

ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาและอุบัติการณ์ของ *Helicobacter spp.* ในกระเพาะอาหารสุนัข

นพดล พิพารัตน์^{1*} เทพลีรินทร์ มากบุญศรี² ศิริโชค สุขกมล² สุชาดา อมรชัยเลิศรัตน์²
อนุเทพ รังสีพิพัฒน์¹ บุญมี สัตยญสุจจารี¹

Abstract

Nopadon Pirarat¹ Thepsirin Makbunsri² Sirichoke Sukkamon² Suchada Amornchailertrat²
Anudep Rungsipat¹ Boonmee Sunyasootcharee¹

THE RELATIONSHIP BETWEEN PATHOLOGICAL GASTRIC CHANGES AND *HELICOBACTER SPP.* IN DOGS

A study of canine, gastric, *Helicobacter spp.* infection was performed. A total of 56 biopsied samples of cardia, fundus, body and pyloric antrum, submitted to the Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, during October, 2001 to 2002, were investigated. The objective of this study was to detect *Helicobacter spp.* infections in the stomach of dogs and to confirm any relationship between the histopathological changes in the stomach with the presence of bacteria. The histopathological results revealed inflammatory cell infiltration 100%(56/56), crypt distortion 69.64%(39/56), lymphoid follicular formation 67.86%(38/56) and epithelial degeneration 28.57%(16/56). The presence of *Helicobacter spp.* using Hematoxylin & Eosin(H&E) staining, revealed positive totals of 53.57%(30/56), with Warthin Starry staining, 89.29%(50/56) and by immunohistochemistry 85.71%(48/56). *Helicobacter spp.* were localized in the luminal crypt 87.50%(49/56), the gastric gland 71.29%(40/56), the gastric epithelium and the gastric pit 67.86%(38/56). There were no significantly different histopathological changes in any part of the stomach ($p>0.05$). The number of *Helicobacter spp.* was not significantly different in each part of stomach ($p>0.05$). The present study revealed significantly different correlations for bacterial detection between H&E and Warthin Starry stain ($p=0.001$) but there was no correlation between bacterial localization and the histopathological changes seen in each part of the stomach ($p>0.05$).

Keywords : stomach, dogs, *Helicobacter spp.*

¹Department of Pathology, ²6th years student, academic year 2002, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

*Corresponding author

¹ภาควิชาพยาธิวิทยา ²นิสิตชั้นปีที่ 6 ปีการศึกษา 2545 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

นพดล พิพรัตน์^{1*} เทพสิรินทร์ มากบุญศรี² ศิริโชค สุขกมล² สุชาดา อมรชัยเลิศรัตน์² อนุเทพ รังสีพิพัฒน์¹ บุญมี สัญญะสุจจารี¹

ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาและอุบัติการณ์ของ *Helicobacter* spp. ในกระเพาะอาหารสุนัข

ศึกษาการติดเชื้อ *Helicobacter* spp. ในกระเพาะอาหารสุนัขจำนวน 56 ตัวอย่าง สุ่มเก็บตัวอย่างกระเพาะอาหารที่ตำแหน่ง cardia fundus body และ pyloric antrum ของสุนัขที่ส่งชันสูตรซาก ณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างเดือนตุลาคม 2544 ถึง เดือนตุลาคม 2545 จุดประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าเพื่อตรวจหา *Helicobacter* spp. ในกระเพาะอาหารสุนัข และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหาร และการตรวจพบแบคทีเรีย ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา พบการแทรกตัวของเซลล์อักเสบ 100% (56/56) การบิดเบี้ยวของคริปเซลล์ 69.64% (39/56) การรวมกลุ่มของลิมโฟไซท์ 67.86% (38/56) และพบการเสื่อมของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร 28.57% (16/56) ตามลำดับ ศึกษาตำแหน่งการกระจายของเชื้อ พบที่ luminal crypt 87.50% (49/56), gastric gland 71.29% (40/56) gastric epithelium และ gastric pit 67.86% (38/56) ตามลำดับ ศึกษาอุบัติการณ์การตรวจพบ *Helicobacter* spp. ด้วยการย้อม H&E พบ 53.57% (30/56) ย้อมสีพิเศษ Warthin Starry stain พบ 89.29% (50/56) และย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี พบ 85.71% (48/56) ไม่พบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหารในแต่ละบริเวณ ($p>0.05$) และการตรวจพบแบคทีเรียทั้ง 4 ตำแหน่งของกระเพาะอาหารไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของการตรวจหา *Helicobacter* spp. ด้วยวิธี H&E และ Warthin Starry stain พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.001$) และพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหารไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบแบคทีเรีย

คำสำคัญ : กระเพาะอาหาร สุนัข *Helicobacter* spp.

บทนำ

ความผิดปกติของกระเพาะอาหาร เช่น การอักเสบ (gastritis) การเกิดแผลหลุม (gastric ulcer) หรือการเกิดเนื้องอก มักพบอาการเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน หรือปวดท้องร่วม (Nelson and Couto, 1998) สาเหตุเกิดจากความเครียด สารพิษ การได้รับยาบางชนิด เช่น ยาต้านมะเร็ง ยาแก้ปวดในกลุ่ม non-steroid anti-inflammatory drug (NSAID) รวมถึงการติดเชื้อ ไวรัส รา ปรสิต และแบคทีเรีย (Jenkins and Denovo, 1997) ในสภาวะปกติกระเพาะอาหารจะมีสภาพเป็นกรด ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในการดำรงชีพหรือก่อพยาธิสภาพ แต่เมื่อปี ค.ศ.1983 มีรายงานการตรวจพบ *Helicobacter pylori* ครั้งแรกในกระเพาะอาหารคน (EL-Zaatari et al., 1997) ซึ่งก่อให้เกิดการอักเสบ แผลหลุม และเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร (Fox

et al., 1995; Handt et al., 1995; Utriainen et al., 1997) ต่อมามีการค้นพบ *Helicobacter* spp. ดังกล่าวเพิ่มขึ้น พบอย่างน้อย 16-18 species โดยทั้งหมดแยกได้จาก กระเพาะอาหาร และลำไส้ของสัตว์เลี้ยง และสัตว์ป่าชนิดต่างๆ อาทิ แมว สุนัข สุนัข เฟอร์เรต เสือชีตาร์ ลิง แกะ หนู มิงค์ เป็นต้น ซึ่งในสัตว์เหล่านี้บางตัวแสดงอาการป่วย หรือมีปัญหาของโรคในระบบทางเดินอาหารร่วมด้วย (Handt et al., 1995; Fox et al., 1996; Shibahara et al, 2001).

Helicobacter spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นเกลียวโค้ง (curved to spiral shaped) บางครั้งพบลักษณะเป็น coccoid อาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารของคนและสัตว์ สไปโรจิตแบคทีเรียชนิดนี้สามารถตรวจวินิจฉัยด้วย urea breath biochemical test, การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา การย้อมสีพิเศษ เช่น Warthin Starry stain การวิเคราะห์โปรตีน

โดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacryamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), อิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry), ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Cornetta, 1998; Neiger and Simpson, 2000) ในกระเพาะอาหารมนุษย์ที่มีสภาพเป็นกรด (pH 2) จะมีชั้นเยื่อเมือกที่หนาเพื่อป้องกันกระเพาะอาหารจากการทำลายของกรด ดังนั้น *Helicobacter pylori* จึงอาศัยอยู่บนชั้นเยื่อเมือก และสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนยูเรียเป็นไบคาร์บอเนต (ด่างอ่อน) และแอมโมเนีย (ด่างแก่) จึงเกิดสภาพเป็นกลางในบริเวณตำแหน่งที่เชื้ออาศัยอยู่ (Ayali and Simpson, 1999) ในปัจจุบันยังหาข้อสรุปได้ไม่แน่ชัด สำหรับความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิดนี้กับตัวสัตว์ พยาธิกำเนิดลักษณะรอยโรคที่ปรากฏ หรือความสำคัญด้านโรคสัตว์ติดคน (Lee et al., 1991; Dore et al., 1999; Simpson et al., 1999)

ในประเทศไทย ยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ *Helicobacter spp.* ในสัตว์โดยเฉพาะสุนัข การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวินิจฉัยยืนยัน *Helicobacter spp.* ในกระเพาะอาหารสุนัข ซึ่งใช้เป็นหลักฐานรายงานการพบเชื้อในประเทศไทย และศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะพยาธิวิทยา กับอุบัติการณ์ของ *Helicobacter spp.* ในกระเพาะอาหารสุนัข

วัสดุและวิธีการ

เก็บตัวอย่างกระเพาะอาหารสุนัข ที่ส่งชันสูตรซาก ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยไม่จำกัดช่วงอายุ เพศ และพันธุ์สุนัข จำนวน 56 ตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2544 ถึง 2545 เก็บตัวอย่างพร้อมทั้งบันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พันธุ์ เพศ อายุ สาเหตุของอาการป่วยหรือตาย เป็นต้น ทำการตรวจบันทึกรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา (gross lesions) โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วน cardia fundus body และ pyloric antrum แต่ละส่วนยาว 1 ซม. หนาประมาณ 0.5 ซม. ใส่ในน้ำยาฟอร์มอลิน 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) นาน 24 ชม. ผ่านขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

ตรวจดูลักษณะรอยโรค (Handt et al., 1995) โดยส่องตรวจรอยโรค 10 ตำแหน่ง/สไลด์ และให้คะแนนรอยโรค คือ

0 : ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา

+1 : กระเพาะอาหารอักเสบระดับอ่อน พบเซลล์อักเสบไม่เกิน 10 เซลล์ที่กำลังขยายสูง (40X) พบการรวม

กลุ่มของเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphoid follicles) 2-3 กลุ่มที่กำลังขยายต่ำ (4X) แทรกตัวชั้นได้เยื่อ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อกระเพาะอาหาร

+2 : กระเพาะอาหารอักเสบระดับปานกลาง พบเซลล์อักเสบ 10-50 เซลล์ที่กำลังขยายสูง (40X) พบการรวมกลุ่มของเซลล์ลิมโฟไซต์มากกว่า 2-3 กลุ่มที่กำลังขยายต่ำ (4X) และพบการเปลี่ยนแปลงของเยื่อกระเพาะอาหารระดับอ่อน

+3 : กระเพาะอาหารอักเสบระดับรุนแรง พบเซลล์อักเสบมากกว่า 50 เซลล์ที่กำลังขยายสูง (40X) พบการรวมกลุ่มของเซลล์ลิมโฟไซต์มากกว่า 2-3 กลุ่มที่กำลังขยายต่ำ (4X) และพบการเปลี่ยนแปลงของเยื่อกระเพาะอาหารอย่างรุนแรง

ตรวจหาเชื้อ *Helicobacter spp.* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง สุ่มตรวจ 10 ตำแหน่ง/สไลด์ (Handt et al., 1995) จากการย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E)

- : ไม่พบเชื้อ *Helicobacter spp.*

+ : พบเชื้อ *Helicobacter spp.*

การย้อมสีพิเศษชนิด Warthin Starry Stain เริ่มจากขจัดพาราฟินและเอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อ จากนั้นจุ่มในสารละลาย 1% ซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) ที่อุณหภูมิ 60°C. 1 ชม. แช่ในดีเวลลอปเปอร์ (developer) ประกอบด้วย 2% ซิวเวอร์ไนเตรท 30 มล., 0.15% สารละลายไฮโดรควิโนน 30 มล. และ 5% สารละลายเจลาติน ที่อุณหภูมิ 60°C. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น 60°C. และน้ำกลั่น อุณหภูมิห้อง ขจัดน้ำออกและปิดสไลด์ ตามลำดับ

ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างเพื่อบันทึกจำนวนศึกษาลักษณะและตำแหน่งที่พบแบคทีเรีย *Helicobacter spp.* โดยสุ่มดู 10 ตำแหน่ง/สไลด์ (Handt et al., 1995)

0 : ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter spp.*

+1 : พบเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter spp.* น้อยกว่า 10 ตัว

+2 : พบเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter spp.* จำนวน 10-50 ตัว

+3 : พบเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter spp.* มากกว่า 50 ตัว

เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

ย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี ด้วยวิธีอะวิดิน-ไบโอตินคอมเพล็กซ์ (Avidin-Biotin Complex; ABC) โดยขจัดพาราฟินและเอาน้ำออกจากเนื้อเยื่อ ล้างในสารละลาย phosphate buffer saline solution (PBS) 5 นาที หยอด 0.1%

ทริปซิน (trypsin) ที่ 37°C. 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ละ 5 นาที แช่ในสารละลาย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในเมทานอล ที่ 37°C. 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แช่ใน skim milk ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง หยด rabbit polyclonal anti-*Helicobacter pylori* antibody (DAKO, Denmark) ที่ความเข้มข้น 1:200 ที่ 37°C. 1 ชม. ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง หยดสารละลาย ABC (DAKO, Denmark) ที่ 37°C. 30 นาที ล้างใน PBS 3 ครั้ง ทำให้เกิดสีโดยการจุ่มใน 0.05% 3,3' diamino benzidine tetrahydrochloride (DAB) ประมาณ 2 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการจุ่มลงในน้ำกลั่น และล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน ย้อมทับด้วย Meyer's hematoxylin ขจัดน้ำออกและปิดสไลด์ ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างเพื่อพิสูจน์ยืนยันเชื้อ *Helicobacter spp.* (Esteves et al., 2000)

วิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้ Spearman rank order correlation เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งที่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา และตำแหน่งที่พบเชื้อ นอกจากนี้ยังใช้ Chi-square เพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อจากการย้อมด้วยวิธีต่างๆ และใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของรอยโรคและตำแหน่งของการพบเชื้อที่กระเพาะอาหารโดยวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษา

ผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิวิทยา 10/56 พบลักษณะการเกิดแผลหลุมที่เยื่อบุกระเพาะอาหาร (focal ulcerative gastritis) กระเพาะอาหารอักเสบแบบมีการสร้างเมือก (catarrhal gastritis) และการอักเสบของกระเพาะอาหารแบบมีเลือดปน (haemorrhagic gastritis) 3/10 และพบมีการเสื่อมของผนังเยื่อส่วน pylorus (focal pyloric gastropathy) 1/10 ตามลำดับ ตรวจพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหารทุกตัวอย่างที่ศึกษา โดยพบที่ส่วน pyloric antrum 91.07% (51/56) cardia 89.29% (50/56) fundus และ body 87.50% (49/56) (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างรอยโรคในกระเพาะอาหารทั้ง 4 ตำแหน่ง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) พบรอยโรคการแทรกของเซลล์อักเสบ (cellular infiltration) 100% (56/56) ในชั้น submucosa พบการบิดเบี้ยวของ

คริปเซลล์ (crypt distortion) 69.64% (39/56) การรวมกลุ่มของเซลล์ลิมโฟไซด์ (lymphoid follicle formation) 67.86% (38/56) (รูปที่ 1) และมีการเสื่อมของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร (epithelium degeneration) 28.57% (16/56)

ผลการตรวจหาแบคทีเรีย *Helicobacter spp.* จากการย้อมด้วยสี H&E พบเชื้อในกระเพาะอาหารทั้งสิ้น 53.57% (30/56) โดยพบที่ตำแหน่ง cardia 35.71% (20/56), pyloric antrum 28.57% (16/56), body 26.79% (15/56) และ fundus 23.21% (13/56) ตามลำดับ (ตารางที่ 1) สำหรับการย้อมด้วยสีพิเศษ Warthin Starry Stain พบแบคทีเรียรูปร่างเกลียว คีดสีน้ำตาลดำในกระเพาะอาหารทั้งสิ้น 89.29% (50/56) โดยพบที่ตำแหน่ง cardia และ fundus 76.79% (43/56), pyloric antrum 75.00% (42/56) และ body 73.21% (41/56) (รูปที่ 2 และ 3) ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ตรวจพบการกระจายของแบคทีเรียที่ตำแหน่งต่างๆ คือ luminal crypt 87.50% (49/56), gastric gland 71.29% (40/56), gastric epithelium และ gastric pit 67.86% (38/56) เปรียบเทียบอุบัติการณ์การตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในกระเพาะอาหาร พบว่าการตรวจด้วยวิธี Warthin Starry Stain ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียมากกว่าการตรวจด้วยวิธีย้อมสี H&E ชนคมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.001$) ส่วนตำแหน่งของกระเพาะอาหารที่พบเชื้อไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบจากการย้อมสี H&E และ Warthin Starry Stain การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบเชื้อและการพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าอุบัติการณ์การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาจะสูงขึ้นเมื่อตรวจพบ *Helicobacter spp.* มากขึ้นในกระเพาะอาหารจากการย้อม Warthin Starry Stain แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอุบัติการณ์การเปลี่ยนทางจุลพยาธิวิทยาและการตรวจพบเชื้อเมื่อทำการย้อมด้วยสี H&E ปกติ (ตารางที่ 1)

ผลการตรวจยืนยัน *Helicobacter spp.* ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Helicobacter pylori* พบให้ผลบวกมีทั้งสิ้น 85.71% (48/56) โดยพบการคีดสีน้ำตาลของเชื้อที่ตำแหน่ง luminal crypt, gastric pits, gastric gland และ epithelium lining (รูปที่ 4) เมื่อทำการเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี Warthin Starry Stain และวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยคะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่กระเพาะอาหารกับการตรวจพบ *Helicobacter spp.* พบว่ากลุ่มที่ตรวจพบแบคทีเรียมี

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างที่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาและการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในแต่ละตำแหน่งของกระเพาะอาหารสุนัข

จำนวนตัวอย่าง	ตำแหน่งที่ศึกษา			
	Cardia	Fundus	Body	Pylorus
พบรอยโรค (%)	89.29 (50/56) ^a	87.50 (49/56) ^a	87.50 (49/56) ^a	91.07 (51/56) ^a
พบเชื้อ ย้อม H&E	35.71 (20/56) ^b	23.21 (13/56) ^b	26.79 (15/56) ^b	28.57 (16/56) ^b
พบเชื้อ ย้อม WSS	76.79 (43/56) ^a	76.79 (43/56) ^a	73.21 (41/56) ^a	75.00 (42/56) ^a

^{a,b} ตัวอักษรกำกับที่ต่างกันหมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคะแนนรอยโรคในแต่ละตำแหน่งของกระเพาะอาหารที่ตรวจพบและไม่พบ *Helicobacter spp.*

กลุ่มทดลอง	ค่าเฉลี่ยคะแนนการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา			
	Cardia	Fundus	Body	Pylorus
ตรวจพบเชื้อ	1.40 ± 0.82 ^a	1.19 ± 0.70 ^a	1.32 ± 0.72 ^a	1.31 ± 0.68 ^a
ตรวจไม่พบเชื้อ	1.08 ± 0.86 ^a	1.15 ± 0.69 ^a	1.00 ± 0.76 ^a	1.21 ± 0.70 ^a

^a ตัวอักษรกำกับที่ต่างกันหมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

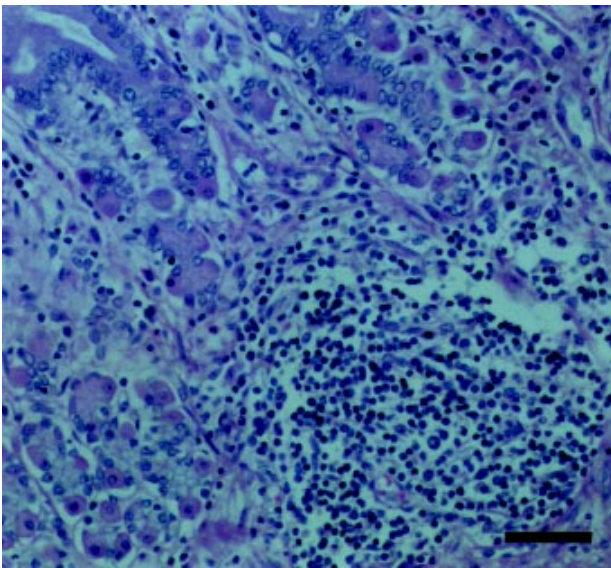
การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยามากกว่ากลุ่มที่ตรวจไม่พบแบคทีเรียแต่เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

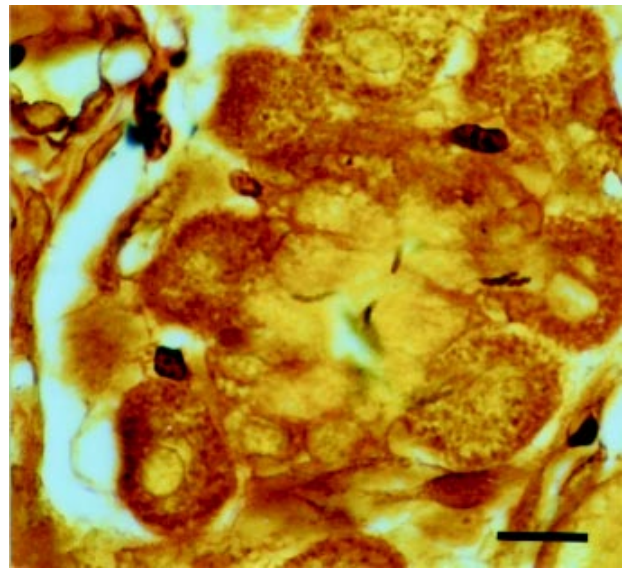
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหารสุนัขในครั้งนี้ บ่งชี้ว่ามีการอักเสบของกระเพาะอาหาร และเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ซึ่งการตอบสนองของร่างกายต่อ *Helicobacter spp.* สามารถก่อให้เกิดการอักเสบเฉพาะแห่ง โดยร่างกายสามารถสร้าง IgA จับกับผิวแอนติเจนของ *Helicobacter spp.* พบการรวมกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดขาว ลิมโฟไซต์และพลาสมาเซลล์ ดังเช่นรอยโรคที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ส่วนการตอบสนองทั้งระบบ พบ IgG เพิ่มขึ้นในพลาสมา ภายหลังการติดเชื้อ 1 เดือนขึ้นไปซึ่งสามารถตรวจโดยวิธี ELISA (Neiger and Simpson, 2000) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาและตำแหน่งที่พบเชื่อนั้น ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับรายงานของ Simpson et al.

(1999) ที่ทำการศึกษาในกระเพาะอาหารที่ไม่พบรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยามากที่สุดที่ตำแหน่ง pyloric antrum แต่พบเชื้อส่วนใหญ่บริเวณ fundus body และ cardia รวมทั้งรายงานของ Lee et al. (1992) พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยามากที่ตำแหน่ง fundus และ body แต่พบ *Helicobacter spp.* ที่ตำแหน่ง fundus และ pyloric antrum มากที่สุด ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาและจำนวน *Helicobacter spp.* ที่ตรวจพบอาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความแตกต่างกันของการตอบสนองภูมิคุ้มกันของสุนัขแต่ละตัว การได้รับยาในกลุ่ม NSAIDs ภาวะยูรีเมีย (uremia) การติดเชื้อของร่างกายและภาวะเครียด การใช้ยาปฏิชีวนะในสุนัขซึ่งอาจมีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายสุนัข และส่งผลกระทบต่อปรากฏของเชื้อแบคทีเรียภายในกระเพาะอาหารได้ รวมทั้งความแตกต่างของเทคนิควิธีการตรวจวินิจฉัยในแต่ละวิธีได้

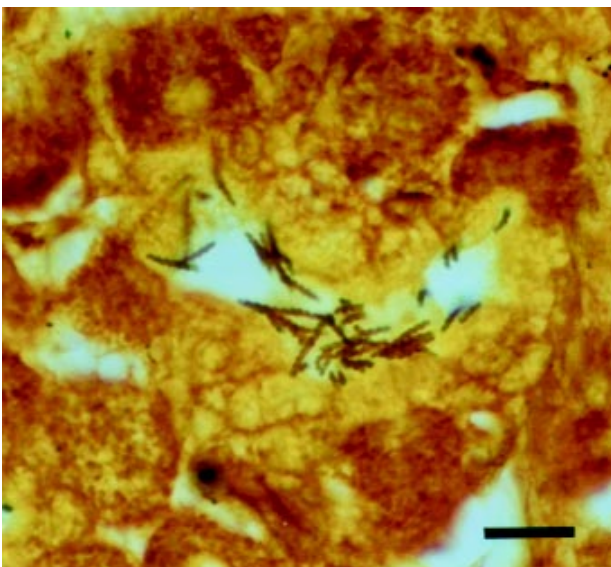
อุบัติการณ์การติดเชื้อแบคทีเรียในกระเพาะอาหารของสุนัขในประเทศไทยมีอุบัติการณ์ค่อนข้างสูง ร้อยละ 80-90 เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Simpson et al. (1999) อุบัติ



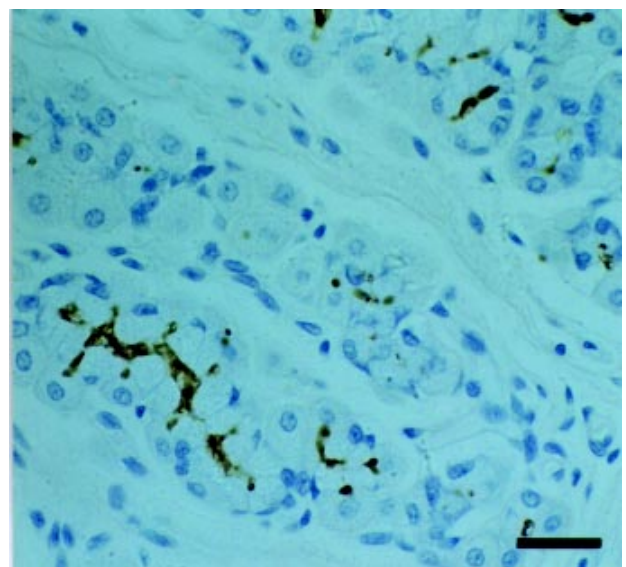
รูปที่ 1 แสดงการรวมกลุ่มของลิมโฟไซต์จำนวนมากในเนื้อเยื่อของกระเพาะอาหารของสุนัข ตำแหน่ง body (H&E, bar = 25 ไมครอน)



รูปที่ 2 แบคทีเรีย *Helicobacter* spp. ภายในเซลล์ที่หลังกรดและน้ำย่อยของกระเพาะอาหารสุนัขตำแหน่ง fundus (Warthin Starry, bar = 50 ไมครอน)



รูปที่ 3 แบคทีเรีย *Helicobacter* spp. ภายใน lumen ของ gastric gland กระเพาะอาหารสุนัขตำแหน่ง body (Warthin Starry, bar = 50 ไมครอน)



รูปที่ 4 อิมมูโนฮิสโตเคมี แสดงแอนติเจนของเชื้อ *Helicobacter* spp. บริเวณภายใน lumen ของ gastric gland (IHC, bar = 50 ไมครอน)

การณ์ของการตรวจพบ *Helicobacter* spp. ในสุนัขที่พบอาการอาเจียนและไม่พบอาการใด ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 60-80)

การศึกษาถึงตำแหน่งการกระจายในกระเพาะอาหารสุนัข พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีการกระจายตัวทั่วไปทั้งภายในและภายนอกเซลล์ในส่วนของ mucosa โดยพบที่ตำแหน่ง

luminal crypt, gastric gland, gastric pit และ gastric epithelium และ canaliculi ของ parietal cell อีกด้วย ซึ่งจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ามี *Helicobacter* spp. หลายชนิดที่อาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารสุนัขและการพบเชื้อที่ตำแหน่งต่างกันเป็นผลมาจากการพบ *Helicobacter* spp. ต่างชนิด Lee et al. (1992) รายงานการพบเชื้อ *Helicobacter felis* ที่

ตำแหน่งของ canaliculi ของ parietal cell ในกระเพาะอาหารสุนัข ซึ่งแตกต่างจาก *Helicobacter pylori* ในกระเพาะอาหารมนุษย์ ซึ่งจะอาศัยอยู่ภายนอกเซลล์บริเวณภายในช่องว่างของกระเพาะอาหารและบริเวณ gastric pits

การตรวจหาเชื้อโดยการย้อมด้วยสี H&E พบอุบัติการณ์น้อยกว่าการตรวจหาเชื้อโดยการย้อมด้วยวิธี Warthin Starry Stain อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.001$) เนื่องจากการย้อม H&E นั้น สามารถมองเห็นแบคทีเรียชัดเจนต่อเมื่อมีการติดเชื้อมีปริมาณสูงและมีปริมาณเชื้อจำนวนมาก แต่การย้อม Warthin Starry Stain ซึ่งส่วนประกอบของซิลเวอร์ในสีที่ใช้จะจับกับผิวภายนอกของแบคทีเรีย ทำให้เห็นแบคทีเรียรูปร่างเกลียว สีน้ำตาลดำ สามารถตรวจหาเชื้อได้ง่าย (Nelson and Couto, 1998; Anim et al., 2000; Shibahara et al., 2001) แต่วิธี Warthin Starry Stain อาจเกิดผลบวกลวงได้เนื่องจากสามารถย้อมติดแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Campylobacter* spp., *Bartonella henselae*, *Leptospira* spp. การตรวจที่แม่นยำต้องตรวจหลายบริเวณและขึ้นกับประสบการณ์ของพยาธิสัตวแพทย์ ซึ่งอาจใช้สีย้อมอื่นร่วมด้วย เช่น PAS, modified Steiner stain, Ziehl Neelsen stain เป็นต้น (Ayali and Simpson, 1999) จะทำให้ผลการตรวจแม่นยำมากขึ้น การตรวจยืนยันเชื้อด้วยการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยการให้แอนติบอดีต่อ *Helicobacter pylori* ให้ผลไม่แตกต่างจากการย้อมด้วยวิธี Warthin Starry Stain ดังนั้นจึงสามารถนำวิธี Warthin Starry Stain มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ *Helicobacter* spp. ได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และสะดวกกว่าวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Ayali and Simpson, 1999) แต่กรณีที่มีการติดเชื้อ *Helicobacter* ในระยะเริ่มต้น การมีเชื้อในปริมาณน้อย อาจทำให้การอ่านผลจาก Warthin Starry Stain เกิดผลบวกลวงได้ ดังนั้นวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีจะให้ผลแม่นยำมากกว่า (Humason, 1967; Rossi et al., 1999) เนื่องจากวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นการตรวจหาแอนติเจนของแบคทีเรียที่อยู่บนผิวเซลล์ วิธีนี้ให้ผลบวกเฉพาะต่อเชื้อ *Helicobacter* spp. มากกว่าวิธี Warthin Starry Stain รวมทั้งไม่เกิดปฏิกิริยาต่อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (Anim et al., 2000) เนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้ในการทดสอบนี้เป็นแบบ polyclonal antibody ที่สามารถให้ผลบวกต่อ *Helicobacter* spp. ชนิดอื่น ไม่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อที่เป็นชนิดก่อโรคและไม่ก่อโรค (Simpson, 1999; Anim et al., 2000)

สำหรับการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกนั้น สามารถทำได้โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารโดยการสอดท่อ ซึ่ง

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวินิจฉัย (Anim et al., 2000) นอกจากนี้อาจสามารถเก็บตัวอย่างจากน้ำลาย เยื่อข้างแก้ม อาเจียน และสิ่งคัดหลั่งจากกระเพาะอาหารโดยการล้างท้องได้ (Tennant, 1996) นอกจากวิธีดังกล่าวแล้ว สามารถวินิจฉัยจากการทดสอบยูเรีย (urease test) ซึ่งในสัตว์ที่มีการติดเชื้อ *Helicobacter* spp. นั้นจะพบความเป็นเบสสูงกว่าปกติ และเมื่อทำการทดสอบด้วยสีย้อมฟีนอลเรด จะให้ผลบวกโดยมีการเปลี่ยนสีจากสีส้มแดงเป็นสีชมพู (Ayali and Simpson, 1999)

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ยังไม่สามารถบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่าง ลักษณะอาการทางคลินิก รอยโรคทางมหพยาธิวิทยา รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาและจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter* spp. ที่พบได้ จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่า *Helicobacter* spp. เป็นสาเหตุหลักในการทำให้เกิดกระเพาะอาหารอักเสบในสุนัขได้โดยตรง อย่างไรก็ตาม สัตว์ส่วนจำนวนตัวอย่างกระเพาะอาหารสุนัขที่พบรอยโรคและไม่พบรอยโรคและตรวจพบเชื้อและไม่พบเชื้อในการศึกษาครั้งนี้มีไม่เพียงพอ จึงควรเพิ่มจำนวนตัวอย่าง และบันทึกอาการที่แสดงออกทางคลินิกอย่างละเอียด เพื่อเป็นพื้นฐานในการทำการศึกษาลำดับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการเสริมทักษะการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2545 ที่สนับสนุนเงินทุนอุดหนุนการศึกษานี้ น.สพ. พิสุทธิ เพ็ญสิทธิพร และ สพ.ญ. รุจิรา ชรรมา สำหรับคำแนะนำและช่วยเก็บตัวอย่าง คุณสุประดิษฐ์ หวังในธรรม ที่ให้ความรู้เรื่องเทคนิคการย้อมสีต่างๆ และเจ้าหน้าที่หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน อ.น.สพ.ดร. เสด็จ ธรรมรักษ์ ภาควิชาสัตวศาสตร์-สัตวเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำการใช้สถิติในการตรวจสอบข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

Anim, J.T., AI-Sobkie, N., Prasad, A., John, B., Sharma, P.N. and AI-Hamar. 2000. Assessment of different methods for staining *Helicobacter pylori* in endoscopic gastric biopsies. Acta Histochem. 102: 129-137.

- Ayali, D.S. and Simpson, K.W. 1999. Gastric *Helicobacter* infection in dogs. *Vet Clin North Ame.* 29; 347-411.
- Cornetta, A.M., Simpson, K.W., Strauss-Ayali, B.P., Rosanna, D., Andrea, A.D., McDonough, P.L. and Gleed, R.D. 1998. Use of [c] urea breath test for detection of gastric infection with *Helicobacter spp.* in dogs. *J. Vet. Res.* 59(11): 1364-1368.
- Dore, M. P., Bilotta, M., Vaira, D., Manca, A., Massarelli, G., Leandro, G., Atzei, A., Pisanu, G., Graham, D.Y. and Realdi, G. 1999. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in shepherds. *Diag. Dis. Sci.* 44(6): 1161-1164.
- EL-Zaatari, F.A.K., Woo, J.S., Badr, A., Osato, M.S., Serna, H., Lichtenberger, L.M., Genta, R.M. and Graham, D.Y. 1997. Failure to isolate *Helicobacter pylori* from stray cats indicates that *H. pylori* in cats may be an anthroponosis an animal infection with a human pathogen. *J. Med. Microbiol.* 46: 372-376.
- Esteves, M.I., Schrenzel, M.D., marini, R.P., Taylor, N.S., Xu, S., Hagen, S., Feng, Y., Shen, Z. and Fox, J.G. 2000. *Helicobacter pylori* gastritis in cats with long-term natural infection as a model of human disease. *Am. J. Pathol.* 156(2): 709-720.
- Fox, F.G., Batchelder, M., Marini, R., Yan, L., Handt, L., Li, X., Shames, B., Hayward, A., Campbell, J. and Murphy, J.C. 1995. *Helicobacter pylori*-induced gastritis in the domestic cat. *infect. Immun.* 63(7): 2674-2681.
- Fox, J.G., Perkins, S., Yan, L., Shen, Z., Attardo, L. and Pappo, J. 1996. Local immune response in *Helicobacter pylori*-infected cats and identification of *Helicobacter pylori* in saliva, gastric and faeces. *Immunol.* 88: 400-406.
- Handt, L.K., Fox, J.G., Stalis, I.H., Rufo, R., Lee, G., Linn, J., Li, X. and Kleanthous, H. 1995. Characterization of feline *Helicobacter pylori* stains and associated gastritis in a colony of domestic cats. *J. Clin. Microbiol.* 33(9): 2280-2289.
- Humason, G.L. 1967. Silver impregnation I: reticulum techniques. In: *Animal Tissue Techniques*. 2nd ed. San Francisco : W.H. Freeman company. 184-188.
- Jenkins, C.C. and Denovo, C.R. 1997. Disease of the stomach. In: *Handbook of Small Animal Practice*. 3rd ed. Philadelphia : W. B. Saunders Company. 334-343.
- Lee, A., Fox, J.G., Otto, G., Dick, E.H. and Krakowka, S. 1991. Transmission of *Helicobacter spp.* a challenge to the dogma of faecal-oral spread. *Epidemiol. Infect.* 107(1) : 99-109.
- Lee, A., Krakowka, S., Fox, J.G., Otto, G., Eaton, K.A. and Murphy, J.C. 1992. Role of *Helicobacter felis* in chronic canine gastritis. *Vet. Pathol.* 29(6): 487-494.
- Neiger, R. and Simpson, K.W. 2000. *Helicobacter* Infection in dogs and cats: Facts and Fiction. *J. Vet. Intern. Med.* 14 : 125-133.
- Nelson, R.W. and Couto, C.G. 1998. *Helicobacter*-associated disease. In: *Small Animal Internal Medicine*. 2nd ed. St. Louis: Mosby Year Book. 422-423.
- Rossi, G., Rossi, M., Claudia, G.V., Fortuna, D., Brioni, D., Pancott, L., Capecchi, S., Sozzi, S., Renzoni, G., Braca, G., Giudice, G.D., Rappuoli, R., Ghiara, P. and Taccini, E. 1999. A conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter Pylori*. *Infect. Immun.* 67(6): 3112-3120.
- Shibahara, T., Wada, Y., Tsunemitsu, H., Kubo, M., Ishikawa, Y. and Kadota, K. 2001. Gastroenteritis associated with *Helicobacter*-like organisms and rotavirus in a reindeer (*Rangifer tarandus*). *Aust. Vet. J.* 79(2) : 133-135.
- Simpson, K.W., Ayali, D.S., McDonough, P.L., Chang, Y.F. and Valentine, B.A. 1999. Gastric function in dogs with naturally acquired gastric *Helicobacter spp.* infection. *J. Vet. Intern. Med.* 13: 507-515.
- Tennant, B. 1996. Scientific information document *Helicobacter pylori*. *J. Small. Anim. Pract.* 37(12): 609-610.
- Utriainen, M., Jalava, K., Sukura, A. and Hanninen, M. L. 1997. Morphological diversity of cultured canine gastric *Helicobacter spp.* *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 20(4): 285-297.