รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกรียงศักดิ์ พูนสุข 2540. สารพิษจากเชื้อรา : อาการ และการชันสูตรในไก่ : การประชุมทางวิชาการเรื่องสารพิษจากเชื้อรา : ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : 173

ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และ ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว 2524. แอฟฟล่าท๊อกซิน : สารพิษจากเชื้อราที่ทำให้เกิดมะเร็งของตับ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล : 1

นิยม สุดเพราะ เลขา มาโนช อุบล คือประโคน พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์ และอภิรัชต์ สัมฤทธิ์ 2542. 51 *Oomycetes*, *Deuteromycetes* และ *Ascomycetes* จากดินเกษตรกรรม จังหวัดสกลนคร การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 บทคัดย่อ หน้า 39

ปิยะวดี เจริญวัฒนะ 2533. ชนิดของเชื้อรา *Fusarium* จากพืชและดินในประเทศไทย วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 142 หน้า

ภัทนีย์ เล็กศรีสมพงษ์ 2540. สารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์ : การประชุมทางวิชาการเรื่องสารพิษจากเชื้อรา : ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : 88-89

เลขา มาโนช 2542. บทปฏิบัติการราในน้ำและดิน ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 156 หน้า

เลขา มาโนช จินตนา ชะนะ สายัณห์ สมฤทธิ์ผล และสุจิตรา โกศล 2540. สายพันธุ์เชื้อรา *Ascomycetes* และ *Deuteromycetes* จากดินและพืช การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 บทคัดย่อ หน้า 58

วารี สัจพันโรจน์ และอรวรรณ นวีภาพ 2540 . เชื้อราที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบและอาหารสัตว์ : การศึกษาเบื้องต้น : การประชุมทางวิชาการเรื่องสารพิษจากเชื้อรา : ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : 56-57

อรุณศรี วงษ์อุไร และวีรวัฒน์ นิลรัตนคุณ 2544. การเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และการสร้างสารพิษในไร่ข้าวโพด : จุลสารโรคพืชและจุลชีวิทยา ปีที่ 11 เล่มที่ 1 ม.ค.-เม.ย. หน้า 2-11

ภาษาอังกฤษ

Alexopoulus, C. J., Mims, C. W., Blackwell, M. 1966 . Introductory Mycotogy 4th ed. John Wiley & Sons, Inc. USA. 869 p.

Allen, N.K., Burmeister, H.R., Weaver, G.A. and Mirocha, C.J., 1981. Toxicity of dietary and intravenously administered moniliformin to broiler chicken. Poult. Sci. 60:1415-1417

Balachandran, C, and Ramakrishnan, R. 1987. An experimental study on the pathology of aflatoxicosis in broiler chicken. Indian Vet. J. 64:911-914

Barron, G. L., 1971. Method in Microbiology. Academic Press, Inc., New York. 250 p.

Benjamin, M.M. 1981. Liver function test. Outline of Veterinary Clinical Pathology 3rd edition. The Iowa State University Press. Ames, Iowas, USA. 233-254

Bermudez, A.J., Ledoux, D.R., and Rottinghaus, G.E. 1995. Effect of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducklings. Avian Dis. 39 : 879 - 886

Betina, V.1984. Mycotoxins. Production, isolation, separation and purification. Elsevier, Amsterdam. 156, 239

Booth, C., 1977a. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. Survey, England. 237 p.

Booth, C., 1977b. *Fusarium* : Laboratory Guide to the identification of the maior species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey England. 58 p.

Brown, T.P., Rottinghaus, G.E., and William, M.E.1992. Fumonisin mycotoxicosis in broiler : performance and pathology. Avian Dis. 36 : 450-454

Brintvhok, A., P., Kiatipattanasakul, W., and Doi, K. 1997. Acute toxicity of aflatoxin B1 in three species of domestic fowls. J. Toxicol. Pathol. 10:149-152

Burmeister, H.R., Ciegler, A., and Vesonder, R.F. 1979. Moniliformin, a metabolite of *Fusarium moniliforme* NRLL 6322 : purification and toxicity. App. Env. Micro. 37:11-13

Charmley, L. L., Rosenberg, A., and Trenholm, H. L. 1994. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods and feed stuffs. In ; Mycotoxins in grain, Ccompounds other than aflatoxin. J. D. Miller, Trenholm, H. L. (Eds) Eagan Press, Ma. USA, 471 p.

Chi, M. S., Robison, T. S., Miroche, C. J., Swanson, S. P. and Shimoda, W. 1978. Excretion and tissue distribution of radioactivity from tritium labeled T-2 toxin in chick. Tox. & Appl. Pharm. 45 : 391-402

Chen. J., Mirocha, C. J., Xic, W., Hogge, L., and Olsor. 1992. Production of the mycotoxin fumonisin B1 by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. Appl. Environ. Microbio. 58 : 3928-3931

Chu, Q., Wee, W, and Smalley, E. B. 1993. Decreased cell-mediated immunity and lack of skeletal problems in broiler chickens consuming diets amended with fusaric acid. Avian Dis. 37 : 863-867

Chu,Q., Weidong, W., Cook, M.E, and Smally, E. Induction of tibial dyschondroplasia and suppression of cell-mediated immunity in chicken by *Fusarium oxysporum* grown on sterile corn. Avian Dis. 39:100 -107

Chu,Q., Weidong, W., Cook, M.E. and Smally, E.B.1996. Elevated plasma glycosamonoglycans in chickens with tibial dyschondroplasia induced by a *Fusarium oxysporum* isolation. Avian Dis. 40:715-719

Cole,R.J., Kirksey, J.W., Cutler, H.G., Doupnik, B.L. and Peckham, J.C.1973. Toxin from *Fusarium moniliforme* : effect on plants and animals. Science 179:1324-1326

Deacon, J.W. (1977) Modern Mycology . 3rd ed. The Blackwell science, UK. 303 p.

Doerr, J. A., Huff, W. E., Tung, H. T., Wyatt, R. D., and Hamilton, P. B. 1974. A survey of T-2 toxin, ochratoxin and aflatoxin for their effects on the coagulation of blood in young broiler chickens. Poult. Sci. 53 : 1728-1734

Dvorska, Y.E. 2000. Effect of dimeric nephthoquinone aurofusarin produced by *Fusarium graminearum* on chicken meat quality. Proceeding on XXI World's Poultry Congress. Montriol, Canada. p 27.12

Ensminger, M. E. 1991. Animal Science (Animal Agriculture series) 9 ed. Interstate Publisher, Inc., USA. pp. 144

Espada, Y., Ruiz de Gopegur, P., Caudradas, C., and Cabanes, F. J. 1994. Fumonisin mycotoxin in broiler : weights and serum chemistry modification. Avian Dis. 38; 454-460

Espada, Y., Ruiz de Gopegur, P., Caudradas, C., and Cabanes, F. J. 1997. Fumonisin mycotoxin in broiler : plasma proteins and coagulation modification. Avian Dis. 41:73-79

Fudge, A.M., 2000. Avian liver and gastrointestinal testing. Laboratory medicine : avian and exotic pets. W.B. Sauders Company. pp. 47-55

Gams, W., Vander Aa, H. A., Vander Plaats-Niterink., Samson, R. A., and Stalpers, J. A. 1987. CBS course of mycology 3rd ed., Netherlands. pp.139

Gatheriole, P.S., Thiel, P.G. and Hofmeyr, J.H.S. 1986. Inhibition of pyruvate dehydrogenase conplex by moniliformin. Biochem. J. 233:719-723

Greenhalgh, R., Fielder, D. A., Morrison, L. A., Charland, J. S., Blackwell, B. A., Miller, J. D., Savard, M. E. and Apsimon, J. W. 1988. Apotrichothecenes-Minor metabolites of the *Fusarium spp.* species. The 7th international IUPAC symphosium on mycotoxins and phycotoxins, Tokyo, Japan, pp 223-232

Hayes, A. W. 1980. Mycotoxins : biological effects and their role in human disease. Clin. Toxicology. 17: 45-83

Henry, M.H., and Waytt, R.D. 1994. The toxicity of purified fumonisin B1 in broiler chicks. Poult. Sci. 73 :123-12

Hoerr, F. J., Carlton, W. W. and Yagen, B., 1981. Mycotoxicosis cause by a single dose of T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in broiler chickens. Vet. Pathol. 18 : 652-66

Hoerr, F. J., Carlton, W. W., Tuite, J., Vesonder, R. I., Rohwedder, W. K., and Szigeti G. 1982a. Experimental trichothecene mycotoxicosis produced in broiler chicken by *Fusarium sporotrichiella* var. *Sporotrichiodes*. Avian. Pathol. 11 : 385-105

Hoerr, F. J., Carlton, W. W., Yagen, B. and Joffe, A. Z. 1982b. Mycotoxicosis caused by either T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in the diet of broiler chickens. Fund. App. Toxicol. 2 : 121-124

Hoerr, F. J., Carlton, W. W., Yagen, B. and Joffe, A. Z. 1982c. Mycotoxicosis produced in broiler chickens by multiple doses of either T-2 toxin or diacetoxyscirpenol. Avian. Pathol. 11 : 369-383

Hoerr, F. J. 1997. Poisons and toxins : mycotoxicoses. Disease of Poultry 10th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp 951 – 952

Hollinger, K. and Ekperigin, H. E. 1999. Mycotoxicosis in food producing animals. Chemical food borne hazards and their control. 15 : 133

Hong, Z. and Jialun, L. 1988. Mechanism of toxicity of moniliformin. The proceeding of the Japanese Association of Mycotoxicology. Supplement 1. p 109-110

Hoog, G.S.D. and Guarr, J., (1995) Atlas of clinical fungi. Baarn and Delft, The Netherlands. pp 526

Huff, W. F., Doerr, J. A., Hamilton, P. B. and Vesonder, R F. 1981. Acute toxicity of vomitoxin (deoxynivalenol) in broiler chickens. Poult. Sci. 60 : 1412-1414

Huff, W.E., Harvey, R.B. and Kubena, L.F. 1988. Toxic synergism between aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. Poult. Sci. 67:1418-1423

Ionov, I.A., Shapovalov, S.O., Mikitjuk., D.N. and Kharchenko, L.P. 2000. The effect of mycotoxins in the feed on physiological biochemical process in laying hen. [CD-ROM] Proceeding on XXI World's Poultry Congress. Montriol, Canada, p 27.12

Javed, T., Bemett., G. A., Richard, J. L., Dombrink-kurtzman, M. A., Cote, L. M. and Buck, W. B. 1993. Mortality in brioler chickens on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or with purified fumonsis B1 and moniliformin. Mycopathologia 123 : 171-184

Joffe, A. Z. and Yagen, B. 1978. Intoxication produced by toxic fungi *Fusarium poae* and *F. sporotrichiodes* on chicks. Toxicon 161: 236-273

Jonden, F.T.W. 1996. Poultry disease 4th ed. W.B. Saunders. Ch.33 pp 258 – 259.

Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O., Steyn, P.S., Van Rensberg, S.J.and Steyn, M. 1977. Toxicity of a moniliformin – producing strain of *Fusarium moniliforme* var *subglutinans* isolated from maize. Food Cosmet.Toxicol. 15 : 579-587

Kubena, L. F., Harvey, R. B., Huff, W. E., Corrier, D. E., Phillips, T. D. and Rottinghous, G.E.1987. Effect of feeding deoxynivalenol (DON,Vomitoxin)-contaminated wheat to female white leghorn chickens from day old through egg production. Poult. Sci. 66:1612-1618

Kubena, L. F., Harvey, R. B., Huff, W. E., Corrier, D. E., Phillips T. D. and Rottinghous, G. E. 1989. Influence of ochratoxin A and T-2 toxin singly and in combination on broiler chicken. Poult. Sci. 68:867-872

Kubena, L. F., Harvey, R. B., Huff, W. E., Corrier, D. E., Phillips, T. D. and Rottinghous, G.E. 1990. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. Poult. Sci. 69 : 1078-1086

Kubena, L.F., Edrington, T.S.,Harvey, R.B.,Buckley, S.A.,Phillips, T.D., Rottinghaus, G.E. and Lombined.1997b. Effects of fumonisin B1 present in *Fusarium moniliforme* culture material and T-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. Poult. Sci. 76:1239-1247

Kubena, L.F., Harvey, Rb., Buckley, S.A., Edrigton, T.S. and Rottinghans, G.E. 1997c. Individual and combined effects of moniliformin present in *Fusarium Fujikuroi* culture mateerial and aflatoxin in broiler chicks. Poult. Sci. 76:265-270

Ledoux. D.R., Brown, T.P., Weibkins, T.S. and Rottimghaus, G.E. 1992. Fumonisin toxicity in broiler chicken. J. Vet. Diag. Invest. 4:330-335

Ledoux, D.R., Bermudez, A.J., Rottinghaus, G.E. and Broomhead, J. 1995. Effects of feeding *Fusarium fujikuroi* culture material, containing known levels of moniliformin, in young broiler chicks. Poult. Sci. 74:297-305

Leeson, S., Diaz, G. J. and Summersa, J. D. 1995 . Fumonisins : mechanisms of action of fumonisins. Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins. University Book. Guelph, Ontrio, Cannade. pp 351

Li,Y.C., Ledoux, D.R., Bermudez, A.J., Fritsche, K.L. and Rottinghaus, G.E. 1999. Effect of fumonisin B1 on selected immune response in broiler chicks. Poul. Sci. 78:1275-1282

Li,Y.C., Ledoux, D.R., Bermudez, A.J., Fritsche, K.L. and Rottinghaus, G.E. 2000. Effect of moniliformin on performance and immune function of broiler chicks. Poult. Sci. 79:26-32

Lopez T. A., Escande, A., Chayer, R., Dosanto, M., Gerpe, O. and Salomon, M. L. 1997. *Fusarium crookwellense*-produced zearalenone in maize stubble in the field. New Zealand Vet. J. 45: 254-253

Lacey, J. 1988. Prevention of mould growth and mycotoxin production through control of environmental factors. The 7th international IUPAC symposium on mycotoxin and phycotoxins, Tokyo, Japan. p 161-168

Mezes, M., Barta. M. and Nagy, G. 1998. Comparative investigation on the effect of T-2 mycotoxin on lipid peroxidation and antioxidant status in different poultry species. Res. Vet. Sci. 66 : 19-23

Mirocha, C. J. and Abbas, H. K. 1988. Chemistry, occurrence and toxicology of the hemorrhagic mycotoxin (wortmannin) produced by Fusarium. The 7th international IUPAC symposium on mycotoxin and phycotoxin. Tokyo, Japan. p 213-221

Mirocha, C. J. and Abbas, H. K. 1989. Chemistry, occurrence and toxicology of the haemorrhgic mycotoxin (wortmannin) produced by *Fusarium*. Mycotoxins and Phycotoxin. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. p 231-213

Moran, E. T., Hunter, J.B., Ferket., P., Youung, L. G. and Mc Girr, L. G. 1982. High tolerance of broiler to vomitoxin from corn infected with *Fusarium graminearum*. Poult. Sci. 61: 1828-1831

Nagaraj, R.Y., Wu, W., Will, J.A. and Vesonder, R.F. 1995. Acute cardiotoxicity of moniliformin in broiler chickens as measured by electrocardiography. Avian Dis. 40:223-227

Nelson P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O., 1983. Fusarium species : an illustratid manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. p 193

Nelson, P. E.1992.Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia 117 : 29-36

Norred, W.P. 1993. Fumonisins – mycotoxins produce by *Fusarium moliniforme*. J. Toxico. Environ. Health. 38:309-328

Oguba, S., Ledoux, D. R., Bermundez, A. J. and Rottinghaus, G. I. 1994. Effects of fusaric acid on brioler chicks and turkey poultry. Poult. Sci. 73 : Sup. 1 : 154

Pathra, S. V., Gleeson, W. B., Lee, Y. W. and Mirocha, C. J. 1986. The structure of fusarochromanone : new mycotoxin from *Fusarium Roseum* "Graminearum" Can. J. Chem. 64 : 1308-1311

Pearson, A. W. 1978. Biochemical changes produced by *Fusarium* T-2 toxin in the chicken. Res. Vet. Sci . 24 : 92-97

Pettit, R. E., and Taber, R. A. 1976. Introduction and historical perspectives in mycotoxicology research. Symposium on mycotoxicology food and feed contamination. Vol. 3 the 68th Annual Meeting of the American Phytopathological Society. Kansas City, Missouri. July 13, p 99

Pitt, J. I. and Hocking, A. D. 1985. Fungi and food spoilage. Academic press. p 21

Prathapkumar, S.H., Rao, V.S., Paramkishan, R.J. and Bhat, R.V. 1997. Disease outbreak in laying hens arising from the comsumption of fumonisin contaminated food. British. Poult. Sci. 38:475-479

Rabie, C. J., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Lubben, A. and Vleggaar, R. 1982. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa. Appl. Environ. Microbiol. 43 : 517-521

Raybaudi M., Rosa M., Martinez Y and Amaury J. 2000. Incidence and identification of mycobiota of corn grains and comparison of culture media for the determination of toxigenic molds Fitopatologia Venezolana. [Abstratc] 13(1) : p 15-18

Ross, P. F., Nelson, P. E., Richard, J. L., Osweiller, G. D., Rice, L.G., Plattner, R. D., and Wilson, T. M. 1990. Production of fumonisin by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 3224-3226

Ross, P.F., Rice, L.G., Isweiler, G. D., Nelson, P.E. and Richard, J.J. 1992. A review and update of Animal toxicoses associated with fumonisin contaminated feeds and production of fumonisin by *Fusarium* Isolates. Mycopathologia. 117:109-114

Sakhatsky,I.M. and Trufanova, V.O. 2000. Effect of *Fusarium* mycotoxins present in laying hens ration on immune system function in progeny chick. [CD-ROM] Proceeding on XXI World's Poultry Congress. Montriol, Canada. p 17.20

Scott, P. M. 1993. Fumonisins. Int. J. Food. Microbiol. 18 : 257-270

Schroeder, E.C., Nair,K.P.C and Caroeilhac, P.T. 1992. Response of broiler chicks to a single dose of aflatoxin. Poult. Sci. 51: 1552 - 1556

Smith. J. E.and Moss, M. O. 1985. Mycotoxins : Formation, analysis and significance. John Wiley & Sons. p 123

Smith, T. K., and Sousadias. G. 1993. Fusaric acid content of swine feedstuffs. J. Agric. Chem. 41 : 2296-2298

Snijders, C. H. A. 1988. The phytotoxic action of deoxynivalenol and zearalenone on wheat seedings. Mycotoxins and phycotoxin. Proceeding of the Japanese Association of Mycotoxicology Supplement no.1 . The Japan association of mycotoxicology. p 103

Speers, G. M., Mirocha, C. J. and Christensen, C. M. 1973. Effect of feeding *F. tricinctum* and *F. roseum* isolate "oxyrose" invaded corn and the purified T-2 mycotoxin on S. C. W. L. hens. Poult. Sci 52 : 2088 (Abstr.)

Speers, G. M., Mirocha, C. J., and Christensen, C. M. and Behrans, J. C. 1977. Effect on laying hens of feeding corn invaded by two species of *Fusarium* and pure T-2 mycotoxin. Poult. Sci 56 : 98-102

Seifert, K. 2000. Fusky-*Fusarium* Interactive Key. [internet] Electronic Production Product Development Unit. URL: http/sis. Agf.gc. calbrd/fusarium/page size 7582

Steyn, P.S., Vleggaar, R., Rabie, C. J., Kriel, N. P. J. and Harington, J. S. 1978. Trichothecene mycotoxin from *Fusarium sulphureum*. Phytochem. 17 : 949-951

Steyn, P.S., and Vleggaar, R. 1988. Recent advances on the chemistry of mycotoxin. The 7th international IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxin, Tokyo, Japan. p 185-192

Thiel, P. G. 1978. A molecular mechanism for the toxic action of moniliformin, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. Biochem. Pharmacol. 27:483-486

Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Sydenham, E. W., Shephard, G. S. and Gelderblom, W. C. A.1992. The implications of maturally occuring levels of fumonisin in corn for human and animals health. Mycopathologia 117 : 3-9

Thrane, U.L.F. and Lund, F. 1988. Influence of environmental conditions on production of secondary metabolitees by *Fusarium* species. Proceeding of the Japan Association of Mycotoxicology Supplement no.1. The Japan Association of Mycotoxicology. p 86

Thrane, U.L.F. 1988. Geographic distribution of toxigenic *Fusarium spp.* Proceeding of the Japan Association of Mycotoxicology Supplement no.1 The Japan Association of Mycotoxicology. p 227

Thrane, U. 1989. *Fusarium* species and their specific profiles of secondary metabolites.In: CHELKOWSKI, J (Ed) *Fusarium* Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity. Elsevier, Amsterdam. p 199-225

Trenholm, H. L., Thompson, B. K., Standish, J. F. and Seamen, W. L. 1985. Mycotoxins in feeds and feedstuffs. In : Mycotoxins : A Canadian Perspective. P. M. Scott, H. L Trenholm, M. D. Sutton (Eds). National Reserch Council of Canada, Ohawa, On, 22848 : 43

Ueno, Y., (Ed.) 1983. Trichothecenes. chemical, biological and toxicological aspests, Elsevier, Amsterdam, New York.

USDA .1990.Fumonisin. Mycotoxin : Summary of USDA Conference . Ames,Iowa. Sep.6-7 Vesonder, R.F. and Golinski, P. 1989. Metabolites of *Fusarium*. In : CHELKOWSKI, J. (Ed) *Fusarium*. Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity. Elsevier, Amsterdam. p:1-39

Walser, M.H., Alleus, W.K. and Mirocha, C.J.1980. Tibial dyschondroplasia induced by toxins of *Fusarium roseum*. Poult. Sci. 59: 1669-1670

Walser, M. M., Allen, N.K., Mirocha, C. J., Hanlon, G. F. and Newman, J. A. 1982. *Fusarium*-induced osteochondrosis (tibial dyschondroplasia) in chicken. Vet. Pathol. 19 : 544-550

Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T. and Merrill, A. H. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisin. J. Biol. Chem. 266 : 14486-14490

Weibking., T. S., Ledoux, D. R., Bermuder, A. J., Turk , J. R. and Rottinghaus, G. E. 1993. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1, on the young broiler chick. Poult. Sci. 72 : 456-466

Wu.W . Li.G. and Liu.T. 1995. The effect of fumonisin B1 on isolated chondrocytes and on bone formation. Poult. Sci. 74:1431-1436

Wyatt R. D., Hamilton, P. B. and Burmeister, H. R. 1973. The effect of T-2 toxin in broiler chickens. Poult. Sci. 52 : 1853-1859

ภาคผนวก

สารบัญ

ภาคผนวก **หน้า**

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อรา ---------- 110

ข. วิธีการตรวจหาสารพิษจากเชื้อราด้วย Elisa Test Kit (Veratox™) ---------- 112

ค. วิธีการตรวจหาเอ็นไซม์จากน้ำเหลือง

Aspatate aminotransferase (AST / SGOT) ---------- 115

Alanine aminotransferase (ALT / SGPT)

Alkaline Phosphatase ---------- 118

Gamma - Glutamyltransferase (γ-GT/GGT) ---------- 121

ง. การเตรียมเนื้อเยื่อและสีย้อม ---------- 124

จ. วิธีคำนวนสูตรอาหารสัตว์ โดย Pearson square method ---------- 127

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อรา

PNCB (peptachloronitrobenzene) - peptone agar medium (Nash and Snyder,1962)

Peptone	7.50	gm.
$MgSo_4.7H_2O$	0.025	gm.
KH_2PO_4	0.50	gm.
Agar	6.00	gm.
Distilled water	500.00	ml.

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน flask แล้ววางใน water bath (90-95°C) เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หรือสังเกตสารละลายใสเข้ากันดี จึงเติม PCNB 0.5 กรัม ลงในสารละลายที่ยังร้อน เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไป autoclave (PCNB มีคุณสมบัติเป็น antimicrobial agent)

เมื่อสารละลายอุ่นเติม Neomycin 5 ml. (จาก 1 gm./100 ml. Stock solution) จากนั้นเท อาหารที่มีส่วนประกอบของสารเหล่านี้ลงในจานเลี้ยงเชื้อ (อาหาร 20 ml. ต่อจาน) ทิ้งให้เย็น ควรเตรียมอาหารใส่ plate ไว้ล่วงหน้าประมาณ 3-4 วัน เพื่อให้ผิวหน้าวุ้นแห้ง

0.1% water agar

Agar	1.00	gm.
Distilled water	1,000.00	ml.

Potato dextrose agar

Potato	200	gm.
Dextrose	20	gm.
Agar	20	gm.
Water	1	lit.

ละลาย agar ด้วยความร้อนจนละลายหมด แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที แล้วจึงเท อาหารนี้ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้เย็นก่อนนำไปใช้

Potato sucrose agar (Booth, 1977)

Potato extract	500	gm.
Sucrose	20	gm.
Agar	20	gm.
Water	500	ml.

เตรียม Potato extract จากมันฝรั่งที่ปอกเปลือกหลัง 1,800 กรัม ต้มในน้ำ 4,500 มล. เป็นเวลา 10 นาทีกรองเอาแต่น้ำ ทำการนึ่งฆ่าเชื้อและเก็บไว้ในตู้เย็นสำหรับใช้ต่อไป

Cornmeal agar (เลขา, 2542)

ข้าวโพดป่น	60	gm.
Agar	15	gm.
Distilled water	1,000	ml.

ละลาย agar ใน Distilled water แล้วนำข้าวโพดป่นใส่ลงไป นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ121°C นาน 15 นาที แล้วเท plate

Corn leaf agar (Modified from carnation leaf agar : Nelson และคณะ, 1983)

เตรียมโดยวางใบข้าวโพด ขนาด 5 ตารางมิลลิเมตรหลาย ๆ ใบ ที่ได้ทำการฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เท water agar 1.5-2.0% และทำให้เย็นลงที่ 45°C เตรียมไว้ก่อนแล้วจากนั้นจึงอบไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน เพื่อตรวจดูเชื้อที่อาจปนเปื้อนมากับชิ้นใบพืชก่อนนำไปใช้

Corn seed agar

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar แล้ววางเมล็ดข้าวโพดที่อบฆ่าเชื้อ (ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ กดให้เมล็ดข้าวโพดจมลงในเนื้อวุ้น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-4 วัน เพื่อตรวจดูเชื้อที่อาจปนเปื้อนมากับเมล็ดข้าวโพดก่อนนำไปใช้งาน

ภาคผนวก ข

วิธีการตรวจหาสารพิษจากเชื้อราด้วย Elisa Test Kit (Veratox™)

หลักการของชุดการทดสอบ Veratox™

ELISA เป็นวิธีการทดสอบเพื่อตรวจหา หรือวัดระดับ antigen หรือ antibody ในรูปของเหลว โดยการจับตัวกับ specific antibody หรือ specific antigen ที่เคลือบผิว solid phase แล้วจึงใช้ specific antibody ที่ conjugate กับ enzyme ไปจับตัวอีกชั้นหนึ่ง การแสดงผลการทดสอบ นั้นจะขึ้นอยู่กับความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจากการย่อย substrate ที่เหมาะสมกันของ enzyme ELISA มีด้วยกันหลายหลักการ ซึ่งในชุดทดสอบของ Veratox ใช้วิธี Competitive Method โดย antibody จะ coat อยู่ที่ก้น well เมื่อใส่ตัวอย่างพร้อมกับ conjugate ใน antibody cost well free toxin ในตัวอย่างจะจับตัวกับ specific antibody ที่ก้น well ได้ดีกว่า conjugate ทำให้ตัวอย่างที่มี antigen ที่เฉพาะจะจับตัวกับ antibody ที่ coat อยู่ก้น well เมื่อใส่ enzyme substrate ลงใน well ถ้ามีสีฟ้าเกิดขึ้นแสดงว่าตัวอย่างค่อนข้าง negative

รายชื่ออุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. Cylinder ปริมาตร 1000 ml	1 อัน
2. Cylinder ปริมาตร 500 ml	1 อัน
3. Cylinder ปริมาตร 250 ml	1 อัน
4. บีกเกอร์ ปริมาตร 2000 ml	2 อัน
5. Erlenmayer flask ปริมาตร 500	1 อัน/ 1 ตัวอย่าง
6. Test tube ขนาด 20 x 150 mm. มีฝาปิด	1 หลอด/ 1 ตัวอย่าง
7. Test tube ขนาด 12 x 120 mm. มีฝาปิด (fumonisin)	1 หลอด/ 1 ตัวอย่าง
8. Test tube rack ขนาด 20 mm.	1 อัน
9. Test tube rack ขนาด 12 mm.	1 อัน
10. กรวย เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 cm.	1 อัน/ 1 ตัวอย่าง
11. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1	1 แผ่น/ 1 ตัวอย่าง

12. จุกยางปิด Erlenmayer flask	1 อัน/ 1 ตัวอย่าง
13. Single reagent basin ปริมาตร 20-100 ml	3 อัน/ 1 test kit
14. Multichannel pipette 12 Chanel ปริมาตร 20-100 µl	1 อัน
15. Microwell holder	1 อัน
16. Pipette tips ปริมาตร 100 µl	96 อัน/ 1 test
17. เครื่องชั่ง	1 เครื่อง
18. เครื่องบด	1 เครื่อง
19. Computer	1 เครื่อง
20. Microplate reader	1 เครื่อง
21. Printer	1 เครื่อง
22. นาฬิกาจับเวลา 60 นาที	2 เครื่อง
23. Miniwasher	1 ชุด

รายการสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1 Methyl alcohol 70 % (ACS Grade)	250 ml/ตัวอย่าง
2. Deionized water	500 ml
3. Mycotoxin test kit	

ส่วนประกอบของชุดการทดสอบ Veratox

1 Antibody coat well strip	48 well
2. Red Marked Mixing Well Strips	48 well
3. Control	1.5 ml/1 Bottle
4. HRP Conjugate Solution	7 ml
5. TMB Substrate	24 ml
(Substrate Solution Capped Tubes)	
6. Red Stopping Solution	32 ml

การอ่านค่าด้วย Microplate Reader โดยใช้โปรแกรม x Chek

1. เปิดเครื่อง Computer , printer
2. เข้า Program X Chek ดังนี้

เข้า File Templates	เลือก Assay ของ Toxin
เข้า Edit Template	แก้ไขจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์
	OK และ Done

3. เปิดเครื่อง Microplate Reader ควรเปิดก่อนที่ทำการอ่านค่าประมาณ 5 นาที
4. เช็ดก้น Micro well ให้สะอาดและแห้งแล้วนำไปใส่ใน Plate holder ของเครื่อง Microplate Reader
5. เข้า File Read เลือก Assay AE

Choose template	เลือกตาม Assay ของ toxin
	OK
	Print

ข้อมูลที่อ่านค่าได้จะถูกพิมพ์ออกมาในแผ่นกระดาษที่เตรียมไว้ แล้วนำไปแปรผลในโปรแกรม Veratox ออก จาก Program X Chek โดยการเลือกคำสั่ง Close

การแปรข้อมูลด้วยโปรแกรม Neogen

ลำดับที่	หน้าจอ	แป้นพิมพ์	
1	MAIN MENU	เลื่อนลูกศรไปที่ A	Enter
2	Please enter the number of control(4 or 5)	4 หรือ 5	Enter
3	Enter standard unit (ppb or ppm)	ppb หรือ ppm	Enter
	Standard 1 Concentration	ค่า control ที่ 1	
	Standard 2 Concentration	ค่า control ที่ 2	
	Standard 3 Concentration	ค่า control ที่ 3	
	Standard 4 Concentration	ค่า control ที่ 4	
4		F1	
5	READY TO CALCULATE DATA PREESS(R) FOR READY OR (M) FOR MANUAL	M	Enter
6	บันทึกผลลงตารางที่ปรากฏบนหน้าจอ		Enter
7		F1 (เพื่อ save ข้อมูล)	
8	ชื่อ File AF = Aflatoxin ชื่อ File T2 = T2 toxin ชื่อ File OC = Ochratoxin ชื่อ File FU = Fumonisin	.....-...../..... File-ครั้งที่บันทึกผล/ปีที่บันทึกผล	
9		F2 (เพื่อ print ข้อมูล)	

ภาคผนวก ค

วิธีการตรวจหาเอ็นไซม์จากน้ำเหลือง

Aspatate aminotransferase (AST / SGOT)

Alanine aminotransferase (ALT / SGPT)

PRINCIPLE

SGOT: enzyme AST จะเป็นตัว catalyze ปฏิกิริยา transmination ของ aspartate กับ ∝-ketoglutarate ให้ glutamate และ oxalacetate. dinitrophenylhydrazine จะ form hydrazones กับ ketoacids ที่มีอยู่

PRINCIPLE

SGPT: enzyme ALT. จะเป็นตัว Catalyze Trans-aminase reaction ของ alanine และ ∝-ketoglutarate ให้ pyruvate และ glutamate ซึ่งจะให้สีกับ dinitrophenyl-hydrazine ในสารละลายด่าง

REAGENTS

for SGOT 100 tests:

1. SGOT substrate 100 ml.
2. phenylhydrazine 100 ml.
3. NaOH 0.4N 1,000 ml.
4. pyruvate standard 5 ml.

REAGENTS

for SGPT 100 tests:

1. SGPT Substrate 100 ml.
2. phenylhydrazine 100 ml.
3. NaOH 0.4N 1,000 ml.
4. pyruvate standard 5 ml.

STABILITY OF SAMPLE

SGOT & SGPT stable อย่างน้อย 1 อาทิตย์ที่ 4 °C., stability ที่อุณหภูมิห้องค่อนข้างต่ำ serum ควรเก็บเข้า ตู้เย็นถ้ายังไม่ตรวจในทันที

PROCEDURE

for SGOT;

อ่าน OD. ที่ 520 nm, water blank set "O"

	Test (ml.)
SGOT SUBSTRATE	1.0
อุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที	
SERUM	0.2
ผสม, incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 60 นาทีพอดี	
PHENYLHYDRAZINE	1.0
ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 20 นาทีพอดี	
0.4N NaOH	10

ผสม, ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที อ่าน OD. ที่ 520 nm.

ใช้ water blank set "O"สีจะ stable 30 นาที หลังจากเติมด่าง

for SGPT;

อ่าน OD. ที่ 520 nm, water blank set "O"

	Test (ml.)
SGPT SUBSTRATE	1.0
อุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที	
SERUM	0.2
ผสม, incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาทีพอดี	
PHENYLHYDRAZINE	1.0
ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 20 นาทีพอดี	
0.4N NaOH	10

ผสม, ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที อ่าน OD. ที่ 520 nm.

ใช้ water blank set "O" สีจะ stable 30 นาที หลังจากเติมด่าง

หมายเหตุ : SGOT ถ้าต้องการให้เวลาที่ใช้ในการตรวจเท่ากับ SGPT ให้ลดปริมาณของ substrate, phenylhydrazine **จาก 1.0 ml. มาเป็น** 0.5 **ml.** 0.4N NaOH จาก 10 ml. มาเป็น 5 ml. จะเปลี่ยนเวลา incubate ที่ 37 ^{o}C หลังจากเติม serum **แล้วจาก 60 นาที เป็น** 30 **นาที** นอกนั้นคงเติมเหมือนปฏิกิริยาที่ใช้เวลา incubate 60 นาที

CALIBRATION CURVE : WATER BLANK SET "O"

ทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ standard PYRUVATE และ substrate ดังตารางต่อไปนี้

				SGOT ACTIVITY	SGPT ACTIVITY
Tube no.	ml. pyruvate	ml. substrate	ml. H_2O	SF units/ml.	SF units/ml.
1	0	1.0	0.2	0	0
2	0.1	0.9	0.2	20	25
3	0.2	0.8	0.2	55	50
4	0.3	0.7	0.2	95	83
5	0.4	0.6	0.2	148	126
6	0.5	0.5	0.2	215	-

เติม dinitrophenylhydrazine 1 ml ลงในทุก tubes, ผสมและตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 0.4N NaOH 10 ml ลงในทุก tubes ผสม ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที อ่าน OD ที่ 520 nm plot curve ระหว่าง SGOT unit หรือ SGPT unit กับ OD ของแต่ละค่า ลากเส้นต่อแต่ละจุดจะได้ calibration curve ของ SGOT หรือ SGPT เป็นเส้นโค้ง

หมายเหตุ

- Calibration curve นี้ใช้ได้ทั้ง SGOT ที่ใช้เวลา incubate 60 หรือ 30 นาที
- ใช้ SGOT substrate สำหรับ calibration curve ของ SGOT
  SGPT substrate สำหรับ calibration curve ของ SGPT

NORMAL VALUE

ค่าปกติ SGOT 8-40 units (u/ml) ค่าปกติ SGPT 5-30 units (u/ml)

SOURCES OF ERRORS

Hemolyzed serum จะทำให้ค่าที่ได้สูงกว่าความเป็นจริง เนื่องจากในเม็ดเลือดแดงมี SGOT เป็น 15 เท่าของที่ มีใน serum และมี SGPT เป็น 7 เท่าของที่มีใน serum

Lipemic serum จะทำให้ค่าที่ได้ผิดไปเนื่องจากความขุ่น

serum ควรแยกออกภายใน 2 ชั่วโมงนับจากเจาะเลือดมาและเก็บเข้าตู้เย็นถ้ายังไม่ตรวจทันที พยายามให้ทุก tubes มีช่วงเวลาที่จะทำปฏิกริยาเท่ากันและควรเท่ากันทุกครั้งด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง SGOT ที่ใช้เวลา incubate 30 นาที มีโอกาสผิดพลาดเนื่องจากเหตุนี้มากที่สุด

COMMENT

serum ที่ขุ่นมากควรทำ serum blank โดยทำเช่นเดียวกับ tests แต่ใส่ serum หลังจากเติม phenylhydrazine เรียบร้อยแล้วและใช้ serum blank set "O" แทน reagent blank

serum ที่มี aldehydes, ketones และ ketoacids สูงจะทำให้ค่าสูงกว่าความเป็นจริง ซึ่งแก้ไขได้โดยการทำ serum blank

sample ที่มีค่า SGOT และ SGPT สูงกว่าค่าที่มีใน standard curve ให้ dilute serum ด้วยน้ำกลั่น แล้วคูณค่าที่ได้จาก curve ด้วย dilution factor เช่น dilute serum เป็น 1:5 (serum 1 : water 4) ก็คูณค่าที่อ่านได้จาก curve ด้วย 5, ถ้า dilute serum เป็น 1:10 (serumv1 : water 9) ก็คูณค่าที่อ่านได้จาก curve ด้วย 10

REFFERENCES

1. KERMEN,A.,WROBLEWSKI,F.AND J.S.LADUE.1953.CLIN.INVEST.34. 126
2. LADUE,J.S., WROBLEWSKI, F. AND KARMEN. 1954. SCIENCE 120, 497
3. STEINBERG, D., BALDWIN, D.AND B.H.OSTROW.1956.LAB.CLIN. MED. 48, 144
4. STEINBERG, D. AND B.H.OSTROW. 1955. PROC. SAC. EXP. BIOL. MED. 89, 31
5. SOBELC., BERKMAN,S. AND N.SWABB.1956. AM.J.CLIN.PATHO. 26, 1477
6. NORBERT. W.1970 .FUNDAMENTLS OF CLINICAL CHEMISTRY. LONDON.446

Alkaline Phosphatase

Principle and intended use

ปฏิกริยาที่ใช้ในการหา alkaline phosphatase (ALP) คือ

$$\text{4-nitrophenylphonplats + DEA} \xrightarrow{\text{ALP}} \text{DEA - phosphate + 4-nitrophenol}$$

4-nitrophenol จะ absorb แสงที่ 405 nm. absorbance ที่สูงขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ enzyme activity ที่เพิ่มขึ้น alkaline phosphatase (ALP) พบได้ในเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดในร่างกาย Serum ALP ใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์เรื่อง hepatobiliary disorder หรือ โรคเกี่ยวกับกระดูก ค่าอ้างอิง (reference value) จะเปลี่ยนแปลงเมื่อ มีการเจริญของกระดูก จะมีค่าสูงในเด็กและในการตั้งครรภ์ในระยะที่สาม

Reagents

Reagent 1.

Diethanolamine	1.0	mol/L
Magnesium chloride	0.5	mmol/L
pH 9.8		

Reagent 2. (หลังจากละลายแล้ว)

4-nitrophenylphosphate	12	mmol/L

ข้อควรระวัง

ใช้สำหรับวิเคราะห์แบบ in vitro เท่านั้น

ทำการวิเคราะห์ด้วย good laboratory procedure ระวังอย่าให้สารเคมีเข้าตา สัมผัสผิวหนังหรือกลืนกิน

การเก็บรักษาและการเสื่อมของ Reagent

ให้เก็บ reagent ที่ 2-8 $^{\circ}$C ห้ามแช่เข็ง สามารถใช้ reagent นี้จนถึงวันหมดอายุที่ระบุไว้บนขวดได้ ถ้า reagent ขุ่น หรือ blank absorbance (of the working reagent) สูงกว่า 1.00 ที่ 405 nm. ให้งดใช้ reagent นั้น

ตัวอย่างที่ใช้ตรวจ

serum ที่เก็บใหม่ ๆ หรือ heparinized plasma

ALP activity จะคงที่ใน serum ได้นาน 7 วันที่ 2-8 °C

วิธีการเตรียม Reagent

Code 6013 - 10 x 20 ml.

ละลาย reagent 2 1 เม็ดในน้ำยา reagent 1 20 ml.

Code 6040 - 5 x 100 ml.

ละลาย reagent 2 1 หลอดในน้ำยา reagent 1 1 ขวด (note 1) สารละลายนี้เก็บไว้ใช้ได้นาน 2 เดือน ที่ 2-8 °C

วิธีดำเนินการ

น้ำยานี้ใช้ได้ทั้งกับ automated procedure ด้วย chemistry analyzers หรือ manual procedure ด้วย photometer ที่เหมาะสม สำหรับ automated procedure ต้องการอุปกรณ์ที่มีสภาวะ ดังนี้คือ ใช้ wavelenght 405 nm. Light Path 1 cm. temperature 25 °C, 30°C หรือ 37 °C sample fraction volume 1/51

1. นำ working regent และ photometer มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง
2. ผสม working reagent 1.0 ml. เข้ากับตัวอย่าง 20 µl ใน cuvette แล้วเอา cuvetteใส่ลงใน photometer
3. อ่าน initial absorbance อ่านซ้ำเมื่อเวลาผ่านไป 1, 2 และ 3 นาที

การคำนวณค่า

1. คำนวณหาความแตกต่างของ absorbances ที่ติดกัน และค่าเฉลี่ยของผลต่างของ absorbance ต่อนาที (Δ A/min)
2. คำนวณหา catality c concentration โดยใช้สูตรคำนวณต่อไปนี้ (กำหนดให้ Molar absorbance of 4-4-nitrophenol ที่ 405 เท่ากับ 18450) :

   ΔA/min X 2764 = U/L

   ΔA/min X 46.08 = µkat/L

Reference Values

ระดับ ALP ขึ้นอยู่กับอายุของเจ้าของตัวอย่าง และช่วงเวลาที่มีการเจริญเติบโตของกระดูกใน adult

Temperature	μ kat/L	U/L
25 °C	0.92 - 2.90	55 - 175
30 °C	1.08 - 3.50	65 - 210
37 °C	1.50 - 4.67	90 - 280

Procedural Limitations

- anticoagulants (EDTA, citrate, fluoride หรือ oxalate sodium) จะยับยั้ง ALP activity
- ไม่ควรใช้ตัวอย่างที่ haemolized เม็ดเลือดแดงจะมี ALP ที่จะทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาด
- Temperation correction : to converse result (ในซีรั่มของมนุษย์) ใช้ factor ต่อไปนี้

  $30^{\circ}C / 25^{\circ}C = 1.22$ $37^{\circ}C / 30^{\circ}C = 1.39$

- ผลการวิเคราะห์จะเป็น linear จนถึงเมื่อ Δ A/min = 0.250 (690 U/L)
- วิธีการวิเคราะห์นี้พัฒนาขึ้นมาด้วยการแนะนำจาก German Society for Clinical Chemistry and Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Chancel Physiology

Quality Control

แนะนำให้ใช้ assay control serum level I (Code 6062 และ 6064) และ level II (code 6063 และ 6065) ในการดำเนินการวิเคราะห์แต่ละครั้งเพื่อ verified วิธีการทดสอบ ถ้าผลการทดสอบไม่ได้ค่าอยู่ในช่วงที่ควร เป็นจะชี้บ่งถึง Reagent deterioration เครื่องมือชำรุดหรือมีข้อบกพร่องในขบวนการทดสอบ

Note

IFCC แนะนำให้ใช้ปริมาณ Reagent ต่อไปนี้ในการทดสอบที่ 30 °C

- code 6013 : ละลาย reagent 2 1 เม็ด ใน 15 ml. ของ reagent 1
- code 6040 : ละลาย reagent 2 1 หลอด ใน 75 ml. ของ reagent 1

Reference

IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. 1983. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21:731-748

Gamma - Glutamyltransferase (γ-GT/GGT)

Principle and intended use

ปฏิกิริยาที่ใช้ในการทดสอบ GGT มีดังต่อไปนี้

γ -glutamyl-3-carboxul-4- nitroanilide+ glycylglycine $\xrightarrow{GGT}$

γ -glutamyl- glycylglycine+3-carboxy-4-nitroaniline

γ - GT จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนของ γ - glutamyl group จาก γ -glutamyl-3- carboxy-4-nitroanilide ไปเป็น glicylgluycine อัตราการปล่อย 3-carboxy-4-nitroaniline ออกมาจะแปรผันตาม γ - GT acticity ในตัวอย่าง และวัดได้จากการที่ absorbance เพิ่มขึ้นเมื่อวัดที่ 405 nm

γ - glutamiltransferase เป็นส่วนหนึ่งของ peptidases มันมีต้นกำเนิดในตับและไต การที่ γ - GT ในน้ำเหลืองเพิ่ม จะสัมพันธ์โดยตรงกับ hepatobiliary และ pancratic disease อัลกอฮอล์และยาบางประเภทจะชักนำให้ตับสังเคราะห์ γ -glutamyltransferase

Reagents

Reagents 1

glycylglycine 165 mmol/lit

pH 7.9

Reagents 2 หลังจากละลายแล้วจะได้

γ - Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide 6.6 mmol/lit

วิธีการเก็บรักษาและการเสื่อมของน้ำยา

เก็บ reagent ที่ 2-8 °C ห้ามแช่แข็ง reagent สามารถใช้ได้จนถึงตามวันหมดอายุที่เขียนไว้ข้างขวด ต้องทิ้ง reagent นี้ไปถ้าขุ่น หรือ blank absorbance (ของ working reagent) มีค่ามากกว่า 0.900 ที่ 405 nm

ตัวอย่าง

เก็บ serum ใหม่ ๆ γ -Glutamyltransferase activity จะ stableในตัวอย่างน้ำเหลืองได้นาน 5 วันที่ 2-8 °C

การเตรียม Reagents

เตรียม working reagent ดังนี้

Code 6018 - 10 x 15 ml. ให้ละลาย reagent 2 ด้วย reagent 1 แล้วผสมให้เข้ากัน

Code 6019 - 4 x 50 ml. ให้ละลาย reagent 2 2 หลอดด้วย reagent 1 ทั้งหมดผสมให้เข้ากัน น้ำยานี้เก็บได้นาน 2 เดือนที่ 2-8 °C

วิธีดำเนินการ

Reagent นี้ใช้ได้ทั้งกับวิธีอัตโนมัติด้วย chemistry analyser หรือ ทำด้วยมือโดยใช้ photometer ที่เหมาะสม

Reaction conditions

Wavelenght	405 หรือ 410 nm
Light path	1 cm
Temperature	25 °C, 30 °C หรือ 37 °C
Sample fraction volume	1/11

1. ต้องใช้ working reagent และ photometer มีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้องก่อนเริ่มงาน
2. แจก working reagent จำนวน 1 ml. ลงใน curettes แล้วเติมตัวอย่าง 100 µl
3. ผสมให้เข้ากัน เสียบ cuvette เข้าใน photometer
4. อ่านค่า absorbance ของตัวอย่างทันที อ่านซ้ำเมื่อเวลาผ่านไป 1, 2 และ 3 นาที

การคำนวณ

1. คำนวณค่า mean absorbance ที่เปลี่ยนไปใน 1 นาที (Δ A/min)
2. คำนวณ catalytic concentration โดยใช้สูตรต่อไปนี้ (Note 1)

   410 nm ΔA/min x 1391 = U/L

   405 nm ΔA/min x 1111 = U/L

ถ้าต้องการค่าเป็น S.I. Units (nkat/L) ให้คูณด้วย 16.67

Procedural limitation

1. Temperature correction ใช้ conversion factors นี้

   30 °C/25 °C = 1.38

   37 °C/30 °C = 1.30

2. การตรวจสอบนี้จะได้ค่าเป็น linear จนถึงเมื่อ ΔA/min = 0.215 ที่ 410 nm หรือ 0.270 ที่ 405 nm
3. Reagent concentration ใช้ตามคำแนะนำจาก International Federation of Clinical Chemistry

Quality Control

ควรใช้ assayed control serum level I (code 6062 และ 6064) และ control serum level II (Code 6063 และ 6065) ในตัวอย่างแต่ละชุด เพื่อ verify ประสิทธิภาพของวิธีการ การที่ได้ค่าผิดพลาดจาก control material อาจเกิดจากการเสื่อมของ reagent อุปกรณ์ชำรุด หรือวิธีการบกพร่อง

Note 1 สูตรจะ deduce ค่า molar absorbance ของ 3-carboxi-nitro aniline ที่ 410 คือ 7908 และ 405 คือ 9900

Reference

IFCC method for the measurement of catalytic concentration of enzymes.1983. J. Clin Chem Clin Biochem. 2:633-646

ภาคผนวก ง

การเตรียมเนื้อเยื่อและสีย้อม

Harris hematoxylin

(Regressive stain)

Harris's hematoxylin		
Hematoxylin crystals	5.0	gm.
Alcohol, 100%	50.0	ml.
Ammonium or potassium alum	100.0	gm.
Distilled water	1000.0	ml.
Mercuric oxide (red)	2.5	gm.

ละลาย hematoxylin ใน alcohol ละลาย alum ในน้ำใช้ความร้อนด้วย และเอาสารละลาย 2 ตัวนี้มาผสมกัน นำไปต้มให้เดือดโดยเร็วที่สุดเท่าที่จะเร็วได้ (ให้เวลาแค่น้อยกว่า 1 นาที และคนด้วย) เอาออกจากความร้อนและเติม mercuric oxide อย่างช้า ๆ เอาไปต้มอีกให้เดือดน้อย ๆ จนกระทั่งสารละลายหมด ทิ้งให้เย็นลงนำไปใช้ได้ทันทีที่เย็น ให้เติม glacial acetic acid 2-4 ml. ต่อสีย้อม 100 ml. เพื่อให้ย้อมสี nuclei ได้ดีขึ้นให้กรองสีก่อนใช้

Acid alcohol

Alcohol, 70%	1000.0	ml.
Hydrochloric acid, concentrated	10.0	ml.

Ammonia water

Tap water	1000.0	ml.
Ammonium hydroxide 28%	2.3	ml.

Saturated Lithium Carbonate

Lithium carbonate	1.0	gm.
Distilled water	100.0	ml.

Counterstains for hematoxylin (Eosin)

1% Stock alcohol Eosin

Eosin.Y,water soluble	1.0 gm.
Distilled water	20.0 ml.
ละลายให้เข้ากันแล้วเติม	
Alcohol, 95%	80.0 ml.

Working Eosin Solution

Eosin Stock Solution	1.0 part
Alcohol. 80%	3.0 part

ก่อนใช้ให้เติม glacial acetic acid 0.5 ml. ต่อสีย้อม 100 ml. แล้วคนให้เข้ากัน

วิธีการย้อมสีชิ้นเนื้อ

1. ดึง paraffin ออกจาก block ชิ้นเนื้อ และแช่น้ำให้น้ำซึมเข้าในชิ้นเนื้อ
2. แช่ใน Harris's hematoxylin นาน 15 นาที
3. ล้างด้วยน้ำประปา
4. แช่ผ่านใน acid alcohol อย่างเร็ว ๆ 3-10 clip ดูลักษณะสีที่ย้อมด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะเห็น nuclei ชัดมาก และ background จะใสมากหรือไม่มีสี
5. ล้างประปาอีกครั้ง
6. แช่ใน ammonia water หรือ lithium carbonate water จนกระทั่งเห็น nuclei ติดสีน้ำเงินสด (3-5 clip)
7. ล้างในประปาที่ไหลนาน 10-20 นาที ถ้าล้างประปาไม่สะอาดพอจะติดสี Eosin ไม่ดีนัก
8. ย้อมด้วย Eosin นาน 15-20 วินาที ขึ้นกับอายุของสีที่ใช้ ให้ยก Rack จุ่มขึ้นลงหลาย ๆ ครั้งก่อนแช่ลงในสี
9. Dehydrate ใน 95% และ absolute alcohol จนกระทั่งสี Eosin ส่วนเกินถูกล้างออกหมด โดยล้างอย่างน้อย 2 ครั้งเป็นอย่างน้อย ให้ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

10. ให้แช่ใน absolute alcohol อีก 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

11. แช่ใน Xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที

12. ปิด coverglass ด้วย permount หรือ Histoclad หรือ canada balsom

ผลการย้อม

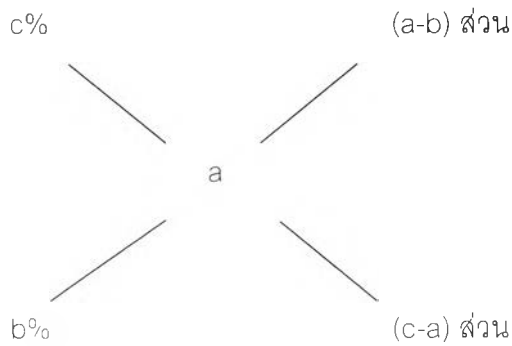
nuclei	:-	ติดสีน้ำเงิน
cytoplasm	:-	ติดสีชมพู

ภาคผนวก จ

วิธีการคำนวณสูตรอาหารสัตว์โดย
Pearson square method (Ensimager, 1991)

หลักการที่ใช้ในการคำนวณสัดส่วนของวัตถุดิบอาหารสัตว์

โภชนะที่ต้องการมีในอาหารสัตว์ a% โภชนะของวัตถุดิบที่ใช้ b% โภชนะหัวอาหารเข้มข้น c%

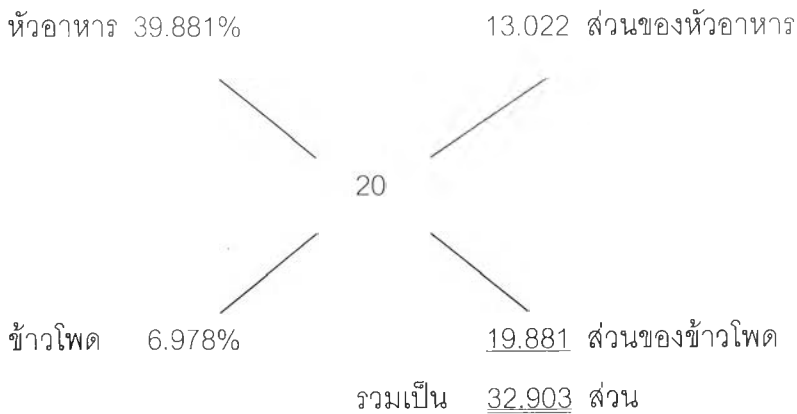


ในสูตรอาหารที่ต้องการโภชนะ a%

จะต้องใช้หัวอาหารเข้มข้น (a-b) ส่วน ผสมกับวัตถุดิบอาหารสัตว์ (c-a) ส่วน

ตัวอย่างการคำนวณสูตรอาหารที่มีโภชนะ 20% **โปรตีน โดยหัวอาหารมีโปรตีน** 39-88%

1. **เมื่อใช้ข้าวโพดที่มีโปรตีน** 6.978%



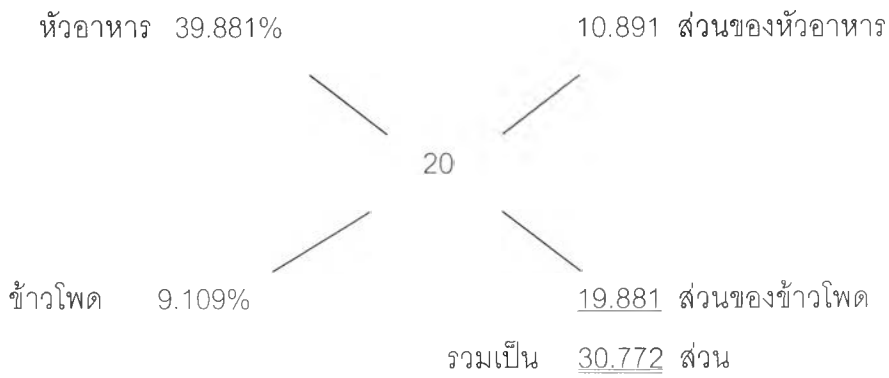
อาหาร 32.903 ส่วน ใช้ข้าวโพด 19.881 ส่วน อาหาร 32.90 ส่วน ใช้หัวอาหาร 13.02 ส่วน

อาหาร 100 ส่วน ใช้ข้าวโพด 60.423 ส่วน อาหาร 10 ส่วน ใช้หัวอาหาร 39.576 ส่วน

ฉะนั้น ถ้าต้องการอาหารที่มีโปรตีน 20% จำนวน 100 กก.

จะต้องใช้ข้าวโพด 60.5 กก. ผสมกับหัวอาหาร 39.5 กก.

2. **เมื่อใช้ข้าวโพดที่มีโปรตีน** 9.109%



อาหาร 30.772 กก. ใช้ข้าวโพด 19.881 กก. อาหาร 30.772 กก. ใช้หัวอาหาร 10.891 กก.

อาหาร 100 กก. ใช้ข้าวโพด 64.607 กก. อาหาร 100 กก. ใช้หัวอาหาร 35.392 กก.

ถ้าต้องการอาหารที่มีโปรตีน 20% จำนวน 100 กก.

จะต้องใช้ข้าวโพด 64.6 กก. ผสมกับหัวอาหาร 35.4 กก.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

น.ส.บังอร จินะณรงค์ เกิดเมื่อวันที่ 15 สิงหาคม พ.ศ. 2498 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2521 เข้าทำงานในตำแหน่ง คลินิเซี่ยน โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521 – 2522

ได้ทำงานในตำแหน่งสัตวแพทย์ประจำฟาร์ม บริษัท แหลมทองฟาร์ม จำกัด เครือบริษัท แหลมทองสหการ จำกัด ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2522 ลาออกเมื่อปี พ.ศ. 2539 ตำแหน่งสุดท้าย คือ ผู้ช่วยกรรมการผู้จัดการ บริษัท แหลมทองฟาร์ม จำกัด และเข้าทำงานในบริษัท โกลเด้น โพลทรี ฟาร์ม จำกัด ในตำแหน่ง ผู้ช่วยผู้อำนวยการ ฝ่ายบริหารสุขภาพสัตว์ในปีเดียวกัน

ลาศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพยาธิชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2540