

การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในโคนมด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเชื้อ การดื้อยา และเทคนิคทางชีวโมเลกุล

Comparative Analysis of Bacteria Causing Bovine Mastitis by Culture Dependent Antimicrobial Resistance and Molecular Technique

อามินี เจ๊ะลี¹ สมพงษ์ โอทอง² และศุภชัย นิติปันธ^{2*}

Aminee Jhelee¹, Sompong O-thong² and Supachai Nitipan^{2*}

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษา เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* *S. agalactiae* *E. coli* และ *Corynebacterium* spp. จากน้ำนมโคที่เก็บมาจากฟาร์มโคนมขนาดเล็กมหาวิทยาลัยทักษิณ 10 ตัวอย่าง สุ่มเชื้อ *Staphylococcus* spp. จำนวน 95 ไอโซเลท ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์คัตเลส และเอนไซม์โคแอกกูเลส พบ 13 ไอโซเลท (ร้อยละ 18.57) ให้ผลเป็นเชื้อ *S. aureus* และเชื้อ *Streptococcus* spp. จำนวน 103 ไอโซเลท ทดสอบการสร้างเอนไซม์คัตเลสและเอนไซม์เอสคิวลินไฮโดรไลซิส ไอโซเลท พบว่า 7 ไอโซเลท (ร้อยละ 8.97) เป็นเชื้อ *S. agalactiae* เชื้อ *S. aureus* ที่คัดแยกได้สามารถดื้อต่อยา Penicillin G (ร้อยละ 84.62) และ Kanamycin (ร้อยละ 46.15) ในขณะที่มีความไวต่อยา Cephalothin (ร้อยละ 100) และ Gentamicin (ร้อยละ 92.3) ส่วนไอโซเลทของ *S. agalactiae* ดื้อต่อยา Penicillin G Kanamycin Cephalothin และ Gentamicin การวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มตัวอย่างน้ำนม โดยเทคนิค 16S rDNA-PCR และ DGGE เชื้อ *Serratia* sp. และ *Alcaligenes* sp. ถูกพบเป็นเชื้อเด่น

คำสำคัญ: 16S rDNA-PCR DGGE ความไวต่อยาต้านจุลชีพ การดื้อยา

Abstract

The objective of this study were to isolate *S. aureus* *S. agalactiae* *E. coli* and *Corynebacterium* spp. from bovine-mastitis milk that were collected from small dairy farm at Thaksin University 10 samples. Ninety-five isolates of *Staphylococcus* were randomized collected to examine *S. aureus* by catalase and coagulase productions. Thirteen isolates (18.57%) were *S. aureus*. One hundred-three isolates of *Streptococcus* were examined by catalase and esculin hydrolysis production that found seven isolates (8.97%) of *S. agalactiae*. Isolated *S. aureus* could resist to Penicillin G (84.62%), Kanamycin (46.15%) while these isolates were susceptible to Cephalothin (100%) and Gentamicin (92.3%). The all of isolated *S. agalactiae* resisted to Penicillin G Kanamycin Cephalothin and Gentamicin. The bacterial diversity in both samples were examined by 16S rDNA-PCR and DGGE. *Serratia* sp. and *Alcaligenes* sp. were found to be dominant species.

Keywords: 16S rDNA-PCR, DGGE, Sensitivity, Resistance

^๑ นิสิตปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง ๙๓๒๑๐

^๒ ผศ.ดร., ^๓ อ., ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และหน่วยการจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง ๙๓๒๑๐

*Corresponding author: e-mail: supachai_nitipan@hotmail.com Tel. ๐๘๔-๐๘๔-๐๒๐๗

บทนำ

โรคเต้านมอักเสบส่งผลให้การผลิตน้ำนมมีปริมาณที่ไม่เพียงพอและมีคุณภาพลดลง เกิดจากหลายปัจจัย เช่น ทางกายภาพ หรือการติดเชื้อของแบคทีเรีย แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบ ได้แก่ *Staphylococcaceae* *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae* และ *Corynebacteriaceae* [1] การรักษา และการจัดการโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนม เกษตรกรอาศัยการตรวจนับระดับจำนวนเซลล์โซมาติก (Somatic Cells) ในน้ำนมซึ่งมีความสัมพันธ์กับโรคเต้านมอักเสบ โดยปกติโคนมที่มีสุขภาพดี มีปริมาณเซลล์โซมาติก น้อยกว่า 200,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถ้าพบมากกว่า 200,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงว่าโคเป็นโรคเต้านมอักเสบ [2] แบคทีเรียที่พบมักเป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและแบบไม่แสดงอาการ คือ เชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* และ *Escherichia coli* และมีการพบเชื้อ *Corynebacterium* spp. และ Coagulase negative Staphylococci บ้างเล็กน้อย [4] การรักษาส่วนใหญ่ใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษา เนื่องจากไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรคและใช้เวลาในการรักษานานส่งผลให้มียาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนม [3] ซึ่งส่งผลค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงขึ้นและรักษาให้หายได้ยาก ซึ่งใช้เวลาในการรักษานาน [1] อย่างไรก็ตามพบเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ที่มีรายงานว่า เป็นเชื้อหลักของการเกิดโรคเต้านมอักเสบ พบเพียงร้อยละ 3 ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่การนำเทคนิค DGGE มาวิเคราะห์สาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ พบเชื้อ *S. aureus*, *Sphingomonas* และ *E. coli* [4-5] ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเทคนิคทางชีวโมเลกุลให้ผลตรวจพบแบคทีเรียสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบแตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสาเหตุที่แท้จริงของโรคเต้านมอักเสบ โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ไม่แสดงอาการของโรคเต้านมอักเสบ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ การทดสอบการดื้อยา และเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยการตรวจวิเคราะห์ยีน 16S rDNA และ Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) เพื่อยืนยันสาเหตุของโรค และเพื่อเป็นประโยชน์ในการหาสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการได้อย่างแม่นยำยิ่งขึ้น

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ แบ่งกลุ่มออกเป็น 2 ระดับ โดยการตรวจด้วยน้ำยา California mastitis test (CMT) คือ ตัวอย่างน้ำนมดิบจากเต้านมโคปกติ (CMT 0) จำนวน 5 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (CMT+3) จำนวน 5 ตัวอย่าง จากฟาร์มโคนม มหาวิทยาลัยทักษิณ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดแก้วเก็บตัวอย่างปราศจากเชื้อ ขนาด 150 มิลลิลิตรโดยเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส แบ่งน้ำนมดิบ 50 มิลลิลิตร ส่งตรวจปริมาณเซลล์โซมาติก ที่เหลือนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ และหาประชากรแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล [4]

2. การศึกษาด้วยเทคนิคการแยกเชื้อ

2.1 การพิสูจน์ยืนยันเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ส่มเลือกโคโลนี ที่มีลักษณะเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ และสามารถย่นน้ำตาลแมนนิทอล เปลี่ยนอาหาร Mannitol salt agar เป็นสีเหลือง นำไปย้อมสีแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์คัตตาเลสและเอนไซม์โคแอกกูเลส โดยที่เชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อที่ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมเรียงตัวเป็นกลุ่ม ให้ผลบวกกับการทดสอบเอนไซม์คัตตาเลสและเอนไซม์โคแอกกูเลส [6]

2.2 การพิสูจน์ยืนยันเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

ส่มเลือกโคโลนีสีขาว กลม นูน ขอบเรียบ ที่ขึ้นบนอาหาร Columbia agar นำไปย้อมสีแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์คัตตาเลสและเอนไซม์เอสคิวลินไฮโดรไลซิส โดย *S. agalactiae* ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมเรียงตัวเป็นสายยาว ให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์คัตตาเลสและเอนไซม์เอสคิวลินไฮโดรไลซิส [6]

2.3 การพิสูจน์ยืนยันเชื้อ *Escherichia coli*

ส้อมเลือกโคโลนีลักษณะสีชมพู กลม ที่เจริญบนอาหาร MacConkey agar ย้อมสีแกรมและทดสอบ IMVIC Test โดยที่เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อที่ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว และให้ผลการทดสอบ IMVIC Test ดังนี้ คือ + + - - (Biotype I) หรือ - + - - (Biotype II) [6]

2.4 การพิสูจน์ยืนยันเชื้อ *Corynebacterium* sp.

ส้อมเลือกโคโลนีสีดำหรือเทาดำ กลม ขอบเรียบ ที่เจริญบนอาหาร Tellurite blood agar นำไปย้อมสีแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์เคตาเลส โดยที่เชื้อ *Corynebacterium* sp. เป็นเชื้อที่ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน คล้ายอักษรจีน ให้ผลบวกกับการทดสอบเอนไซม์เคตาเลส [4]

3. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Disc diffusion

ทดสอบความไวของ *S. aureus* *S. agalactiae* *E. coli* และ *Corynebacterium* sp. ที่แยกได้จากข้อ 2 ด้วยวิธี Kirby-Bauer disc diffusion susceptibility test โดยผสมโคโลนีของเชื้อลงในสารละลายร้อยละ 0.85 โซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ปราศจากเชื้อจุ่มสารละลายเชื้อ พอหมาด แล้วป้ายลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton agar (MHA) แล้ววางแผ่นยามาตรฐานชนิดต่าง ๆ คือ Penicillin G Cephalothin Gentamicin และ Kanamycin นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (Inhibition zone) บันทึกผลในหน่วยมิลลิเมตรและแปลผล [7-9]

4. การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมดิบด้วยเทคนิค DGGE

การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA จากตัวอย่างน้ำนมดิบนำมาสกัด DNA ด้วยวิธีฟีนอลและคลอโรฟอร์ม [10] ใช้เป็นต้นแบบสารพันธุกรรมในการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มปริมาณ 16S rDNA โดยใช้เทคนิค PCR ด้วย Universal primer ที่มีความจำเพาะกับช่วง V3 region ของยีน 16S rDNA ประกอบด้วย Reverse primer 518R (ATTACCGCGGCTGCTGG) Forward primer 357F - GC ((GC-Clamp)^a-CTCCTACGGGAGGAGCAGCAG) ซึ่งมี GC-Clamp: GCGCCGCCGCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCGCCCGCCCG และมีการหาความหลากหลายของประชากรในตัวอย่างด้วยเทคนิค DGGE นำแถบของดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้วิธี Basic local alignment search tool (BLAST) เพื่อระบุชนิด [10]

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ปริมาณเซลล์โซมาติกทดสอบด้วยน้ำยา CMT (California mastitis test) และการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150

จากผลการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกเบื้องต้นด้วยน้ำยา CMT ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบเชิงคุณภาพที่ง่ายและรวดเร็วกว่าการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 ที่เป็นวิธีการตรวจเชิงปริมาณด้วยเครื่องอัตโนมัติ พบว่า การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยน้ำยา CMT ให้ผลการตรวจตรงกับผลการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 จำนวน 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 70) ขณะที่ 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30) ให้ผลไม่สอดคล้องกัน (ตารางที่ 1) ทำให้วิธีการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 เป็นวิธีการที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการตรวจด้วยน้ำยา CMT ดังนั้นจึงใช้ 2 วิธีนี้ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมเบื้องต้น เพื่อเฝ้าระวัง ควบคุมและป้องกันโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมได้ ซึ่งจุดเริ่มต้นที่ดีของการจัดการเกี่ยวกับสุขภาพของเต้านม คือ การทราบระดับของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนม ซึ่งจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนมมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อและการอักเสบบริเวณเต้านมเกิดขึ้น ความรุนแรงของการอักเสบจะแปรผัน

ตามจำนวนเซลล์ในน้ำนม [3] แต่วิธีการนี้ไม่สามารถทราบถึงเชื้อที่เป็นสาเหตุของการอักเสบในเต้านมได้ จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคการเพาะเชื้อหรือเทคนิคทางชีวโมเลกุลร่วมด้วย

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างที่พบในปริมาณเซลล์โซมาติกระดับต่าง ๆ จากการตรวจด้วยน้ำยา CMT และการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 และความสอดคล้องของผลการทดสอบทั้ง 2 วิธี

ระดับเซลล์โซมาติก (เซลล์/มิลลิลิตร)	CMT (ตัวอย่าง)	Somacount 150 (ตัวอย่าง)	ความสอดคล้องระหว่างผล CMT กับ Somacount 150 (ร้อยละ)
< 200,000	5	5	4 (ร้อยละ40)
>5,000,000	5	5	3 (ร้อยละ30)
รวม	10	10	7 (ร้อยละ70)

CMT; California mastitis test Somacount 150; การตรวจนับเซลล์โซมาติกในน้ำนมด้วยเครื่องอัตโนมัติ

การคัดแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* *Streptococcus agalactiae* *Escherichia coli* และ *Corynebacterium* sp.

จากการศึกษาปริมาณเชื้อในน้ำนมที่แยกได้จากการเพาะเชื้อที่ CMT +3 พบปริมาณเชื้อ *Staphylococcus* spp. เท่ากับ 3.95 Log CFU/มิลลิลิตร สูงกว่าปริมาณเชื้อที่ CMT 0 เท่ากับ 3.45 Log CFU/มิลลิลิตร ส่วนปริมาณเชื้อ *Streptococcus* spp. พบปริมาณเชื้อที่ CMT +3 เท่ากับ 4.8 Log CFU/ml สูงกว่าที่ CMT 0 พบปริมาณเชื้อ เท่ากับ 3.39 Log CFU/มิลลิลิตร ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ปริมาณเซลล์โซมาติกสูงในน้ำนม สะท้อนให้เห็นถึงการติดเชื้อของตัวอย่างน้ำนมในเบื้องต้นมากเช่นเดียวกัน [5] จากผลการแยกเชื้อ *Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp. *Escherichia coli* และ *Corynebacterium* spp. จากตัวอย่างน้ำนมดิบ 10 ตัวอย่าง จากฟาร์มโคนม มหาวิทยาลัยทักษิณ เพื่อคัดแยก เชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส และการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสจากไอโซเลททั้งหมด 95 ไอโซเลท พบเชื้อ *S. aureus* ที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส และสามารถสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส 13 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 18.57 โดย 6 ไอโซเลท พบในค่า CMT 0 และค่า CMT +3 พบ 7 ไอโซเลท และคัดแยกเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส และการสร้างเอนไซม์เอสคิวลิน ไฮโดรไลซิส จากไอโซเลททั้งหมด 103 ไอโซเลท พบเชื้อ *S. agalactiae* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส และการสร้างเอนไซม์เอสคิวลิน ไฮโดรไลซิส 7 ไอโซเลท คิดเป็น ร้อยละ 8.97 โดย 6 ไอโซเลท พบในตัวอย่างที่มีค่า CMT 0 และค่า CMT +3 พบ 1 ไอโซเลท

รูปแบบแผนความไวของยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* จากตัวอย่าง น้ำนมดิบ

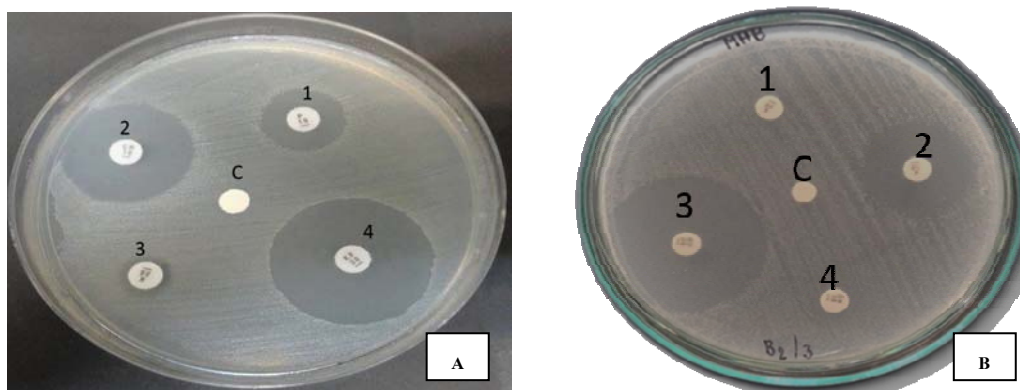
จากการทดสอบแบบแผนความไวของเชื้อ พบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลท พบการดื้อต่อยา Penicillin G มากที่สุด ร้อยละ 84.62 รองลงมา Kanamycin ร้อยละ 46.15 แต่เชื้อทั้งหมดไวต่อยา Gentamicin และ Cephalothin ร้อยละ 92.30 และ 100 ตามลำดับ โดยไอโซเลทเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้มีแบบแผนการดื้อยา ทั้งหมด 2 แบบ คือ แบบที่ 1 ดื้อต่อยา Penicillin G และKanamycin แบบที่ 2 ดื้อต่อยา Penicillin เพียงอย่างเดียว และพบเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้ ทั้งหมด 7 ไอโซเลท พบการดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิด คิดเป็นร้อยละทั้งหมด ซึ่งมีแบบแผนการดื้อยาปฏิชีวนะเพียงแบบเดียว คือ Penicillin G Gentamicin Cephalothin และ Kanamycin และไม่พบเชื้อที่ไวต่อยาดังกล่าว (ตารางที่ 2 และภาพที่ 1)

ตารางที่ 2 รูปแบบแผนการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus* และ *S. agalactiae* จากตัวอย่างนํ้านมดิบ

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	ยาปฏิชีวนะ				จำนวน
	P	K	CN	KF	
<i>S. aureus</i> (CMT 0)	R	R	S	S	2
	R	R	I	S	1
	S	S	S	S	1
	R	S	S	S	2
<i>S. aureus</i> (CMT +3)	R	R	S	S	3
	S	S	S	S	3
	R	S	S	S	1
<i>S. agalactiae</i> (CMT 0)	R	R	R	R	6
<i>S. agalactiae</i> (CMT +3)	R	R	R	R	1

Susceptibility (S) = ความไว; Intermediate (I) = ความไวปานกลาง; Resistance (R) = การดื้อยา; Penicillin G 10 unit (P); Kanamycin 30 ไมโครกรัม (K); Cephalothin 30 ไมโครกรัม (KF); Gentamicin 10 ไมโครกรัม (CN)

จากการศึกษารูปแบบแผนความไว พบว่า เชื้อ *S. aureus* และ *S. agalactiae* ซึ่งมีแนวโน้มการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะยาในกลุ่ม Beta lactam ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการที่เชื้อ *S. aureus* และ *S. agalactiae* สามารถปรับตัวให้ทนต่อการใช้ยา และเกษตรกรใช้ตัวยาในระดับความเข้มข้นที่มากขึ้น ซึ่งการจัดการโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมมหาวิทยาลัยทักษิณ นิยมใช้ยาปฏิชีวนะ Amoxicillin จัดอยู่ในยาปฏิชีวนะ กลุ่ม Penicillins ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบทดแทนการใช้ยา Penicillin G ส่วนการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus* พบว่ามีการดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Aminoglycoside บางชนิด ดังนั้น การใช้ยา Gentamicin และ Cephalothin ยังมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคเต้านมอักเสบที่เกิดการติดเชื้อจาก *S. aureus* [2]

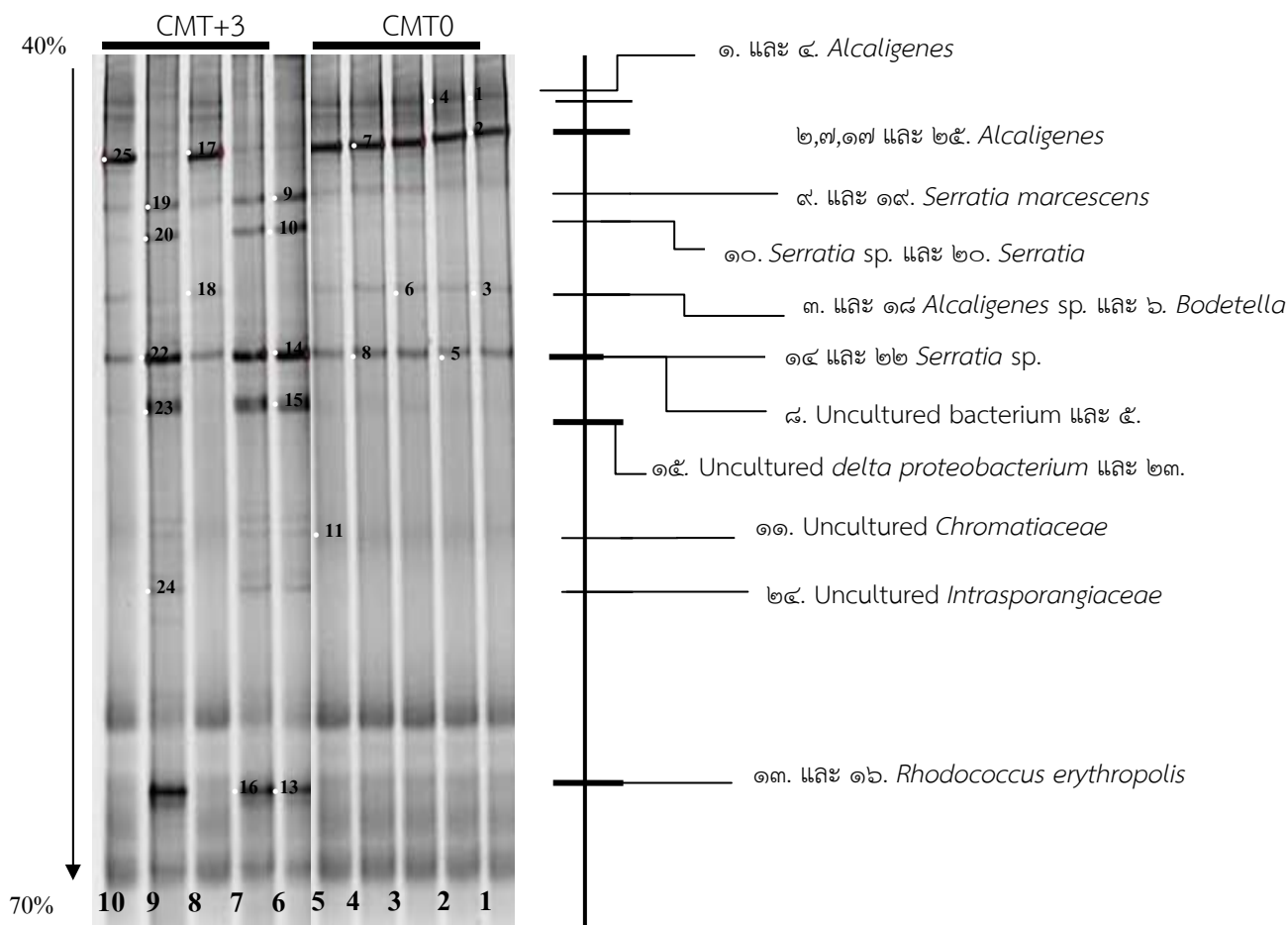


ภาพที่ 1 ผลการทดสอบ Disc diffusion ของเชื้อทดสอบต่อยาปฏิชีวนะ ทั้ง 4 ชนิด A; Disc diffusion ของเชื้อ *S. aureus* B; Disc diffusion ของเชื้อ *S. agalactiae* 1: Penicillin G 2: Gentamicin 3: Kanamycin 4: Cephalothin

การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในนํ้านมดิบด้วยเทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

การศึกษาความหลากหลายของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย จากตัวอย่างนํ้านมดิบ 2 กลุ่ม คือ CMT 0 และ CMT+3 นำมาศึกษาด้วยเทคนิค DGGE เพื่อทำให้ทราบถึงความหลากหลายของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างนํ้านมดิบ โดยตัวอย่างนํ้านมโค

ปกติที่ระดับ CMT 0 (ภาพที่ 2 รหัส HZE1 - HZE5) พบแบคทีเรียที่ปรากฏทั้งหมด 8 แบคทีเรีย พบเชื้อ *Alcaligenes* sp. *Bordetella* sp. *Serratia* sp. และ Uncultured bacterium โดยเชื้อ *Alcaligenes* sp. เป็นเชื้อโคคคัสที่พบจากตัวอย่างน้ำนมปกติที่ระดับ CMT 0 ตัวอย่างน้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการที่ระดับ CMT+3 (ภาพที่ 2 รหัส MTH1-MTH5) พบแบคทีเรียที่ปรากฏทั้งหมด 15 แบคทีเรีย คือ *Serratia marcescens* *Serratia nematodiphila* *Serratia* sp. Uncultured *Intrasporangiaceae* bacterium *Alcaligenes* sp. Uncultured *delta* proteobacterium *Rhodococcus erythropolis* และ *Bacillus* sp. โดยเชื้อ *Alcaligenes* sp. และ *Serratia* sp. เป็นเชื้อโคคคัสที่พบจากตัวอย่างน้ำนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการที่ระดับ CMT+3 โดยเชื้อ *S. marcescens* และ *S. nematodiphila* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน พืช อาหาร และน้ำ ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ [11] ซึ่งเชื้อ *S. marcescens* มีความเกี่ยวข้องกับการระบาดของโรคติดเชื้อเข้าสู่เต้านม ในขณะที่ระดับ CMT 0 และ CMT+3 ไม่พบเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ มีความเป็นไปได้ที่ *S. Marcescens* *Rhodococcus erythropolis* และ *S. nematodiphila* เป็นเชื้อสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบที่ได้จากเทคนิค DGGE ผลการศึกษาแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบด้วยเทคนิคการแยกเชื้อ และเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลให้ผลการศึกษาที่ไม่สอดคล้องกัน การตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมดิบด้วยเทคนิคการแยกเชื้อ พบเชื้อในสกุล *Actinobacteria* *Bacteroidetes* *Firmicutes* และ *Proteobacteria* ซึ่งเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ในสกุล *Bacteroidetes* *Actinobacteria* และ *Proteobacteria* ถูกตรวจพบด้วยเทคนิคไม่เพาะเลี้ยงเชื้อ [12] จากผลการศึกษาเทคนิคการแยกเชื้อ พบแบคทีเรียดิสแกรมบวก รูปท่อนของเชื้อ *Corynebacterium* spp. จัดอยู่ในสกุล *Actinobacteria* และรูปกลมของเชื้อ *S. aureus* และ *S. agalactiae* จัดอยู่ในสกุล *Bacteroidete* ไม่มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่พบบนเทคนิค DGGE ซึ่งเป็นแบคทีเรียรูปท่อน ดิสแกรมลบของ *Serratia* และ *Alcaligenes* จัดอยู่ในสกุล *Proteobacteria* และแบคทีเรียแกรมบวกของ *Rhodococcus erythropolis* ดังนั้นขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำนมดิบเป็นขั้นตอนที่สำคัญในเทคนิคไม่เพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งในน้ำนมดิบมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ถ้ามีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ไม่ดี มีผลทำให้เกิดการย่อยเซลล์แบคทีเรียไม่สมบูรณ์ อาจพบแค่แบคทีเรียแกรมลบ หรือแบคทีเรียแกรมบวกเพียงอย่างเดียว เนื่องจาก ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีความหนาแน่นกว่าแบคทีเรียแกรมลบ [12] ซึ่งจากผลการศึกษาของเทคนิค DGGE พบ *Alcaligenes* sp. และ *Serratia* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่พบจากเทคนิค DGGE โดยไม่พบแบคทีเรียแกรมบวกจากเทคนิคนี้ ดังนั้นเทคนิค DGGE จึงมีประสิทธิภาพมากกว่าเทคนิคการแยกเชื้อ แม้ว่าเทคนิค DGGE ไม่ใช่เทคนิคที่ดีที่สุด แต่ถ้าต้องการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบชนิดที่ไม่สามารถแยกเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรใช้เทคนิค DGGE เข้ามาช่วยศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน



ภาพที่ 2 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมดิบเย็น 16S rRNA ด้วยเทคนิค DGGE โดยกำหนดรหัสตัวอย่างที่ 1-5 (น้ำนมโคปกติที่ระดับ CMT 0) คือ รหัส HZE1 - HZE5) รหัสตัวอย่างของการทดลองที่ 6-10 (น้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการที่ระดับ CMT+3) คือ รหัส MTH1 - MTH5

สรุปผลการวิจัย

การใช้เทคนิคการเพาะเชื้อ *S. aureus* *S. agalactiae* *E. coli* และ *Corynebacterium* sp. ในตัวอย่างน้ำนมดิบ CMT 0 และ CMT+3 จากฟาร์มโคนม มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง พบเชื้อ *S. aureus* ร้อยละ 18.57 และเชื้อ *S. agalactiae* ร้อยละ 8.97 การทดสอบการดื้อยา พบว่า เชื้อ *S. aureus* ดื้อต่อยา Penicillin G ร้อยละ 84.62 Kanamycin ร้อยละ 46.15 ไวโดยา Gentamicin Cephalothin ร้อยละ 92.30 และ 100 ตามลำดับ และการดื้อยาทั้ง 4 ชนิดของ เชื้อ *S. agalactiae* คิดเป็น ร้อยเปอร์เซ็นต์ทั้งหมด และจากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในน้ำนมดิบที่แบ่งตามระดับ CMT 2 ระดับ ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้ข้อมูลของยีน 16S rRNA และเทคนิค DGGE พบเชื้อ *Alcaligenes* sp. และ *Serratia* sp. เป็นเชื้อโดดเด่นที่พบจากตัวอย่างน้ำนม 2 ระดับ และเชื้อ *S. marcescens* *Rhodococcus erythropolis* และ *S. nematodiphila* ที่ระดับ CMT+3 น่าจะเป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ จะเห็นได้ว่าผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อและการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DGGE ให้ผลการพบเชื้อที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากหลายสาเหตุซึ่งสามารถแยกเชื้อที่ไม่สามารถเจริญ เช่น การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อต่างชนิด หรืออาจเพราะปริมาณเชื้อที่มีอยู่เพียงเล็กน้อยไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ อีกทั้งความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อแต่ละชนิดด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยทักษิณ สนับสนุนทุนวิจัยประเภททุนวิจัยร่วมบัณฑิตศึกษา สาขา
ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ และฟาร์มโคนม มหาวิทยาลัยทักษิณ

เอกสารอ้างอิง

- [1] มงคล ประทุมมณี. (2548). **สถานการณ์โรคเต้านมอักเสบของโคนม ในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุงและการพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบในโคนม**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. พัทลุง : มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- [2] Barlow, J. (2011). “Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle”, **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. 16, 383-407.
- [3] Eberhart, R.J., Hutchinson, L. J. and Spencer, S.B. (1982). “Relationships of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production”, **Journal of Food Protect.** 45, 125.
- [4] กันตกรณ พานิช. (2555). **การตรวจหาความหลากหลายของแบคทีเรียในน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต. พัทลุง : มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- [5] Bradley, A.J. and Green, M.J. (2002). “Aetiology of clinical mastitis in six Somerset dairy herds”, **Journal of Vet Rec.** 22, 683- 686.
- [6] กรรณิกา พรหมสมบัติ. (2555). **การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* และการตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในเต้าหูนมสด ที่จำหน่ายในอำเภอเมืองและป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต. พัทลุง : มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- [7] กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และกุสุมา สามงามณี. (2550). “ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดของสมุนไพรบางชนิดต่อ *Staphylococcus aureus* ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบในโคนม”, **เวชศาสตร์สัตว์แพทย์**. 35, 103-104.
- [8] Oliveira, L., Langoni, H., Hulland, C. and Ruegg, P.L. (2012). “Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis”, **Journal of Dairy Science**. 95, 1913–1920.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). “Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically,” **Approved Standard-Ninth Edition**. (pp. 20-34). Columbus : Charles E. Merrill.
- [10] Kuang, y., Tani, k., Synnott , A.J., Ohshima, K., Higuchi, H., Nagahata, H. and Tanji, T. (2009). “Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture- independent PCR–DGGE method”, **Journal of Biochemical Engineering**. 45, 76–81.
- [11] Kamarudin, M.I., Fox, L.K., Gaskins C.T. and Gay, J.M. (1996). “Environmental reservoirs for *Serratia marcescens* intramammary infections in dairy cows”, **Journal of Food Protect.** 208, 555-558.
- [12] Mareike, W., Janina, G., Myriam, K . and André, L. (2014). “Comparative analysis of bacterial community composition in bulk tank raw milk by culture-dependent and culture-independent methods using the viability dye propidium monoazide”, **Journal of Dairy Science**. 97, 6761-6776.