพัก การเกิดการเสื่อมของเซลล์ตับ การเพิ่มจำนวนเซลล์ของท่อน้ำดี และการลดขนาดลงของต่อมไทรอยด์ ไก่ที่ได้รับอาหารที่มี 1 หรือ 5% fungal culture material น้ำหนักตัวและการกินอาหารจะลดลง แต่ไม่มีอัตราการตาย

## Trichothecenes type B ในไก่เนื้อ

DON มักพบพร้อมสารพิษ zearalenone, aflatoxin และอื่น ๆ พบว่า DON มีความเป็นพิษต่อสัตว์ปีกต่ำ (Hoerr , 1997) ลูกไก่อายุ 1 วันได้รับ DON ขนาด 70 mg/kg โดยป้อนทางปากจึงทำให้เกิดการตายได้ และ oral LD 50 คือ 140 mg/kg (Moran *et al.*, 1982) Kubena (1985) ได้ทำการทดลองให้ไก่ Leghorn ตัวผู้ได้รับ DON ขนาด 0 9 หรือ 18 mg ในอาหารหนึ่งกิโลกรัม ตั้งแต่อายุ 1 ถึง 35 วัน พบว่าไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ค่า absolute และ relative weight ของตับอ่อนต่ำลง แต่ของกระเพาะบดกลับสูงขึ้น ค่า hemoglobin และ hematocrit ต่ำลงเมื่ออายุ 28 และ 35 วัน

DON ไม่ค่อยจะมีผลที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อไก่เนื้อ Huff และคณะ (1981) ได้ให้ DON ในขนาดสูงผิดปกติ (140 -1120 mg/kg) ทำให้ไก่เนื้อเกิดอาการอ้าปาก หายใจ เซื่องซึม ปีกและหัวตก เสียการทรงตัวและตายใน 14 ชั่วโมง เมื่อทำการผ่าซากพบ ecchymotic hemorrhage ใน ระบบทางเดินอาหาร ตับ และกล้ามเนื้อ พบ visceral gout และเนื้อตายของกระเพาะบด แต่อย่างไรก็ดีระดับ DON ที่ให้ในการทดลองที่ไม่มีโอกาสพบได้ในธรรมชาติ

## 2.5 สารพิษจากเชื้อรา *Fusarium* ชนิดอื่น ๆ

นอกจากสารพิษ TCT fumonisin และ moniliformin แล้ว *Fusarium* spp. ยังสามารถสร้างสารพิษอื่น ๆ ได้อีก ได้แก่ fusarochomanone ( FC ) fusaric acid และ zearalenone (ZEA) ดังที่แสดงไว้ในตารางที่4 ส่วนโครงสร้างทางเคมีของสารพิษแสดงในรูปที่ 7

FC สร้างโดย *F. equiseti* FC จะทำให้อุบัติการของ dyschondroplasia ในไก่เนื้อเพิ่มขึ้น Walser และ คณะ (1982) พบว่าในไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยข้าวโพดที่ปนเปื้อนเชื้อรา *F. roseum* "Graminearum" จะมีอุบัติการของ Osteochondrosis ใน proximal tibiotarsi สูง จึงตั้งชื่อสารพิษนี้ว่า TDP-1 ภายหลัง Pathre และคณะ (1986) ได้ศึกษา chemical structure และให้ชื่อว่า fusarochromanone ที่แสดงให้เห็นว่ามีกำเนิดจาก *Fusarium* และมี chromanone ring

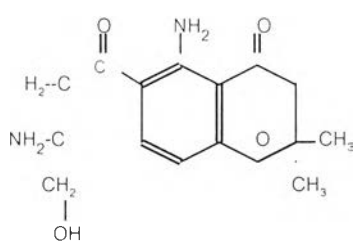
Fusaric acid (5-butylpicolinicacid; 5-butly pyridine-2-carboxylic acid) เป็น phytotoxin และมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอย่างอ่อน fusaric acid ถูกผลิตขึ้นมาจากเชื้อรา *F. moniliforme, F. oxysporum, F. sacchari, F. solani* และ *F. verticillioides* (Thrane, 1989) fusaric acid จะยับยั้ง dopamine-β-hydroxylase Chu *et al.*,1993; Oguba *et al.*,1994 พบว่าเมื่อให้ fusaric acid ในขนาด 0 35 75 150 และ 400 ppm กับไก่เนื้อเป็นเวลา 21 วัน จะไม่มีผลกับน้ำหนักตัวหรือการกินอาหาร แต่ cell-mediated immune response ต่อ phytohemagglutinin-β จะลดลง เมื่อให้ 1-150 ppm (Chu *et al.*,1993) ถึงแม้ว่า fusaric cid จะไม่แสดงผลเสียชัดเจนในไก่ แต่ปฏิกิริยาของสารพิษนี้กับ *Fusarium* toxin อื่นๆ เช่น moniliformin, FC, fumonisin, TCT ก็น่าสนใจที่ทำการศึกษา (Leeson *et al.*,1995)

ZEA เป็น phenolic resorcyclic acid lactone มีคุณสมบัติคล้าย estrogen เป็น metabolite ของ *F. roseum* และ *F. crookwellense* (Lopez *et al.*,1997) ZEA สามารถก่อให้เกิดอาการเป็นสัดในแม่สุกรที่ไม่มีรังไข่ หรือในสุกรสาวก่อนถึงวัยผสมพันธุ์ อาหารที่มี ZEA ระดับ 1-5 ppm ทำให้เกิด vulvovaginitis ในสุกรสาวได้ แต่สำหรับไก่จะไม่มีผลต่อสุขภาพ มีการให้ ZEA 300 ppm กับไก่เนื้อนาน 7 สัปดาห์ พบว่าไม่มีผลต่อ performance การทดลองซึ่งให้อาหารที่มี ZEA ขนาด10-800 ppm กับไก่เนื้ออายุ 1 วัน นาน 21 วัน พบว่าไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว การกินอาหาร หรือ อัตราการแลกเนื้อ ในไก่เนื้ออายุ 6-9 สัปดาห์ ได้รับอาหารที่มี ZEA 50-800 ppm พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใน performance parameter, relative organ weights และ blood parameter (Lesson *et al.*,1995)

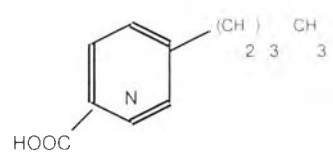
**ตารางที่ 4** ชื่อสารพิษที่สร้างโดย *Fusarium* spp. และ ผลทางพิษวิทยาต่อไก่ (Lesson *et al.*,1995)

| สารพิษจากเชื้อรา | สร้างจากเชื้อรา | ผลทางพิษวิทยาต่อไก่ |
|---|---|---|
| Fusarochromanone | *F. equsiti* | Dyschondroplastic lesion ใน proximal physis ของ long bone โดยเฉพาะที่ tibiotarsi |
| Fusaric acid | *F. moniliforme* | ลด cell-mediated immunity |
| Moniliformin | *F. moniliforme* | ตายเฉียบพลันโดยไม่พบวิการขณะทำการผ่าซาก |
| Zearalenone | *F. graminearum* | Hypertrophy ของ oviduct ถ้าให้ในระดับสูง (800 ppm) |

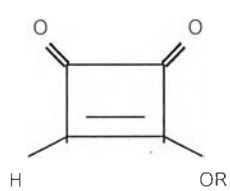
**รูปภาพที่ 7** โครงสร้างทางเคมีของ fusarochromanone, fusaric acid และ moniliformin (Lesson *et al.*,1995)




Fusarochromanone




Fusaric acid




Moniliformin

R = Na or K

TH842168

## 2.6 ความเป็นพิษของสารสีจากเชื้อรา *Fusarium*

Aurofusarin (dimeric naphthoquinone aurofusarin) เป็นสารสี (pigment) ที่สร้างโดย *F. graminearum* Dvorska (2000) ได้อ้างถึงการศึกษาของ Kotic ว่า aurofusarin สามารถลดคุณภาพของไข่และลดไวตามินในไก่ จึงได้ทำการศึกษาผลของaurofusarinต่อคุณภาพเนื้อของไก่อายุ 180 วัน โดยให้ไก่ได้รับอาหารที่มีเชื้อรา *F. graminearum* ในระดับ 3% ซึ่งมี aurofusarin 880 mg/kg แล้วใช้คุณสมบัติทาง organoleptic และส่วนประกอบทางชีวเคมีเป็นเครื่องวัดผล พบว่า ซากมีลักษณะเหลวตัว กล้ามเนื้อนุ่ม (soften) มีสีแดงคล้ำ ตับมีสีคล้ำ (dark-clay) บวมและเหลวตัว เนื้อไก่มี pH 6.52 $\pm$0.06 หลังจากเชือดได้ 1 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุม คุณสมบัติทางชีวเคมีของเนื้อที่ได้จากไก่ที่รับ aurofusarin ต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด ในระดับของโปรตีน ไขมัน และ เปอร์เซ็นต์น้ำที่พบในซาก ระดับกรดอะมิโนลดลงทั้งในเนื้อขาและเนื้ออก โดยพบว่าในเนื้อขา กรดอะมิโนที่ลดลงคือ alanine, valine, leucine, lysine, glutamic acid และ glycine ในเนื้ออก กรดอะมิโนที่ลดลงคือ alanine, valine, leucine, lysine และ phenylalanine

Ionovและคณะ (2000)ได้ศึกษาผลของ T-2 toxin aurofusarin และZEA ต่อขบวนการเปลี่ยนแปลงทางสรีระชีวะเคมี (physiological-biochemical process) ในเม็ดเลือดแดงและเซลล์ตับ โดยให้ไก่ไข่อายุ 280 วัน ได้รับ aurofusarin (culture) ZEA 1.6 mg/kg feed และ T-2 toxin 8 mg/kg feed เป็นเวลา 30 วัน ในวันที่ 14 และ 30 ได้สุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อมาตรวจหา activity ของ superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, gluthatione reductase, glutathione transferase, restored glutathione (GSH), melondialdehyde (MDA) และ Vitamin A, E, C สรุปผลการทดลองได้ว่าการมีสารพิษเหล่านี้ในอาหารชักนำให้เกิด initiation of peroxidation processes ลด vitamin status และ activate antioxidant enzymes

Sakhatsky (2000) ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของ *Fusarium* mycotoxin (T-2 toxin ZEA และ aurofusarin) ในอาหารไก่ไข่ต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคของลูกไก่ที่เกิดจากแม่ไก่ โดยใช้ผลต่อระดับเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิล bactericidal activity ของ blood serum globulin และ immunoglobulins concentration ในซีรั่มของ ลูกไก่อายุ 1 วันเป็นตัววัด โดยให้แม่ไก่ได้รับอาหารที่มี T-2 toxin 8 ppm หรือ zearalenone 1.6 ppm หรือ aurofusarin 26.4 ppm พบว่า ในทุกชนิดสารพิษ ลูกไก่อายุ 1 วัน มี immunodeficiency เนื่องจากสารพิษ และสารสีจากเชื้อรา *Fusarium* ที่แม่ไก่ได้รับ

## 2.7 ปฏิสัมพันธ์ (Interactions) ระหว่างสารพิษจากเชื้อรา

ในสภาพธรรมชาติ อาหารอาจปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรามากกว่า 1 ชนิด เนื่องจากเชื้อราบางสายพันธุ์ สามารถสร้างสารพิษได้มากกว่า 8 ชนิด หรืออาหารสัตว์ประกอบด้วยธัญพืชหลายชนิดรวมกัน จึงทำให้พบสารพิษจากเชื้อราหลายชนิด ปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสารพิษแต่ละชนิดอาจมีหลายกลไก เช่น เกิดการเปลี่ยนแปลงในความสามารถในการดูดซึม การจับตัวกันของโปรตีน และ biotransformation คำอธิบายเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ของความเป็นพิษได้แก่ addition, synergism, potentiation และ antagonism (Leeson *et al.*, 1995)

Huff และคณะ (1981) พบว่าเมื่อทดลองให้อาหารที่มีส่วนผสมของสารพิษ aflatoxin 2.5 ppm และ T-2 toxin 4 ppm กับไก่เนื้อ พบว่ามีผลทำให้น้ำหนักตัวลดลง น้ำหนักสัมพัทธ์ของไต กระเพาะบด และหัวใจเพิ่มขึ้น ลด mean corpuscular volume (MCV) และระดับของ potassium ในเลือด ได้มีงานทดลองที่คล้ายคลึงกันคือ ให้ไก่เนื้อได้รับ T-2 toxin 8 ppm และ aflatoxin 3.5 ppm พบว่า body weight gain ลดลง ถ้าให้ aflatoxin หรือ T-2 toxin เดี่ยว ๆ แต่ถ้าให้สารพิษจากเชื้อรา 2 ชนิดนี้พร้อมกัน body weight gain จะลดลงมากกว่าให้สารพิษตัวใดตัวหนึ่ง อย่างเห็นได้ชัด (Kubena *et al.*, 1990)

Kubena และคณะ (1989) ได้ทดลองให้ไก่เนื้อได้รับ T-2 toxin 4 ppm และ/หรือ ochratoxin A 2 ppm พบว่า เมื่อให้สารพิษสองชนิดพร้อมกัน จะมีผลทำให้ body weight gain, MCV, serum protein และ lactate dehydrogenase activity ลดลง ไม่มีผลต่อ serum calcium และ gamma glutamyl transferase แต่ทำให้ serum triglyceride เพิ่มขึ้น

Kubena และคณะ (1987) ได้ให้ข้าวสาลีที่ปนเปื้อนสารพิษ DON 16 ppm และ pure T-2 toxin 4 ppm พบว่าน้ำหนักตัวลดลงมากถ้าให้สารพิษสองชนิดพร้อมกัน แต่จะไม่ลดลงถ้าให้สารพิษชนิดใดตัวหนึ่ง

Nagaraj และ Wu(1994) ให้ *F. proliferatum* M 7176 culture meterial (FPC) ซึ่งมี moniliformin 37 ppm FB1 14 ppm และ hydrolyzed FB1 47.5 ppm กับลูกไก่นาน 2 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่มี FPC 30% ทำให้น้ำหนักตัวลดลง และเพิ่มน้ำหนักหัวใจสัมพัทธ์ พบ hydropericardium ในกว่าครึ่งหนึ่งของลูกไก่ที่ได้รับอาหารดังกล่าว แต่ไม่มีอัตราการตายเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังใช้ FPC ชุดนี้ทดลองร่วมกับการให้ selenium (Se) และ thiamine (B1) พบว่า FPC 30% จะลดน้ำหนักตัว (weight gain) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร

น้ำหนักหัวใจสัมพัทธ์ และ น้ำหนักตับสัมพัทธ์ การเติม Se 5 mg/kg ลงในอาหารที่มี FPC 30% ทำให้น้ำหนักตับและน้ำหนักหัวใจสัมพัทธ์ต่ำลง เมื่อเทียบกับอาหารที่มี FPC 0% + Se 5 mg/kg การเติม vitamin B1 25 mg/kg มีผลต้านฤทธิ์ (antagonist) ต่อ FPC พบ hydropericardium ในกลุ่ม 30% FPC และ 30% FPC + 5 mg/kg Se ในการทดลองนี้ไม่มีอัตราการตาย เมื่อเปลี่ยนใช้ FPC ชุดใหม่ ซึ่งมี moniliformin 102 ppm FB1 37 ppm และ hydrolyzed FB1 112 ppm มาทดลอง พบว่าทำให้ไก่ตายถึง 36% vitamin E ที่เติมลงในอาหารที่ให้ไก่กินไม่มีปฏิกิริยากับ FPC Se ทำปฏิกิริยากับ FPC แสดงผลต่อน้ำหนักหัวใจสัมพัทธ์เท่านั้น การเติม vitamin B1 แม้ว่าระดับต่ำถึง 10 mg/kg ก็มีผลยับยั้งความเป็นพิษบางอย่างของ FPC แต่อย่างไรก็ดี vitamin B1 ในระดับ 50 mg/kg ก็ลด cardiotoxicity ได้ไม่หมด จากการศึกษานี้สรุปว่า ความเป็นพิษที่สำคัญของ *F. proliferatum* M 7176 คือ ความเป็น anit-thiamine factor