ผลของอิมมูโนโกลบูลินจีต่อการทำงานของนิวโทรฟิลในการต่อต้านเชื้อสเตรปโตคอกคัส ยูเบอริส ที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบในห้องปฏิบัติการ

นางสาวอาภาภรณ์ เทพสิทธิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF IMMUNOGLOBULIN G ON NEUTROPHIL ACTIVITY *in vitro* AGAINST MASTITIS CAUSING *Streptococcus uberis*

Miss Arbhabhorn Thepsit

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของอิมมูโนโกลบูลินจีต่อการทำงานของนิวโทรฟิลในการต่อต้านเชื้อสเตรปโตคอกคัส ยูเบอริส ที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบในห้องปฏิบัติการ
โดย	นางสาวอาภาภรณ์ เทพสิทธิ์
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. มงคล เตชะกำพุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ. รัตนาภรณ์ พรหมาสา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ. อินทิรา กระหม่อมทอง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. วิทยา สุริยาสถาพร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาภาภรณ์ เทพสิทธิ์ : ผลของอิมมูโนโกลบูลินจีต่อการทำงานของนิวโทรฟิลในการต่อต้านเชื้อสเตรปโตคอกคัส ยูเบอริส ที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบในห้องปฏิบัติการ. (EFFECT OF IMMUNOGLOBULIN G ON NEUTROPHIL ACTIVITY *in vitro* AGAINST MASTITIS CAUSING *Streptococcus uberis*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.น.สพ.ดร. กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร, 84 หน้า.

การศึกษาผลของอิมมูโนโกลบูลินจีต่อการทำงานของนิวโทรฟิลในการต่อต้านเชื้อ *S. uberis* ที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบในห้องปฏิบัติการ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม และซีรั่มของแม่โครีดนมจำนวน 7 ตัวที่ได้การตรวจยืนยันการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมจำนวน 8 เต้า และมีเต้านมปกติภายในแม่โคตัวเดียวกันจำนวน 7 เต้า และแม่โครีดนมที่มีเต้านมปกติจำนวน 6 ตัว คัดเลือกเชื้อ *S. uberis* ที่ได้จากการติดเชื้อธรรมชาติจำนวน 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (CM isolate) และแบบไม่แสดงอาการ (SCM isolate) เพื่อใช้ในการกระตุ้นการสร้างอิมมูโนโกลบูลินจีในลูกโค 2 กลุ่ม โดยมีกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือเป็นกลุ่มควบคุม ทำการตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ในตัวอย่างน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่ติดเชื้อธรรมชาติ และแม่โคที่มีเต้านมปกติ และซีรั่มของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้น ทำการตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิลในการเก็บกินเชื้อ และฆ่าเชื้อ *S. uberis* ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีในตัวอย่างน้ำนม และซีรั่มดังกล่าว

ผลการศึกษาพบแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมมีลำดับท้อง วันที่ให้นม และค่าเฉลี่ย log ของจำนวนเซลล์โซมาติกมากกว่าแม่โคที่มีเต้านมปกติ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าเฉลี่ย log ของจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมจากเต้านมที่มีการติดเชื้อกับเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อในแม่โคตัวเดียวกัน ($p<0.05$) เชื้อ *S. uberis* สามารถแยกได้จากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการได้มากที่สุด ระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมของเต้านมที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมมีความแตกต่างกับเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อของแม่โคที่มีเต้านมปกติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของแม่โคทั้ง 2 กลุ่มกับในน้ำนมของเต้านมที่มีการติดเชื้อของแม่โคที่ติดเชื้อ และน้ำนมของแม่โคที่มีเต้านมปกติ ($p<0.05$) การตรวจด้วยแอนติเจนเคลือบผิวเพลทเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate พบระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate ของวันที่ 28 และ 35 ของการกระตุ้นมีความแตกต่างกันกับวันที่ยังไม่ได้รับการกระตุ้น ($p<0.05$) และพบความแตกต่างของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในวันที่ 28 ระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate และในวันที่ 28 และ 35 ระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate กับกลุ่มควบคุม การตรวจด้วยแอนติเจนเคลือบผิวเพลทด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate พบระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในวันที่ 14 และ 28 มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate กับกลุ่มควบคุม ในสภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate ได้ แต่ให้ผลไม่ชัดเจนในการส่งเสริมการฆ่าเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate อย่างไรก็ตามอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อเข้าเต้านมสามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ แต่กลับพบว่าอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมของแม่โคที่มีการติดเชื้อเข้าเต้านมสามารถกระตุ้นนิวโทรฟิลในการฆ่าเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....อาภาภรณ์ เทพสิทธิ์.....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2552

4975580031 : MAJOR VETERINARY MEDICINE
KEY WORDS : IMMUNOGLOBULIN G / PHAGOCYTOSIS / KILLING / NEUTROPHIL / *Streptococcus uberis* / BOVINE MASTITIS

ARBHABHORN THEPSIT : EFFECT OF IMMUNOGLOBULIN G ON NEUTROPHIL ACTIVITY *in vitro* AGAINST MASTITIS CAUSING *Streptococcus uberis*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KITTISAK AJARIYAKHAJORN, Ph.D., 84 pp.

The study of effecf of immunoglobulin G (IgG) on neutrophil activity in vitro against mastitis causing *S. uberis*. Milk and serum samples were collected from *S. uberis* IMI lactating cows (7 cows, 8 infected quarters and 7 healthy quarters) and 6 healthy cows. Two isolates of *S. uberis* (CM isolate and SCM isolate) were originally isolated from cases of *S. uberis* IMI, to be immunized antigen to produce hyperimmune serum in 2 groups of 3 calves. A third group of saline injected calves acted as control. Milk, serum and hyperimmune serum were investigated to determine *S. uberis*-specific IgG. Determine *S. uberis*-specific IgG on neutrophil activities, to phagocytose and kill *S. uberis*.

Results in this study showed *S. uberis* IMI cows had lactation number, day in milk and mean of log of SCC higher than healthy cows. There was significantly difference between mean of log of SCC of infected quarters and non-infected quarters in the same cow. *S. uberis* was mostly isolated from subclinical mastitis cases. IgG in milk of infected quarters significantly differed from non-infected quarters of healthy cows. Moreover, there was significantly difference between IgG in serum and in milk of 2 groups of cow and in milk of healthy cows. IgG in day 28 and 35 of immunization from hyperimmune serum with *S. uberis* CM isolate significantly differed from day 0 and control, and IgG in day 28 of immunization from hyperimmune serum with *S. uberis* SCM isolate significantly differed from control when detected with *S. uberis* CM isolate coated-plate. IgG in day 14 and 28 of immunization from hyperimmune serum with *S. uberis* SCM isolate significantly differed from control when detected with *S. uberis* SCM isolate coated-plate. *S. uberis*-specific IgG from hyperimmune serum in 2 groups phagocytosed *S. uberis* SCM isolate but could not influence on killing ability in CM isolate. However, IgG derived from serum of *S. uberis* IMI cases influenced on phagocytosis in both CM and SCM isolates but could not influence on killing ability but IgG derived from milk of *S. uberis* IMI cases influence on killing ability of neutrophil in both isolates.

Department: Veterinary Medicine Student's Arbhabhorn Thepsit
Field of Study: Veterinary Medicine Advisor's Kittisak Ajariyakhajorn
Academic year: 2009

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยมี รศ.น.สพ.ดร. กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รวมทั้ง ผศ.น.สพ. ธนศักดิ์ บุญเสริม ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ การศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์การเก็บตัวอย่างน้ำนมจากฟาร์มเกษตรกรโคนมรายย่อยในเขตอำเภอเมือง และอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม อ.น.สพ. ปิยะณัฐ ประสมศรี สพ.ญ. ศริญญา ฤกษ์อยู่สุข สพ.ญ. วีรยาภรณ์ ทัดศรี และนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ ชั้นปีที่ 5 และปีที่ 6 ปีการศึกษา 2551 สำหรับความเอื้อเฟื้อในการช่วยเก็บตัวอย่างน้ำนมในฟาร์ม คุณสุกุมา สามงามนิ่ม สำหรับคำแนะนำในการตรวจวินิจฉัยเพาะแยกเชื้อที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบ คุณพนิดา ขานดา สำหรับคำแนะนำในการตรวจด้วยวิธี ELISA และคุณนพดล สะอาดเอี่ยม สำหรับคำแนะนำในการตรวจการเก็บกินเชื้อแบคทีเรียของนิวโทรฟิลด้วยวิธี flow cytometry ครอบครัวเทพสิทธิ์ และครอบครัวสิริวรรณศิลปี ที่เป็นแรงผลักดัน และกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นผู้ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ประจำปีการศึกษา 2549 และทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีการศึกษา 2551

ทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการผลักดันให้การศึกษาครั้งนี้บรรลุวัตถุประสงค์สำเร็จลงได้ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญภาพ.....ญ

บทที่

1 บทนำ.....1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....3

คำสำคัญ.....3

คำถามสำหรับการวิจัย.....3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5

เต้านมอักเสบจากการติดเชื้อ *Streptococcus uberis*.....5

ระบบภูมิคุ้มกันของเต้านม.....9

3 วิธีการศึกษา.....17

การศึกษาที่ 1 การติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมในแม่โครีดนม.....17

การเก็บตัวอย่างน้ำนมและเลือด.....17

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....18

1. การเพาะแยกเชื้อและตรวจระบุเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบในน้ำนมรายเต้านม.....18

2. การตรวจวัดจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมรายเต้านม.....20

3. การเตรียมตัวอย่างน้ำนมซีรั่ม และตัวอย่างซีรั่มสำหรับการวิเคราะห์.....20

การศึกษาที่ 2 การผลิต Hyperimmune serum ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Streptococcus uberis* ในลูกโค.....22

การเตรียมวัคซีน.....22

บทที่ **หน้า**

การเตรียมสัตว์ทดลอง.....22
การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *S. uberis* การตรวจร่างกาย และการเก็บตัวอย่างเลือด...22
การศึกษาที่ 3 การตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Streptococcus uberis* ด้วยวิธี ELISA.....24
การเตรียมแอนติเจนเคลือบผิวเพลท.....24
การเคลือบผิวเพลท.....24
การทดสอบหาระดับเจือจางที่เหมาะสมของตัวอย่างซีรั่ม น้ำนม และ conjugate.....24
การตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis*.....25
การศึกษาที่ 4 การตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกายในการต่อต้านเชื้อ *Streptococcus uberis*.....26
การเตรียมเชื้อ *S. uberis* ที่ใช้ตรวจสอบ.....26
การแยกนิวโทรฟิล.....26
การตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิล.....26
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....28

4 ผลการศึกษา.....29
การศึกษาที่ 1 การติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมในแม่โครีดนม.....29
การศึกษาที่ 3 การตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Streptococcus uberis* ด้วยวิธี ELISA.....31
การศึกษาที่ 4 การตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกายในการต่อต้านเชื้อ *Streptococcus uberis*.....35

5 วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา.....39

รายการอ้างอิง.....48

ภาคผนวก.....58
ภาคผนวก ก การเก็บตัวอย่างและการตรวจตัวอย่างน้ำนมทางห้องปฏิบัติการ.....59
ภาคผนวก ข การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus uberis* สำหรับขั้นตอนการเตรียมวัคซีน การเคลือบผิวเพลท และการทำงานของนิวโทรฟิล.....70
ภาคผนวก ค วิธีการ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....78
ภาคผนวก ง การตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิล.....81

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....84

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การทำงานของอิมมูโนโกลบูลินภายในเต้านม.....13
ตารางที่ 2 ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินที่มีอยู่ในซีรั่ม น้ำนม และนมน้ำเหลืองของโคปกติ.....13
ตารางที่ 3 แนวทางกำหนดความมีนัยสำคัญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนม ของแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบ.....19
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ย log ของจำนวนเซลล์โซมาติกของแม่โคในการศึกษานี้.....29
ตารางที่ 5 สายพันธุ์เชื้อ *S. uberis* ที่ติดเชื้อเข้าเต้านม.....30
ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมและซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมและแม่โคที่มีเต้านมปกติด้วยวิธี ELISA ที่มีแอนติเจนเคลือบผิวเพลทเชื้อ *S. uberis* CM isolate และ SCM isolate.....31
ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate และได้รับน้ำเกลือ (saline) ด้วยวิธี ELISA ที่มีแอนติเจนเคลือบผิวเพลทเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate.....33
ตารางที่ 8 การเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ของนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติ.....35
ตารางที่ 9 การฆ่าเชื้อ *S. uberis* ของนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติ.....36
ตารางที่ 10 การเก็บกินเชื้อ และฆ่าเชื้อ *S. uberis* ของนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate.....36
ตารางที่ 11 สรุปความสามารถของนิวโทรฟิลในการเก็บกินและฆ่าเชื้อ *S. uberis* ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม (*S. uberis* IMI) และแม่โครีดที่มีเต้านมปกติ (healthy) และซีรั่มของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate (hyperimmune serum) และลูกโคที่ได้รับน้ำเกลือ (saline).....38

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การเกิดเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรีย.....5
ภาพที่ 2 นิวโทรฟิลที่พบในเลือดของโคภายใต้ light microscope……..……10
ภาพที่ 3 นิวโทรฟิลที่พบในเลือด และในน้ำนมภายใต้ scanning electron microscope……10
ภาพที่ 4 โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินจี.....12
ภาพที่ 5 กลไกการทำงานของนิวโทรฟิล และ IgG_2 ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่เต้านม.....14
ภาพที่ 6 การย้อมแกรมเพื่อวินิจฉัยแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบ.....64

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เต้านมอักเสบ (mastitis) เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจของฟาร์มผู้เลี้ยงโคนม โดยพบว่าเป็นปัญหาสุขภาพสูงถึง 21.01 เปอร์เซ็นต์ของปัญหาสุขภาพทั้งหมด (ชัยเทพ พูลเขตต์ และคณะ, 2001) ผลกระทบต่อการลดลงของปริมาณผลผลิตและคุณภาพของน้ำนม ทำให้ต้นทุนการผลิตน้ำนมสูงขึ้นจากการเสียค่าใช้จ่ายในการรักษา การทิ้งน้ำนมที่มีการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะ และการคัดทิ้งโคก่อนเวลาอันสมควรเพิ่มขึ้น (Lightner et al., 1988; Miller et al., 1993)

การอักเสบของเต้านมโคส่วนใหญ่มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่มาจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ *Streptococcus uberis* *Escherichia coli* และ *Streptococcus dysagalactiae* (Barkema et al., 1999) จากรายงานของ Jayarao และคณะ (1999) พบโคที่มีเต้านมอักเสบเกิดจากการติดเชื้อ *S. uberis* เท่ากับ 12-16 เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อปี ซึ่งมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์เป็นแบบไม่แสดงอาการ นอกจากนี้ Roberson และคณะ (2004) ตรวจพบเชื้อ *S. uberis* จากโคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ 29.1 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาในประเทศไทยพบว่า *S. uberis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เพาะแยกได้มากที่สุดจากเต้านมอักเสบ (กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และสุกุมา สามงามนิ่ม, 2004) โดยมักพบการติดเชื้อในช่วงระยะพักการรีดนมเท่ากับ 32.3 เปอร์เซ็นต์ ช่วงใกล้คลอดเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ และระยะรีดนมช่วงต้นเท่ากับ 42.6 เปอร์เซ็นต์ (Smith et al., 1985; Todhunter et al., 1995; Oliver et al., 2004) ซึ่งการพบการติดเชื้อสูงในช่วงระยะการรีดนมช่วงต้นทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจของฟาร์มสูงขึ้นมาก เชื้อชนิดนี้สามารถแพร่กระจายภายในเต้านมได้อย่างรวดเร็ว ผลการศึกษาภายนอกร่างกายสัตว์พบว่าเชื้อ *S. uberis* สามารถยึดเกาะเซลล์เยื่อบุเต้านมและดำรงชีพอยู่ภายในเซลล์เยื่อบุเต้านมได้จึงทำให้เกิดการติดเชื้อที่ยาวนาน และพัฒนาเป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง (Phuektes et al., 2001) นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อได้ในท่อน้ำนม เซลล์ผลิตน้ำนม และภายในเซลล์อื่นๆในเต้านมด้วย เช่น ภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ (Thomas et al., 1994) และภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล เป็นต้น (Pedersen et al., 2003)

โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรังจากการติดเชื้อ *S. uberis* พบว่าในน้ำนมมีจำนวนเซลล์โซมาติกสูงขึ้นซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (De Hass et al., 2004; Oviedo-Boyso et al., 2007) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเต้านมที่มีจำนวนนิวโทรฟิลอยู่สูงนั้นกลับไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ซึ่งอาจเป็นเพราะนิวโทรฟิลในเต้านมมีความสามารถในการเก็บกินเชื้อ

ได้น้อย (Guidry et al. 1993) เนื่องจากในเต้านมมีปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินจีที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงเชื้อให้นิวโทรฟิลเข้าไปเก็บกิน (opsonized) อยู่ในระดับต่ำ (Newbould, 1967) นอกจากนี้นิวโทรฟิลในเต้านมมีเอนไซม์ที่มีความสามารถในการทำลายเชื้อต่ำ (Prin-Mathieu et al., 2002) ตลอดจนความแตกต่างระหว่างตัวโคและระหว่างเต้านม (Paape et al., 1978) หรือความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อ *S. uberis* (Leigh et al., 1990) มีผลต่อความสามารถในการเก็บกินเชื้อของนิวโทรฟิลทั้งสิ้น

นอกจากนี้เชื้อ *S. uberis* ยังตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาเต้านมอักเสบได้ไม่ดีนัก โดยพบว่าอัตราการหาย (bacteriological cure) จากการติดเชื้อ *S. uberis* ในเต้านม ตามลักษณะการให้ยา ความถี่ของการให้ยา และการใช้ยาร่วมกันมีตั้งแต่ 64-80 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาเต้านมอักเสบจากเชื้อ *S. uberis* ยังเป็นวิธีการที่ได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากตัวเชื้อเองหรือพยาธิสภาพของเต้านมอันเกิดจากการติดเชื้อซึ่งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Pedersen et al., 2003) นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาเต้านมอักเสบ เช่น penicillin ampicillin ceftiofur neomycin และ dihydrostreptomycin ยังมีฤทธิ์ในการกดการทำงานของนิวโทรฟิลอีกด้วย (Hoeben et al, 1997; 1998) แม้แต่การพยายามพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมในปัจจุบันนี้พบว่าวัคซีนยังไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ดีนัก เนื่องจากเชื้อ *S. uberis* ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบมีหลากหลายสายพันธุ์ และพบว่าวัคซีนที่ศึกษาไม่มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อข้ามระหว่างสายพันธุ์ได้ (Finch et al., 1994; Leigh, 2000)

ปัจจุบันแม้ว่าฟาร์มโคนมจะพยายามป้องกันปัญหาเต้านมอักเสบโดยการใช้มาตรการต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการรีดนมตามหลักสุขศาสตร์ การจุ่มเต้านมด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อทันทีหลังการรีดนม การใช้ยาปฏิชีวนะรักษาโคที่แสดงอาการเต้านมอักเสบ การใช้ยาปฏิชีวนะในช่วงพักการรีดนม ตลอดจนการคัดทิ้งโคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรังแล้วก็ตาม แต่ก็ยังพบโคที่มีการติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อมเข้าเต้านมมากขึ้นในขณะที่การแพร่เชื้อจากเต้านมที่ติดเชื้อไปสู่เต้าอื่นๆมีอัตราลดลงนั้น ชี้ให้เห็นได้ว่ามาตรการดังกล่าวยังไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันเต้านมอักเสบที่มีสาเหตุมาจากสิ่งแวดล้อมได้ (Oliver and Mitchell, 1984; Smith et al., 1985; Jayarao et al., 1999; Denis et al., 2006)

จากมาตรการการควบคุมป้องกันเต้านมอักเสบในปัจจุบันตลอดจนการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะยังไม่สามารถลดปัญหาเต้านมอักเสบที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *S. uberis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีแนวโน้มเป็นการอักเสบอย่างเรื้อรังเนื่องจากมีการติดเชื้อดังกล่าวเป็นระยะเวลายาวนาน ดังนั้นแนวคิดในการใช้ภูมิคุ้มกันในการรักษาเต้านมอักเสบจากเชื้อ *S. uberis* โดยการให้อิมมูโนโกลบูลินจีเข้าเต้านม เพื่อให้เต้านมมีปริมาณอิมมูโนโกลบูลินจีที่สามารถ

จับกับเชื้อได้อย่างเพียงพอจึงน่าจะเป็นอีกแนวทางในการเพิ่มความสามารถในการเก็บกินเชื้อแบคทีเรียของนิวโทรฟิลให้ดีมากขึ้น เพื่อเป็นการทำให้เต้านมสามารถกำจัดเชื้อให้หมดไป และยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง เพื่อช่วยลดอัตราการคัดทิ้งโคที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของฟาร์ม ทั้งยังช่วยลดปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนม และสามารถลดต้นทุนการผลิตที่เกิดจากการรักษาเต้านมอักเสบ ดังนั้นข้อมูลด้านผลของระดับของอิมมูโนโกลบูลินจี และความสามารถของอิมมูโนโกลบูลินจีต่อการทำงานของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกายสัตว์ จึงมีความจำเป็นในการพัฒนาการรักษาโคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมโคด้วยอิมมูโนโกลบูลินจีต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจวัดระดับของอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ในน้ำนม และซีรั่มจากโคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* โดยธรรมชาติ โคที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และโคปกติ
2. เพื่อวิเคราะห์ความสามารถของของอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มของโคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* โดยธรรมชาติ โคที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และโคปกติว่ามีผลต่อการทำงานของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกายอย่างไร

คำสำคัญ

อิมมูโนโกลบูลิน จี	Immunoglobulin G
การเก็บกินเชื้อ	Phagocytosis
การฆ่าเชื้อ	Killing
นิวโทรฟิล	Neutrophil
สเตรปโตคอกคัส ยูเบอริส	*Streptococcus uberis*
เต้านมอักเสบในโค	Bovine mastitis

คำถามสำหรับการวิจัย

อิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมและซีรั่มของโคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* โดยธรรมชาติ โคที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และโคปกติมีผลต่อการทำงานของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกายได้แตกต่างกันหรือไม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถตรวจวัดระดับของอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ในน้ำนมและซีรั่มจากโคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* โดยธรรมชาติ โคที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และโคปกติได้
2. ทราบถึงความสามารถของอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มจากโคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* โดยธรรมชาติ โคที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และโคปกติต่อการทำงานของนิวโทรฟิลได้
3. สามารถผลิต hyperimmune serum ที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ได้
4. เพื่อเป็นข้อมูลในการตัดสินใจในการพัฒนาวิธีการรักษาเต้านมอักเสบแบบเรื้อรังในโคโดยการเพิ่มการทำงานของนิวโทรฟิลด้วยอิมมูโนโกลบูลินจี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

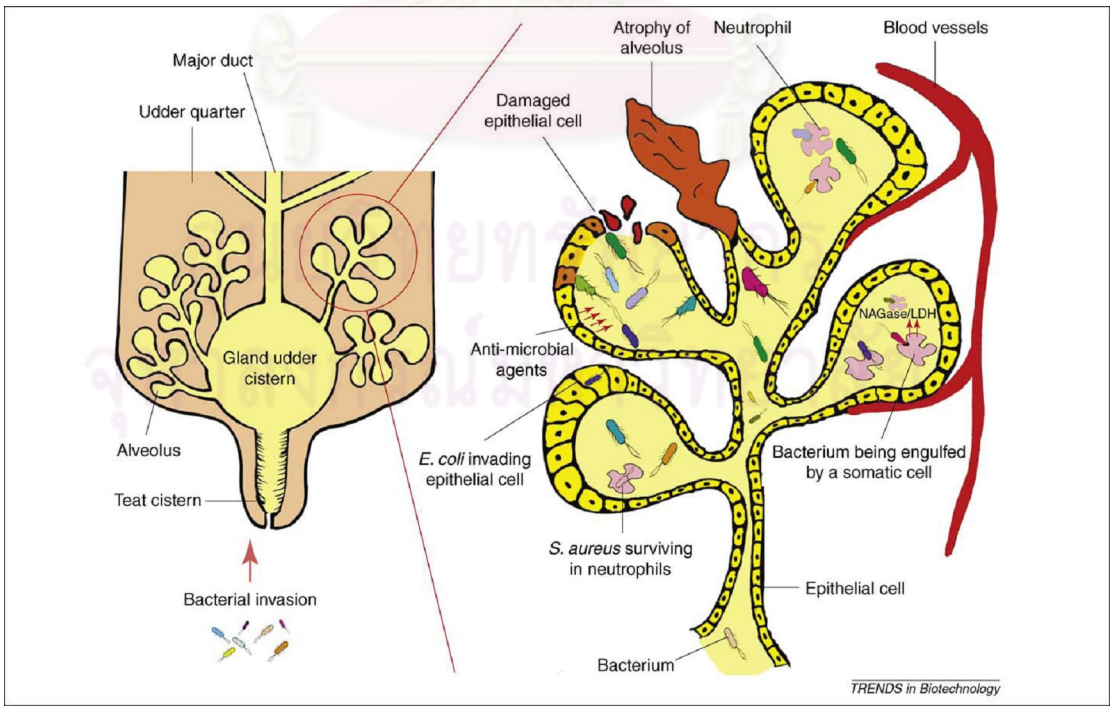
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เต้านมอักเสบจากการติดเชื้อ *Streptococcus uberis*

เต้านมอักเสบ (mastitis) เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจของฟาร์มผู้เลี้ยงโคนม โดยพบว่าเป็นปัญหาสุขภาพสูงถึง 21.01 เปอร์เซ็นต์ของปัญหาสุขภาพทั้งหมด (ชัยเทพ พูลเขตต์ และคณะ, 2001) ผลกระทบต่อการลดลงของปริมาณผลผลิตและคุณภาพของน้ำนม ทำให้ต้นทุนการผลิตน้ำนมสูงขึ้นจากการเสียค่าใช้จ่ายในการรักษา การทิ้งน้ำนมที่มีการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะ และการคัดทิ้งโคก่อนเวลาอันสมควรเพิ่มขึ้น (Lightner et al., 1988; Miller et al., 1993)

เต้านมอักเสบเป็นกระบวนการอักเสบที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่สามารถติดต่อระหว่างเต้านมสู่เต้านมหรือเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมแล้วติดต่อเข้าสู่เต้านม (Oviedo-Boyso et al., 2007) ดังแสดงในภาพที่ 1 นอกจากนี้กลไกการป้องกันตนเองของโค และปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม ตลอดจนการจัดการฟาร์มเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเต้านมอักเสบด้วย (Suriyasathaporn et al., 2000)

ภาพที่ 1 การเกิดเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (Viguier et al., 2009)



การเกิดเต้านมอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อโดยทั่วไปสามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การบุกรุกของเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่เต้านม โดยเชื้อผ่านเข้าทางรูหัวนม (teat canal)

ขั้นตอนที่ 2 การติดเชื้อในเต้านม โดยเชื้อแบคทีเรียเกาะยึดที่บริเวณ gland cistern มีการแบ่งตัวและแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อเต้านม

ขั้นตอนที่ 3 กระบวนการตอบสนองด้วยการอักเสบของเต้านม การอักเสบของเต้านมที่เกิดขึ้น ทำให้จำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมเพิ่มขึ้น โดยพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลเป็นเซลล์โซมาติกส่วนใหญ่ที่พบในน้ำนม (Oviedo-Boyso et al., 2007)

เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดเต้านมอักเสบแบ่งเป็น 2 ประเภท (Barkema et al., 1999)

1. เชื้อแบคทีเรียที่สามารถติดต่อจากเต้านมสู่เต้านมระหว่างโคได้ (contagious bacteria) เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae*
2. เชื้อแบคทีเรียที่ติดต่อมาจากสิ่งแวดล้อมรอบตัวสัตว์ (environmental bacteria) เช่น *Streptococcus uberis Escherichia coli* และ *Streptococcus dysagalactiae*

โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Streptococci ที่สามารถทำให้เกิดเต้านมอักเสบได้ทั้งแบบเฉียบพลันหรือแบบเรื้อรังพบได้หลายชนิด ได้แก่ *S. uberis* *S. agalactiae* และ *S. dysgalactiae* แต่ทั้งนี้พบว่าเชื้อ *S. uberis* เป็นเชื้อจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อเข้าเต้านม (Leigh, 1999) Jayarao และคณะ (1999) รายงานพบอัตราการเกิดเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *S. uberis* เท่ากับ 12-16 เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อปี สำหรับในประเทศไทยเชื้อ *S. uberis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเพาะแยกได้มากที่สุดจากตัวอย่างน้ำนมโคที่เป็นเต้านมอักเสบ (กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และสุกุมา สามงามนิ่ม, 2004) Todhunter และคณะ (1995) รายงานอุบัติการณ์การเกิดเต้านมอักเสบจากเชื้อ *S. uberis* ในช่วงระยะพักการรีดนมเท่ากับ 32.3 เปอร์เซ็นต์ ช่วงใกล้คลอดเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ และระยะรีดนมช่วงต้นเท่ากับ 42.6 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Oliver และคณะ (2004) พบว่าการติดเชื้อ *S. uberis* ในช่วงระยะแห้งนมและช่วงใกล้คลอดจะทำให้โคหลังคลอดแสดงอาการเต้านมอักเสบทั้งแบบแสดงอาการหรือแบบไม่แสดงอาการ ทั้งนี้สามารถพบเชื้อนี้ได้ที่บริเวณผิวหนัง ระบบสืบพันธุ์ ระบบทางเดินอาหาร ต่อมทอนซิลของโค (Cullen and Little, 1969) สิ่งปูรองนอน เช่น ฟาง และมูลโค (Ward et al, 2002) โดยมีสมมติฐานว่าทั้งสิ่งปูรองนอนและมูลโคเป็นแหล่งของเชื้อ *S. uberis* ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อเข้าสู่เต้านม การศึกษาภายนอกร่างกายสัตว์พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการเกาะและเข้าสู่ภายในของเซลล์เยื่อบุของเต้านมได้ นอกจากนี้เชื้อยัง

สามารถแบ่งตัวและมีชีวิตอยู่ภายในเซลล์เยื่อบุของเต้านมได้เป็นเวลานาน โดยไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อแบบรุนแรงและความเสียหายของเซลล์เยื่อบุเต้านม ดังนั้นจึงทำให้เกิดการติดเชื้อที่ยาวนานและพัฒนาเป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง เนื่องจากเชื้อสามารถหลบหลีกการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันของเต้านมและจากยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาได้ (Mathews et al., 1994; Oliver et al, 1998; Phuektes et al., 2001; Tamilselvam et al, 2006) เชื้อชนิดนี้มีความสามารถแพร่กระจายภายในเต้านมได้อย่างรวดเร็วจึงพบเชื้อได้ในท่อน้ำนม เซลล์ผลิตน้ำนม ภายในเซลล์แมคโครฟาจ (Thomas et al., 1994) และภายในเซลล์นิวโทรฟิล (Pedersen et al., 2003) การศึกษาการทำให้โคติดเชื้อ *S. uberis* พบว่าโคแสดงอาการเต้านมอักเสบแบบเฉียบพลันตั้งแต่ 4 ชม. และพบว่ามีจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมสูงขึ้นภายใน 7 ชม. หลังการติดเชื้อ เกิดการอักเสบบวม มีการสร้าง fibrin ทำให้เกิดการอุดตันภายในท่อน้ำนม เมื่อน้ำนมไม่สามารถไหลผ่านไปได้จึงทำให้มีการคั่งของน้ำนมและเชื้อแบคทีเรียอยู่ในภายในเต้านมเป็นจำนวนมากจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ในเต้านมได้เป็นระยะเวลานาน การเกิดพยาธิสภาพดังกล่าวจึงมีผลทำให้ประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาลดลง (Pedersen et al., 2003) เชื้อ *S. uberis* แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการทำให้เกิดเต้านมอักเสบต่างกัน (Hill, 1988) ตลอดจนเชื้อ *S. uberis* มี antiphagocytic factor เช่น hyarulonic acid capsule neutrophil toxin M-like protein และ R-like protein ซึ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียมีความแตกต่างในด้านการต้านทานต่อการถูกเก็บกินของนิวโทรฟิล (Leigh et al., 1990; Oliver et al., 1998) รายงานของ Thomas และคณะ (1994) สอดคล้องกับรายงานของ Rambeaud และคณะ (2003) ที่พบเชื้อ *S.uberis* จำนวนน้อยที่อยู่ภายในเซลล์นิวโทรฟิลแสดงให้เห็นว่านิวโทรฟิลที่เข้ามายังเต้านมไม่สามารถกำจัดเชื้อนี้ออกไปได้ ซึ่งปัจจุบันก็ยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดถึงบทบาทความสำคัญของนิวโทรฟิลในการกำจัดเชื้อนี้ออกจากเต้านม (Thomas et al., 1994; Pedersen et al., 2003; Rambeaud et al., 2003)

อุบัติการณ์การเกิดเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการจากการติดเชื้อ *S. uberis* มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ เช่น โรงเรือน อาหาร ประสิทธิภาพของเครื่องรีดนม ลำดับท้อง ระยะการให้นม ตลอดจนประวัติการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมด้วยเชื้อ *S. aureus* หรือ *S. uberis* ที่ผ่านมา (Barkema et al., 1999; Jayarao et al., 1999; Zadoks et al., 2001)

มาตรการต่างๆ เพื่อควบคุมและป้องกันการเกิดเต้านมอักเสบในฟาร์ม ไม่ว่าจะเป็นการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อจุ่มเต้านมภายหลังรีดนม การใช้ยาปฏิชีวนะ หรือการคัดทิ้งโคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง แต่ก็พบว่ามาตรการเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการเป็นวิธีการควบคุมป้องกันเต้านมอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่แพร่จากเต้านมสู่เต้านม เช่น *S. agalactiae* และ *S. aureus* ได้เท่านั้นแต่ไม่สามารถควบคุมและป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่มาจากสิ่งแวดล้อมได้ดี ไม่ว่าจะเป็นเชื้อกลุ่ม *Streptococcus* spp. หรือเชื้อแบคทีเรียแกรมลบก็ตาม ดังจะเห็นได้

จากอัตราการเกิดเต้านมอักเสบในฟาร์มที่ใช้มาตรการควบคุมเต้านมอักเสบเหล่านี้มีความชุกของการติดเชื้อจากเชื้อแบคทีเรียที่สามารถติดต่อระหว่างเต้านมสู่เต้านมลดลงในขณะที่การติดเชื้อจากเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมแล้วติดต่อเข้าสู่เต้านมกลับมีสัดส่วนเพิ่มขึ้น (Oliver and Mitchell, 1984; Smith et al., 1985) นอกจากนี้เชื้อ *S. uberis* ยังตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาเต้านมอักเสบได้ไม่ดีนักขึ้นกับลักษณะการให้ยา ความถี่ของการให้ยา และการใช้ยาร่วมกันมีตั้งแต่ 64-80 เปอร์เซนต์ โดยพบว่าหากฉีดยา penethamate เข้ากล้ามเนื้อมีอัตราการหายของเต้านมอักเสบเท่ากับ 74 เปอร์เซ็นต์ (Serieys et al, 2005) หรือยา penicillin-dihydrostreptomycin มีอัตราการหายของเต้านมอักเสบเท่ากับ 73 เปอร์เซ็นต์ (Hillerton and Kliem, 2002) การรักษาด้วยการสอดยาที่มีส่วนผสมของ ampicillin และ cloxacillin เข้าเต้านม พบว่ามีอัตราการหายของเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อนี้เพียง 71 เปอร์เซ็นต์ (Serieys et al, 2005) จะเห็นได้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาเต้านมอักเสบจากเชื้อ *S. uberis* ยังเป็นวิธีการที่ได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากตัวเชื้อเองหรือพยาธิสภาพของเต้านมอันเกิดจากการติดเชื้อซึ่งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Pedersen et al., 2003) นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาเต้านมอักเสบ เช่น penicillin ampicillin ceftiofur neomycin และ dihydrostreptomycin ยังมีฤทธิ์ในการกดการทำงานของนิวโทรฟิลอีกด้วย (Hoeben et al, 1997; 1998)

การพยายามพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมในปัจจุบันนี้พบว่าวัคซีนยังไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ดีนัก แม้ว่าเมื่อทำวัคซีนแล้วระดับของ IgG_2 ในซีรั่มจะเพิ่มสูงขึ้นก็ตาม แต่กลับไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ IgG_2 ในน้ำนม และ IgG_2 ที่พบนั้นไม่มีความสามารถร่วมกับนิวโทรฟิลในการทำลายเชื้อชนิดนี้ได้ เนื่องจากเชื้อ *S. uberis* ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบมีหลากหลายสายพันธุ์ และพบว่าวัคซีนที่ศึกษาไม่มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อข้ามระหว่างสายพันธุ์ได้ (Finch et al., 1994; Leigh, 2000) ดังนั้นการจะควบคุมการเกิดเต้านมอักเสบที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *S. uberis* ให้ประสบผลสำเร็จจึงจำต้องมีความเข้าใจถึงพยาธิกำเนิดของการก่อโรค ซึ่งปัจจุบันนี้กลไกการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้ก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ในการควบคุมเชื้อชนิดนี้จึงน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของเต้านม (Rambeaud et al., 2003) โดยอาศัยหลักการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunomodulation) เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของกลไกการป้องกันตนเอง เพื่อทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *S. uberis* ออกจากเต้านม โดยไม่ก่อให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อเต้านม (Sordillo and Streicher, 2002) เพื่อเป็นการลดความสูญเสียผลผลิตน้ำนมอันเกิดจากจำนวนเซลล์ผลิตน้ำนมลดลง

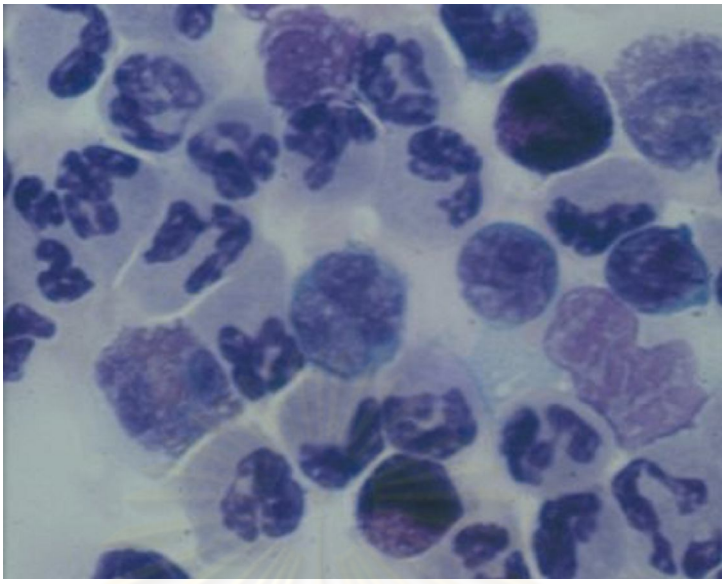
ระบบภูมิคุ้มกันของเต้านม

ระบบภูมิคุ้มกันของเต้านมทำหน้าที่ในการป้องกัน และต้านทานการติดเชื้อ โดยเป็นการทำงานร่วมกันทั้งส่วนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน กลไกการป้องกันตนเองของเต้านมจะมีการทำงานร่วมกันทั้งกลไกการป้องกันทางทางด้านกายวิภาคของเต้านม (anatomic factor) เซลล์ต่างๆ (cellular factor) และสารละลายของเซลล์ (soluble faactor) ซึ่งกลไกเหล่านี้จะมีผลต่อการต้านทานหรือความไวต่อการติดเชื้อของเต้านมโดยตรง (Oviedo-Boyso et al., 2007)

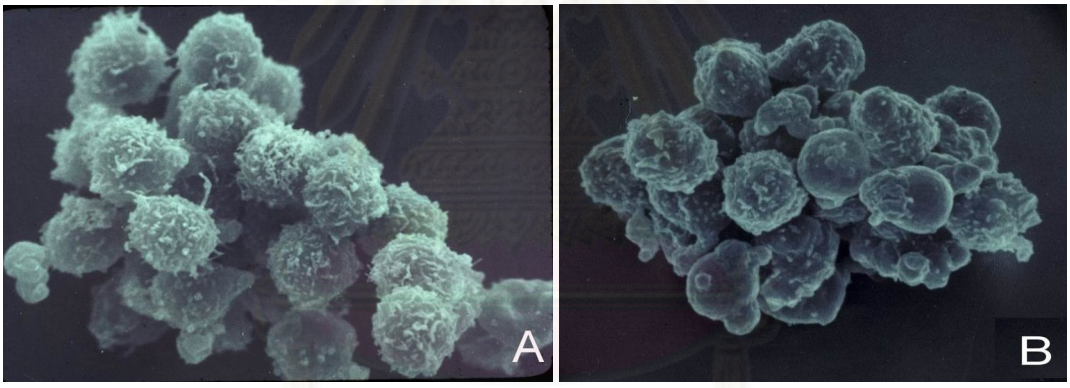
ระบบภูมิคุ้มกันของเต้านมแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) โดยที่ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเป็นกลไกแรกที่จะตอบสนองในช่วงแรกของการติดเชื้อ การตอบสนองจะเกิดขึ้นเมื่อระบบภูมิคุ้มกันได้รับตัวกระตุ้น โดยที่ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะนี้จะไม่มีการจดจำตัวกระตุ้น ดังนั้นการตอบสนองที่เกิดขึ้นครั้งต่อไปจึงไม่จำเป็นต้องเกิดจากการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวเดิม ถ้าระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะนี้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เชื้อแบคทีเรียส่วนมากก็จะถูกกำจัดออกไปจากเต้านมได้ภายในระยะเวลาอันสั้น กล่าวคือ หากเชื้อแบคทีเรียสามารถผ่าน teat canal ซึ่งมี sphincter muscle และ keratin เป็นด่านแรกของกลไกการป้องกันตนเองแบบไม่จำเพาะได้แล้ว ต่อมาเต้านมจะมีการตอบสนองเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกไป โดยมีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล และแมคโครฟาจคอยทำหน้าที่เก็บกินเชื้อ และทำลายเชื้อแบคทีเรีย แต่ถ้าระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะไม่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ก็จะมีการกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะออกมาทำงานในขั้นต่อไป (Sordillo and Streicher, 2002)

เมื่อเกิดการติดเชื้อเข้าเต้านม (intramammary infection; IMI) ร่างกายจะมีการสร้าง immune effector ออกมาอย่างต่อเนื่อง เพื่อส่งเข้ามายังเต้านมที่มีการติดเชื้อ (Burton and Erskine, 2003) immune effector ที่มีความสำคัญในการต่อสู้กับเชื้อแบคทีเรียในเต้านม ได้แก่ นิวโทรฟิล และ opsonizing immunoglobulin ซึ่งเป็นชนิดอิมมูโนโกลบูลินจี (Harmon, 1994; Kehrli and Shuster, 1994) โดยปกติในโครีดนมจะมีจำนวนนิวโทรฟิลเท่ากับ $2x10^{11}$ เซลล์ต่อมล. ซึ่งจะอยู่ในกระแสเลือดเป็นจำนวนครึ่งหนึ่ง และส่วนที่เหลืออยู่ที่ไขกระดูกและยึดเกาะอยู่ที่ผนังหลอดเลือด เมื่อมีการติดเชื้อเข้าเต้านมจะมีจำนวนนิวโทรฟิลในน้ำนมเท่ากับ $4x10^{6}$ เซลล์ต่อมล. (Paape et al., 1963) โดยการเคลื่อนย้ายนิวโทรฟิลที่อยู่ในกระแสเลือดไปยังเนื้อเยื่อเต้านมเป็นผลทำให้จำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมสูงขึ้น (Oviedo-Boyso et al., 2007)

ภาพที่ 2 นิวโทรฟิลที่พบในเลือดของโค ภายใต้ light microscope (Paape et al., 2003)



ภาพที่ 3 นิวโทรฟิลที่พบในเลือด (A) และในน้ำนม (B) ภายใต้ scanning electron microscope (Paape et al., 2003)



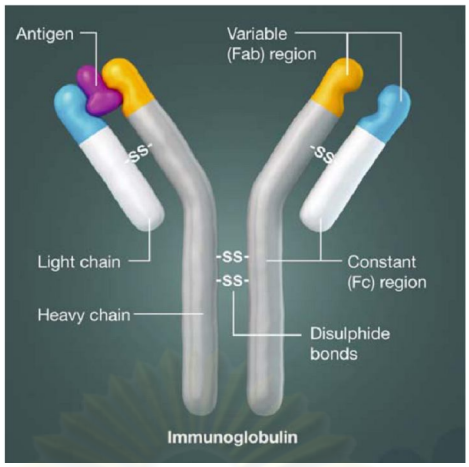
นิวโทรฟิลเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีความสำคัญในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่เข้ามายังเต้านม มีการสร้างที่ bone marrow จากนั้นจึงถูกส่งเข้ากระแสเลือด และเดินทางผ่านผนังเส้นเลือดเข้าสู่เต้านม เพื่อทำหน้าที่ในการเก็บกินเชื้อแบคทีเรีย นิวโทรฟิลเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสเป็นลักษณะ segmented ภายใน cytoplasm มีลักษณะ clear และมี granule อยู่มากมาย ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่ง granule ที่พบในเซลล์นิวโทรฟิลแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ azulophilic granule ได้แก่ myeloperoxidase secondary granule ได้แก่ gelatinase และ lactoferrin และ third novel granule ได้แก่ bactenectins และ β-defensin ซึ่งมีความสำคัญในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เก็บสะสมไกลโคเจนเพื่อเป็นพลังงาน ผิวเซลล์ของนิวโทรฟิลมีลักษณะเป็นแบบ convulated ที่ช่วยในการเก็บกินเชื้อ ซึ่งนิวโทรฟิลที่พบในเลือดมีจำนวน 95 เปอร์เซ็นต์ที่มีลักษณะเซลล์เป็น spherical และมี convulated cell membrane ที่สามารถเปลี่ยนเป็น protruding pseudopods

ได้ ในขณะที่นิวโทรฟิลในน้ำนมมีจำนวนเพียง 37 เปอร์เซ็นต์ที่ลักษณะเป็น pseudopod formation ได้ ดังแสดงในภาพที่ 3 นิวโทรฟิลมี receptor บนผิวเซลล์อยู่มากมายที่ทำหน้าที่ตรวจจับ chemoattractant ในการเรียกให้นิวโทรฟิลเคลื่อนที่มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ และมี receptor ที่ใช้จับกับอิมมูโนโกลบูลิน และ complement เพื่อช่วยในการเก็บกินและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Paape et al., 2003)

Guidry และคณะ (1983) ศึกษาการตอบสนองของอิมมูโนโกลบูลินจีต่อการได้รับ endotoxin ของเชื้อ *E. coli* โดยพบระดับ IgG_1 และ IgG_2 ก่อนการตอบสนองของนิวโทรฟิลเป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง โดยปริมาณ IgG_1 และ IgG_2 ในน้ำนมจะมีระดับสูงสุดภายใน 4 ชั่วโมงหลังการได้รับเชื้อซึ่งการที่นิวโทรฟิลมีการตอบสนองในเวลาที่ต่างกันกับ opsonizing immunoglobulin นั้นเป็นผลอันเนื่องมาจาก opsonizing immunoglobulin ต้องจับกับเชื้อแบคทีเรียก่อนเพื่อให้นิวโทรฟิลสามารถทำการเก็บกินเชื้อแบคทีเรียเหล่านั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Burton and Erskine, 2003) โคที่มีจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมสูงจะนิวโทรฟิลมีความสามารถในการเก็บกินเชื้อแบคทีเรียลดลง (Rivas et al., 2006) ดังเช่นโคที่มีจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมต่ำกว่า 200,000 เซลล์ต่อมล. มีความเสี่ยงต่อการเกิดเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการอันเกิดจากการติดเชื้อ *E. coli* หรือ *S. uberis* น้อยกว่าโคที่มีจำนวนเซลล์โซมาติกสูง (Green et al., 2004) ทั้งนี้เป็นผลจากโคมีนิวโทรฟิลที่สามารถตอบสนองต่อการติดเชื้อเหล่านี้ได้เร็ว และสามารถเก็บกินเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพจนสามารถหายจากเต้านมอักเสบได้เองแม้ว่าจะมีจำนวนนิวโทรฟิลน้อยก็ตาม แต่ในขณะที่โคที่มีนิวโทรฟิลที่ไม่มีการตอบสนองหรือมีการตอบสนองช้าก็จะมีการชดเชยโดยการเพิ่มจำนวนนิวโทรฟิลให้มากขึ้นเพื่อให้สามารถกำจัดเชื้อออกไปจากเต้านม แต่ถ้ายังไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ก็จะเกิดการพัฒนาเป็นเต้านมอักเสบแบบกึ่งเฉียบพลัน แบบเฉียบพลัน หรือแบบรุนแรง จนสามารถพัฒนาเป็นแบบเรื้อรังได้ต่อไป ดังเช่น เต้านมอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ *E. coli* (Hill, 1981; Heyneman et al., 1990)

Hill และคณะ (1983) พบว่านิวโทรฟิลสามารถเก็บกินเชื้อ *E. coli* ได้มากขึ้นเมื่อมี IgG_2 เช่นเดียวกับรายงานของ Rainard และคณะ (1988) ที่พบว่า IgG_2 ช่วยให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อ *S. agalactiae* ได้ดีขึ้น และรายงานของ Miller และคณะ (1988) พบว่าการมี opsonizing immunoglobulin ที่จำเพาะต่อเชื้อทำให้อัตราการเก็บกินเชื้อ *S. aureus* ของนิวโทรฟิล (phagocytic rate) เพิ่มขึ้น จากการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการที่นิวโทรฟิลจะทำงานอย่างมีประสิทธิภาพได้นั้นต้องประกอบด้วยไปด้วยปริมาณของนิวโทรฟิล ช่วงเวลาที่นิวโทรฟิลเข้ามายังเต้านม และที่สำคัญคือต้องมีการทำงานร่วมกันกับ opsonizing immunoglobulin โดยเฉพาะ IgG_2

ภาพที่ 4 โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินจี (Gapper et al., 2007)



อิมมูโนโกลบูลินเป็นไกลโคโปรตีนประกอบด้วย 2 ส่วนคือ heavy polypeptide (H) chain และ light polypeptide (L) chain อย่างละ 2 chain โดยมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งแต่ละสายโพลีเปปไทด์ประกอบด้วย Fc และ Fab region โดยมีส่วนที่จำเพาะกับแอนติเจน (antigen binding site) อยู่ที่ส่วน Fab N-terminal region (Gapper et al., 2007) ดังภาพที่ 2 อิมมูโนโกลบูลินเป็น soluble effector ของการตอบสนองต่อการติดเชื้อของระบบภูมิคุ้มกัน โดยสามารถพบอิมมูโนโกลบูลินในน้ำนมทั้งสิ้น 4 ชนิด ได้แก่ IgG_1 IgG_2 IgA และ IgM (Guidry and Miller, 1986) ซึ่งมีหน้าที่การทำงานดังแสดงในตารางที่ 1 แต่อิมมูโนโกลบูลินที่มีบทบาทสำคัญในการจับกับเชื้อเพื่อให้นิวโทรฟิลเก็บกินได้คือ IgG_2 และ IgM (Guidry et al., 1993) ซึ่งการที่นิวโทรฟิลจะมีความสามารถเก็บกินเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพได้นั้นจำเป็นต้องอาศัยอิมมูโนโกลบูลินที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียโดยจับกับเชื้อแบคทีเรียผ่านทาง Fab receptor และสามารถจับกับ Fc receptor บนผิวของนิวโทรฟิลได้

ระดับอิมมูโนโกลบูลินจะเพิ่มสูงสุดในช่วงการสร้างนมน้ำเหลือง และช่วงที่เต้านมมีการอักเสบ ในน้ำนมปกติและนมน้ำเหลืองจะพบ IgG_1 เป็นหลัก โดยมาจากกระแสเลือดผ่านเข้ามาทางเซลล์สร้างน้ำนม ในขณะที่ IgG_2 จะเพิ่มขึ้นในกรณีเต้านมเกิดการอักเสบ (Guidry and Miller, 1986) โดยมาจากกระแสเลือดหรืออาจมีการสร้างจาก plasma cell ที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงแล้วจึงเคลื่อนย้ายไปยังเซลล์สร้างน้ำนม แม้ว่า IgG_2 ในน้ำนมจะมีปริมาณน้อยกว่าในกระแสเลือดถึง 184 เท่า (ตารางที่ 2) แต่ก็มีหน้าที่ที่สำคัญในการเป็นสาร opsonin ที่ใช้จับกับเชื้อ (Guidry and Miller, 1986) โดยมี affinity ต่อนิวโทรฟิล และมีความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเก็บกินเชื้อได้มากกว่า IgG_1 (Opdebeeck, 1982) Guidry และคณะ (1980) พบว่าปริมาณของ IgG_1 และ IgG_2 ที่ตอบสนองต่อการฉีดเชื้อ *S. aureus* เข้าเต้านมมีอัตราส่วนของปริมาณ IgG_1 และ IgG_2 ในน้ำนมเท่ากับ 7.0 ในขณะที่อัตราส่วนของปริมาณ IgG_1 และ IgG_2 ในซีรั่มเท่ากับ 0.7

แสดงถึงเต้านมที่มีการอักเสบแม้จะมีปริมาณ IgG_2 ในน้ำนมสูงขึ้น แต่ปริมาณของ IgG_2 ในน้ำนมก็ยังคงมีน้อยกว่าในกระแสเลือด

ตารางที่ 1 การทำงานของอิมมูโนโกลบูลินภายในเต้านม (Sordillo and Streicher, 2002)

ชนิดอิมมูโนโกลบูลิน	การทำงาน
IgG_1	- เปลี่ยนแปลงเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวการเก็บกินได้ดีขึ้น
IgG_2	- เปลี่ยนแปลงเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวการเก็บกินได้ดีขึ้น
IgA	- ตกตะกอนเพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรียเกาะกลุ่ม และทำลายสารพิษ
IgM	- อยู่ในกระบวนการ complement fixation เคลือบเชื้อเมื่อมี complement เพื่อให้นิวโทรฟิลมาเก็บกินเชื้อ - ตกตะกอนเชื้อ และทำลายสารพิษ

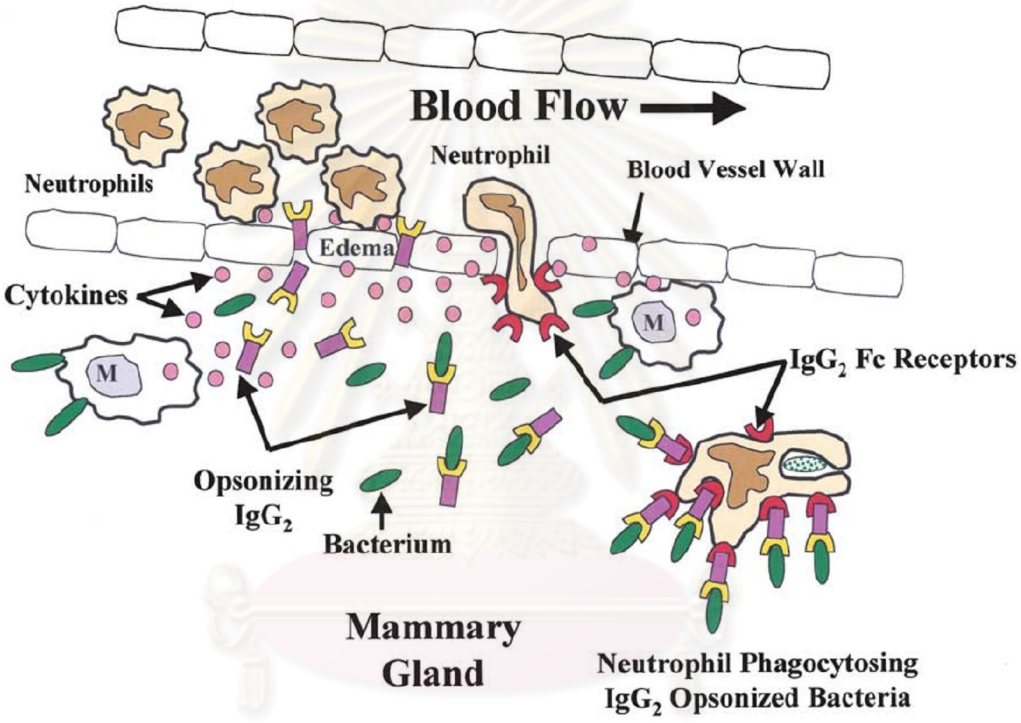
ตารางที่ 2 ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินที่มีอยู่ในซีรั่ม น้ำนม และนมน้ำเหลืองของโคปกติ (Farrell et al., 2004 cited in Butler and Kehrli, 2004)

ชนิดอิมมูโนโกลบูลิน	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	ซีรั่ม	น้ำนม	นมน้ำเหลือง
IgG_1	11.2	0.58	464
IgG_2	9.2	0.05	2.87
IgA	0.37	0.1	5.36
IgM	3.1	0.09	6.77

เมื่อเชื้อแบคทีเรียเข้าเต้านมจะมีการแบ่งตัวและผลิตสารที่สามารถเหนี่ยวนำแมคโครฟาจและเซลล์เยื่อบุผิวให้มีการหลั่ง chemoattractant ได้แก่ TNF-α IL-1 IL-8 elcosanoids oxygen radical และ acute phase protein (APP) เพื่อเรียก circulating immune effector โดยเฉพาะนิวโทรฟิลให้เข้ามายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ (Paape et al., 2003) นิวโทรฟิลที่อยู่ในกระแสเลือดจะเข้าเกาะกับผนังเส้นเลือด และเคลื่อนผ่านผนังเส้นเลือดมายังบริเวณที่ติดเชื้อ จากนั้นนิวโทรฟิลจะเข้าจับส่วน Fc region ของอิมมูโนโกลบูลินจีผ่านทาง Fc receptor ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากที่อิมมู

โนโกลบูลินจีได้จับกับเชื้อแบคทีเรียด้วยส่วน Fab region แล้ว จากนั้นนิวโทรฟิลเข้าเก็บกินเชื้อและฆ่าเชื้อผ่านทางระบบ oxygen-dependent และ oxygen-independent ดังแสดงในภาพที่ 5 หลังจากนั้นนิวโทรฟิลจะเกิด apoptosis และมีแมคโครฟาจมาเก็บกินนิวโทรฟิลต่อไป โดยเซลล์เยื่อบุผิวที่ตายและหลุดลอกออกมากับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ตายแล้วจะถูกปล่อยออกมากับน้ำนม จึงพบน้ำนมมีจำนวนเซลล์โซมาติกสูงขึ้น (Burton and Erskine, 2003)

ภาพที่ 5 กลไกการทำงานของนิวโทรฟิล และ IgG_2 ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่เต้านม (Burton and Erskine, 2003)



Newbould (1973) พบว่าผลของการให้อิมมูโนโกลบูลินจีภายนอกตัวสัตว์ ทำให้นิวโทรฟิลมีความสามารถในการเก็บกินเชื้อที่มีเชื้อ *S. aureus* ได้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม Leigh และ Field (1994) พบว่านิวโทรฟิลมีความสามารถในการฆ่าเชื้อ *S. uberis* ที่ไม่ได้เลี้ยงในอาหารที่มี casein hydrolysate โดยนิวโทรฟิลจะฆ่าเชื้อได้ดีเมื่อทำงานร่วมกับ hyperimmune serum ที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากการกระตุ้นแม่โคด้วยเชื้อ *S. uberis* แต่ทั้งนี้เชื้อ *S. uberis* ที่เลี้ยงในอาหารที่มี casein hydrolysate กลับมีความต้านทานต่อการถูกนิวโทรฟิลเก็บกิน ในขณะที่ Grant และ Finch (1996) พบว่าผลการศึกษาภายนอกร่างกายโดยกระตุ้นแมคโครฟาจด้วย IgG_1 และ IgG_2 สามารถทำให้แมคโครฟาจเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ที่ต้านทานต่อการถูกนิวโทรฟิลเก็บกินได้ดีขึ้น แต่แมคโครฟาจจะไม่สามารถเก็บกินเชื้อได้เลยถ้าปราศจาก IgG_1 และ IgG_2 แต่การศึกษาของ

Denis และคณะ (2006) กลับพบว่าแมคโครฟาจมีความสามารถในการเก็บกินและฆ่าเชื้อ *S. uberis* ได้ต่ำ เนื่องจากเชื้อที่นำมาศึกษาเป็นเชื้อที่ต่างสายพันธุ์กันกับเชื้อในการศึกษาของ Grant และ Finch (1996) นอกจากนี้เชื้อ *S. uberis* ยังสามารถกระตุ้นให้แมคโครฟาจเกิดขบวนการ Apoptosis ได้จึงทำให้แมคโครฟาจมีประสิทธิภาพการทำงานต่ำ จากการศึกษาข้างต้นทำให้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่านิวโทรฟิลหรือแมคโครฟาจที่เป็น immune effector ที่สำคัญต่อการเก็บกินและฆ่าเชื้อ *S. uberis* ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบได้ แต่อาจสรุปได้ว่าสายพันธุ์ของเชื้อ *S. uberis* มีผลต่อการเก็บกินและฆ่าเชื้อของนิวโทรฟิลและแมคโครฟาจได้แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ดีพบว่าอิมมูโนโกลบูลินจีเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้ทั้งนิวโทรฟิลและแมคโครฟาจสามารถทำหน้าที่เก็บกินและฆ่าเชื้อ *S. uberis* ได้มากขึ้น

โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรังจากการติดเชื้อ *S. uberis* มักตรวจพบว่ามีจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมสูง ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่ที่พบคือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (De Hass et al., 2004; Oviedo-Boyso et al., 2007) โดยพบจำนวนนิวโทรฟิลมากกว่า 90 เปอร์เซนต์ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด แต่จำนวนนิวโทรฟิลที่สูงนั้นกลับไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ และแม้แต่การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเองก็ยังไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควรอันเนื่องมาจากการดื้อยาของเชื้อ *S. uberis* หรือพยาธิสภาพของเต้านมอันเกิดจากการติดเชื้อ *S. uberis* (Pedersen et al., 2003) จากปัจจัยต่างๆทั้งข้อจำกัดที่ความสามารถของนิวโทรฟิลในการเก็บกินเชื้อและฆ่าเชื้อ และจำนวนของนิวโทรฟิลในน้ำนมที่มีน้อยกว่าในกระแสเลือด (Guidry et al., 1993; Prin-Mathieu et al., 2002) ร่วมกับการมีปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมมีระดับต่ำ (Newbould, 1967) ตลอดจนความแตกต่างระหว่างตัวโคและระหว่างเต้านม และความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อ *S. uberis* (Leigh et al., 1990) มีผลต่อการหายจากเต้านมอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. uberis* แนวคิดการให้นมน้ำเหลืองเข้าเต้านมในการรักษาเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อ *S. uberis* ก็อาจสามารถทำได้ แต่การไม่ทราบความจำเพาะที่แน่นอนของอิมมูโนโกลบูลินจีในนมน้ำเหลืองต่อเชื้อ *S. uberis* ส่งผลต่อประสิทธิภาพของนิวโทรฟิลในการกำจัดเชื้อ ในขณะที่ hyperimmune serum ที่ได้จากการกระตุ้นภูมิด้วยเชื้อ *S. uberis* จะมีอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ดังนั้นในการรักษาเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อ *S. uberis* ด้วย hyperimmune serum จึงน่าจะมีประสิทธิภาพมากกว่านมน้ำเหลือง ปัจจุบันยังเป็นที่ถกเถียงอยู่ว่านิวโทรฟิลเป็น immune effector หลักในการกำจัดเชื้อ *S. uberis* หรือไม่ (Thomas et al., 1994; Pedersen et al., 2003; Rambeaud et al, 2003) ดังนั้นการศึกษาว่านิวโทรฟิลมีบทบาทในการเก็บกินและฆ่าเชื้อ *S. uberis* ภายนอกร่างกายได้อย่างไรนั้นก็จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับกำหนดแนวทางในการควบคุมเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อ *S. uberis* โดยการให้อิมมูโนโกลบูลินจีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม เพื่อให้มีปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินจีมากพอในการกระตุ้นนิวโทร

ฟิลให้เกิดการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ได้มากขึ้น เพื่อกำจัดเชื้อให้หมดไปจากเต้านมได้ ซึ่งอาจพัฒนาเป็นแนวทางในการรักษาเต้านมอักเสบแบบเรื้อรังได้ โดยไม่ต้องทำการคัดทิ้งโคที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของฟาร์ม ทั้งยังไม่มียาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม และลดต้นทุนจากการรักษาเต้านมอักเสบได้

การศึกษานี้ดูผลของอิมมูโนโกลบูลินจีจากโคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* โดยธรรมชาติ โคที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และโคปกติต่อการทำงานของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกาย เพื่อนำผลไปประยุกต์ใช้ในการรักษาเต้านมอักเสบโดยให้อิมมูโนโกลบูลินจีเข้าเต้านม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีการศึกษา

การศึกษาผลของอิมมูโนโกลบูลินจีต่อการทำงานของนิวโทรฟิลในการต่อต้านเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบในห้องปฏิบัติการมีวิธีการศึกษาดังนี้

การศึกษาที่ 1 การติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมในแม่โครีดนม

เป็นการศึกษาแบบ observational study โดยเข้าไปเก็บตัวอย่างน้ำนมในแม่โครีดนม จำนวน 2 ครั้ง มีระยะเวลาห่างกัน 7 วัน ในฟาร์มโคนมที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ว่ามีความชุกและอุบัติการณ์การติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม (ศริญญา ฤกษ์อยู่สุข, 2008) โดยมีระยะเวลาในการเข้าไปศึกษาระหว่างเดือนพฤษภาคม 2551 ถึงเดือนกันยายน 2551 เพื่อคัดเลือกแม่โครีดนมที่มีคุณสมบัติดังนี้

1. แม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม (*S. uberis* IMI cows) เป็น case ซึ่งเป็นแม่โคที่ได้รับการตรวจยืนยันการติดเชื้อเข้าเต้านมอย่างน้อย 1 เต้า ด้วยชุดตรวจชีวเคมีจำแนกชนิดเชื้อ API 20 STREP® ว่าเป็นเชื้อ *S. uberis* ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนกัน และต้องมีเต้านมอย่างน้อย 1 เต้าที่ตรวจไม่พบเชื้อใดๆ เข้าเต้านมติดต่อกัน 2 ครั้ง เป็นระยะเวลาห่างกัน 7 วัน เมื่อคัดเลือก case ได้แล้วจะทำการคัดเลือกแม่โคที่เป็น control ในฟาร์มเดียวกันตามวิธีการที่จะกล่าวต่อไป
2. แม่โคที่มีเต้านมปกติ (healthy cows) เป็น control ซึ่งเป็นแม่โคที่มีผลการตรวจไม่พบเชื้อใดๆ เข้าเต้านมทั้ง 4 เต้า

การเก็บตัวอย่างน้ำนมและเลือด

การเก็บตัวอย่างน้ำนม

ขั้นตอนเก็บตัวอย่างน้ำนมในฟาร์ม มีดังนี้

1. แม่โครีดนมทุกตัวในฟาร์มทำการเตรียมเต้านมก่อนทำการรีดน้ำนม โดยการล้างทำความสะอาดบริเวณเต้านมให้สะอาดด้วยน้ำเปล่า และเช็ดเต้านมให้แห้ง
2. รีดน้ำนมใส่ถาดตรวจ ซี.เอ็ม.ที. เพื่อตรวจหาสภาวะเต้านมอักเสบในฟาร์ม แม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการจะสังเกตพบลักษณะเต้านมมีลักษณะบวม แดง ร้อน และน้ำนมที่รีดออกมาได้มีลักษณะที่ผิดปกติ เช่น เป็นก้อนหนอง มีเลือดปน ส่วนแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ ตรวจไม่พบความ

ผิดปกติใด ๆ ที่บริเวณเต้านมและน้ำนมที่รีดออกมาได้ แต่เมื่อทำการตรวจตัวอย่างน้ำนมด้วยน้ำยา ซี.เอ็ม.ที. จะให้ผลบวก ภายหลังจากการตรวจทำการจดบันทึกผลการตรวจทุกเต้าในแม่โครีดนมทุกตัว

3. ทำการรีดน้ำนมแม่โคตามปกติ
4. ภายหลังจากการรีดน้ำนมแม่โค ในกรณีที่พบว่าเป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการหรือแม่โคที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ ซี.เอ็ม.ที. จะทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมรายเต้านมทั้ง 4 เต้านมทันที ภายหลังจากการรีดน้ำนมเสร็จ โดยเก็บตัวอย่างเต้าละ 15 มล. ด้วยวิธีปลอดเชื้อ เพื่อนำตัวอย่างน้ำนมไปตรวจวินิจฉัยเพาะแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบและจำนวนเซลล์โซมาติก (รายละเอียดการเก็บตัวอย่างน้ำนมแสดงในภาคผนวก ก)
5. ในการเข้าไปเก็บตัวอย่างน้ำนมครั้งแรกในฟาร์มให้ทำการรีดน้ำนมแม่โคตามปกติตามขั้นตอนที่ 3 และสำหรับการเก็บตัวอย่างน้ำนมครั้งที่สองเป็นการเก็บตัวอย่างน้ำนมเพื่อนำไปตรวจสอบในการศึกษาที่ 3 ต่อไป โดยภายหลังจากการตรวจ ซี. เอ็ม. ที. ให้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมในแม่โคที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วก่อนทำการรีดน้ำนม ตัวอย่างเต้าละ 30 มล. ด้วยวิธีเดียวกับขั้นตอนที่ 4
6. ตัวอย่างน้ำนมเก็บใส่ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง และส่งเข้าห้องปฏิบัติการทันทีเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดในแม่โคที่คัดเลือกไว้แล้วในการเข้าฟาร์มครั้งที่สอง โดยเก็บตัวอย่างเลือดในแม่โคที่เส้นเลือดดำที่หาง (coccygeal vein) ด้วยวิธีปลอดเชื้อ ตัวละ 10 มล. ด้วยหลอดเก็บเลือด Monovett®

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างน้ำนมและเลือดที่ได้จากฟาร์มทั้งหมดนำมาตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการดังนี้

1. **การเพาะแยกและตรวจระบุเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบในน้ำนมรายเต้านม** (quarter milk sample)

การเพาะแยก และตรวจระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบ ตามการแนะนำของ National Mastitis council รายงานผลเป็นชนิดเชื้อจุลินทรีย์ และระดับความมีนัยสำคัญของการเป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบ (NMC, 1999) (รายละเอียดการเพาะเชื้อหาสาเหตุ

ของเต้านมอักเสบ แสดงในภาคผนวก ก) โดยแนวทางกำหนดความมีนัยสำคัญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมของแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบ แสดงในตารางที่ 3 การศึกษาครั้งนี้พิจารณาเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ชนิด *S. uberis* ที่ได้จากการเพาะแยกและตรวจระบุวินิจฉัยว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมที่มีนัยสำคัญระดับ 3 และ 4

ตารางที่ 3 แนวทางกำหนดความมีนัยสำคัญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมของแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบ

จำนวนโคโลนีทั้งหมด	1	2-10			มากกว่า 10		
ชนิดเชื้อ	**ชนิดเดียว**	**ชนิดเดียว**	**มากกว่าสองชนิด**	**หลายชนิด**	**ชนิดเดียว**	**มากกว่าสองชนิด**	**หลายชนิด**
S. agalactiae	4*	4	4	4	4	4	4
Group G streptococci	4	4	4	4	4	4	4
Streptococcal species	2	3	2	2	4	3	1
S. aureus	3	4	4	4	4	4	4
Staphylococcal species	1	2	2	2	4	2	1
E. coli Klebsiella Enterobacter Serratia	2	3	2	2	4	2	1
Pasteurella	4	4	4	4	4	4	4
Pseudomonas	2	3	2	2	4	4	2
Yeast, Mold & other Fungi	2	3	1	1	4	2	1
Nocardia	2	3	2	2	4	3	3
Prototheca	2	3	3	2	4	3	3
C. bovis	1	2	2	2	4	3	3
C. pyogenes	2	3	3	3	4	3	3
C. ulcerans	2	4	3	2	4	4	3
Proteus	2	3	1	1	4	2	1

* ระดับ 1 – ไม่มีนัยสำคัญ 2 – ต้องสงสัย
3 – มีนัยสำคัญ 4 – มีนัยสำคัญอย่างสูง

เชื้อแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก จากการทดสอบทางชีวเคมีให้ผลลบกับการทดสอบ catalase ให้ผลบวกหรือลบกับการทดสอบ CAMP และให้ผลบวกกับการทดสอบ esculin hydrolysis ที่มีนัยสำคัญระดับ 3 และ 4 จะทำการยืนยันผลการวินิจฉัยด้วยชุดตรวจชีวเคมีจำแนกชนิดเชื้อ API 20 STREP® (bioMérieux, France) รายงานผลเป็นชนิดเชื้อแบคทีเรีย เพื่อนำไปประเมินสถานภาพการติดเชื้อ *S. uberis* ในฟาร์ม และนำไปสู่การตัดสินใจคัดเลือกแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* ต่อไป

2. **การตรวจวัดจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมรายเต้านม** (quarter milk sample)

การตรวจนับจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมจากเต้านมที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และเต้านมที่ไม่ติดเชื้อใด ๆ ในแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และน้ำนมจากเต้านมของแม่โคที่ไม่มีการติดเชื้อเข้าเต้านมหรือแม่โคที่มีเต้านมปกติ โดยใช้เครื่องนับอนุภาค Coulter Counter ZM® (Hinz et al., 1992) รายงานผลเป็นเซลล์ต่อมล. (รายละเอียดการตรวจนับจำนวนเซลล์โซมาติกแสดงในภาคผนวก ก)

3. **การเตรียมตัวอย่างน้ำนมและตัวอย่างซีรั่มสำหรับการวิเคราะห์**

การเตรียมตัวอย่างน้ำนม และตัวอย่างซีรั่มประยุกต์ตามวิธีของ Grant และ Finch (1996) และ Guidry และคณะ (1980) ดังนี้ ตัวอย่างน้ำนมที่เก็บได้นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000g เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกเอาไขมันออกจากน้ำนม น้ำนมที่ผ่านกระบวนการนี้จะเป็นน้ำนมที่แยกไขมัน จากนั้นนำไปตกตะกอนเคซีนที่มีอยู่ในน้ำนมด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCL) เพื่อให้ pH ของน้ำนมมีค่าเท่ากับ 4.6 แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 46,000g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับ pH ของน้ำนมให้มีค่าเท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นนำตัวอย่างน้ำนมมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำลาย complement ที่อยู่ในน้ำนม

ตัวอย่างเลือดที่ได้นั้นให้นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกซีรั่มออกจากเซลล์เม็ดเลือด จากนั้นนำตัวอย่างซีรั่มมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำลาย complement ที่อยู่ในซีรั่ม

เก็บตัวอย่างน้ำนม และตัวอย่างซีรั่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างดังกล่าวไปตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ด้วยวิธี ELISA และตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิลในขั้นตอนต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาที่ 2 การผลิต Hyperimmune serum ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Streptococcus uberis* ในลูกโค

การศึกษาแบบทดลอง (experimental study) โดยการฉีดเชื้อ *S. uberis* ที่เพาะแยกได้จากแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมที่มีปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างกัน 2 รูปแบบ เพื่อเป็นตัวแทนสายพันธุ์ของเชื้อที่ทำให้เกิดเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (clinical mastitis; CM isolate) และเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (subclinical mastitis; SCM isolate) เพื่อกระตุ้นให้ลูกโคมีการสร้างอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis*

การเตรียมวัคซีน

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. uberis* ชนิด CM isolate และ SCM isolate ให้มีปริมาณเชื้อ 10^{10} cfu ต่อมล. และฆ่าเชื้อด้วยสารฟอร์มัลดีไฮด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ในการเตรียมวัคซีนเชื้อตายที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 1 โดส โดยประยุกต์ตามวิธีของ Leigh และ Field (1994) และ Finch และคณะ (1994) ประกอบด้วยเชื้อ *S. uberis* ปริมาตร 1 มล. ในสารละลายที่ประกอบด้วย Freund's incomplete adjuvant ปริมาตร 1 มล. และ Tween20 ปริมาตร 2 มล. (รายละเอียดการเตรียมวัคซีนแสดงในภาคผนวก ข)

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ลูกโคเพศผู้พันธ์ขาวดำ อายุ 1-3 เดือน ที่มีสุขภาพดี จำนวน 9 ตัว ทำการแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้รับเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate

กลุ่มที่ 2 ได้รับเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate

กลุ่มที่ 3 ได้รับน้ำเกลือ เป็นกลุ่มควบคุม

ทั้งนี้ลูกโคที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านกระบวนการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง เลขที่ 0931002 จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *S. uberis* การตรวจร่างกาย และการเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแก่ลูกโคทั้ง 3 กลุ่ม โดยฉีดเชื้อหรือน้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous route) ด้วยวิธีปลอดเชื้อที่บริเวณหลังกระดูก scapula จำนวน 4 ครั้ง ฉีดสลับข้างกัน โดยทำการฉีดในวันที่ 0 7 14 และ 21 และเก็บตัวอย่างเลือดลูกโคทั้ง 3 กลุ่มที่เส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ด้วยวิธีปลอดเชื้อ ตัวละ 20 มล. ลงในหลอดเก็บเลือด Monovette® โดยเก็บตัวอย่างเลือดก่อนกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก (วันที่ 0) วันที่ 1 14 28 และ 35 ของการกระตุ้น

ภูมิคุ้มกัน ตัวอย่างเลือดที่ได้มีวิธีการเตรียมเป็นตัวอย่างซีรั่มเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างซีรั่มในการศึกษาที่ 1 จากนั้นนำตัวอย่างซีรั่มไปตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ด้วยวิธี ELISA ต่อไป ทั้งนี้ต้องทำการตรวจร่างกายลูกโคทุกครั้งก่อนทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยตรวจวัดอุณหภูมิทางทวารหนัก อัตราการหายใจ อัตราการเต้นของหัวใจ และการอักเสบในตำแหน่งที่ฉีดเชื้อ และสังเกตอาการแพ้ทุกครั้งภายหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาที่ 3 การตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Streptococcus uberis* ด้วยวิธี ELISA

การเตรียมแอนติเจนเคลือบผิวเพลท (coated antigen)

คัดเลือกเชื้อ *S. uberis* ที่ได้จากแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม โดยเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่เลือกเชื้อ *S. uberis* มาใช้ในการเตรียมวัคซีน คือ สายพันธุ์ CM isolate และสายพันธุ์ SCM isolate จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนให้มีความเข้นข้นที่ 10^6 cfu ต่อมล. (รายละเอียดการเตรียมเชื้อ *S. uberis* แสดงในภาคผนวก ค)

การเคลือบผิวเพลท (Coating)

นำเพลท ชนิด 96 หลุม ก้นแบน (96 well flat bottom microtiter plate) มาเตรียมผิวเพลทด้วยสารกลูตาร์อัลดีไฮด์ (glutaldehyde) ที่มีความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงเคลือบผิวเพลทด้วยเชื้อ *S. uberis* ที่ความเข้มข้น 10^5 cfu ต่อหลุมตามวิธีของ Finch และคณะ (1994) (รายละเอียดการเคลือบผิวเพลทแสดงในภาคผนวก ค)

การทดสอบหาระดับเจือจางที่เหมาะสมของตัวอย่างซีรั่ม น้ำนม และ conjugate

เจือจางตัวอย่างซีรั่มในอัตราส่วน 1:1 1:2 1:4 และ 1:8 และตัวอย่างน้ำนมในอัตราส่วน 1:4 และ 1:8 และเจือจาง peroxidase conjugated rabbit anti-bovine IgG ในอัตราส่วน 1:1000 1:2000 และ 1:4000 ไป โดยมีตัวอย่างควบคุมสำหรับตัวอย่างซีรั่มเป็น fetal bovine serum และตัวอย่างควบคุมสำหรับตัวอย่างน้ำนมเป็นน้ำนม UHT ที่แยกไขมันและเคซีนแล้ว อิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อ *S. uberis* ที่มีในตัวอย่างก็จะจับกับเชื้อ *S. uberis* ที่เคลือบอยู่บนหลุม จากนั้นจึงใส่ peroxidase conjugated rabbit anti-bovine IgG และเติมสาร O-phenylenediamine (OPD) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (substrate) ลงไป และหยุดปฏิกิริยาด้วย H_2SO_4 เมื่อถึงขั้นตอนนี้ anti-bovine IgG จะเข้าจับกับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* และเอนไซม์ peroxidase ทำการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นให้เป็นสารที่สามารถอ่านค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรได้

หาระดับความเข้นข้นที่เหมาะสมของตัวอย่างซีรั่ม และตัวอย่างน้ำนม และ peroxidase conjugate ที่ให้ผลบวกที่ชัดเจน โดยกำหนดให้มีค่าการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีเป็น 1.5 เท่า เพื่อนำไปใช้ในการตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในตัวอย่างซีรั่ม และน้ำนมต่อไป

การตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis*

การตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ประยุกต์ตามวิธีของ Finch และคณะ (1994) Hill และคณะ (1994) และ Leigh และ Field (1994) ดังนี้ นำตัวอย่างซีรั่มจากลูกโคที่เจือจางในอัตราส่วน 1:4 และตัวอย่างซีรั่มจากแม่โคที่เจือจางในอัตราส่วน 1:8 และตัวอย่างน้ำนมที่เจือจางในอัตราส่วน 1:8 มาตรวจสอบ โดยทำ 2 ครั้ง (duplicate) และนำ peroxidase conjugated rabbit anti-bovine IgG ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:2000 มาใช้ในการจับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* และทำปฏิกิริยากับสาร OPD และหยุดปฏิกิริยาด้วย H_2SO_4 อ่านค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Anthos ELISA reader 2010 (Anthos, Austria)

ระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* (titers) ที่ตรวจด้วยวิธี ELISA มีวิธีการคำนวณดังนี้

$$\text{Titers} = \overline{X}\ OD_{sample} - OD_{negative\ control} - OD_{blank}$$

Titers	คือ ระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis*
$\overline{X}\ OD_{sample}$	คือ ค่าเฉลี่ยของค่า OD ที่ตรวจวัดได้ 2 ครั้ง (duplicate)
$OD_{negative\ control}$	คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำนม UHT หรือ fetal bovine serum
OD_{blank}	คือ ค่าดูดกลืนแสงของการตรวจส่วนควบคุมการทดลอง

คำนวณการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจี โดยคิดเป็นจำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้น (fold increase) ดังนี้

$$\text{Fold increase} = \frac{\text{Titers}}{OD_{negative\ control}}$$

ตัวอย่างซีรั่มและตัวอย่างน้ำนมที่ให้ค่าการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 เท่า ถือว่าตัวอย่างนั้นให้ผลบวก (รายละเอียดการตรวจสอบระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* แสดงในภาคผนวก ค)

การศึกษาที่ 4 การตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกายในการต่อต้านเชื้อ *Streptococcus uberis*

การศึกษาความสามารถของนิวโทรฟิลในการเก็บกิน และฆ่าเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate ภายนอกร่างกาย (*in vitro*) ภายใต้สภาวะที่มีซีรั่ม และน้ำนมของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติ และซีรั่มของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นภูมิกันต่อเชื้อ *S. uberis* (hyperimmune serum)

การเตรียมเชื้อ *S. uberis* ที่ใช้ในการตรวจสอบ

วิธีการเตรียมเชื้อ *S. uberis* ที่ยังมีชีวิตที่ใช้ในตรวจสอบการเก็บกิน และฆ่าเชื้อของนิวโทรฟิล มีวิธีการเช่นเดียวกับการเตรียมเชื้อสำหรับเคลือบผิวเพลท เชื้อ *S. uberis* ที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 cfu ต่อมล. (รายละเอียดการเตรียมเชื้อ *S. uberis* แสดงในภาคผนวก ข)

การแยกนิวโทรฟิล

เก็บตัวอย่างเลือดในโคสาวพันธุ์ขาวดำที่มีสุขภาพดีที่เส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ปริมาตร 50 มล. ลงในหลอดเก็บเลือดที่มีสาร EDTA เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำมาตรวจแยกนิวโทรฟิลตามวิธีของ Leigh และ Field (1994) ตรวจสอบจำนวนนิวโทรฟิลที่มีชีวิต (viability) ด้วยการย้อมสี trypan blue และเตรียมสารละลายที่มีนิวโทรฟิลที่มีชีวิตมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 เซลล์ต่อมล. (รายละเอียดการแยกนิวโทรฟิลแสดงในภาคผนวก ง)

การตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิล

ศึกษาการทำงานของนิวโทรฟิลในการต่อต้านเชื้อ *S. uberis* ดังนี้

1. **การเก็บกินเชื้อ *S. uberis* (Phagocytosis)**

ศึกษาการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ที่ย้อมด้วยสารเรืองแสง fluorescein isothiocyanate (FITC) ของนิวโทรฟิล แล้วตรวจวัดด้วยวิธี flow cytometry โดยเตรียมสารละลายที่มีเชื้อ *S. uberis* ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 cfu ต่อมล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นผสมสารละลายเชื้อ *S. uberis* กับตัวอย่างน้ำนมหรือตัวอย่างซีรั่มที่เตรียมได้จากการศึกษาที่ 1 และ 2 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายที่มีนิวโทรฟิลระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 เซลล์ต่อมล.ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 30 นาที ที่อุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส โดยมีน้ำนม UHT เป็น

ตัวอย่างควบคุมสำหรับตัวอย่างน้ำนม และ fetal bovine serum เป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับตัวอย่างซีรั่ม จากนั้นตรวจวัดตัวอย่างด้วยเครื่อง FACSCalibur® flow cytometer (Becton Dickinson, USA) และวิเคราะห์ผลการตรวจวัดด้วยโปรแกรม CellQuestPro® (Becton Dickinson, USA) ผลการตรวจวัดการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* แสดงเป็นค่ามัธยฐานของความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไปของนิวโทรฟิลที่เก็บกินเชื้อ (median fluorescence intensity; MFI)

2. **การฆ่าเชื้อ *S. uberis*** (Killing)

ศึกษาการฆ่าเชื้อ *S. uberis* ของนิวโทรฟิล โดยการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิต (bacteria count) บนอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีของ Leigh และ Field (1994) ดังนี้ ผสมสารละลายที่มีเชื้อ *S. uberis* ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 cfu ต่อมล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นผสมสารละลายเชื้อ *S. uberis* กับตัวอย่างน้ำนมหรือตัวอย่างซีรั่มที่เตรียมได้จากการศึกษาที่ 1 และ 2 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายที่มีนิวโทรฟิลระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 เซลล์ต่อมล. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 90 นาที ที่อุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส โดยมีน้ำนม UHT เป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับตัวอย่างน้ำนม และ fetal bovine serum เป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับตัวอย่างซีรั่ม จากนั้นตรวจนับเชื้อ *S. uberis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเชื้อ *S. uberis* ที่ถูกนิวโทรฟิลฆ่าไป (% killing) ดังนี้

$$\% \text{ killing} = \frac{[\text{จำนวนเชื้อตั้งต้น} - \text{จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต}]}{\text{จำนวนเชื้อตั้งต้น}} \times 100$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาที่ 1

ข้อมูลลำดับท้อง วันที่ให้นม แสดงผลเป็นค่ามัธยฐาน (median) และข้อมูลจำนวนเซลล์โซมาติกแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย $\log_{10}$ ของจำนวนเซลล์โซมาติกที่วัดได้ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย log ของจำนวนเซลล์โซมาติกด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม Statistix® version 8.0 กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $p<0.05$

การศึกษาที่ 3

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมและซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติ และซีรั่มของกลุ่มลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม Statistix® version 8.0 กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $p<0.05$

การศึกษาที่ 4

วิเคราะห์ความแตกต่างของค่ามัธยฐานของความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไปของนิวโทรฟิลที่เก็บกินเชื้อ และค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเชื้อ *S. uberis* ที่ถูกนิวโทรฟิลฆ่าไป (% killing) ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติ และซีรั่มของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม Statistix® version 8.0 กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $p<0.05$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการศึกษา

การศึกษาที่ 1 การติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมในแม่โครีดนม

การศึกษาการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมในแม่โคในฟาร์มโคนมรายย่อยทั้งหมด 7 ฟาร์มที่มีประวัติการติดเชื้อ *S. uberis* ในฟาร์มพบแม่โคที่มีเต้านมที่ติดเชื้อ *S. uberis* และมีเต้าที่ไม่มีการติดเชื้อใดๆ อย่างน้อย 1 เต้า จำนวน 7 ตัว โดยมีเต้าที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมทั้งหมด 8 เต้า และมีเต้าที่ไม่มีการติดเชื้อทั้งหมด 7 เต้า และแม่โคที่ไม่มีการติดเชื้อใดๆเข้าเต้านมทั้ง 4 เต้า หรือแม่โคที่มีเต้านมปกติ จำนวน 6 ตัว

แม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติมีค่ามัธยฐานของลำดับท้อง (lactation number) เท่ากับ 3 และ 2 ตามลำดับ และค่ามัธยฐานของวันที่ให้นม (day in milk) เท่ากับ 269 และ 213 ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ย log ของจำนวนเซลล์โซมาติก (somatic cell count; SCC) ในน้ำนมรายเต้านมดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ย log ของจำนวนเซลล์โซมาติกของแม่โคในการศึกษานี้

กลุ่มแม่โค	เต้านม	ค่า log ของ SCC
1. *S. uberis* IMI (N=7)	ก. *S. uberis* IMI (n=8)	6.52±0.798[a]
	ข. ไม่มีการติดเชื้อใดๆ (n=7)	5.59±0.519[b]
2. เต้านมปกติ (N=6)	ไม่มีการติดเชื้อใดๆ (n=6)	5.98±0.702

[a b] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

N = จำนวนโค (cows)

N = จำนวนเต้านม (quarters)

จากตารางที่ 4 พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าเฉลี่ยของค่า log ของจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมจากเต้านมที่มีการติดเชื้อเข้าเต้านมกับน้ำนมจากเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อในแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม

ตารางที่ 5 สายพันธุ์เชื้อ *S. uberis* ที่ติดเชื้อเข้าเต้านม

API-profile*	**แยกได้จากเต้านมอักเสบ**	**จำนวน** isolate
7443710	แบบแสดงอาการ	1
	แบบไม่แสดงอาการ	4
7543710	แบบไม่แสดงอาการ	2
7543713	แบบไม่แสดงอาการ	1

*API 20 biochemical test (API 20 STREP®, bioMérieux, France)

การตรวจเพาะแยกเชื้อ และตรวจยืนยันชนิดเชื้อ *S. uberis* ที่มีการติดเชื้อเข้าเต้านมพบเชื้อ *S. uberis* ที่มีรูปแบบของปฏิกิริยาทางชีวเคมีเหมือนกันมากที่สุด คือ API-profile 7443710 จำนวน 5 isolate ซึ่งพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดเต้านมอักเสบทั้งแบบแสดงอาการ และแบบไม่แสดงอาการ รองลงมาคือ เชื้อ *S. uberis* ที่มี API-profile 7543710 จำนวน 2 isolate ที่มาจากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ ดังนั้นจึงเลือก API-profile 7443710 เป็นตัวแทนของสายพันธุ์ของ *S. uberis* ที่แยกได้จากแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (CM isolate) และ API-profile 7543710 เป็นตัวแทนของสายพันธุ์ที่แยกได้จากแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (SCM isolate) มาเป็นแอนติเจนของวัคซีนที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แอนติเจนเคลือบผิวเพลท และแอนติเจนที่ให้นิวโทรฟิลเก็บกินและฆ่าเชื้อในขั้นตอนการศึกษาต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาที่ 3 การตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Streptococcus uberis* ด้วยวิธี ELISA

1. แม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม

การวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ในน้ำนมและซีรั่มที่มาจากแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติด้วยวิธี ELISA โดยมีแอนติเจนเคลือบผิวเพลท 2 ชนิด คือ เชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate พบว่า ระดับความเจือจางที่เหมาะสมของน้ำนม ซีรั่ม และ peroxidase conjugate ที่ใช้ทดสอบกับเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เท่ากับ 1:8 1:8 และ 1:2000 ตามลำดับ ที่ให้ผลบวกชัดเจนต่อการทดสอบ

การเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมทั้งหมดที่จำเพาะต่อแอนติเจนเคลือบผิวเพลทเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่ามากกว่า 1.5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนม UHT เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มทั้งหมดที่มาจากแม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติที่จำเพาะต่อแอนติเจนเคลือบผิวเพลทเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่ามากกว่า 1.5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับระดับอิมมูโนโกลบูลินจีใน fetal bovine serum ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมและซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมและแม่โคที่มีเต้านมปกติด้วยวิธี ELISA ที่มีแอนติเจนเคลือบผิวเพลทเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate

แหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจี			แอนติเจนเคลือบผิวเพลท	
			CM isolate*	SCM isolate*
น้ำนม	1. แม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม	1. เต้าที่มีการติดเชื้อ	18.11±1.278 [b]	8.75±0.825 [b]
		2. เต้าที่ไม่ติดเชื้อ	15.05±1.366 [b]	7.463±0.882 [bc]
	2. แม่โคที่มีเต้านมปกติ	เต้าที่ไม่ติดเชื้อ	8.59±1.476 [c]	4.459±0.952 [c]
ซีรั่ม	1. แม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม		29.81±1.278 [a]	23.74±0.825 [a]
	2. แม่โคที่มีเต้านมปกติ		29.08±1.476 [a]	22.85±0.952 [a]

[a b c] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญในแนวตั้ง ($p<0.05$)

* การเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้น (mean±SEM)

การเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมและซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติที่จำเพาะต่อแอนติเจนเคลือบผิวเพลทด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate พบว่า การเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมของเต้านมที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมไม่มีความแตกต่างจากระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมของเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อในแม่โครีดนมตัวเดียวกัน แต่กลับพบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมของเต้านมที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมกับเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อของแม่โคที่มีเต้านมปกติ ($p<0.05$)

การเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมไม่มีความแตกต่างจากระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของแม่โคที่มีเต้านมปกติ แต่กลับพบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของแม่โคทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างกับระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่ตรวจวัดได้ในน้ำนมของเต้านมที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และในน้ำนมของแม่โคที่มีเต้านมปกติ ($p<0.05$)

2. ลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis*

การตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่ม (hyperimmune serum) ของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate และลูกโคที่ได้รับน้ำเกลือที่เป็นกลุ่มควบคุมพบว่า ระดับความเจือจางที่เหมาะสมของซีรั่ม และ peroxidase conjugate ที่ใช้ทดสอบกับแอนติเจนเคลือบผิวเพลทเชื้อ *S.uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เท่ากับ 1:4 และ 1:2000 ตามลำดับ ที่ให้ผลบวกชัดเจนต่อการทดสอบ

การตรวจด้วยแอนติเจนเคลือบผิวเพลทเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จาก CM isolate พบระดับอิมมูโนโกลบูลินจีใน hyperimmune serum เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือในวันที่ 28 และ 35 เท่ากับ 6.6 และ 7.7 ตามลำดับ เช่นเดียวกับระดับอิมมูโนโกลบูลินจีใน hyperimmune serum เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือในวันที่ 28 และ 35 เท่ากับ 4.3 และ 4.9 ตามลำดับ ในขณะที่การตรวจด้วยแอนติเจนเคลือบผิวเพลทเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate พบระดับอิมมูโนโกลบูลินจีใน hyperimmune serum เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือในวันที่ 28 และ 35 เท่ากับ 2.9 และ 5.6 ตามลำดับ เช่นเดียวกับระดับอิมมูโนโกลบูลินจีใน hyperimmune serum เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือในวันที่ 28

และ 35 เท่ากับ 7.9 และ 8.1 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า hyperimmune serum ทั้งหมดมีระดับอิมมูโนโกลบูลินจีจำเพาะต่อแอนติเจนเคลือบผิวเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จาก CM isolate มากกว่าเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จาก SCM isolate

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate และได้รับน้ำเกลือ (saline) ด้วยวิธี ELISAที่มีแอนติเจนเคลือบผิวเพลทเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate

วันที่ได้รับการกระตุ้น	แอนติเจนเคลือบผิวเพลท CM isolate			แอนติเจนเคลือบผิวเพลท SCM isolate		
	SCM*	CM*	Saline*	SCM*	CM*	Saline*
0	20.84±3.200	19.48±2.030[1]	18.54±2.175	11.23±2.096	8.05±0.625	7.48±1.447
1	18.92±3.427	21.86±0.711[1]	19.65±0.937	11.16±1.198	10.52±2.714	8.04±1.329
14	23.17±1.312	23.69±1.177[12]	19.92±1.405	13.33±0.629[a]	9.41±0.636[ab]	8.88±1.489[b]
28	25.01±0.974[a]	27.38±0.055[a2]	20.79±1.055[b]	17.41±1.125[a]	12.39±1.604[ab]	9.54±0.836[b]
35	24.30±1.180[ab]	27.02±0.328[a2]	19.36±2.018[b]	16.58±1.583	14.08±3.550	8.52±0.854

[a b c] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญแนวนอน ($p<0.05$) (ระหว่างกลุ่มทดลอง)

[1 2] ตัวเลขต่างแสดงความมีนัยสำคัญแนวตั้ง ($p<0.05$) (ระหว่างวันที่ได้รับการกระตุ้น)

* การเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้น (mean±SEM)

การเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีใน hyperimmune serum ทั้งหมดต่อการตรวจด้วยแอนติเจนเคลือบผิวเพลททั้ง 2 สายพันธุ์มีค่ามากกว่า 1.5 เท่าดังแสดงในตารางที่ 7 การตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีด้วยแอนติเจนเคลือบผิวเพลทด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate พบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีใน hyperimmune serum ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate ระหว่างวันที่ได้รับการกระตุ้นโดยเริ่มตั้งแต่วันที่ 28 และ 35 ของการได้รับการกระตุ้นเปรียบเทียบกับวันที่ยังไม่ได้รับการกระตุ้น (วันที่ 0) ($p<0.05$) และพบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในวันที่ 28 ระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate กับกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือ ($p<0.05$) และพบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในวันที่ 35 ระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate กับกลุ่มที่

ได้รับน้ำเกลือ ($p<0.05$) ในขณะที่ตรวจไม่พบความแตกต่างของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate

อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อแอนติเจนเคลือบผิวเพลทด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate มีความแตกต่างกับระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในวันที่ 14 และ 28 ระหว่างกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate กับกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือ ($p<0.05$) และตรวจไม่พบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate กับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate และกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือ

จากการตรวจพบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในวันที่ 28 เปรียบเทียบกับวันที่ 0 ของการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์จึงนำตัวอย่างซีรั่มของวันที่ 0 และ 28 ไปตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิลในการศึกษาต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาที่ 4 การตรวจสอบทำงานของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกายในการต่อต้านเชื้อ *Streptococcus uberis*

การศึกษาการทำงานของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกายในสภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ซึ่งได้จากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติ และ hyperimmune serum ที่ได้จากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate ดังแสดงในตารางที่ 8-10

ตารางที่ 8 การเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ของนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติ

แหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจี			Phagocytosed *S. uberis*	
			SCM isolate*	CM isolate*
น้ำนม	1. แม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม	1. เต้าที่มีการติดเชื้อ	46.52±16.459[c]	55.45±44.815[b]
		3. เต้าที่ไม่ติดเชื้อ	48.32±13.672[c]	47.41±21.081[b]
	2. แม่โคที่มีเต้านมปกติ	เต้าที่ไม่ติดเชื้อ	55.61±11.834[c]	61.69±24.654[b]
ซีรั่ม	1. แม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม		172.33±32.944[a]	217.87±41.516[a]
	2. แม่โคที่มีเต้านมปกติ		121.46±24.388[b]	241.43±24.860[a]

[abc] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญในแนวตั้ง ($p<0.05$) (ระหว่างแหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจี)

* การเก็บกินเชื้อแสดงผลเป็นค่ามัธยฐานของความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไปของนิวโทรฟิลที่เก็บกินเชื้อ (median fluorescence intensity; MFI) (mean±SEM)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 การฆ่าเชื้อ *S. uberis* ของนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนมและซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติ

แหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจี			Killed *S. uberis*	
			SCM isolate*	CM isolate*
น้ำนม	1. แม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม	1. เต้าที่มีการติดเชื้อ	98.02±1.096[a]	61.95±32.815[a]
		2. เต้าที่ไม่ติดเชื้อ	98.12±0.707[a]	41.51±33.810[ab]
	2. แม่โคที่มีเต้านมปกติ	เต้าที่ไม่ติดเชื้อ	98.00±0.840[a]	5.56±9.580[b]
ซีรั่ม	1. แม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม		34.34±10.172[c]	28.89 ± 26.396[a]
	2. แม่โคที่มีเต้านมปกติ		47.81±10.882[b]	53.30±24.579[ab]

[a b c] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญในแนวตั้ง ($p<0.05$) (ระหว่างแหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจี)

* การฆ่าเชื้อแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเชื้อ *S. uberis* ที่ถูกนิวโทรฟิลฆ่าไป (% killing)

ตารางที่ 10 การเก็บกินเชื้อ และฆ่าเชื้อ *S. uberis* ของนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate

Tested	การเก็บกินเชื้อ			การฆ่าเชื้อ		
S.uberis	SCM isolate*	CM isolate*	Saline*	SCM isolate**	CM isolate**	Saline**
SCM isolate						
Day 0	10.78±1.492[a1]	9.82±0.614[ab]	6.80±1.812[b]	26.58±28.497	34.58±36.084	67.67±1.450
Day 28	30.95±4.538[a2]	17.96±4.309[b]	6.29±2.105[b]	29.72±2.459[b]	32.17±13.592[b]	61.06±13.090[a]
CM isolate						
Day 0	14.26±1.666	22.97±6.903	14.17±0.687	83.07±7.365	64.18± 24.286	92.87±3.708
Day 28	12.90±1.513	39.15±28.898	15.25±0.260	84.68±11.761[ab]	63.66±9.990[b]	92.13±2.524[a]

[a b c] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญแนวนอน ($p<0.05$) (ระหว่างกลุ่มทดลอง)

[1 2] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญแนวตั้ง ($p<0.05$) (ระหว่างวันที่ได้รับการกระตุ้น)

* การเก็บกินเชื้อแสดงผลเป็นค่ามัธยฐานของความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไปของนิวโทรฟิลที่เก็บกินเชื้อ (median fluorescence intensity; MFI) (mean±SEM)

** การฆ่าเชื้อแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเชื้อ *S. uberis* ที่ถูกนิวโทรฟิลฆ่าไป (% killing)

นิวโทรฟิลมีความสามารถในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจากซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมแตกต่างจากซีรั่มของแม่โคที่มีเต้านมปกติ และน้ำนมของแม่โคทั้ง 2 กลุ่ม ($p<0.05$) และความสามารถในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate ของนิวโทรฟิลมีความแตกต่างกันภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจากซีรั่มของแม่โคทั้ง 2 กลุ่มกับน้ำนมของแม่โคทั้ง 2 กลุ่ม ($p<0.05$) อย่างไรก็ดีความสามารถในการฆ่าเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate ของนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจากน้ำนมของแม่โคทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างจากซีรั่มของแม่โคทั้ง 2 กลุ่ม ($p<0.05$) ในขณะที่ความสามารถในการฆ่าเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate ของนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจากน้ำนมจากเต้านมที่ติดเชื้อ *S. uberis* และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมมีความแตกต่างจากน้ำนมของแม่โคที่มีเต้านมปกติ ($p<0.05$)

นิวโทรฟิลมีความสามารถในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจาก hyperimmune serum ที่กระตุ้นด้วยเชื้อ SCM isolate ได้แตกต่างจากการได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และการได้รับน้ำเกลือของวันที่ 28 ของการกระตุ้น ($p<0.05$) แต่พบความสามารถของนิวโทรฟิลในการฆ่าเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากซีรั่มของกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือมีความแตกต่างจากกลุ่ม hyperimmune serum ที่ได้รับการกระตุ้นในวันที่ 28 ด้วยเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ($p<0.05$) ในขณะที่พบความสามารถของนิวโทรฟิลในการฆ่าเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate เท่านั้นภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจากซีรั่มของกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือแตกต่างจาก hyperimmune serum ที่ได้รับการกระตุ้นในวันที่ 28 ด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate ($p<0.05$)

ความสามารถของนิวโทรฟิลในการเก็บกิน และฆ่าเชื้อ *S. uberis* ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 11 ซึ่งพบว่านิวโทรฟิลสามารถเก็บกินเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate ได้ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจาก hyperimmune serum ทั้งที่ได้จากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate นอกจากนี้อิมมูโนโกลบูลินจีจากซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมสามารถกระตุ้นการเก็บกินได้ทั้งเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate อย่างไรก็ดีพบว่าอิมมูโนโกลบูลินจีจากซีรั่มของแม่โครีดนมเต้านมปกติก็สามารถกระตุ้นการเก็บกินได้เฉพาะเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate

Hyperimmune serum ให้ผลไม่ชัดเจนในการส่งเสริมความสามารถในการฆ่าเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate แต่พบว่าอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมสามารถกระตุ้นการฆ่าเชื้อโดยนิวโทรฟิลได้ทั้งเชื้อ *S. uberis* ทั้งสายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate อย่างไรก็ตามอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมของแม่โคที่มีเต้านมปกติปกติก็

มีความสามารถในการฆ่าเชื้อได้เฉพาะเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate การศึกษานี้ยังพบว่าภายใต้สภาวะการทดลองในห้องปฏิบัติการกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมก็สามารถกระตุ้นให้เกิดการฆ่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ได้เช่นกัน

ตารางที่ 11 สรุปความสามารถของนิวโทรฟิลในการเก็บกินและฆ่าเชื้อ *S. uberis* ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม (*S. uberis* IMI) และแม่โคที่มีเต้านมปกติ (healthy) และซีรั่มของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate (hyperimmune serum) และลูกโคที่ได้รับน้ำเกลือ (saline)

ความสามารถของนิวโทรฟิล	***S. uberis* Isolate ที่ใช้ทดสอบ**	**แหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจี**						
		Hyperimmune serum		*S. uberis* IMI cows		Healthy cows		Control
		CM	SCM	**น้ำนม**	**ซีรั่ม**	**น้ำนม**	**ซีรั่ม**	Saline
การเก็บกินเชื้อ (Phagocytosis)	CM	-	-	-	+	-	+	-
	SCM	+	+	-	+	-	-	-
การฆ่าเชื้อ (Killing)	CM	-	+/-	+	-	-	-	+
	SCM	-	-	+	-	+	-	+

\+ พบความสามารถในการเก็บกิน/ ฆ่าเชื้อ

\- ไม่พบ

+/- พบไม่เด่นชัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

แม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมในการศึกษาครั้งนี้มีลำดับท้อง และมีระยะการรีดนมมากกว่าแม่โคที่มีเต้านมปกติ ซึ่งแตกต่างจากรายงานที่พบว่าปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม ได้แก่ ลำดับท้องแรก ระยะแรกการรีดนม ระยะท้ายของการรีดนม และระยะแรกของการพักรีดนมที่ไม่มีการสอดยาเข้าเต้านม นอกจากนี้อายุของโคมีผลต่อการติดเชื้อ *S. uberis* ได้ โดยพบว่าแม่โคที่อายุมากกว่า 2 ปี มีการติดเชื้อ *S. uberis* ยาวนานกว่าแม่โคที่มีอายุน้อยกว่า 2 ปี ซึ่งยังไม่ทราบเหตุผลแน่ชัด แต่อาจมีความเกี่ยวข้องกับการจัดการการรีดนม โภชนาการ และพันธุกรรม (Williamson et al., 1995; McDougall et al., 2004; Pullinger et al., 2007; Petrovski et al., 2009) และการที่แม่โคมีความไวต่อการเกิดเต้านมอักเสบในช่วงใกล้คลอดเนื่องจากจากการเปิดของรูหัวนม อันเกิดจากการมีความดันของน้ำนมในเต้านมสูงขึ้น (Nickerson, 1987) และในช่วงระยะแรกของการพักรีดนมอันเป็นผลจากรูหัวนมเปิดในช่วงพักรีดนมได้นานถึง 7 วันจึงทำให้เชื้อสามารถเข้าสู่เต้านมได้ง่ายขึ้น (Comalli et al., 1984) น้ำนมของเต้านมที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมมีจำนวนเซลล์โซมาติกเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการศึกษาของ Finch และคณะ (1994) และศริญญา ฤกษ์อยู่สุข (2008) การมีจำนวนเซลล์โซมาติกเพิ่มขึ้นนี้เป็นผลมาจากเต้านมมีการตอบสนองต่อการอักเสบ โดยมีการเคลื่อนย้ายนิวโทรฟิลที่อยู่ในกระแสเลือดไปยังเนื้อเยื่อเต้านมเป็นผลทำให้จำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมสูงขึ้น (Oviedo-Boyso et al., 2007)

Pyor และคณะ (2009) รายงานว่า เชื้อ *S. uberis* มีหลายสายพันธุ์ที่สามารถเข้าเต้านมได้ แต่มีเพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถติดเชื้อในเต้านมได้ขึ้นกับความสามารถในการเจริญเติบโตในน้ำนม การยึดเกาะกับผนังเยื่อบุเต้านม ความทนต่อ flushing effect และความทนต่อการเก็บกินโดยนิวโทรฟิล ในการตรวจยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ *S. uberis* โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางชีวเคมีพบว่า รูปแบบการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีหรือ API profile 7443710 เป็นรูปแบบที่พบได้มากที่สุด และสามารถพบได้ในการเกิดเต้านมอักเสบทั้งแบบแสดงอาการ และแบบไม่แสดงอาการเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Rerk-u-suke et al., 2009) แต่การศึกษาของกิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และสุกุมา สามงามนิ่ม (2004) กลับพบ API profile 7543710 ได้มากที่สุด อย่างไรก็ดีการพบแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมแล้วทำให้เกิดเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการนั้นมีเพียง 1 รายเท่านั้น จึงทำให้ไม่สามารถกล่าวอ้างได้ว่า API profile อื่นๆไม่สามารถทำให้เกิดเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการได้ แต่ส่วนมากแล้วมักพบการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมที่ทำให้เกิดเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการเช่นเดียวกับการศึกษาของ Rerk-u-suke และคณะ

(2009) โดยพบมากถึง 94.44 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *S. uberis* มีความสามารถในการมีชีวิตอยู่ในเต้านมได้นานจึงสามารถพัฒนาเป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรังได้ (Jayarao et al., 1999; Phuektes et al., 2001; Tamilselvam et al., 2006) โดยพบการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมที่มี API profile 7443710 และ 7543710 ได้เป็นระยะเวลานานตั้งแต่ 41-111 วัน (Rerk-u-suke et al., 2009)

น้ำนมของเต้านมที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมมีระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* สูงกว่าน้ำนมจากเต้านมของแม่โคที่มีเต้านมปกติ และมีความสามารถในการฆ่าเชื้อ *S. uberis* ทั้งสายพันธุ์เต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ และแบบไม่แสดงอาการได้ การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในแม่โคที่มีการติดเชื้อธรรมชาติ ในขณะที่การศึกษาทดลองก่อนหน้านี้พบว่า การให้วัคซีนเชื้อ *S. uberis* ชนิดเชื้อตายเข้าเต้านมในแม่โคทำให้ในน้ำนมมีระดับ IgG_1 และ IgG_2 เพิ่มขึ้น และให้ผลคุ้มกันต่อการฉีดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันได้ โดยลดปริมาณเชื้อในน้ำนม แต่อิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ทั้งในน้ำนม และในซีรั่มไม่สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลสามารถเก็บกินเชื้อได้ (Finch et al., 1994) เช่นเดียวกับการได้รับวัคซีนเชื้อ *S. uberis* ชนิดเชื้อเป็นเข้าใต้ผิวหนังสามารถทำให้มีระดับ IgG_1 และ IgG_2 ในซีรั่มเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของ IgG_1 และ IgG_2 ในน้ำนม (Hill et al., 1994) ซึ่งไม่ว่าจะเป็นการติดเชื้อธรรมชาติ การได้รับการกระตุ้นด้วยวัคซีนเชื้อตายหรือเชื้อเป็น ตลอดจนรูปแบบการให้วัคซีนทั้งการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และการให้เข้าเต้านมส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มมากกว่าในน้ำนม

แม้ว่าในน้ำนมจะมีระดับอิมมูโนโกลบูลินจีต่ำกว่าในซีรั่มแต่เมื่อนำมาทดสอบการเก็บกินและฆ่าเชื้อของนิวโทรฟิลกลับพบว่า อิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมสามารถทำให้นิวโทรฟิลฆ่าเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ได้อาจเป็นเพราะในน้ำนมมีปริมาณอิมมูโนโกลบูลินจีที่ต่ำอยู่แล้ว (Farrell et al., 2004) และอิมมูโนโกลบูลินจีเองไม่สามารถจับกับเชื้อ *S. uberis* แล้วให้นิวโทรฟิลเก็บกินได้ ในการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่างน้ำนมได้มีการนำเอาไขมัน และเคซีนออกไปแล้ว จึงไม่น่าจะเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเก็บกินของนิวโทรฟิลได้ เพราะนิวโทรฟิลที่เก็บกินไขมัน และเคซีนในน้ำนมจะทำให้ pseudopodia และ cell rounding สูญเสียไป ทำให้ความสามารถในการเก็บกินเชื้อลดลง (Paape et al., 1979; 2003) นอกจากนี้มีรายงานว่า lactoferrin ที่อยู่ในน้ำนมสามารถลดการเก็บกินเชื้อของแมคโครฟาจในห้องปฏิบัติการได้จึงเป็นไปได้ว่า lactoferrin ในน้ำนมอาจไปลดการเก็บกินเชื้อของนิวโทรฟิลได้เช่นกัน (Otani and Futakami, 1994) และการฆ่าเชื้อโดย complement ในน้ำนมไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากในตัวอย่างน้ำนมได้มีการทำลาย complement ด้วยความร้อนแล้ว ดังนั้นการฆ่าเชื้อโดยกลไก antibody-complement system จึงไม่สามารถเกิดขึ้นได้ และพบว่ากลไกนี้ไม่ได้ผลในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Targowski, 1983) ดังนั้นจึงน่าจะมีปัจจัยอย่างใด

อย่างหนึ่งในองค์ประกอบของน้ำนมที่ส่งเสริมการฆ่าเชื้อ *S. uberis* ได้เอง โดยไม่ต้องอาศัยกระบวนการเก็บกิน และฆ่าเชื้อโดยนิวโทรฟิล ดังการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อ *S. uberis* มีการเจริญในห้องปฏิบัติการถูกยับยั้งโดย lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system (Sordillo et al., 1997) ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Fang และคณะ(1998) ที่พบว่า lactoperoxidase ในน้ำนมไม่มีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. uberis* เนื่องจาก lactoperoxidase ต้องอาศัย hydrogen peroxide และ thiocyanate ในการเป็น cofactor เพื่อผลิต oxidizing hypothiocyanate ในการกำจัดเชื้อ ซึ่งในน้ำนมไม่มี thiocyanate และhydrogen peroxide เพียงพอเช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Cooray และ Bjorck (1995) หรือการยับยั้งการเจริญของเชื้ออาจเกี่ยวกับการขาดสารที่จำเป็นต่อการเปลี่ยน plasminogen ไปเป็น plasmin (Kliem and Hillerton, 2002) นอกจากนี้มีการศึกษาที่พบว่าในน้ำนมที่ได้จากเต้านมอักเสบมี immune complex ที่สามารถจับกับส่วน Fc receptor ของเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนมได้ส่งผลทำให้การเก็บกิน *S. aureus* โดยผ่านการจับกับ Fc receptor ของนิวโทรฟิลลดลง (Targowski and Klucinski, 1985)

อิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมมีระดับสูงกว่าในน้ำนมทั้งจากเต้านมที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อในแม่โคตัวเดียวกัน และเต้านมของแม่โคที่มีเต้านมปกติ นอกจากนี้อิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมสามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลมีความสามารถในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลฆ่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ โดยปกติแล้วระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มจะมีมากกว่าในน้ำนม (Farrell et al., 2004) ดังนั้นการที่นิวโทรฟิลสามารถเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ได้นั้นอาจเป็นเพราะการมีอิมมูโนโกลบูลินจีในปริมาณสูงอยู่แล้ว จึงสามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อได้ดีมากขึ้น และเมื่อนิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อได้แล้วเชื้อ *S. uberis* นั้นสามารถคงอยู่ภายในเซลล์ของนิวโทรฟิลได้โดยไม่ถูกทำลายไปจึงทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่ในเต้านมได้นาน และเป็นเหตุผลของการพัฒนาเป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง(Jayarao et al., 1999; Phuektes et al., 2001; Tamilselvam et al., 2006)

การเพิ่มขึ้นของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate ในซีรั่มของลูกโคภายหลังจากกระตุ้นไปแล้ว 3 ครั้งแสดงให้เห็นว่า การฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถกระตุ้นให้ลูกโคมีการตอบสนองต่อการสร้างอิมมูโนโกลบูลินจี และการตรวจวัดด้วยแอนติเจนเคลือบผิวเพลทด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์เดียวกันกับแอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิสามารถตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของลูกโคเหล่านี้ได้ ชัดเจนชี้ให้เห็นว่า เชื้อ *S. uberis* มีลักษณะของ homologous strain ดังการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าแม่โคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* ชนิดเชื้อเป็นเข้าใต้ผิวหนังร่วมกับการให้

cell wall extract ของเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมหรือการให้วัคซีนเชื้อตายสามารถป้องกันการติดเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์เดียวกันกับสายพันธุ์ที่ใช้กระตุ้นเข้าเต้านมได้ ในขณะที่การป้องกันการติดเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์อื่นๆยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ (Finch et al., 1994; 1997) ดังนั้นวัคซีนที่มีประสิทธิภาพดีอาจต้องประกอบไปด้วยเชื้อ *S. uberis* หลากหลายสายพันธุ์ในการป้องกันเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม (Finch et al., 1997)

ในการศึกษาครั้งนี้การกระตุ้นลูกโคด้วยเชื้อ *S. uberis* ชนิดเชื้อตายสายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate กลับพบว่าไม่สามารถทำให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันกับที่ได้รับการกระตุ้นได้ ยกเว้นสายพันธุ์ SCM isolate ที่ถูกนิวโทรฟิลเก็บกินโดยมีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากการกระตุ้นด้วยเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ และอิมมูโนโกลบูลินจีของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ไม่สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลฆ่าเชื้อได้เลย อาจเป็นเพราะการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* ในครั้งนี้จำนวนครั้งของการกระตุ้นน้อยเกินไปจึงไม่สามารถทำให้ร่างกายสามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ได้เพียงพอในการช่วยนิวโทรฟิลให้เก็บกินเชื้อ *S. uberis* ได้ และการได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* ชนิดเชื้อตายในครั้งนี้อาจไม่สามารถให้การป้องกันการติดเชื้อ *S. uberis* ได้ แต่ก็มีรายงานการศึกษาว่าการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อตายแก่แม่โคถึง 10 ครั้งสามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง IgG_2 จับกับเชื้อ *S. uberis* ทั้งสายพันธุ์ที่ทนต่อการเก็บกิน และไวต่อการเก็บกินของนิวโทรฟิลได้ แต่ก็ยังไม่สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลฆ่าเชื้อได้เช่นกัน นอกจากนี้การศึกษาของ Leigh และคณะ (1999) พบว่าแม่โคที่ได้รับการกระตุ้นด้วย total antigen ของ PauA มีการตอบสนองโดยมีการสร้าง IgG_1 และ IgG_2 เพิ่มขึ้น และ IgG มีความสามารถในการยับยั้ง plasminogen activation โดย PauA ได้ โดยมีความสำคัญในการป้องกันการเชื้อ *S. uberis* เกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวของเต้านม อย่างไรก็ดีการให้ PauA อย่างเดียวยังให้ผลไม่ชัดเจนในการสร้างภูมิคุ้มกันได้

อิมมูโนโกลบูลินจีสามารถส่งเสริมให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ SCM isolate ได้เป็นส่วนใหญ่ แต่อย่างไรก็ดีแม้นิวโทรฟิลจะสามารถเก็บกินเชื้อได้ แต่ก็ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ ในขณะที่นิวโทรฟิลเองก็ไม่สามารถเก็บกิน และฆ่าเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate ได้ จึงเป็นเหตุผลที่ว่าเชื้อ *S. uberis* จึงสามารถคงอยู่ได้นานภายในเต้านมโดยไม่ถูกนิวโทรฟิลทำลายและทำให้เกิดการติดเชื้อยาวนาน และพัฒนาเป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรังในที่สุด นอกจากนี้ซีรั่มของกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือสามารถทำให้เชื้อ *S. uberis* ถูกฆ่าได้ จึงน่าจะมีสภาวะบางอย่างในซีรั่มที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อ *S. uberis* ถูกทำลายไปได้โดยไม่ต้องอาศัยอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* และนิวโทรฟิลในการทำลายเชื้อได้

แม้ว่าในน้ำนมจะมีปัจจัยใดก็ตามที่สามารถส่งเสริมการฆ่าเชื้อได้ แต่การที่เชื้อ *S. uberis* ชอบอาศัยอยู่ในเซลล์เยื่อบุผิวของเต้านม (Tamilselvam et al., 2006) และพบว่าสามารถอยู่ใน

เซลล์ของนิวโทรฟิล (Pederson et al., 2003) และแมคโครฟาจได้ (Thomas et al., 1994) ทำให้เชื้อสามารถคงอยู่ได้ในเซลล์เหล่านี้โดยไม่ถูกทำลายไป จึงเป็นเหตุผลที่ทำให้เต้านมที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมยังคงมีการติดเชื้อคงอยู่ได้ยาวนานเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน ซึ่งมีรายงานว่าการติดเชื้อ *S. uberis* ได้ถึง 300 วัน (Pullinger et al., 2007) ซึ่งลักษณะที่พบในเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และแบบเรื้อรัง คือ มีการสะสมของนิวโทรฟิลอย่างยาวนานอันเป็นผลมาจากการเกิด apoptosis ที่ล่าช้า (Boutet et al., 2004) ในการเกิดความล่าช้าของกระบวนการ apoptosis ของนิวโทรฟิล และแมคโครฟาจมาเก็บกินนิวโทรฟิลที่เกิด apoptosis ยาวนานออกไป และการเกิด DNA fragmentation ช้าลง (Van Oostveldt et al., 2002) และ pro-inflammatory mediator ได้แก่ TNF-α IL-1β และ IL-8 ที่สูงขึ้นจากการติดเชื้อ *S. uberis* (Rambeaud et al., 2003; Bannerman et al., 2004) ทำให้นิวโทรฟิลเกิด apoptosis ช้าลง จึงทำให้ขบวนการจัดการการอักเสบโดยแมคโครฟาจยาวนานออกไป (Sladek et al., 2006) ทำให้มีการสะสมของนิวโทรฟิลอยู่ในเต้านมโดยที่ยังคงมีกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบอยู่ ซึ่งนิวโทรฟิลเหล่านี้จะไปทำลายเนื้อเยื่อเต้านม และพัฒนาเต้านมอักเสบไปเป็นแบบเรื้อรังได้ (Sladek et al., 2005) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Rambeuad และคณะ (2003) พบว่าเชื้อ *S. uberis* มีความสามารถในการปรับตัวในช่วง lag phase และเจริญเติบโตในเต้านมได้ (Sladek et al., 2006) นอกจากนี้การติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมทำให้นิวโทรฟิลมีจำนวนมากขึ้นพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของเชื้อ *S. uberis* ด้วยชี้ให้เห็นว่านิวโทรฟิลไม่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *S. uberis* ได้ (Grant and Finch, 1996; Rambeuad et al., 2003; Sladek et al., 2006) และนิวโทรฟิลอาจไม่มีความเกี่ยวข้องกับกลไลการกำจัดเชื้อ *S. uberis* ออกจากเต้านมได้ (Hill et al., 1994; Thomas et al., 1994)

ไม่ว่าจะเป็นอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมและซีรั่มหรือองค์ประกอบใดในน้ำนมก็ตามของแม่โคที่มีเต้านมปกติสามารถส่งเสริมให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อ และฆ่าเชื้อ *S. uberis* ได้บ้างก็ตาม แต่การที่แม่โคเหล่านี้ยังคงไม่มีการติดเชื้อใดๆ เข้าเต้านมอาจเป็นเพราะมีปัจจัยด้านกายวิภาคศาสตร์ เช่น รูหัวนมที่มี keratin และกล้ามเนื้อที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียเข้าเต้านมได้ (Sordillo and Streicher, 2002)

ในการศึกษาครั้งนี้การที่นิวโทรฟิลไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพภายนอกร่างกายอาจเป็นผลเนื่องจากการไม่มี pro-inflammatory cytokine ในการทำงานร่วมกันกับนิวโทรฟิลเหมือนดังที่เกิดขึ้นภายในเต้านม ซึ่งการศึกษาการฉีดเชื้อเข้าเต้านมแม่โคพบ TNF-α ในน้ำนม แต่ไม่พบในเลือด (Pederson et al., 2003; Rambeaud et al., 2003; Bannerman et al., 2004) แสดงให้เห็นว่าเต้านมที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* มีการเหนี่ยวนำการหลั่ง pro-inflammatory cytokine ได้ (Rambeaud et al., 2003) โดยพบระดับของ IL-1β IL-8 IL-10 IL-12 IFN-γ TNF-α

และ C5a สูงขึ้น (Bannerman et al., 2003) ดังเช่นการศึกษาการให้ GM-CSF TNF-α และ IL-8 เพิ่มความสามารถในการฆ่าเชื้อ *S. suis* ที่มี capsule ได้ (Chabot-Roy et al., 2006) ชี้ให้เห็นว่าการไม่มี cytokine ทำให้เชื้อทนต่อการเก็บกินและฆ่าเชื้อโดยนิวโทรฟิลได้ นอกจากนี้เชื้อ *S. uberis* ไม่สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลเกิด respiratory burst ได้ และพบว่าการเกิดเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการมีความสัมพันธ์กับการลดลงของ phagocytic activity ของนิวโทรฟิล (Zecconi et al., 1994) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของแม่โคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* สามารถเกิดขบวนการ opsonization กับเชื้อ *S. uberis* ได้ดีทั้งเชื้อที่ทนและไวต่อการเก็บกินโดยนิวโทรฟิล โดยการตรวจยืนยันด้วย horseradish peroxidase-rabbit immunoglobulin conjugate อย่างไรก็ดีเชื้อ *S. uberis* ที่เจริญในอาหาร chemically defined medium (CDM) ที่มี casein hydrolysate ไม่สามารถเกิด opsonization กับอิมมูโนโกลบูลินจีได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบ IgG_2 Fc region บนผิวเชื้อ *S. uberis* โดยการตรวจด้วย protein A ที่มีความจำเพาะต่อ Fc portion ของ IgG_2 (Leigh and Field, 1994) แม้ว่าการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการตรวจสอบขบวนการ opsonozation ของอิมมูโนโกลบูลินจีกับเชื้อ *S. uberis* ก็ตาม แต่เป็นไปได้ว่ามีขบวนการ opsonization เกิดขึ้นจริงแต่อาจเกิดขึ้นได้น้อยจึงส่งผลต่อการทำงานของนิวโทรฟิลโดยร่วมกับอิมมูโนโกลบูลินจีในด้านการเก็บกินเชื้อและฆ่าเชื้อไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดขบวนการ opsonoization น่าจะเป็นจำนวนครั้งของการได้รับการกระตุ้นที่น้อยกว่า และชนิดของสัตว์ทดลองที่ได้รับการกระตุ้นภูมิซึ่งในที่นี้เป็นลูกโคที่มีความสามารถในการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะซึ่งก็คือ การสร้างอิมมูโนโกลบูลินจีได้น้อยกว่าแม่โค (Chase et al., 2008) นอกจากนี้ incubation period ในการศึกษาการทำงานของนิวโทรฟิลอาจมีผลกระทบต่อขบวนการ opsonization ของอิมมูโนโกลบูลินจีกับเชื้อ *S. uberis* โดยการศึกษาครั้งนี้อิมมูโนโกลบูลินจีมีระยะเวลาในเกิดขบวนการ opsonization กับเชื้อ *S. uberis* 1 ชม. ในขณะที่การติดเชื้อเข้าเต้านมพบ IgG_2 สูงสุดภายใน 2-4 ชม. ซึ่ง IgG_2 จะเกิดขบวนการ opsonization กับเชื้อแบคทีเรียก่อนตามด้วยนิวโทรฟิลที่เข้ามาเก็บกินเชื้อแบคทีเรียโดยมีจำนวนมากที่สุดใน 8-12 ชม. (Guidry et al., 1983) ชี้ให้เห็นว่าขบวนการ opsonization กับเชื้อ *S. uberis* ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เวลาน้อยเกินไปเมื่อเทียบกับสภาพความเป็นจริงที่เกิดภายในเต้านม อย่างไรก็ดี hyaluronic acid capsule บนผิวของเชื้อ *S. uberis* สามารถช่วยป้องกันการเก็บกินระหว่างเชื้อกับนิวโทรฟิลได้ โดยเป็น masking Fc terminus ของอิมมูโนโกลบูลินจี ซึ่งขัดแย้งกับกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ที่ทนต่อการเก็บกินสามารถเกิด opsonization ได้เท่ากับเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ที่ไวต่อการเก็บกินบ่งบอกว่า capsule ไม่สามารถป้องกันมิให้อิมมูโนโกลบูลินจีเกิด opsonozation กับเชื้อได้ (Leigh and Field, 1994) virulence factor ที่สำคัญของเชื้อ *S. uberis* อาจไม่ใช่ somatic antigen ที่ปรากฏบน capsule หรือ cell wall แต่อาจเป็น

สารที่เชื้อ *S. uberis* สร้างขึ้นมาในระหว่างที่มีการเจริญเติบโตภายในร่างกายได้ที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายมีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *S. uberis* (Finch et al., 1997) สำหรับการศึกษาครั้งนี้การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย formalin-killed whole cell อาจเป็นแอนติเจนที่ไม่มี epitope หรือ antigen determinant ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง hyperimmune serum ที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่มีปริมาณสูง ซึ่ง epitope หรือ antigen determinant อาจถูกทำลายด้วยฟอร์มาลีน จึงทำให้ส่วน Fab receptor ของอิมมูโนโกลบูลินจีที่ใช้จับกับเชื้ออย่างจำเพาะนั้นมีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อ *S. uberis* เชื้อตายกับเชื้อเป็นส่งผลต่อการ opsonization กับเชื้อจึงทำให้นิวโทรฟิลไม่สามารถเก็บกินและฆ่าเชื้อโดยผ่านทางอิมมูโนโกลบูลินจีได้

เช่นเดียวกับการศึกษาการให้วัคซีนเชื้อ *S. uberis* ชนิด formalin-killed whole cell เข้าเต้านม แม้ว่าจะพบระดับของ IgG_1 และ IgG_2 ในน้ำนมและซีรั่มเพิ่มขึ้น แต่กลับไม่พบ opsonic activity ในน้ำนมและซีรั่ม อย่างไรก็ดีสามารถพบความต้านทานต่อการฉีดเชื้อ *S. uberis* ที่เป็นสายพันธุ์เดียวกับวัคซีนได้บ่งบอกว่าความต้านทานที่เกิดขึ้นนี้อาจไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเก็บกินของนิวโทรฟิล (Finch et al., 1994) นอกจากนี้การที่นิวโทรฟิลไม่สามารถทำการเก็บกินหรือฆ่าเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพอาจเป็นผลเนื่องมาจากตัวเชื้อ *S. uberis* เองสามารถเหนี่ยวนำให้นิวโทรฟิลในเต้านมเกิด apoptosis ได้ โดยเกิดลักษณะ phosphatidylserine tranlocation ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของการเกิด apoptosis ซึ่งนิวโทรฟิลเกิด apoptosis ได้ภายใน 3 ชม.หลังจากพบกับเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่านิวโทรฟิลสามารถเกิด apoptosis ได้เองถึง 30 เปอร์เซ็นต์อีกด้วย จึงมีความเป็นไปได้เช่นกันที่เชื้อ *S. uberis* ที่ใช้ในการตรวจสอบครั้งนี้สามารถทำให้นิวโทรฟิลเกิด apoptosis ได้ จนไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นจึงควรมีการตรวจยืนยันการเกิด apoptosis ของนิวโทรฟิลในระหว่างขั้นตอนการศึกษาด้วยวิธีการตรวจด้วย light microscopy หรือ flow cytometry หรือ transmission electron microscopy หรือ ELISA เป็นต้น (Sladek et al., 2005) นอกจากนี้การศึกษาภายนอกร่างกายพบว่านิวโทรฟิลที่ได้จากเต้านมของโคสาว และที่ได้จากเลือดสามารถเกิด apoptosis ได้เองภายหลัง 2 ชม.ซึ่งการที่นิวโทรฟิลเกิด apoptosis ได้เองนั้นอาจเกิดจากระยะเวลาที่บ่มนานเกินไป (Van Oostveldt et al., 1999; Sladek et al., 2002) และการมีเซลล์ที่มีผลต่อ plasma membrane integrity (Van Oostveldt et al., 1999)

การศึกษาครั้งนี้ไม่มีการตรวจยืนยันการเก็บกินเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และในขั้นตอนการศึกษาการทำงานของนิวโทรฟิลทั้งการเก็บกิน และฆ่าเชื้อที่ใช้ตัวอย่างเดียวกัน เวลาในการศึกษาเวลาเดียวกัน และอยู่สภาวะแวดล้อมเดียวกัน แต่ก็เป็นการศึกษาที่ทำการทดลองแยกจากโดยสิ้นเชิง ดังนั้นผลการศึกษาของการเก็บกินของนิวโทรฟิลจึงไม่อาจกล่าวอ้างถึงผลการศึกษาของการฆ่าเชื้อของนิวโทรฟิลได้ ดังการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการศึกษาการเก็บกินของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกาย คือ จำนวน bead ต่อจำนวนนิวโทรฟิล

เท่ากับ 20 ต่อ 1 ระยะเวลาในการบ่มเท่ากับ 30 นาที และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเท่ากับ 38.5 องศาเซลเซียส (Ducusin et al, 2001) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีสภาวะบางอย่างมีความแตกต่างกัน คือ จำนวน FITC-labeled *S. uberis* ต่อจำนวนนิวโทรฟิลเท่ากับ 1 ต่อ 20 และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้อาจมีผลต่อความสามารถของนิวโทรฟิลในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ได้ นอกจากนี้ EDTA ที่ใช้เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดในการเก็บเลือดเพื่อแยกนิวโทรฟิลในการศึกษาครั้งนี้สามารถยับยั้งการเก็บกินเชื้อของนิวโทรฟิลได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ อันเป็นผลเนื่องจากการขาด Ca^{2+} ที่จำเป็นต้องใช้ในกระบวนการเก็บกิน และการเกิด clump formation (Ducusin et al., 2001)

มาตรการต่างๆ เพื่อควบคุมและป้องกันการเกิดเต้านมอักเสบในฟาร์ม ไม่ว่าจะเป็นการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อจุ่มเต้านมภายหลังรีดนม การใช้ยาปฏิชีวนะหรือการคัดทิ้งโคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง แต่ก็พบว่ามาตรการเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการเป็นวิธีการควบคุมป้องกันเต้านมอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่แพร่จากเต้านมสู่เต้านม เช่น *S. agalactiae* และ *S. aureus* ได้เท่านั้นแต่ไม่สามารถควบคุมและป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่มาจากสิ่งแวดล้อมได้ (Oliver and Mitchell, 1984; Smith et al., 1985) จากการพบอุบัติการณ์การติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมสูงในช่วงต้นของการพักรีดนม (Smith et al., 1985; Todhunter et al., 1995) ดังนั้นการสอดยาปฏิชีวนะเข้าเต้านมสามารถลดอุบัติการณ์การติดเชื้อ *S. uberis* ได้ (Williamson et al., 1995) นอกจากนี้เครื่องรีดนมเป็นแหล่งของการแพร่เชื้อ *S. uberis* ในฟาร์มได้ (Zadock et al., 2003) ดังนั้นฟาร์มจึงต้องมีโปรแกรมการดูแลทำความสะอาด และเปลี่ยนอุปกรณ์เครื่องรีดนมและระบบรีดนมเป็นประจำ

เชื้อ *S. uberis* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมแม้ว่าเชื้อจะมาจากโคที่อยู่ในฝูงเดียวกัน (McDougall et al., 2004) แต่อย่างไรก็ตามการพบเชื้อ *S. uberis* ที่มีลักษณะสายพันธุ์เดียวกันภายในฝูงเดียวกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ภายในฝูงโคนมสามารถพบลักษณะของเชื้อ *S. uberis* ที่เป็นเชื้อที่มาจากสิ่งแวดล้อมหรือเชื้อที่สามารถติดต่อจากเต้านมสู่เต้านมได้ ดังนั้นมาตรการในการป้องกันเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อชนิดนี้ต้องอาศัยฐานข้อมูลในด้านลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อที่พบในรายฝูงนั้นๆ เพื่อบ่งบอกว่าการเกิดเต้านมอักเสบจากเชื้อนี้มีลักษณะเป็นแบบติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อมหรือเป็นแบบเต้านมสู่เต้านม และระบาดวิทยาของเชื้อเป็นแบบใด เพื่อจะได้มีมาตรการที่เหมาะสมในป้องกัน และควบคุมเต้านมอักเสบภายในฟาร์มได้ แต่อย่างไรก็ดีกลไกการก่อโรคและระบาดวิทยาของเชื้อ *S. uberis* ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จึงทำให้การป้องกันการติดเชื้อ *S. uberis* จึงยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ (Fang et al., 1998)

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาผลของอิมมูโนโกลบูลินจีต่อการทำงานของนิวโทรฟิลในการต่อต้านเชื้อ *S. uberis* ที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบในห้องปฏิบัติการพบว่าเต้านมที่มีการติดเชื้อของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมมีจำนวนเซลล์โซมาติกสูงกว่าเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อของแม่โคที่มีเต้านมปกติ บ่งบอกถึงการมีภาวะอักเสบภายในเต้านมที่มีการติดเชื้อ และพบว่าระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมจากเต้านมที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* สูงกว่าในน้ำนมของเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อของแม่โคที่มีเต้านมปกติ นอกจากนี้ระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของแม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมและแม่โคที่มีเต้านมปกติมีระดับสูงกว่าทั้งในน้ำนมของแม่โคทั้ง 2 กลุ่ม บ่งบอกว่าน้ำนมจากเต้านมที่มีภาวะเต้านมอักเสบมีระดับอิมมูโนโกลบูลินจีสูงกว่าในน้ำนมจากเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อ และอิมมูโนโกลบูลินจีที่พบในน้ำนมมักมีระดับต่ำกว่าที่พบในซีรั่มเสมอ การกระตุ้นการสร้าง hyperimmune serum ด้วยเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate พบว่าสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ โดยพบระดับอิมมูโนโกลบูลินจีสูงขึ้นในวันที่ 28 ของการกระตุ้น อย่างไรก็ดีการตรวจวัดระดับอิมมูโนโกลบูลินจีจะให้ผลชัดเจนก็ต่อเมื่อตรวจวัดด้วยแอนติเจนเคลือบผิวเพลทที่เป็นเชื้อ *S. uberis* สายพันธุ์เดียวกันกับสายพันธุ์ที่ใช้ในการกระตุ้นชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *S. uberis* มีลักษณะการเป็น homologous strain การศึกษาการทำงานของนิวโทรฟิลพบว่านิวโทรฟิลสามารถถูกกระตุ้นให้มีการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ได้ในสภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และ hyperimmune serum สำหรับการฆ่าเชื้อ *S. uberis* พบว่าองค์ประกอบในน้ำนมที่ไม่ใช่อิมมูโนโลบูลินจีอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการฆ่าเชื้อ *S. uberis* ได้ เพราะไม่พบว่าอิมมูโนโกลบูลินจีสามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อได้ ซึ่งถ้านิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อไม่ได้ ขั้นตอนการฆ่าเชื้อก็ไม่สามารถทำงานได้ จากการศึกษาในครั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงความสามารถของนิวโทรฟิลในการเก็บกิน และฆ่าเชื้อ *S. uberis* ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และซีรั่มของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* (hyperimmune serum) ไม่สามารถส่งเสริมให้นิวโทรฟิลมีการเก็บกิน และฆ่าเชื้อ *S. uberis* ทั้งสายพันธุ์ CM isolate และ SCM isolate ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการป้องกันปัญหาเต้านมอักเสบเรื้อรังจากการติดเชื้อ *S. uberis* ในฟาร์มด้วยการส่งเสริมการทำงานของนิวโทรฟิลด้วยอิมมูโนโกลบูลินจีจึงยังไม่สามารถสรุปได้ ทั้งนี้ต้องอาศัยความรู้ด้านความสามารถในการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้ และระบบภูมิคุ้มกันของเต้านมต่อไปในการพัฒนาด้านการป้องกันหรือรักษาเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อ *S. uberis* ในฟาร์ม

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และสุกุมา สามงามนิ่ม. 2004 (2547). การระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลมและให้ผลลบต่อการทดสอบ catalase ซึ่งแยกได้จากการติดเชื้อเต้านมของโคนม. การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30. กรุงเทพ, ประเทศไทย, 10-12 พฤศจิกายน: 52-59.

กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และอลงกร อมรศิลป์. 2004 (2547). อณูระบาดวิทยาของเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบในโคนม. การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30. กรุงเทพ, 10-12 พฤศจิกายน: 207-213.

ชัยเทพ พูลเขตต์ จตุรงค์ วงษ์สนิท และธีระ รักความสุข. 2001 (2544). ปัญหาสุขภาพของโคนมที่เลี้ยงในฟาร์มรายย่อยในเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ระหว่างตุลาคม 2542 ถึง กันยายน 2543. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาสัตว์ สาขาสัตวแพทยศาสตร์. กรุงเทพ, ประเทศไทย, 5-7 กุมภาพันธ์ 2544: 376-380.

ศริญญา ฤกษ์อยู่สุข. ผลกระทบของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมโคต่อคุณภาพน้ำนมดิบ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2008 (2551).

ภาษาอังกฤษ

Bannerman, D.D., Paape, M.J., Goff, J.P., Kimura, K., Lippolis, J.D. and Hope, J.C. 2004. Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. Vet. Res. 35: 681-700.

Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Beiboer, M.L., Benedictus, G., and Brand, A. 1999. Management practices associated with incidence rate of clinical mastitis. J. Dairy Sci. 82: 1643-1654.

Boutet, P., Boulanger, D., Gillet, L., Vanderplasschen, A., Closset, R., Bureau, F., et al. 2004. Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis. J. Dairy Sci. 87: 4104-14.

Burton, J.L., and Erskine, R.J. 2003. Immunity and mastitis some new ideas for an old disease. Vet. Clin. Food Anim. 19: 1-45.

Chabot-Roy, G., Willson, P., Segura, M., Lacouture, S., and Gottschalk, M. 2006. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. Microb. Pathog. 41: 21-32.

Chase, C.C.L., Hurley, D.J., and Reber, A.J. 2008. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. Vet. Clin. Food Anim. 24: 87-104.

Comalli, M.P., Eberhart, R.J., Griel, L.C. Jr., and Rothenbacher, H. 1984. Changes in the microscopic anatomy of the bovine teat canal during mammary involution. Am. J. Vet. Res. 45:2236-2242.

Cooray, R., and Bjorok, L. 1995. Bactericidal activity of the bovine myeloperoxidase system against bacteria associated with mastitis. Vet. Microbiol. 46: 427-434.

Cullen, G.A., and Little, T.W. 1969. Isolation of *Streptococcus uberis* from the rumen of cows and from sell. Vet. Rec. 85: 115-118.

De Hass, Y., Veerkamp, R.F., Barkema, H.W., Grohn, Y.T., and Schukken, Y.H. 2004. Association between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. J. Dairy Sci. 87: 95-105.

Denis, M., Parlane, N.A., Lacy-Hulbert, S.J., Summers, E.L., Buddle, B.M., and Wedlock, D.N. 2006. Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying off cows. Vet. Immunol. Immunopathol. 114: 111-120.

Ducusin, R.J.T., Sarashina, T. Uzaka, Y., Tanabe, S. and Ohtani, M. 2001. Phagocytic response of bovine polymorphonuclear leukocytes to different incubation conditions and following exposure to some effectors of phagocytosis and different anticoagulants *in vitro*. Can. J. Vet. Res. 65: 38-44.

Fang, W., Luther, D.A., Almeida, R.A. and Oliver, S.P. 1998. Decreased growth of *Streptococcus uberis* in milk from mammary glands of cows challenged with the same mastitis pathogen. J. Vet. Med. B 45: 539-549.

Farrell, H.M.Jr., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., et al. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. J. Dairy Sci. 87: 1665. Cited in Butler, J.E., and Kehrli, M.E.Jr. 2004. Immunocytes and immunoglobulins in milk. In: Mucosal Immunology. 3rd ed. P.L., Ogra, J.,

Mestecky, M.E., Lamm, W., Strober, J.R., McGhee, and J., Bienenstock (eds). New York: Academic Press.

Field, T.R., Ward, P.N., Pedersen, L.H., and Leigh, J.A. 2003. The hyaluronic acid capsule of Streptococcus uberis is not required for the development of infection and clinical mastitis. Infect. Immun. 71: 132-139.

Finch, J.M., Hill, A.W., Field, T.R., and Leigh, J.A. 1994. Local vaccination with killed *Streptococcus uberis* protects the bovine mammary gland against experimental intramammary challenge with the homologous strain. Infect. Immun. 62(9): 3599-3603.

Finch, J.M., Winter, A., Walton, A.W., and Leigh, J.A. 1997. Further studies on the efficacy of a live vaccine against mastitis caused by *Streptococcus uberis.* Vaccine 15: 1138-1143.

Gapper, L.W., Copestake, D.E.J., Otter, D.E., and Indyk, H.E. 2007. Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrums and dietary supplements: a review. Anal. Bioanal. Chem. 389:93–109.

Grant, R.G., and Finch, J.M. 1996. Phagocytosis of *Streptococcus uberis* by bovine mammary gland macrophages. Res. Vet. Sci. 62: 74-78.

Green, M.J., Burton, P.R., Green, L.E., Schukken, Y.H., Bradley, A.J., Peeler, E.J., et al. 2004. The use of Markov chain Monte Carlo for analysis of correlated binary data: patterns of somatic cells in milk and the risk of clinical mastitis in dairy cows. Prev. Vet. Med. 64: 157-174.

Guidry, A.J., Berning, L.M., and Hambleton, C.N. 1993. Opsonization of *Staphylococcus aureus* by bovine immunoglobulin isotypes. J. Dairy Sci. 76: 1285-1289.

Guidry, A.J., and Miller, R.H. 1986. Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity. J. Dairy Sci. 69: 1799-1805.

Guidry, A.J., Ost, M., Mather, I.H., Shainline, W.E., and Weinland, B.T. 1983. Sequential response of milk leukocytes, albumin, immunoglobulin, monovalent ions, citrate, and lactose in cows given infusions of *Escherichia coli* endotoxin into the mammary gland. Am. J. Vet. Res. 44: 2262-2267.

Guidry, A.J., Paape, M.J., and Pearson, R.E. 1980. Quarter milk variation in immunoglobulins and ability to support phagocytosis. J. Dairy Sci. 63: 611-615.

Guidry, A.J., Pearson, R.E., Paape, M.J., and Williams, W.F. 1980. Relationship among leukocyte phagoctosis, milk immunoglobulins, and susceptibility to intramammary infection. Am. J. Vet. Res. 41: 997-1001.

Harmon, R.J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. J. Dairy Sci. 77: 2103-2112.

Heyneman, R., Burvenich, C., and Vercauteren, R. 1990. Interaction between the respiratory burst activity of neutrophil leukocytes and experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. J. Dairy Sci. 73: 985-994.

Hill, A.W. 1981. Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* mastitis in the dairy cow. Res. Vet. Sci. 31: 107-112.

Hill, A.W. 1988. Pathogenicity of two strains of *Streptococcus uberis* infused into lactating and non-lactating bovine mammary glands. Res. Vet. Sci. 45: 400-404.

Hill, A.W., Finch, J.M., Field, T.R., and Leigh, J.A. 1994. Immune modification of the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis in the dairy cow. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 8: 109-118.

Hill, A.W., Heneghan, D.J.S., Field, T.R., and Williams, M.R. 1983. Increase in specific opsonic activity in bovine milk following experimental *Escherichia coli* mastitis. Res. Vet. Sci. 35: 222-226.

Hillerton, J.E., and Kliem, K.E. 2002. Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. J. Dairy Sci. 85: 1009-1014.

Hoeben, D., Burvenich, C., and Heyneman, R. 1997. Influence of antimicrobial agents on bactericidal activity on bovine milk polymorphonuclear leukocytes. Vet. Immunol. Immunopathol. 56: 271-282.

Hoeben, D., Burvenich, C., and Heyneman, R. 1998. Antibiotics commonly used to treat mastitis and respiratory burst of bovine polymorphonuclear leukocytes. J. Dairy Sci. 81: 403-410.

Jayarao, B.M., Gillespie, B.E., Lewis, M.J., Dowlen, H.H., and Oliver, S.P. 1999. Epidemiology of *Streptococcus uberis* intramammary infections in a dairy herd. J. Vet. Med. B 46: 433-442.

Kehrli, M.E.Jr., and Shuster, D.E. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. J. Dairy Sci. 77: 619-27.

Kliem, K.E., and Hillerton, J.E. 2002. Possible labile inhibition of the growth of *Streptococcus uberis* in milk from cows free from mastitis. J. Dairy Res. 69: 375-382.

Leigh, J.A. 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? Vet. J. 157: 225-238.

Leigh, J.A. 2000. Vaccines against bovine mastitis due to *Streptococcus uberis* current status and future prospects. Adv. Exp. Med. Biol. 480: 307-311.

Leigh, J.A., and Field, T.R. 1994. *Streptococcus uberis* resists the bactericidal action of bovine neutrophils despite the presence of bound immunoglobulin. Infect. Immun. 62: 1854-1859.

Leigh, J.A., Field, T.R., and Williams, M.R. 1990. Two strains of *Streptococcus uberis*, of differing ability to cause clinical mastitis, differ in their ability to resist some host defense factors. Res. Vet. Sci. 49: 85-87.

Leigh, J.A., Finch, F.M., Field, T.R., Real, R.C., Winter, A., Walton, A.W. et al. 1999. Vaccination with the plasminogen activator from *Streptococcus uberis* induces an inhibitory response and protects against experimental infection in the dairy cow. Vaccine 17: 851-857.

Lightner, J.K., Miller, G.Y., Hueston, W.D., and Dorn, C.R. 1988. Estimation of the costs of mastitis, using national animal health monitoring system and milk somatic cell count data. J. Am. Vet. Med. Assoc. 192: 1410-1413.

Matthews, K.R., Almeida, R.A., and Oliver, S.P. 1994. Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*. Infect. Immun. 62: 5641-5646.

McDougall, S., Parkinson, T. J., Leyland, M., Anniss, F. M., and Fenwick, S.G. 2004. Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows' milk. J. Dairy Sci. 87: 2062-2072.

Miller, G.Y., Bartlett, P.C., Lance, S.E., Anderson, J., and Heider, L.E. 1993. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 202:1230-1236.

Miller, R.H., Guidry, A.J., Paape, M.J., Dulin, A.M., and Fulton, L.A. 1988. Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils. Am. J. Vet. Res. 49: 42-45.

Newbould, F.H.S. 1967. Some effects of the source of bovine milk leukocytes and strain of Staphylococcus on their interaction *in vitro*. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 31: 303-308.

Newbould, F.H.S. 1973. The effect of added serum and glucose and some inherent factors on phagocytosis *in vitro* by milk leukocytes from several cows. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 37: 189-194.

Nickerson, S.C. 1987. Resistance mechanisms of the bovine udder: new implications for mastitis control at the teat end. J. Am. Vet. Med. Assoc. 191: 1484-1488.

Oliver, S.P., Almeida, R.A., and Calvinho, L.F. 1998. Virulence factors of *Streptococcus uberis* isolated from cows with mastitis. J. Vet. Med. B 45: 461-471.

Oliver, S.P., Almeida, R.A., Gillespie, B.E., Headrick, S.J., Dowlen, H.H., Johnson, D.L., et al. 2004. Extended ceftiofur therapy for treatment of experimentally-induced *Streptococcus uberis* mastitis in lactating dairy cattle. J. Dairy Sci. 87: 3322-3329.

Oliver, S.P., and Mitchell, B.A. 1984. Prevalence of mastitis pathogens in herds participating in a mastitis control program. J. Dairy Sci. 67: 2436-2440.

Opdebeeck, J.P. 1982. Mammary gland immunity. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181: 1061-1065.

Otani, H. and Futakami, M. 1994. Effects of bovine milk proteins on the phagocytic property and formation of nitrite by mouse peritoneal macrophages. Anim. Sci. Technol. 65: 423-431.

Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcon, J.J., Cajero-Juarez, M., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez-Meza, J.E., Bravo-Patino, A., et al. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. J. Infect. 54: 399-409.

Paape, M.J., Hafs, H.D., and Snyder, W.W. 1963. Variation of estimated numbers of milk somatic stained with Wright's stain or pyronin y-methyl green stain. J. Dairy Sci. 46: 1211-1216.

Paape, M.J., Pearson, R.E., and Schultze, W.D. 1978. Variation among cows in the ability of milk to support phagocytosis and in the ability of polymorphonuclear leukocytes to phagocytose *Staphylococcus aureus*. Am. J. Vet. Res. 39: 1907-1910.

Paape, M.J., Wergin, W.P., Guidry, A.J. and Pearson, R.E. 1979. Leukocytes-second line of defense against invading mastits pathogen. J. Dairy Sci. 62: 135-153.

Paape, M.J., Bannerman, D.D., Zhao, X., and Lee, J.W. 2003. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. Vet. Res. 34: 597-627.

Pedersen, L.H., Aalbaek, B., Rontved, C.M., Ingvartsen, K.L., Sorensen, N.S., Heegaard, P.M.H., et al. 2003. Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. J. Comp. Path. 128: 156-164.

Petrovski, K.R., Heuer, C., Parkinson, T.J., and Williamson, N.B. 2009. The incidence and aetiology of clinical bovine mastitis on 14 farms in Northland, New Zealand. N. Z. Vet. J. 57: 109-115.

Phuektes, P., Mansell, P.D., Dyson, R.S., Hooper, N.D., Dick, J.S., and Browning, G.F. 2001. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. J. Clin. Microbiol. 39(4): 1460-1466.

Prin-Mathieu, C., Le Roux, Y., Faure, C., Laurent, L., Bene, M.C., and Moussaoui, F. 2002. Enzymatic activities of bovine peripheral blood leukocytes and milk polymorphonuclear neutrophils during intrammammary inflammation caused by lipopolysaccharide. Clin. Diag. Lab. Immunol. 9 (4): 812-817.

Pryor, S.M., Cursons, R.T., Williamson, J.H., and Lacy-Hulbert, S.J. 2009. Experimentally induced intramammary infection with multiple strains of *Streptococcus uberis*. J. Dairy Sci. 92: 5467-5475.

Pullinger, G. D., Coffey, T. J., Maiden, M. C. and Leigh, J. A. 2007. Multilocus-sequence typing analysis reveals similar populations of *Streptococcus uberis* are responsible for bovine intramammary infections of short and long duration. Vet. Microbiol. 119: 194-204.

Rainard, P., Lautrou, Y., and Poutrel, B. 1988. Ingestion and killing of *Streptococcus agalactiae* by bovine granulocytes in the presence of natural opsonins. Vet. Microbiol. 18: 41-50.

Rambeaud, M., Almeida, R.A., Pighetti, G.M., and Oliver, S.P. 2003. Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. Vet. Immunol. Immunopathol. 96: 193-205.

Rerk-u-suke, S., Thepsit, A., Samngamnim, S., and Ajariyakhajorn, K. 2009. Diversity of *Streptococcus uberis* biochemical profiles in small dairy holders of Nakhonpathom province, Thailand. Proceedings of the 2nd Federation of Asian Small Animal Veterinary Associations Congress and the 35th Veterinary Medicine and Livestock Development Annual Conference . Bangkok, Thailand, November 3-5: 589-590.

Rivas, A.L., Tadevosyan, R., Gorewit, R.C., Anderson, K.L., Lyman, R., and Gonzalez, R.N. 2006. Relationships between the phagocytic ability of milk macrophages and polymorphonuclear cells and somatic cell counts in uninfected cows. Can. J. Vet. Res. 70: 68-74.

Roberson, J.R., Warniick, L.D., and Moore, G. 2004. Mild to moderate clinical mastitis: efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin, and frequent milk-out treatment versus no treatment. J. Dairy Sci. 87: 583-592.

Serieys, F., Raguet, Y., Goby, L., Schmidt, H., and Friton, G. 2005. Comparative efficacy of local and systemic antibiotic treatment in lactating cows with clinical mastitis. J. Dairy Sci. 88: 93-99.

Sladek, Z. Rysanek, D., and Faldyna, M. 2005. Effect of *Staphylococcus aurues* and *Streptococcus uberis* on apoptosis of bovine mammary gland neutrophils *in vitro*. Vet. Med.-Czech. 50: 11-23.

Sladek, Z., Rysanek, D., Ryznarova, H., and Faldyna M. 2006. The role of neutrophil apoptosis during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. Vet. Med.-Czech. 51: 437-447.

Sladek, Z., Vasickova, D., and Rysanek, D. 2002. The dynamics of morphological changes during *in vitro* aging of bovine virgin mammary gland neutrophils. Vet. Med.-Czech 47: 325-332.

Smith, K.L., Todhunter, D.A., and Schoenberger, P.S. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. J. Dairy Sci. 68: 1531-1553.

Sordillo, L.M., and Streicher, K.L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 7: 135-146.

Statistix® version 8.0. User's manual. Tallahassee: Analytical software, 1985-2003.

Suriyasathaporn, W., Schukken, Y. H., Nielen, M., and Brand, A. 2000. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. J. Dairy Sci. 83: 1248-1255.

Tamilselvam, B., Almeida, R.A., Dunlap, J.R., and Oliver, S.P. 2006. *Streptococcus uberis* internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells. Microb. Pathog. 40: 279-285.

Targowski, S.P. 1983. Role of immune factors in protection of mammary gland. J. Dairy Sci. 66: 1781-1789.

Targowski, S.P. and Klucinski, W. 1985. Effect of immune complexes from mastitic milk on blocking of FcReceptors and phagocytosis. Infect. Immune. 47: 484-488.

Thomas, L.H., Haider, W., Hill, A.W., and Cook, R.S. 1994. Pathologic findings of experimentally induced *Streptococcus uberis* infection in the mammary gland of cows. Am. J. Vet. Res. 55: 1723-1728.

Todhunter, D.A., Smith, K.L., and Hogan, J.S. 1995. Environmental Streptococcal intrammammary infections of the bovine mammary gland. J. Dairy Sci. 78: 2366-2374.

Van Oostveldt, K., Dosogne, H., Burvenich, C., Paape, M.J., Brochez, V., and Van den Eeckhout, E. 1999. Flow cytometric procedure to detect apoptosis of bovine polymorphonucelar leukocytes in blood. Vet. Immunol. Immunopathol. 70: 125-133.

Van Oostveldt, K., Paape, M.J., and Burvenich, C. 2002. Apoptosis of bovine neutrophils following diapedesis through a monolayer of endothelial and mammary epithelial cells. J. Dairy Sci. 85:139-147.

Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K. and O'Kennedy, R. 2009. Mastitis detections: current trends and future perspectives. Trends Biotechnol. 27: 486-493.

Ward, W.R., Hughes, J.W., Cripps, P.J., Sutherland, J.P., and Sutherst, J.E. 2002. Observational study of temperature, pH and bacteria in straw bedding, faecal consistency, cleanliness and mastitis in cows in four dairy herds. Vet. Rec. 151: 199-206.

Williamson, J.H., Woolford, M.W. and Day, A.M. 1995. The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against *Streptococcus uberis*. N. Z. Vet. J. 43: 228-234.

Zadoks, R.N., Allore, H.G., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Wellenberg, G.J., Grohn, Y.T., et al. 2001. Cow and quarter level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. J. Dairy Sci. 84: 2649-2663.

Zadoks, R.N., Gillespie, B.E., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Oliver, S.P., and Schukken, Y.H. 2003. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. Epidemiol. Infect. 130: 335-349.

Zecconi, A., Bronzo, V., Piccinini, R., Spreafico, G., and Ruffo, G. 1994. Phagocytic activity of bovine polymorphonuclear neutrophil leucocytes. J. Dairy Res. 61: 271-279.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเก็บตัวอย่างและการตรวจตัวอย่างน้ำนมทางห้องปฏิบัติการ

การเก็บตัวอย่างน้ำนม

วัสดุและอุปกรณ์

1. ขวดพลาสติกเก็บตัวอย่างน้ำนมขนาด 30 มล. จำนวน 50 ขวด
2. หลอดดูดยา ขนาด 10 มล. จำนวน 1 อัน
3. สำลีก้อนชุบแอลกอฮอล์ 70% จำนวน 1 กระปุก
4. น้ำยาซี.เอ็ม.ที 1 ขวด ปริมาตร 30 มล.
5. ถาดทดสอบซี.เอ็ม.ที
6. ก้อนน้ำแข็ง จำนวน 2 ก้อน
7. ใบบันทึกผลการตรวจซี.เอ็ม.ที
8. ปากกาเขียนแผ่นใสชนิดกันน้ำ 1 ด้าม และ ปากกาลูกลื่น 1 ด้าม
9. กล่องโฟมเก็บความเย็น 1 กล่อง

วิธีการปฏิบัติก่อนทำการรีดน้ำนม ตรวจกรองเต้านมอักเสบเบื้องต้นรายเต้านมภายหลังจากการเตรียมเต้านมก่อนทำการรีดนม

1. คลำตรวจบริเวณเต้านมโค เพื่อตรวจหาภาวะเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ
2. รีดน้ำนมโคใส่ถาดทดสอบซี.เอ็ม.ที. ทั้ง 4 เต้า
3. สังเกตลักษณะน้ำนมที่รีดได้ทั้ง 4 เต้าว่ามีความผิดปกติที่มีลักษณะบ่งชี้ถึงภาวะเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการหรือไม่
4. เอียงถาดทดสอบให้ปริมาณน้ำนมทั้ง 4 ด้าน มีปริมาตรเท่ากัน ประมาณ 2-3 มล.
5. ใส่น้ำยาซี.เอ็ม.ทีลงในถาดทั้ง 4 ด้านในสัดส่วน 1 ต่อ 1 (น้ำนมต่อน้ำยาซี.เอ็ม.ที)
6. หมุนถาดเป็นวงกลมเพื่อให้น้ำนมและน้ำยาซี.เอ็ม.ที.เข้ากัน ประมาณ 15-30 วินาที
7. เอียงถาดซ้าย-ขวา เพื่อให้อ่านผลได้ง่าย ลักษณะผลบวกจากการทดสอบ
   7.1. T น้ำนมมีลักษณะเป็นฟิล์มเคลือบบริเวณก้นถาด
   7.2. +1 น้ำนมมีลักษณะเป็นเมือกบริเวณก้นถาด
   7.3. +2 น้ำนมมีลักษณะเป็นวุ้นสามารถเคลื่อนตัวไปมาได้บริเวณก้นถาด
   7.4. +3 น้ำนมมีลักษณะเป็นก้อนแข็งไม่สามารถเคลื่อนตัวไปมาได้ติดบริเวณก้นถาด
8. จดบันทึกผลภายหลังการทดสอบ

9. เต้าที่ปกติสามารถรีดน้ำนมส่งขายได้ ส่วนเต้าที่เป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ แนะนำให้เกษตรกรไม่รีดส่งขาย แต่รีดทิ้งด้วยมือ ภายหลังจากการรีดนมให้จุ่มหัวนมด้วยน้ำยาจุ่มเต้าทุกตัว
10. ภายหลังจากรีดนมเสร็จแล้ว ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ (Grace et al., 1992 และ NMC, 1999) ดังนี้

<u>วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำนม</u>

1. การเก็บน้ำนมถังรวม
   1) เขียนเบอร์ถังข้างขวดพลาสติกที่จะใช้เก็บตัวอย่างน้ำนม จำนวน 1 ขวด
   2) ล้างมือให้สะอาดก่อนทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม
   3) กวนน้ำนมในถังนมก่อนทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมด้วย syringes
   4) เก็บตัวอย่างน้ำนมใส่ขวดพลาสติกให้ได้ปริมาตร 30 มล.
   5) ปิดฝาขวดให้แน่นและเก็บใส่กล่องโฟมรักษาความเย็น
2. การเก็บน้ำนมรายเต้าด้วยวิธีปลอดเชื้อ
   1) เขียนชื่อโค เต้า และเบอร์ถังข้างขวดพลาสติกที่จะใช้เก็บตัวอย่างน้ำนม จำนวน 4 ขวด
   2) ทำความสะอาดหัวนมโดยใช้ผ้าสะอาดเช็ดบริเวณหัวนมและเต้านม
   3) ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์หมาด ๆ เช็ดบริเวณหัวนม เน้นบริเวณรูเปิดของหัวนมให้สะอาด โดยเริ่มจากเต้าที่อยู่ไกลตัวเข้ามาหาเต้าที่อยู่ใกล้ตัว รอจนหัวนมแห้ง
   4) เช็ดมือข้างที่จะใช้รีดน้ำนมด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์ให้สะอาด
   5) ทำการเก็บตัวอย่างโดยเริ่มจากเต้าที่อยู่ใกล้ตัวออกไปหาเต้าที่อยู่ไกลตัว (ตรงข้ามกับการเช็ดทำความสะอาดเต้านม) เปิดฝาขวดเก็บตัวอย่างด้วยมือข้างที่ไม่ได้เช็ดแอลกอฮอล์ โดยไม่ให้ฝาขวดหงายขึ้น เอียงขวด 45 องศากับหัวนม ไม่ควรเอาปากขวดไปโดนบริเวณปลายเปิดหัวนม ทำการรีดนมและเก็บตัวอย่างน้ำนม ให้ได้ปริมาตร 15 มล.
   6) จุ่มเต้านมด้วยน้ำยาจุ่มเต้า ภายหลังจากการเก็บตัวอย่าง
3. ตัวอย่างน้ำนมที่ได้ทั้งหมดเก็บใส่กล่องรักษาความเย็น และนำส่งห้องปฏิบัติเพื่อตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทันที

การเพาะเชื้อเพื่อหาสาเหตุของเต้านมอักเสบ (NMC, 1999)

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. เครื่องอบความดันไอน้ำ
2. เครื่องชั่งน้ำหนัก
3. ตู้อบบ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
4. โถใส่จานเพาะเชื้อ
5. จานเพาะเชื้อ
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ปริมาณ 16 กรัม
8. น้ำกลั่น
9. ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 400 มล. จำนวน 1 ขวด
10. เลือดแกะที่ใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ปริมาตร 16 มล.
11. เครื่องกวนสารละลายให้ความร้อน
12. กระดาษฟอยด์และสำลี
13. ห่วงถ่ายเชื้อ ขนาด 0.01 มล.
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์
15. แผ่นสไลด์แก้ว
16. สารละลายย้อมสีแกรม
17. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดสอบ catalase
18. Rapid plasma สำหรับการทดสอบ coagulase
19. เชื้อ *Staphylococcus aureus* สำหรับการทดสอบ CAMP
20. สารละลายเอสคูลิน
21. อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar
22. Triple Sugar Iron
23. Simmons Citrate agar
24. Motility agar

<u>วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนประกอบ (Blood agar)</u>

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ปริมาณ 16 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 500 มล. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มล. ปิดฝาขวดด้วยกระดาษฟอยด์

2. นำไปวางบนแท่นให้ความร้อนเพื่อให้ละลายจนเดือด ปิดขวดแก้วรูปชมพู่ ด้วยสำลีและกระดาษฟอยด์
3. นำเข้าเครื่องอบความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.ม. เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อลงแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 1 ชม. แต่ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ไม่ต้องการใช้ทันที ให้เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเก็บได้ไม่เกิน 5 วัน
5. หลังจากแช่อาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิประมาณ 1 ชม. เติมเลือดแกะให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5% ลงใส่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าให้เข้ากันเบา
6. หลังจากเข้ากันดีแล้วให้เทใส่จานเพาะเชื้อจานละ 12-14 มล. ใช้ไฟลนบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อไล่ฟองอากาศ
7. รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวทำการคว่ำจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เพื่อทดสอบการปราศจากเชื้อในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ สามารถเก็บไว้ได้นาน 2 สัปดาห์
8. ก่อนนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนประกอบมาใช้ให้ผึ่งในตู้อบบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ไม่ควรมีการปนเปื้อนของเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย

<u>วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar</u>

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ปริมาณ 25 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 500 มล.
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มล. ปิดฝาขวดด้วยกระดาษฟอยด์ นำไปวางบนแท่นให้ความร้อนให้ละลายจนเดือด ปิดขวดแก้วรูปชมพู่ ด้วยสำลีและกระดาษฟอยด์
3. นำเข้าเครื่องอบความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.ม. เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อลงแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 1 ชม.
5. เทใส่จานเพาะเชื้อจานละ 13-15 มล. รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวทำการคว่ำจานเพาะเชื้อ
6. ใส่ถุงเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียม Triple Sugar Iron Slants

1. ชั่งสาร Triple sugar iron agar ปริมาณ 29.7 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 500 มล.
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มล. ปิดฝาขวดด้วยกระดาษฟอยด์ นำไปวางบนแท่นให้ความร้อนให้ละลายจนเดือด ปิดขวดแก้วรูปชมพู่ ด้วยสำลีและกระดาษฟอยด์
3. แบ่งสารละลายลงในหลอดทดลองขนาด 13x100 มม. หลอดละ 5 มล. นำเข้าเครื่องอบความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.ม. เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ
4. นำมาวางบนแท่นเพื่อให้เย็นตัวและมีผิวหน้าเอียงเป็นแนวลาด
5. เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียม Simmons Citrate Slants

1. ชั่งสาร Simmons citrate agar ปริมาณ 12.2 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 500 มล.
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มล. ปิดฝาขวดด้วยกระดาษฟอยด์ นำไปวางบนแท่นให้ความร้อนให้ละลายจนเดือด ปิดขวดแก้วรูปชมพู่ด้วยสำลี และกระดาษฟอยด์
3. แบ่งสารละลายลงในหลอดทดลองขนาด 13x100 มม. หลอดละ 5 มล.
4. นำเข้าเครื่องอบความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.ม. เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ
5. นำมาวางบนแท่นเพื่อให้เย็นตัว และมีผิวหน้าเอียงเป็นแนวลาด
6. เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

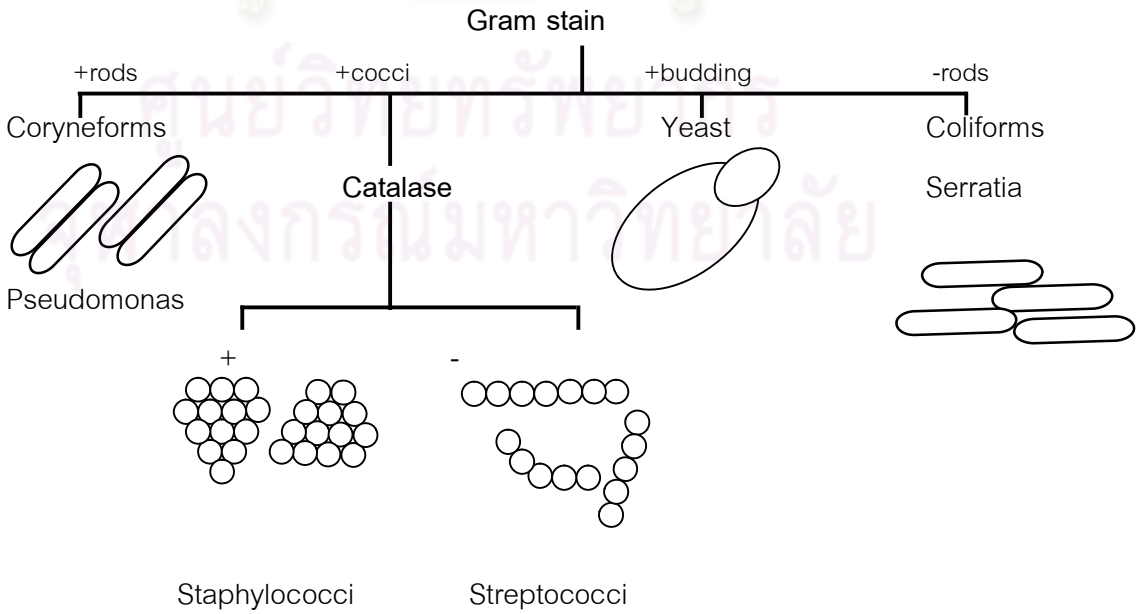
วิธีการเตรียม Motility Test Medium

1. ชั่งสาร Motility test agar ปริมาณ 10 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 500 มล.
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มล. ปิดฝาขวดด้วยกระดาษฟอยด์ นำไปวางบนแท่นให้ความร้อนให้ละลายจนเดือด ปิดขวดแก้วรูปชมพู่ด้วยสำลีและกระดาษฟอยด์
3. เติมสาร 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) ปริมาตร 2.5 มล.
4. แบ่งสารละลายลงในหลอดทดลองขนาด 13x100 มม. หลอดละ 5 มล.
5. นำเข้าเครื่องอบความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.ม. เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ
6. เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>การเพาะแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบ</u>

1. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่มีเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนประกอบ 1 จาน สามารถใช้ลงตัวอย่างน้ำนมได้ 1 ตัว (4 เต้านม) โดยแบ่งพื้นที่ของจานเพาะเชื้อเป็น 4 ส่วน เขียนเบอร์ถัง ชื่อโค และเต้าลงบนจานเพาะเชื้อ บริเวณด้านล่างของจานเพาะเชื้อ
2. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ ขนาด 0.01 มล. ที่ผ่านการเผาไฟและเย็นตัวแล้วจุ่มลงในตัวอย่างน้ำนมที่เก็บได้ให้เต็มห่วงถ่ายเชื้อ นำมาเขี่ยลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนประกอบ โดยตัวอย่างน้ำนม 1 เต้าใช้พื้นที่ ¼ ของจานเพาะเชื้อ
3. สำหรับตัวอย่างน้ำนมจากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการจะใช้พื้นที่ในการลงตัวอย่างน้ำนม ½ ของจานเพาะเชื้อ
4. นำจานเพาะเชื้อที่เขี่ยตัวอย่างน้ำนมแล้วเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชม. เพื่อทำการวินิจฉัยแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบต่อไป
5. ที่ 24 ชม. สังเกตการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนจานเพาะเชื้อและวินิจฉัยแยกเบื้องต้นโดยใช้การย้อมสีโคโลนี หรือใช้สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เพื่อแยกชนิดแบคทีเรียเป็นแกรมบวกและแกรมลบ
6. แบคทีเรียแกรมบวกจะทดสอบ catalase โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวทดสอบเพื่อแยกแบคทีเรีย Streptococci ออกจาก Staphylococci โดยแบคทีเรีย Streptococci จะให้ผลลบ (ลักษณะเซลล์ที่พบจากการย้อมแกรมแสดงในภาพที่ 6)

ภาพที่ 6 การย้อมแกรมเพื่อวินิจฉัยแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบ



7. แบคทีเรีย Streptococci Staphylococci และแบคทีเรียแกรมลบ จะถูกแยกเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนประกอบบนจานเพาะเชื้อใหม่ และนำเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 24 ชม. เพื่อให้ได้จำนวนโคโลนีเดี่ยว ๆ นำไปวินิจฉัยแยกชนิดด้วยการทดสอบชีวเคมีต่อไป
8. ที่ 48 ชม. นำจานเพาะเชื้อที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ นำมาทดสอบทางชีวเคมี ดังนี้

การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อวินิจฉัยแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบ

Streptococci	เขี่ยเชื้อแนวขวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนประกอบที่เขี่ยเชื้อ *Staphylococcus aureus* แนวตั้ง เพื่อทดสอบปฏิกิริยา CAMP เขี่ยเชื้อลงในหลอดทดลองที่บรรจุ สารละลายเอสคูลิน เพื่อทดสอบปฏิกิริยาเอสคูลินไฮโดรไลซิส นำจานเพาะเชื้อทดสอบปฏิกิริยา CAMP และหลอดทดสอบปฏิกิริยาเอสคูลินไฮโดรไลซิสเข้าตู้อบบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 24 ชม. แล้วอ่านผล
Staphylococci	เขี่ยเชื้อลงในหลอดทดลองที่บรรจุ rapid plasma เพื่อทดสอบปฏิกิริยา coagulase นำหลอดทดลองเข้าตู้อบบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 24 ชม. แล้วอ่านผล
แบคทีเรียแกรมลบ	เขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar เขี่ยเชื้อลงในหลอดทดลองที่บรรจุ Triple Sugar Iron, Simmons Citrate agar และ Motility agar นำหลอดทดลองและจานเพาะเชื้อเข้าตู้อบบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 24 ชม. แล้วอ่านผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. ที่ 72 ชม. อ่านผลการทดสอบทางชีวเคมี ดังนี้

แบคทีเรีย	ผลการทดสอบ	แปลผล
Streptococci	ให้ผลบวกปฏิกิริยา CAMP และ เอสคูลินไฮโดรไลซิส (C+E+)	*Streptococcus uberis*
	ให้ผลบวกปฏิกิริยา CAMP แต่ เอสคูลินไฮโดรไลซิส เป็นลบ (C+E-)	*Streptococcus agalactiae*
	ให้ผลลบปฏิกิริยา CAMP แต่ เอสคูลินไฮโดรไลซิส เป็นบวก (C-E+)	*Streptococcus uberis*
	ให้ผลลบปฏิกิริยา CAMP และ เอสคูลินไฮโดรไลซิส (C-E-)	*Streptococcus dysgalactiae*
	ที่ 72 ชม. ให้ผลบวกปฏิกิริยา CAMP แต่ เอสคูลินไฮโดรไลซิสเป็นลบ (C+E-) ให้นำเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสต่อจนเวลาที่ 96 ชม. ให้ปฏิกิริยาเอสคูลินไฮโดรไลซิสเป็นบวก	Group G Streptococci
Staphylococci	ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา coagulase	*Staphylococcus aureus*
	ให้ผลลบกับปฏิกิริยา coagulase	Coagulase-negative staphylococci
แบคทีเรียแกรมลบ	ให้โคโลนีสีชมพูและมี bile precipitate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ให้ผลลบกับการทดสอบ Simmons Citrate agar มีการเคลื่อนที่บน Motility agar และบน Triple Sugar Iron ให้ผลเป็น A/A, G	*Escherichia coli*
	ให้โคโลนีสีชมพู-เหลืองและเป็น mucoid บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ให้ผลบวกกับการทดสอบ Simmons Citrate agar ไม่มีการเคลื่อนที่บน Motility agar และบน Triple Sugar Iron ให้ผลเป็น A/A, G	*Klebsiella spp.*
	ให้โคโลนีสีชมพูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ให้ผลบวกกับการทดสอบ Simmons Citrate agar มีการเคลื่อนที่บน Motility agar และบน Triple Sugar Iron ให้ผลเป็น A/A, G	*Enterobacter spp.*
	ให้โคโลนีใส หรือมี red pigment บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ให้ผลบวกกับการทดสอบ Simmons Citrate agar มีการเคลื่อนที่บน Motility agar และบน Triple Sugar Iron ให้ผลเป็น K/A	*Serratia spp.*
	ให้โคโลนีแวววาว ใสแบบ metalic sheen บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ให้ผลบวกหรือลบกับการทดสอบ Simmons Citrate agar มีการเคลื่อนที่บน Motility agar และบน Triple Sugar Iron ให้ผลเป็น K/K	*Pseudomonas spp.*
	ให้โคโลนีใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ให้ผลบวกหรือลบกับการทดสอบ Simmons Citrate agar มีการเคลื่อนที่บน Motility agar และบน Triple Sugar Iron ให้ผลเป็น K/AS+	*Proteus spp.*

10. แนวทางกำหนดความมีนัยสำคัญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมของแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบ

จำนวนโคโลนีทั้งหมด	1	2-10			มากกว่า 10		
ชนิดเชื้อ	ชนิดเดียว	ชนิดเดียว	มากกว่าสองชนิด	หลายชนิด	ชนิดเดียว	มากกว่าสองชนิด	หลายชนิด
S. agalactiae	4*	4	4	4	4	4	4
Group G streptococci	4	4	4	4	4	4	4
Streptococcal species	2	3	2	2	4	3	1
S. aureus	3	4	4	4	4	4	4
Staphylococcal species	1	2	2	2	4	2	1
E. coli Klebsiella Enterobacter Serratia	2	3	2	2	4	2	1
Pasteurella	4	4	4	4	4	4	4
Pseudomonas	2	3	2	2	4	4	2
Yeast, Mold & other Fungi	2	3	1	1	4	2	1
Nocardia	2	3	2	2	4	3	3
Prototheca	2	3	3	2	4	3	3
C. bovis	1	2	2	2	4	3	3
C. pyogenes	2	3	3	3	4	3	3
C. ulcerans	2	4	3	2	4	4	3
Proteus	2	3	1	1	4	2	1

* ระดับนัยสำคัญของการวินิจฉัยว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ (Degree of confidence in diagnosing an infection)

1 – ไม่มีนัยสำคัญ 2 – ต้องสงสัย

3 – มีนัยสำคัญ 4 – มีนัยสำคัญอย่างสูง

11. เชื้อแบคทีเรีย *S. uberis* ที่วินิจฉัยได้จากการทดสอบทางชีวเคมี จะทำการยืนยันผลการวินิจฉัยด้วยชุดตรวจชีวเคมีจำแนกชนิดเชื้อ API 20 STREP® (bioMérieux, France)
12. เก็บรักษาเชื้อ *S. uberis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) broth ที่มี glecerol 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจนับจำนวนเซลล์โซมาติก โดยใช้เครื่องนับอนุภาค Coulter counter ZM® ในน้ำนมรายเต้านม (Hinz et al., 1992)

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดทดลอง ขนาด 16x150 มม.
2. หลอดไปเปตแก้ว ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ขนาด 5 หรือ 10 มล.
3. เครื่องดูดปริมาณสาร ขนาด 100-200 ไมโครลิตร พร้อม tips ปลอดเชื้อ
4. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส
6. เครื่องเขย่าผสมสารละลาย
7. เครื่องตรวจนับอนุภาค Coulter counter ZM® (Coulter Electronicics Limited, England)
8. สารเคมี fixative solution และ detergent

สารเคมีและวิธีการเตรียมสาร fixative solution

ชั่งสาร EOSIN 0.1 กรัม ใส่ในสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ ปริมาตร 10 มล. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. เขย่าให้สารละลายเข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรอง เก็บใส่ขวดสีชาและเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารเคมีและวิธีการเตรียมสาร detergent

สารละลายเอทานอล 96 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 125 มล. ผสมกับสาร Triton X-100 (Merck®) ปริมาตร 20 มล. และน้ำเกลือ 0.9% NSS ปริมาตร 855 มล. เขย่าให้สารละลายเข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน

วิธีการทดสอบ

1. ดูดตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 10 มล. ผสมกับ fixative solution ปริมาตร 0.2 มล. ลงในหลอดทดลอง เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสารละลาย
2. นำตัวอย่างน้ำนมที่ผ่านการใส่สาร fixed cells แล้ว แช่ลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 20 นาที
3. นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2 ปริมาตร 0.1 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ detergent ปริมาตร 9.9 มล. เขย่าสารให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสารละลาย
4. นำตัวอย่างลงแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
5. นำตัวอย่างขึ้นจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
6. นำตัวอย่างเข้าเครื่องตรวจนับอนุภาค Coulter counter ZM® เพื่อนับจำนวนเม็ดเลือดขาว

ภาคผนวก ข

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus ubeirs* สำหรับขั้นตอนการเตรียมวัคซีน การเคลือบผิวเพลท และการทำงานของนิวโทรฟิล

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องอบความดันไอน้ำ
2. เครื่องชั่งน้ำหนัก
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง
4. ตู้อบบ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์
5. โถใส่จานเพาะเชื้อ
6. จานเพาะเชื้อ
7. หลอดทดลอง ขนาด 16x100 มม.
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
9. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)
10. น้ำกลั่น
11. Phosphate-buffered saline (pH 7.4)
12. ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 400 มล. จำนวน 1 ขวด
13. เครื่องกวนสารละลายให้ความร้อน
14. กระดาษฟอยด์และสำลี
15. ห่วงถ่ายเชื้อ ขนาด 0.01 มล.
16. ตะเกียงแอลกอฮอล์
17. ปิเปตแก้ว ขนาด 10 มล.
18. Automatic pipettor
19. Pipette tips

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth ปริมาณ 6 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 500 มล.
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มล. ปิดฝาขวดด้วยกระดาษฟอยด์ นำไปวางบนแท่นให้ความร้อนให้ละลาย ปิดขวดแก้วรูปชมพู่ ด้วยสำลีและกระดาษฟอยด์

3. นำเข้าเครื่องอบความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.ม. เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ
4. เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>สารเคมีและวิธีการเตรียม Phosphate buffered saline (PBS) 10X</u>

ชั่งสาร NaCl 80 กรัม KCl 2 กรัม KH_2PO_4 1.4 กรัม และ Na_2HPO_4 9 กรัม เติมน้ำกลั่น 1000 มล. เขย่าให้สารละลายเข้ากัน นำเข้าเครื่องอบความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตร.ม. เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ

<u>สารเคมีและวิธีการเตรียมสาร Phosphate buffered saline (PBS) 1X</u>

นำ Phosphate buffered saline (PBS) 10X ปริมาตร 100 มล. เติมน้ำกลั่น 900 มล. เขย่าให้สารละลายเข้ากัน นำเข้าเครื่องอบความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตร.ม. เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ เพื่อนำไปใช้ต่อไป

<u>วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ</u>

1. ละลายเชื้อ *S. uberis* ที่เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
2. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ ขนาด 0.01 มล. ที่ผ่านการเผาไฟและเย็นตัวแล้วจุ่มลงในเชื้อ แล้วเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar แล้วเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 18 ชม. ให้ทำซ้ำ 3 ครั้ง (subculture)
3. เขี่ยเชื้อประมาณ 10 – 15 โคโลนี ถ่ายลงในหลอดแก้วที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 4 มล. เขย่าให้เชื้อแตกกระจายกัน แล้วเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 4 ชม.
4. ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดถ่ายลงไปในขวดแก้วรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 196 มล. แล้วเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 18 ชม.
5. นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000g เป็นเวลา 15 นาที และล้างเซลล์ของเชื้อด้วย PBS ให้ทำการปั่นล้างทั้งหมด 2 ครั้ง
6. เซลล์ของเชื้อที่ได้นำไปตรวจสอบดังนี้
   6.1. ตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar
      6.1.1. เขย่าสารละลายเชื้อ และดูดสารละลายเชื้อ ปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอดทดลอง PBS ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย

ประมาณ 15 วินาที เพื่อให้ละลายเข้าด้วยกัน จะได้สารละลายเชื้อที่เจือจางแล้วความเข้มข้น 10^{-1} ทำซ้ำข้างต้นจนได้สารละลายเชื้อความเข้มข้นที่เจือจางแล้วความเข้มข้น 10^{-8}

6.1.2. ดูดสารละลายเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar โดยสารละลายเชื้อระดับความเข้มข้น 10^{-1} ใช้ปริมาณเชื้อ 100 ไมโครลิตร จะเป็นสารละลายเชื้อระดับความเข้มข้น 10^{-2} ส่วนสารละลายเชื้อระดับความเข้มข้นที่เจือจางแล้ว 10^{-2} และ 10^{-3} จะเป็นสารละลายเชื้อระดับความเข้มข้น 10^{-3} และ 10^{-4} ตามลำดับ

6.1.3. ใช้แท่งแก้วเกลี่ยสารละลายเชื้อจนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดอบบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18 ชม.

6.1.4. การนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ ภายหลังการอบบ่มด้วยการนับมือ (manual counting) ให้ทำการจดบันทึกสายพันธุ์ของเชื้อ และระดับการเจือจางที่นับได้ การนับจำนวนแบคทีเรียแบ่งได้ 4 แบบ ดังนี้

ก) จานเพาะเชื้อธรรมดามีจำนวนแบคทีเรียตั้งแต่ 25-250 โคโลนี หรือน้อยกว่า 25 โคโลนี เลือกจานที่นับได้ ทำการนับจำนวนทั้งหมด (รวมทั้งโคโลนีเล็กฝอย) บนจานเพาะเชื้อ รายงานจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่นับได้คูณกลับระดับการเจือจางที่นับได้

ข) จานเพาะเชื้อที่มีจำนวนแบคทีเรียมากกว่า 250 โคโลนี ไม่ควรรายงานจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนแบคทีเรียมาก ๆ ที่ระดับการเจือจางสูงสุดว่าเป็น Too numerous to count (TNTC) ถ้าแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อมีการกระจายตัวสม่ำเสมอ และมีจำนวนแบคทีเรียมากกว่า 250 โคโลนี ให้ระบุเป็น estimated SPC (ESPC) โดยทำการตีตาราง 9x9 ตร.ซม. จะได้พื้นที่สี่เหลี่ยมจตุรัสขนาด 1 ตร.ซม.จำนวน 81 ช่อง ทำการนับจำนวนแบคทีเรียในช่องดังกล่าว โดยแบ่งเป็น 2 กรณี

1. จำนวนแบคทีเรียน้อยกว่า 10 โคโลนีใน 1 ตร.ซม. ให้นับจำนวนแบคทีเรีย 12 ช่อง แบ่งเป็นด้านกว้าง 6 ช่อง และด้านยาว 6 ช่อง (ไม่ให้ซ้ำช่องตำแหน่งเดิม)
2. จำนวนแบคทีเรียมากกว่า 10 โคโลนีใน 1 ตร.ซม. ให้นับจำนวนแบคทีเรีย 4 ช่อง

จำนวนแบคทีเรียที่นับได้ทั้ง 2 กรณี นำมาหาค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียในพื้นที่ 1 ตร.ซม.แล้วคูณด้วยพื้นที่จานเพาะเชื้อแล้วคูณกลับด้วยระดับการเจือจางจะได้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

ค) จานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียอยู่อย่างการกระจาย ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีการกระจายแบ่งเป็น 3 แบบ ดังนี้

1. โคโลนีที่เป็นสายยาว ไม่ถือว่าเป็นการกระจายตัวของแบคทีเรีย เพราะไม่ได้เกิดจากการแยกตัวของแบคทีเรีย
2. โคโลนีลักษณะเป็นฟิล์มของน้ำระหว่างวุ้นกับก้นของจานเพาะเชื้อ
3. โคโลนีลักษณะเป็นฟิล์มของน้ำบริเวณขอบหรือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

หากพบลักษณะโคโลนีทั้ง 3 แบบดังกล่าวในจานเพาะเชื้อ ให้พิจารณาดังนี้

1. พื้นที่ที่พบโคโลนีกระจายตัวทั้ง 3 แบบ มากกว่า 50% ของพื้นที่จานเพาะเชื้อ หรือ
2. พื้นที่ที่พบโคโลนีกระจายตัวทั้ง 3 แบบ มากกว่า 25% ของพื้นที่จานเพาะเชื้อ

ทั้ง 2 กรณีข้างต้นให้รายงานเป็น spreader (SPR) และการนับโคโลนีทั้ง 3 แบบให้คิดเป็น 1 โคโลนี

ง) ความผิดพลาดทางห้องปฏิบัติการหรือการมีตัวยับยั้งการการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย กรณีที่จานเพาะเชื้อมีการปนเปื้อนหรือจำนวนแบคทีเรียที่นับได้ไม่เหมาะสม ให้รายงานเป็น laboratory accident (LA) และถ้าตรวจพบสารยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียให้รายงานเป็น growth inhibitor (GI)

6.1.5. การคำนวณและการรายงานผล

การรายงานผล SPC จะใช้ตัวเลขที่มีนัยสำคัญเพียงสองตัวแรกที่นับได้เท่านั้น ส่วนตัวเลขในลำดับที่สามหากเป็นเลข 1,2,3,4 จะปัดเศษลง ถ้าเป็นเลข 6,7,8,9 ให้ปัดเศษขึ้น แต่ถ้าเป็นเลข 5 ให้สังเกตตัวเลขตัวที่สองถ้าเป็นเลขคี่ให้ปัดขึ้นแต่ถ้าเป็นเลขคู่ให้ปัดลง

<u>ตัวอย่าง</u>

ตัวเลขที่คำนวณได้	SPC
12,700	13,000
12,400	12,000
15,500	16,000
14,500	14,000

ก) ทุกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนแบคทีเรียระหว่าง 25-250 โคโลนี

คำนวณจำนวนแบคทีเรีย โดยใช้สูตร $N = \Sigma C/[(1xn_1)+(0.1xn_2)]d$

เมื่อ N = จำนวนแบคทีเรียที่นับได้เป็นโคโลนีต่อมล

ΣC = ผลรวมของจำนวนแบคทีเรียที่นับได้ทุกจานเพาะเชื้อ

n_1 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในระดับการเจือจางต่ำสุด

n_2 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในระดับการเจือจางสูงขึ้นจาก n_1

d = ระดับการเจือจางที่นับได้ในครั้งแรก

ตัวอย่าง

1:100	1:1000
232,244	33, 28

$N = (232+244+33+28)/[(1X2)+(0.1X2)]10^{-2}$

= 24,409

= 24,000

ข) ทุกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนแบคทีเรียน้อยกว่า 25 โคโลนี โดยที่ทั้งสองระดับการเจือจางมีจำนวนแบคทีเรียน้อยกว่า 25 โคโลนีให้รายงานเป็น <25 ในระดับการเจือจางที่นับได้ครั้งแรก

ตัวอย่าง

จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี) ที่ระดับการเจือจาง

1:100	1:1000	SPC/มล.
18	2	<2,500 ESPC
0	0	<2,500 ESPC

ค) ทุกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนแบคทีเรียมากกว่า 250 โคโลนี โดยที่ทั้งสองระดับการเจือจางมีจำนวนแบคทีเรียมากกว่า 250 โคโลนี (แต่มีจำนวนแบคทีเรียน้อยกว่า 100 โคโลนีในพื้นที่ 1 ตร.ซม) ให้นับจานเพาะเชื้อที่มีค่าใกล้เคียงกับ 250 แล้วคูณกลับด้วยระดับการเจือจาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่าง

จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี) ที่ระดับการเจือจาง

1:100	1:1000	SPC/มล.
TNTC	640	640,000 ESPC

ง) ถ้าทุกจานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียอยู่อย่างการกระจาย ให้รายงานเป็น SPR ถ้ามีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียให้รายงานเป็น GI หรือมีความผิดพลาดทางห้องปฏิบัติการให้รายงานเป็น LA

จ) ทุกจานเพาะเชื้อที่มีค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียมากกว่า 100 โคโลนีต่อ 1ตร.ซม. ให้นับระดับการเจือจางสูงสุดคูณพื้นที่จานเพาะเชื้อคูณ100

ตัวอย่าง

จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี) ที่ระดับการเจือจาง

1:100	1:1000	SPC/มล.
TNTC	7,150*	<6,500,000* ESPC
TNTC	6,490**	<5,700,000** ESPC
TNTC	2,200***	<2,000,000*** ESPC

* พื้นที่จานเพาะเชื้อเท่ากับ 65 ตร.ซม. (เส้นผ่าศูนย์กลางจานเพาะเชื้อ 9 ซม)

** พื้นที่จานเพาะเชื้อเท่ากับ 57 ตร.ซม. (เส้นผ่าศูนย์กลางจานเพาะเชื้อ 8.5 ซม)

*** พื้นที่จานเพาะเชื้อเท่ากับ 20 ตร.ซม. (เส้นผ่าศูนย์กลางจานเพาะเชื้อ 5 ซม)

6.2. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) ของเชื้อ โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar แล้วเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 18 ชม.

7. เก็บเชื้อไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมวัคซีน *Streptococcus uberis* ชนิดเชื้อตาย

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. เครื่องอบความดันไอน้ำ
2. ตู้อบบ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์
3. โถใส่จานเพาะเชื้อ
4. จานเพาะเชื้อ
5. Phosphate-buffered saline (pH 7.4)
6. ขวดแก้วปลอดเชื้อ ขนาด 20 มล. พร้อมจุกปิด
7. เครื่องกวนสารละลายให้ความร้อน
8. กระดาษฟอยด์และสำลี
9. ห่วงถ่ายเชื้อ ขนาด 0.01 มล.
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์
11. เครื่องดูดปริมาณสาร ขนาด 1000 ไมโครลิตร พร้อม tip ปลอดเชื้อ
12. สารฟอร์มัลดีไฮด์ 1 เปอร์เซ็นต์
13. เชื้อ *S. uberis* ที่เพาะเลี้ยงได้
14. อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar
15. Freund's incomplete adjuvant (Sigma-aldrich, USA)
16. Tween20 (Sigma-aldrich, USA)
17. กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน

<u>สารเคมีและวิธีการเตรียม Tween20 (1 เปอร์เซ็นต์)</u>

1. นำ Tween20 ปริมาตร 1 มล.
2. เติม PBS ปริมาตร 99 มล.

<u>วิธีการเตรียมวัคซีนเชื้อตาย</u>

1. นำเชื้อ *S. uberis* ที่เพาะเลี้ยงได้ความเข้มข้น 10^{10} cfu ต่อมล. มาฆ่าด้วยสารฟอร์มัลดีไฮด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชม.
2. ตรวจสอบการตายของเชื้อ โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ ขนาด 0.01 มล. ที่ผ่านการเผาไฟและเย็นตัวแล้วจุ่มลงในเชื้อ แล้วเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar แล้วเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 18 ชม.

3. เตรียมวัคซีน สำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 1 โดส ซึ่งประกอบด้วย
    3.1 เชื้อ *S. uberis* ความเข้มข้น 10^{10} cfu ต่อมล. ปริมาตร 1 มล.
    3.2 Freund's incomplete adjuvant ปริมาตร 1 มล.
    3.3 Tween20 (1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 2 มล.
4. นำ Freund's incomplete adjuvant ปริมาตร 1 มล. ผสมกับ Tween20 ปริมาตร 2 มล. จะได้สารละลายสีขาว จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ดูดสารละลายสีขาวลงในขวดแก้ว
5. นำเชื้อ *S. uberis* ปริมาตร 1 มล. ถ่ายลงไปในขวดแก้ว ตรวจสอบความปราศจากเชื้อ (sterility) ของวัคซีน โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ ขนาด 0.01 มล. ที่ผ่านการเผาไฟและเย็นตัวแล้วจุ่มลงในเชื้อ แล้วเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar แล้วเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 18 ชม.
6. ปิดฝาจุกให้สนิท
7. เก็บวัคซีนไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

วิธีการ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. 96 well flat bottom microtiter plate (Sterilin, U.K.)
2. สารกลูตาร์อัลดีไฮด์ (Electron Microscopy Science, U.S.A.)
3. Carbonate-bicarbonate buffer
4. ELISA buffer (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
5. Blocking solution
6. peroxidase conjugated rabbit anti-bovine IgG (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
7. *o*-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
8. Phosphate citrate buffer
9. ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์
10. H_2SO_4 (Merck, Germany)
11. ELISA Reader (Anthos, Austria)
12. Multichannel pipettor
13. Pipette tips

<u>สารเคมีและวิธีการเตรียม Carbonate-bicarbonate buffer 0.05M (pH 9.6)</u>

ชั่ง Na_2CO_3 1.59 กรัม $NaHCO_3$ 2.93 กรัม เติมน้ำกลั่น 1000 มล. เขย่าให้สารละลายเข้ากัน วัด pH แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>สารเคมีและวิธีการเตรียมสารกลูตาร์อัลดีไฮด์ 0.025 เปอร์เซ็นต์</u>

นำสารกลูตาอัลดีไฮด์ 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม carbonate-bicarbonate buffer 99.95 มล. เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>สารเคมีและวิธีการเตรียม Blocking solution</u>

ชั่ง skim milk 1 กรัม เติม ELISA buffer 100 มล. เขย่าให้สารละลายเข้ากัน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารเคมีและวิธีการเตรียม Phosphate-citrate buffer 0.05 M (pH 5.0)

นำ Na_2HPO_4 0.2 M ปริมาตร 2.57 มล. Citric acid 0.1 M ปริมาตร 24.3 มล. เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มล. ปรับ pH เท่ากับ 5 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารเคมีและวิธีการเตรียม *o*-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD) 0.34 มก.ต่อมล.

นำสาร OPD 1 เม็ด (10 มก. ต่อเม็ด) ละลายใน phosphate-citrate buffer ปริมาตร 29.4 มล. ก่อนนำไปใช้ให้เติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 118 ไมโครลิตร

สารเคมีและวิธีการเตรียม H_2SO_4 1.0 M

นำสาร H_2SO_4 ที่ความเข้มข้น 95-97 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5.6 มล. เทลงช้าๆในน้ำกลั่น ปริมาตร 80 มล. เขย่าให้สารละลายเข้ากัน และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มล.

ขั้นตอนการเคลือบผิวเพลท

1. นำเพลท ชนิด 96 หลุม ก้นแบน มาเตรียมผิวเพลทด้วยสารกลูตาร์อัลดีไฮด์ 0.025 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. เททิ้ง แล้วเคาะให้แห้ง
2. เจือจางเชื้อ *S. uberis* ใน carbonate-bicarbonate buffer จนได้ความเข้มข้น 10^6 cfu ต่อมล. จากนั้นหยดสารละลายเชื้อลงหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จะได้ความเข้มข้นของสารละลายเชื้อต่อหลุมเท่ากับ 10^5 cfu ต่อมล.
3. ปิดเพลทด้วย paraffin ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
4. ดูดสารละลายเชื้อทิ้งทีละหลุม ทำการล้างด้วย ELISA buffer 2 ครั้ง โดยหยดลงหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นดูดทิ้งทีละหลุม และเคาะให้แห้ง
5. หยดสาร blocking solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเททิ้ง ล้างด้วย ELISA buffer 2 ครั้ง ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเททิ้ง และเคาะให้แห้ง

ขั้นตอน ELISA

1. เจือจางตัวอย่างในอัตราส่วนที่เหมาะสมใน ELISA buffer จากนั้นหยดตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. เททิ้ง และล้างด้วย ELISA buffer 3 ครั้ง ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเททิ้ง และเคาะให้แห้ง
2. เจือจาง peroxidase conjugated rabbit anti-bovine IgG ในอัตราส่วนที่เหมาะสมใน PBS 0.01 M (pH 7.4) หยด peroxidase conjugated rabbit anti-bovine IgG ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. เททิ้ง และล้างด้วย ELISA buffer 3 ครั้ง ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเททิ้ง และเคาะให้แห้ง
3. หยด *o*-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD) ปริมาตร 75 ไมโครลิตรต่อหลุม สังเกตการเกิดสีภายใน 5 นาที
4. หยุดปฏิกิริยาด้วย H_2SO_4 1.0 M ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม
5. อ่านค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 492 นาโนเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
การตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิล

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. ตู้บ่มอุณหภูมิ
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
3. เครื่องอบความดันไอน้ำ
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง
5. กล้องจุลทรรศน์
6. ตู้อบบ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์
7. โถใส่จานเพาะเชื้อ
8. จานเพาะเชื้อ
9. หลอดทดลอง ขนาด 16x100 มม.
10. Phosphate-buffered saline
11. สารฟอร์มัลดีไฮด์
12. Centrifuge tube ขนาด 15 มล.
13. แท่งแก้ว
14. อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar
15. Automatic pipettor
16. Microcentrifuge tube
17. Pipette tips
18. เข็มฉีดยา เบอร์ 18 ยาว 1.5 นิ้ว
19. หลอดฉีดยา ขนาด 50 มล.
20. น้ำกลั่น
21. NaCl 2.7 เปอร์เซ็นต์
22. Fluorescein isothiocyanate isomer I-celite (FITC) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
23. Flow cytometer (Becton Dickinson, U.S.A.)

<u>สารเคมีและวิธีการเตรียมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด</u>

เตรียม sodium phosphate buffer 0.0132 M โดยชั่ง NaH_2PO_4 1.82 กรัม เติมน้ำกลั่น 1000 มล. จากนั้นชั่ง Na_2HPO_4 1.87 กรัม เติมน้ำกลั่น 1000 มล. จากนั้นสารละลาย NaH_2PO_4

ปริมาตร 42.3 มล. ผสมกับสารละลาย Na_2HPO_4 ปริมาตร 57.7 มล. ซึ่งจะได้ sodium phosphate buffer ปริมาตร 100 มล. นำเข้าเครื่องอบความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.ม. เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ชั่ง NaCl 0.07 กรัม และชั่ง EDTA 1.5 กรัม เติม sodium phosphate buffer 100 มล. นำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

<u>สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเรืองแสง Fluorescein isothiocyanate (FITC)</u>

เตรียม $NaHCO_3$ 0.1 M (pH 9.0) โดยชั่ง $NaHCO_3$ 0.84 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มล. จากนั้นชั่งสารเรืองแสง FITC 0.01 กรัม แล้วเติม $NaHCO_3$ ปริมาตร 100 มล. กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>ขั้นตอนการย้อมเชื้อ *S. uberis* ด้วยสารเรืองแสง FITC</u>

1. เติมสารเรืองแสง FITC ปริมาตร 1 มล. ลงในเซลล์ของเชื้อ *S. uberis* ที่อัดกันแน่น เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที
2. ปั่นล้างด้วย PBS 5 ครั้ง ที่ความเร็ว 12000เ เป็นเวลา 3 นาที จนกว่าส่วนบนใสไม่มีสาร FITC ตกค้าง

<u>ขั้นตอนการแยกนิวโทรฟิล</u>

1. เก็บเลือดที่เส้นเลือดที่คอ (jugular vein) ในโคสาวที่มีสุขภาพดี ปริมาตร 50 มล. ลงในหลอดเก็บเลือดที่มีสาร sodium phosphate buffer 0.0132 M sodium chloride 0.012 M และ EDTA 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดในอัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 9:1
2. นำเลือดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000g เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนพลาสมา buffy coat ทิ้งไป
3. ชั่งน้ำหนักของเม็ดเลือดแดงและนิวโทรฟิลที่ตกตะกอน
4. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 เท่าของน้ำหนักที่ชั่งได้ เพื่อสลายเม็ดเลือดแดง ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 45 วินาที จากนั้นเติม NaCl 2.7 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของน้ำหนักที่ชั่งได้ เพื่อให้สารละลายมีสภาพเป็น isotonicity
5. นำไปปั่นที่ความเร็ว 200g เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วย PBS ทั้งหมด 3 ครั้ง

6. ตรวจสอบการมีชีวิตของนิวโทรฟิล (viability) โดยใช้สี trypan blue 0.4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลายนิวโทรฟิล 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นหยดบน hemocytometr counting chamber นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) ที่กำลังขยาย 40X เซลล์นิวโทรฟิลที่ตายแล้วจะติดสี ตรวจนับจำนวนทั้งหมด และการมีชีวิตอยู่มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

<u>ขั้นตอนการศึกษาการเก็บกินเชื้อของนิวโทรฟิล</u>

1. เตรียมสารละลายเชื้อ *S. uberis* ที่ย้อมสารเรืองแสง FITC ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 cfu ต่อมล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน microcentrifuge tube
2. เติมตัวอย่างซีรั่มหรือน้ำนม ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม.
3. เติมสารละลายนิวโทรฟิลความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 เซลล์ต่อมล.ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารฟอร์มัลดีไฮด์ ปริมาตร 6 ไมโครลิตร
4. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. ส่งตรวจการเก็บกินเชื้อด้วยเครื่อง flow cytometer

<u>ขั้นตอนการศึกษาการฆ่าเชื้อของนิวโทรฟิล</u>

1. เตรียมสารละลายเชื้อ *S. uberis* ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 cfu ต่อมล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน microcentrifuge tube
2. เติมตัวอย่างซีรั่มหรือน้ำนม ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม.
3. เติมสารละลายนิวโทรฟิลความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 เซลล์ต่อมล.ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที
8. ตรวจนับปริมาณของเชื้อที่รอดชีวิตด้วยวิธี plate count โดยดูดสารละลาย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar แล้วใช้แท่งแก้วกระจายสารละลายให้แห้ง แล้วเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 18 ชม.
4. ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอาภาภรณ์ เทพสิทธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 3 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2524 จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2548 ได้รับทุนโครงการรับนักเรียนที่มีผลการเรียนดี ปีการศึกษา 2542-2547 จากนั้นเข้าทำงานเป็นผู้ช่วยวิจัยให้กับ ผศ. น.สพ. ธนศักดิ์ บุญเสริม ภาควิชาอายุรศาสตร์ และอาจารย์นายสัตวแพทย์ธีรวัฒน์ สว่างจันทร์อุทัย ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นระยะเวลา 1 ปี หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549 โดยได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ประจำปีการศึกษา 2549

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย