

บทความวิจัย

การเปรียบเทียบวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบของโคนม

Alternative Methods for Mastitis Diagnosis in Dairy Cows

นุกุล อินทรสังขา

วท.ค. (จุลชีววิทยา)

Nugul Intrasungkha

Ph.D. (Microbiology)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110

Assistant Professor, Faculty of Science, Thaksin University, Paphayom, Phatthalung, 93110

Email: nugul@tsu.ac.th

มงคล ประทุมมณี

วท.ม. (ชีววิทยา)

Mongkon Prathumancee

M.Sc. (Biology)

นิสิตบัณฑิตศึกษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

Graduate Student, Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University

สุชาติ สุขสถิตย์

วท.ม. (สัตวศาสตร์)

Suchart Suksathit

MSc. (Animal Science)

อาจารย์ คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ

Lecturer, Faculty of Technology and Community Development, Thaksin University

ไชยวรรณ วัฒนจันทร์

วท.ค. (การผลิตสัตว์)

Chaiwan Wattanachant

PhD. (Animal Production)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Assistant Professor, Faculty of Natural Science, Prince Songkla University

คำสำคัญ : โรคเต้านมอักเสบ, เซลล์โซมาติก, ฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน (FISH)

Keywords : Mastitis, Somatic cell, Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบ (Mastitis) ในโคนมมีหลายวิธี เช่น การตรวจด้วยน้ำยาทดสอบ California Mastitis Test (CMT) การตรวจนับปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somaticount 150 และ/หรือการตรวจจุลินทรีย์สาเหตุของโรคเต้านมอักเสบด้วยเทคนิคการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture-based technique) สำหรับการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบของเทคนิคดังกล่าวกับเทคนิคที่ดัดแปลงจากวิธีการดั้งเดิม ได้แก่ เทคนิคการย้อมสีเซลล์ด้วยสี methylene blue การนับตรงด้วยกล้องอีพิฟลูออเรสเซนซ์ โดยย้อมสีเซลล์ด้วยสารเรืองแสง 4', 6-diamidino 2-phenylindole (DAPI) และเทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) ด้วยวิธีดัดแปลงให้เหมาะสมกับตัวอย่างน้ำนมดิบ จากผลการศึกษาพบว่าวิธีการที่เหมาะสม คือ การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบด้วยเครื่อง Somaticount 150 ซึ่งเป็นการตรวจเชิงปริมาณที่มีความแม่นยำและรวดเร็ว แต่มีค่าใช้จ่ายสูงและใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ส่วนเทคนิคการนับจำนวนเซลล์โซมาติกด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมเซลล์ด้วยสี methylene blue มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับการตรวจด้วยเครื่อง Somaticount 150 ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกมากกว่า 200,000 เซลล์/มล. ($P>0.05$) นอกจากนั้นยังสามารถนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียโดยตรงร่วมด้วยได้ในการย้อมสีเพียงครั้งเดียว ทำให้มีค่าใช้จ่ายน้อยและเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไปในการตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบ สำหรับการใช้เทคนิค FISH ที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ตรวจชนิดของแบคทีเรียในน้ำนมดิบ (เช่น *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp.) ได้ โดยจะมีผลทำให้การวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบมีความรวดเร็วและถูกต้อง และมีราคาถูกกว่าวิธีการที่ใช้กันอยู่ทั่วไป

Abstract

A number of techniques has commonly been used in mastitis diagnosis, for example, California Mastitis Test (CMT), Somatic cell count by Cytofluorometry (such as Somaticount 150) and /or direct mastitis pathogens detection using culture-based technique. The aims of this study, therefore, were to compare the current techniques and the newly developed techniques, namely modified methylene blue staining, DAPI direct count and Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH). This study indicated that the use of Somaticount 150 was most efficient, consuming lesser time with more accuracy but rather expensive and difficult for small laboratory to obtain the equipment. Modified methylene blue staining technique showed a similar result ($P>0.05$) with the Somaticount 150 when numbers of somatic cell were higher than 200,000 cell/ml. Methylene blue staining, however, was the most appropriated method to detect this disease due to its efficiency with low cost as well as provides dual results of somatic cell and bacterial cell number in one test. Nevertheless, the results from this study showed that the modified FISH technique has a high potential in diagnosing the mastitis caused by pathogenic bacteria such as *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. Moreover, the technique consumes less time and be more economical than the conventional methods.

บทนำ

ปัจจุบันอาชีพการเลี้ยงโคนมได้แพร่หลายไปสู่
ทั่วทุกภาคของประเทศไทย และมีแนวโน้มขยายตัว
เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากคนไทยได้ให้ความสำคัญกับ
สุขภาพและเข้าใจคุณค่าทางโภชนาการของน้ำนมมากขึ้น
ทำให้ปริมาณน้ำนมที่ผลิตได้ภายในประเทศไม่เพียงพอ
ต่อความต้องการ ส่งผลให้มีการนำเข้าผลิตภัณฑ์นมจาก
ต่างประเทศมูลค่าปีละไม่ต่ำกว่า 12,871 ล้านบาท ทำให้
มีการส่งเสริมการเลี้ยงโคนมขึ้นใน 40 จังหวัดทั่วประเทศ
(สำนักงานสุขาสดสัตว์และสุขอนามัยที่ 9, 2548) แม้ว่า
การเลี้ยงโคนมจะเป็นอาชีพที่ได้รับความนิยม แต่การเลี้ยง
โคนมก็มีปัญหาหลายประการ เช่น พันธุกรรม อาหาร
และการให้อาหาร การจัดการเลี้ยงดูและการจัดการสุขภาพ
เป็นต้นโดยทางด้านสุขภาพของโค รวมทั้งปัญหาโรค
เต้านมอักเสบ (mastitis) ซึ่งถือได้ว่าเป็นปัญหาที่สำคัญ
มาก เพราะส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของ
น้ำนมดิบ (Bhushan, 2000) จากรายงานการศึกษาที่
เกี่ยวกับสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ พบว่าส่วนใหญ่
เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะจีส *Staphylococcus*
spp. และ *Streptococcus* spp. (สุณีรัตน์, 2541; William
และคณะ, 2002) สำหรับวิธีการตรวจแบคทีเรียน้ำนมดิบ
ที่นิยมใช้กันอยู่เป็นการตรวจเพื่อบ่งชี้คุณภาพน้ำนม
ผลิตภัณฑ์นม และอายุการเก็บรักษา (Sorhaug and
Stepaniak, 1997; Clarke and Pinder, 1998)

โดยทั่วไปการตรวจสอบโรคเต้านมอักเสบ
สามารถตรวจสอบทางอ้อมได้โดยการตรวจหาปริมาณ
เซลล์โซมาติก (somatic cell) ซึ่งเป็นเซลล์ร่างกายหรือ
เซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบในน้ำนมดิบ การตรวจปริมาณ
เซลล์โซมาติกนี้มีหลายวิธี เช่น การตรวจนับเซลล์
เม็ดเลือดขาวโดยตรงด้วยเครื่อง Fossomatic analyzer
และการใช้น้ำยาทดสอบ California mastitis test (CMT)
ซึ่งเป็นเทคนิคที่ปฏิบัติได้ง่าย เหมาะสำหรับเกษตรกร
ผู้เลี้ยงโครายย่อย เพราะมีราคาถูก แต่การตรวจด้วยน้ำยา
CMT เป็นเพียงการตรวจในเชิงคุณภาพเบื้องต้นของ
น้ำนมดิบเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาอุปกรณ์ที่

ทันสมัยสำหรับการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติก เช่น เครื่อง
Somacount 150 และ DeLaval cell counter (DCC;
DeLaval, Tumba/ Sweden) ซึ่งมีความแม่นยำและรวดเร็ว
(อรัญ, 2544; สุณีรัตน์ และคณะ, 2549) แต่เป็นเพียงการ
ตรวจเชิงปริมาณเท่านั้น ไม่สามารถนับจำนวนแบคทีเรีย
ในน้ำนมได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้งานในระดับห้อง
ปฏิบัติการน้อย รวมทั้งมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์แต่ละ
ครั้งสูง จึงอาจจะไม่เหมาะสมกับตัวอย่างน้ำนมดิบจำนวน
น้อยในระดับเกษตรกร หรือโรงงานแปรรูปน้ำนมดิบ
ขนาดเล็ก

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการ
เปรียบเทียบเทคนิคการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกที่
เหมาะสมกับตัวอย่างจำนวนน้อยและช่วยลดต้นทุนในการ
ตรวจวิเคราะห์ และเนื่องจากปัจจุบันการศึกษาประชากร
แบคทีเรียนิยมใช้เทคนิคการศึกษาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ
(culture-dependent techniques) ซึ่งใช้เวลานานและมี
โอกาสให้ผลที่ผิดพลาดได้ เนื่องจากแบคทีเรียที่จับตัว
เป็นกลุ่มก้อนหรือจากการเพาะเลี้ยงในอาหารและสภาพ
แวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าวของ
เทคนิคการศึกษาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อในปัจจุบันมีผู้วิจัย
จำนวนมากได้มีการพัฒนาเทคนิคการศึกษาประชากร
แบคทีเรียโดยไม่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture-independent
methods) เช่น การใช้เทคนิคทางวิทยามิติสัมพันธ์ และการ
ใช้เทคนิคด้านไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) เป็นต้น
ซึ่งการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบเทคนิคที่นิยมใช้
ในปัจจุบัน เช่น CMT กับเทคนิคที่ดัดแปลงเพื่อศึกษา
ปริมาณแบคทีเรียและการตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียใน
ตัวอย่างน้ำนมดิบ โดยเลือกเทคนิคการนับโดยตรงด้วย
กล้องจุลทรรศน์มาใช้ในการศึกษาปริมาณเซลล์แบคทีเรีย
ขณะที่การตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียเลือกเทคนิค
Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) เป็นเทคนิค
ที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์กลุ่มของแบคทีเรีย
ที่เกี่ยวข้องกับโรคเต้านมอักเสบ เทคนิค FISH เป็นการ
อาศัยข้อมูลจากข้อมูลของสารพันธุกรรมในส่วนของ
ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอของแบคทีเรียมาใช้ในการออกแบบ

สายนิวคลีโอไทด์สั้นๆ (oligonucleotide) ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงเรียกว่า “ดีเอ็นเอโพรบ (DNA Probe)” ที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียในระดับหมวดหมู่ต่างๆ ตามต้องการ เมื่อดีเอ็นเอโพรบจับอย่างจำเพาะกับเป้าหมายซึ่งเป็น rRNA ที่มีอยู่มากในเซลล์ (Amann *et al.*, 2001) ก็จะทำให้สามารถมองเห็นเซลล์เรืองแสงขึ้นมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอีพิฟลูออเรสเซนซ์ (Epifluorescence microscope) ที่สำคัญทำให้มองเห็นเซลล์จุลินทรีย์และจัดจำแนกชนิดในสภาพที่อยู่อาศัยจริงของจุลินทรีย์โดยตรง (*In situ*) โดยไม่ต้องมีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างนํ้านม

ทำการเก็บตัวอย่างนํ้านมดิบจากถังรวมนมแต่ละฟาร์ม จำนวน 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดแก้วเก็บตัวอย่างปราศจากเชื้อขนาด 150 มิลลิลิตร จากศูนย์รับนํ้านมดิบ อำเภอป่าพะยอม ช่วงเดือนตุลาคม 2546 ถึงเดือนมีนาคม 2547 โดยเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส และทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง

เปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัย

โรคเต้านมอักเสบของโคนมที่ใช้ในปัจจุบัน

นำตัวอย่างมาตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกเบื้องต้นด้วยน้ำยา CMT (Philpot and Nickerson, 1991) ตรวจปริมาณเซลล์โซมาติก ด้วยเครื่อง Somacount 150 (Bentley Instruments Inc, USA) จากห้องปฏิบัติการคุณภาพนํ้านม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร และทำการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ร่วมกับการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้น (identification) ด้วยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีตามการจัดหมวดหมู่ของ Bergey's Manual of Determinative Microbiology (9th edition) เปรียบเทียบผลการตรวจโรคเต้านมอักเสบแต่ละวิธีการ

การเปรียบเทียบวิธีการตรวจ

ปริมาณเซลล์โซมาติกในนํ้านมดิบ

คัดเลือกตัวอย่างนํ้านมที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกจากการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 แตกต่างกันเพื่อต้องการให้เทคนิคที่นำมาตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกในครั้งนี้ สามารถนำไปใช้ได้กับนํ้านมดิบที่มีคุณภาพแตกต่างกัน เนื่องจากปริมาณเซลล์โซมาติกมีผลต่อคุณภาพนํ้านมดิบ โดยนำตัวอย่างนํ้านมดิบที่ได้มาตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วย 3 วิธีการ คือ (1) ตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 (2) การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมเซลล์ด้วยสี Methylene blue แบบคัดแปลงเล็กน้อยโดยทำการปรับปรุสไลด์ให้เหมาะสมกับตัวอย่างนํ้านมดิบ เพื่อลดการหลุดออกของตัวอย่างในระหว่างทำการย้อม โดยนำสไลด์ดัดในน้ำที่ผสม Detergent ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ผึ่งให้แห้ง นำมาเคลือบด้วยสารละลาย Gelatin 0.1 % ที่ผสมด้วย Chromium potassium sulfate 0.01% ที่ร้อน ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำตัวอย่างปริมาณ 10 ไมโครลิตร เคลือบบนสไลด์ ผึ่งให้แห้ง ทำการย้อมเซลล์ด้วยสี methylene blue ตามวิธีการของ FIL/IDF (1984) (อ้างถึงโดย สุเมธีรัตน์, 2544) แล้วทำการตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่าง (Olympus CH 20) และ (3) การย้อมเซลล์ด้วยสีเรืองแสง DAPI ตามกรรมวิธีของ Wei Yu และคณะ (1995) โดยตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อีพิฟลูออเรสเซนซ์ (Epifluorescence microscope; Olympus BX51) ทำการถ่ายภาพด้วยกล้อง Cooled CCD Digital Camera (Olympus DP50) ปริมาณเซลล์โซมาติกที่ได้จากแต่ละวิธีการมาทำวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบลีสทส์สแควร์ (Least square analysis) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย โดย Least Square Difference (LSD)

การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย

นำตัวอย่างนํ้านมมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียด้วย 4 วิธีการ คือ (1) การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ (2) การนับตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เทคนิคการย้อมสีเซลล์ด้วยสี methylene blue (3) การนับตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์

อีพิฟลูออเรสเซนซ์ โดยย้อมสีเซลล์ด้วย DAPI และ (4) การนับตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์อีพิฟลูออเรสเซนซ์ โดยย้อมสีเซลล์ด้วยสีย้อม DAPI ที่พัฒนาให้เหมาะสมกับตัวอย่างน้ำนมดิบ โดยวิธีการศึกษาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อใช้อาหาร Trypticase Soya Agar (TSA) และใช้ 0.1% Peptone water ในการเจือจาง ขณะที่การนับตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เทคนิคการย้อมสีเซลล์ด้วยสี methylene blue และการนับตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์อีพิฟลูออเรสเซนซ์ โดยย้อมสีเซลล์ด้วยสีย้อมเรืองแสง DAPI ทั้งสองวิธีการมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกและการย้อมสีเซลล์ด้วย DAPI ที่พัฒนาขึ้นนั้นต้องกำจัดโปรตีนและไขมัน ด้วยวิธีการที่พัฒนาจาก Gunasekera และคณะ (2003) โดยใช้ไขมันดิบจำนวน 1 มิลลิลิตร เติมน้ำด้วย 100 ไมโครลิตรของเอนไซม์ Savinase และ 100 ไมโครลิตร ของ 0.1% Triton X 100 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 30-45 นาที เติมน้ำ 800 ไมโครลิตร ของ 0.15 M NaCl ปั่นที่ 14,000 rpm เวลา 10 นาที นำตะกอนด้านล่าง เติมน้ำด้วย 1 มิลลิลิตร ของ 0.15 M NaCl ทำการย้อมเซลล์ด้วย DAPI ตามวิธีการของ Wei Yu และคณะ (1995) นำไปตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อีพิฟลูออเรสเซนซ์ และถ่ายภาพด้วยกล้อง Cooled CCD Digital Camera (Olympus DP50) นำปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากแต่ละวิธีมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบลีสท์ สแควร์ (Least square analysis) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย โดย Least Square Difference (LSD) การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบชนิดแบคทีเรีย

คัดเลือกตัวอย่างน้ำนมจากขั้นตอนแรกมาทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนำไปนึ่งด้วยความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้วนาน 10 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเติมแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบให้มีจำนวนเริ่มต้นประมาณ 10^5 โคโลนี/มล. โดยหลอดที่ 1 เติมน้ำเชื้อ *E. coli* หลอดที่ 2 เติมน้ำเชื้อ *Staphylococcus* spp. หลอดที่ 3 เติมน้ำเชื้อ *Streptococcus* spp. หลอดที่ 4 เติมน้ำเชื้อ *E. coli* กับเชื้อ *Staphylococcus* spp หลอดที่ 5 เติมน้ำเชื้อ *E. coli* กับเชื้อ *Streptococcus* spp. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24

ชั่วโมง นำตัวอย่างดังกล่าวมาทำการจำแนกกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธีการศึกษาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นโดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีตามการจัดหมวดหมู่ของ Bergey's Manual of Determinative Microbiology (9th edition) และเทคนิค FISH ที่ดัดแปลง โดยทำการกำจัดโปรตีนและไขมันในน้ำนมดิบก่อน ด้วยวิธีการที่พัฒนาจาก Gunasekera และคณะ (2003) เช่นเดียวกับการย้อมด้วย DAPI ก่อนนำมาจำแนกกลุ่มแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH ตามวิธีการของ Amann และคณะ (1995) โดยใช้โพรบที่ติดด้วยดีเอ็นเอโพรบ เพื่อให้เข้าไปจับตัวกับสายนิวคลีโอไทด์เป้าหมายภายในเซลล์ จากนั้นล้างดีเอ็นเอโพรบที่ไม่จับตัวหรือจับกันอย่างไม่จำเพาะออก ตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อีพิฟลูออเรสเซนซ์ และถ่ายภาพด้วยกล้อง Cooled CCD (Olympus DP50) ซึ่งดีเอ็นเอโพรบที่ใช้ศึกษาได้แก่ Probe EUB mixed, LGC mixed และ GAM 42a (ตารางที่ 1) ทำการเปรียบเทียบผลการตรวจพบแบคทีเรียดังกล่าวของแต่ละวิธีการและเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย โดย Least Square Difference (LSD)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเปรียบเทียบวิธีวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบ ของโคนมที่ใช้ในปัจจุบัน

จากผลการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกเบื้องต้นด้วยน้ำยา CMT การตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 และผลการตรวจชนิดแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในจีส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. เพื่อระบุการเกิดโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบจากถังนมรวมของทุกฟาร์มในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุงพบว่าแต่ละวิธีการให้ผลไม่สอดคล้องกัน (ตารางที่ 2) โดยการตรวจชนิดแบคทีเรียสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบได้แก่ แบคทีเรียในจีส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการตรวจการระบาดของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์ม

ตารางที่ 1 ดีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในการทดลองตรวจสอบกลุ่มของแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH

Probe	% FA*	Sequence (5'-3')	Specificity	Reference
EUB mixed**			Domain <i>Bacteria</i>	
- EUB 338		GCTGCCTCCCGTAGGAGT		Amann และคณะ (1990)
- EUB 338II	35	GCAGCCACCCGTAGGTGT		Daims และคณะ (1999)
- EUB 338III		GCTGCCACCCGTAGGTGT		Daims และคณะ (1999)
LGC mixed*			Gram-positive Bacteria with low G+C content (Actinobacteria)	
- LGC 354A		TGGAAGATTCCCTACTGC		Meier และคณะ (1999)
- LGC 354B	35	CGGAAGATTCCCTACTGC		Meier และคณะ (1999)
- LGC 354C		CCGAAGATTCCCTACTGC		Meier และคณะ (1999)
GAM42a	35	GCCTTCCACATCGTTT	Gamma <i>Proteobacteria</i>	Manz และคณะ (1992)

หมายเหตุ * % Formaldehyde ใช้ได้ใน hybridization buffer

** ใช้ดีเอ็นเอโพรบย่อยผสมในความเข้มข้นเท่ากันเพื่อให้ครอบคลุมกลุ่มแบคทีเรียให้มากยิ่งขึ้น

ตารางที่ 2 สถานการณ์ของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง จากการตรวจด้วยเทคนิคต่างๆ

Mastitis Diagnostic Techniques	Risky mastitis in farm	Not risky mastitis in farm
California Mastitis test (CMT)	18 Farm (23.08%)	60 Farm (76.92%)
Somatic cell count	34 Farm (43.59%)	44 Farm (56.41%)
Main bacteria genus causing mastitis	58 Farm (74.36%)	20 Farm (25.64%)

หมายเหตุ ระดับปฏิกิริยา CMT ในน้ำนมดิบของโคนมปกติต้องไม่เกิน ระดับ T (พนัส, 2537; วาสนา, 2545)

เซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบของโคนมปกติต้องไม่เกิน 500,000 cell/ml (พนัส, 2537; วาสนา, 2545)

ไม่พบเชื้อสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบของโคนมปกติ (สุธีรัตน์, 2544)

ซึ่งพบฟาร์มถึงร้อยละ 74.4 ที่เสี่ยงต่อการระบาดของโรค
อย่างไรก็ตามเมื่อนำปริมาณแบคทีเรีย 2 จินัสดังกล่าวมา
เปรียบเทียบกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร
เลี้ยงเชื้อ พบว่า มีปริมาณแบคทีเรีย 2 จินัสนี้เพียง
ร้อยละ 3 ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร

เลี้ยงเชื้อเท่านั้น (ตารางที่ 3) จะเห็นได้ว่าอาจจะมีเชื้อ
แบคทีเรียกลุ่มอื่นอีกที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค
เต้านมอักเสบ เนื่องจากมีแบคทีเรียอีกร้อยละ 97 ของ
ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยัง
ไม่ได้จำแนกชนิด และการตรวจปริมาณและชนิดของ

ตารางที่ 3 ปริมาณร้อยละของแบคทีเรียสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบที่พบเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จากตัวอย่าง
น้ำนมที่มีปริมาณเซลล์ไขมันแตกต่างกัน 4 ระดับ

Somatic cell (Cell/ml)	<i>Staphylococcus spp.</i> (% TSA)	<i>Streptococcus spp.</i> (% TSA)	Not identified (% TSA)
< 200,000	0.18	0.26	99.55
200,000-500,000	0.81	0.36	98.84
500,000-1,000,000	1.38	0.04	98.58
>1,000,000	2.73	0.42	96.85

แบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิคการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร ทำให้ปริมาณที่ได้อาจไม่ตรงตามความเป็นจริง เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียที่จับตัวเป็นกลุ่มก้อน อีกทั้งมีแบคทีเรียหลายชนิดที่ไม่เจริญหรือเจริญได้ไม่ดีบนอาหารที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ทำให้แบคทีเรียที่พบอาจไม่ใช่กลุ่มเด่นในสภาพแวดล้อมหรือเป็นสาเหตุของโรคอย่างแท้จริง แต่เป็นเพียงชนิดที่มีการปรับตัวให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีเท่านั้น

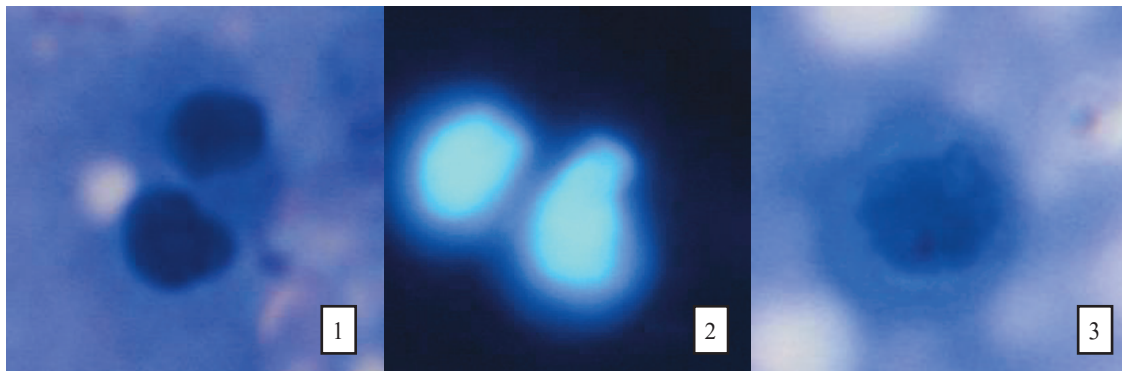
การเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ไขมันที่ได้จากวิธีการต่างๆ

ผลการเปรียบเทียบปริมาณของเซลล์ไขมันที่ตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 กับการตรวจนับโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เทคนิคการย้อมสีเซลล์ด้วยสี methylene blue พบว่า ปริมาณเซลล์ไขมันที่ได้จากทั้งสองวิธีการแตกต่างกัน ($P < 0.05$) ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์ไขมันน้อยกว่า 200,000 เซลล์/มล. ขณะที่ตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์ไขมันมากกว่า 200,000 เซลล์/มล. มีปริมาณเซลล์ไขมันที่ตรวจได้จากทั้งสองวิธีการไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) และผลการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ไขมันจากการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 กับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อีพิฟลูออเรสเซนซ์ โดยย้อมสีเซลล์ด้วย DAPI ตามวิธีการของ Wei Yu และคณะ (1995) พบว่า ปริมาณเซลล์ไขมันที่ได้แตกต่างกัน ($P < 0.05$) ในทุกตัวอย่างน้ำนมดิบ (ตารางที่ 3) เนื่องจากการนับด้วยกล้อง

จุลทรรศน์อีพิฟลูออเรสเซนซ์ที่ย้อมเซลล์ด้วยสี DAPI เห็นเฉพาะนิวเคลียสของเซลล์ไขมันหรือเซลล์เม็ดเลือดขาวเท่านั้น แต่เซลล์เม็ดเลือดขาวมีนิวเคลียสตั้งแต่ 1-5 พู มีผลทำให้อาจตรวจนับ 1 พูของนิวเคลียสเป็น 1 เซลล์ได้ แตกต่างกับการนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่สามารถมองเห็นเยื่อหุ้มเซลล์ได้ชัด (รูปที่ 1)

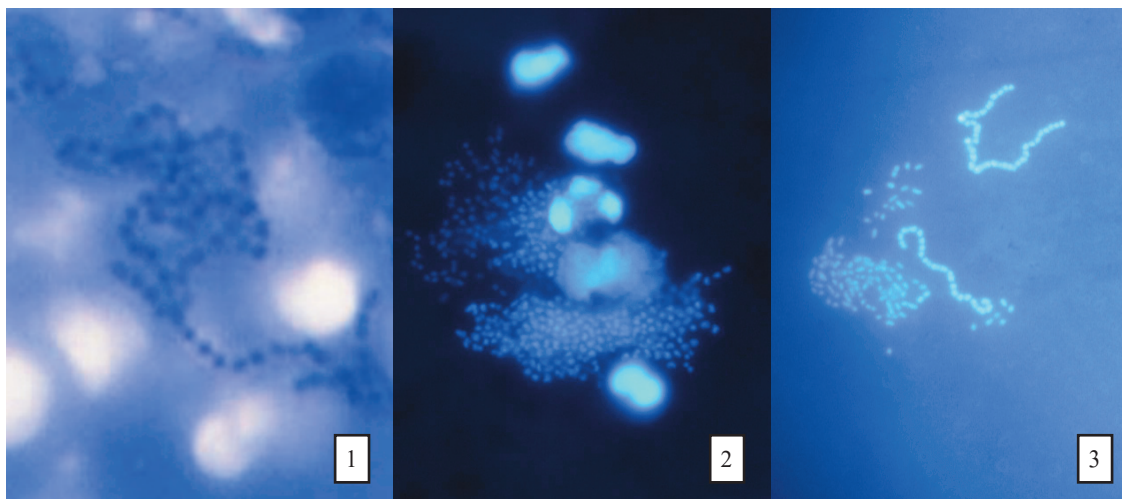
การเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียที่ได้จากวิธีการต่างๆ

ผลการศึกษาปริมาณเซลล์แบคทีเรียในน้ำนมดิบจากการนับด้วยวิธีการต่างๆ ในแต่ละระดับเซลล์ไขมัน พบว่า การย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสี methylene blue และการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสี DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Gunasekera และคณะ (2003) พบปริมาณแบคทีเรียไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) โดยการย้อมเซลล์ด้วย DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Gunasekera และคณะ (2003) มีความคลาดเคลื่อนของปริมาณเซลล์ที่นับได้น้อยกว่าการย้อมเซลล์ด้วยสี methylene blue เนื่องจากการย้อมเซลล์ด้วยสี methylene blue พบเซลล์แบคทีเรียบางส่วนถูกบดบังด้วยเซลล์ไขมันและตะกอนของโปรตีน ขณะที่การย้อมเซลล์ด้วยสี DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Gunasekera และคณะ (2003) ได้กำจัดตะกอนของโปรตีนและไขมันออกแล้ว ทำให้พบแต่เฉพาะเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้น (รูปที่ 2) และทั้งสองวิธีการพบปริมาณแบคทีเรียมากกว่าวิธีการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสี DAPI ตามวิธีการของ



รูปที่ 1 ภาพแสดงผลการตรวจสอบเซลล์ไขมันติดด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสี

- (1) เซลล์ไขมันติดที่เห็นมีนิวเคลียส 2 พู (lobe) เมื่อย้อมด้วยสี methylene blue
- (2) เซลล์ไขมันติดเมื่อย้อมด้วย DAPI
- (3) เซลล์ไขมันติดที่เห็นมีนิวเคลียสก้อนเดียวเมื่อย้อมด้วยสี methylene blue



รูปที่ 2 ภาพเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากการย้อมสีแบบต่างๆ (1) สี Methylene blue (2) สี DAPI
(3) สี DAPI แบบดัดแปลง

ตารางที่ 5 ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดจากการนับ 4 วิธี เปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์โซมาติกที่ระดับต่างๆ

Somatic cell number (Cell / ml)	Total plate count (CFU/ml)	Methylene blue staining (Cell / ml)	DAPI staining (Cell / ml)	DAPI Staining modified (Cell / ml)
10,540	$3.00 \times 10^6 \pm 4.97 \times 10^5$ (a)	$9.25 \times 10^7 \pm 4.25 \times 10^6$ (b)	$5.50 \times 10^6 \pm 1.67 \times 10^6$ (c)	$9.22 \times 10^7 \pm 1.79 \times 10^6$ (b)
104,987	$4.40 \times 10^5 \pm 4.55 \times 10^4$ (a)	$1.69 \times 10^9 \pm 3.54 \times 10^7$ (b)	$5.64 \times 10^7 \pm 4.95 \times 10^5$ (c)	$1.69 \times 10^9 \pm 2.27 \times 10^6$ (b)
195,713	$5.70 \times 10^6 \pm 1.58 \times 10^5$ (a)	$5.55 \times 10^8 \pm 8.92 \times 10^6$ (b)	$2.39 \times 10^6 \pm 2.88 \times 10^5$ (a)	$5.44 \times 10^8 \pm 1.41 \times 10^7$ (b)
207,907	$3.95 \times 10^5 \pm 2.80 \times 10^4$ (a)	$7.47 \times 10^8 \pm 2.11 \times 10^7$ (b)	$5.94 \times 10^6 \pm 1.09 \times 10^6$ (n)	$7.39 \times 10^8 \pm 3.49 \times 10^5$ (b)
355,880	$4.10 \times 10^5 \pm 3.10 \times 10^4$ (a)	$1.27 \times 10^8 \pm 4.66 \times 10^6$ (b)	$4.79 \times 10^6 \pm 2.11 \times 10^5$ (a)	$1.27 \times 10^8 \pm 2.93 \times 10^5$ (b)
469,620	$1.80 \times 10^5 \pm 2.00 \times 10^4$ (a)	$6.78 \times 10^7 \pm 3.71 \times 10^6$ (b)	$1.09 \times 10^8 \pm 4.02 \times 10^6$ (c)	$6.50 \times 10^7 \pm 4.34 \times 10^5$ (b)
815,300	$1.00 \times 10^5 \pm 1.61 \times 10^4$ (a)	$3.41 \times 10^8 \pm 8.45 \times 10^6$ (b)	$1.66 \times 10^7 \pm 1.10 \times 10^6$ (c)	$3.40 \times 10^8 \pm 5.15 \times 10^5$ (b)
1,110,833	$1.05 \times 10^6 \pm 7.02 \times 10^4$ (a)	$4.33 \times 10^7 \pm 1.02 \times 10^6$ (b)	$8.78 \times 10^7 \pm 1.07 \times 10^6$ (c)	$4.35 \times 10^7 \pm 3.24 \times 10^5$ (b)
1,682,680	$5.20 \times 10^5 \pm 3.50 \times 10^4$ (a)	$5.19 \times 10^8 \pm 4.94 \times 10^6$ (b)	$1.90 \times 10^7 \pm 3.33 \times 10^5$ (c)	$5.19 \times 10^8 \pm 3.66 \times 10^5$ (b)

หมายเหตุ ตัวอักษรในแถวเดียวกัน “a b c” แสดงให้เห็นความแตกต่างของข้อมูลทางสถิติอย่างมีนัยยะสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบข้อมูลด้านเครื่องมือ ค่าใช้จ่าย เวลาและความสามารถในการตรวจสอบโรคเอดส์อีกเสบด้วยวิธีต่างๆ

เกณฑ์พิจารณา	Somacount 150	Methylene blue staining	DAPI staining	DAPI staining (modified)
เครื่องมือที่ใช้	Somacount 150	Light Microscope	Epifluorescence microscope	Epifluorescence microscope
ประมาณค่าใช้จ่าย (บาท)	100	2	10	70
เวลา (ตัวอย่างชั่วโมง)	150	20	20	20
ความสามารถในการตรวจสอบ	เซลล์โซมาติก	เซลล์โซมาติกและแบคทีเรีย	เซลล์โซมาติกและแบคทีเรีย	แบคทีเรีย

การเปรียบเทียบวิธีตรวจสอบกลุ่ม ของแบคทีเรียด้วยวิธีการต่างๆ

จากผลการศึกษา เทคนิค FISH ที่พัฒนาขึ้นโดยผู้วิจัย สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคเอดส์อีกเสบได้ไม่แตกต่างกับเทคนิคการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (ตารางที่ 7) ทำให้เทคนิค FISH ที่พัฒนาขึ้น เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ศึกษาและวินิจฉัยโรคเอดส์อีกเสบ

เนื่องจากการใช้เทคนิค FISH สามารถลดข้อจำกัดของเทคนิคอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องใช้เวลานานและให้ผลผิดพลาดในกรณีเซลล์มีการจับตัวเป็นกลุ่มก้อน เนื่องจากสามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้โดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอีพิฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งสามารถมองเห็นการเรืองแสงของดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะเจาะจงกับแบคทีเรียกลุ่มนั้นๆได้ (รูปที่ 3)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลการนับจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบด้วยวิธีต่างกัน (mean $\pm$ SD)

Somacount 150 (Cell / ml)	Methylene blue staining (Cell / ml)	DAPI staining (Cell / ml)
10,540 $\pm$ 2,703 ^(a)	23,121 $\pm$ 5,277 ^(b)	25,963 $\pm$ 17,803 ^(b)
104,987 $\pm$ 4,816 ^(a)	115,607 $\pm$ 6,812 ^(a)	206,965 $\pm$ 11,250 ^(b)
195,713 $\pm$ 6,629 ^(a)	123,314 $\pm$ 12,561 ^(b)	321,946 $\pm$ 16,039 ^(b)
207,907 $\pm$ 3,182 ^(a)	211, 946 $\pm$ 9,634 ^(a)	479,210 $\pm$ 20,551 ^(b)
355,880 $\pm$ 4,495 ^(a)	360,308 $\pm$ 17,501 ^(a)	511,850 $\pm$ 61,842 ^(b)
469,620 $\pm$ 6,706 ^(a)	493,256 $\pm$ 8,060 ^(a)	529,653 $\pm$ 19,870 ^(b)
815,300 $\pm$ 12,384 ^(a)	816,956 $\pm$ 20,886 ^(a)	935,918 $\pm$ 19,870 ^(b)
1,110,833 $\pm$ 5,761 ^(a)	1,117,534 $\pm$ 15,233 ^(a)	1,389,041 $\pm$ 164,364 ^(b)
1,682,680 $\pm$ 27,195 ^(a)	1,687,861 $\pm$ 18,531 ^(a)	1,939,094 $\pm$ 135,098 ^(b)

หมายเหตุ ตัวอักษรในแถวเดียวกัน “a b c” แสดงให้เห็นความแตกต่างของข้อมูลทางสถิติอย่างมีนัยยะสำคัญ (P<0.05)

Wei Yu และคณะ(1995) และการตรวจด้วยเทคนิคการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 5) กล่าวได้ว่า การตรวจปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยสี methylene blue และการย้อมสีเซลล์ด้วยสี DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Gunasekera และคณะ (2003) มีประสิทธิภาพในการตรวจปริมาณเซลล์แบคทีเรียได้ดีกว่าการตรวจนับด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสี DAPI ตามวิธีการของ Wei Yu และคณะ (1995) และการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ

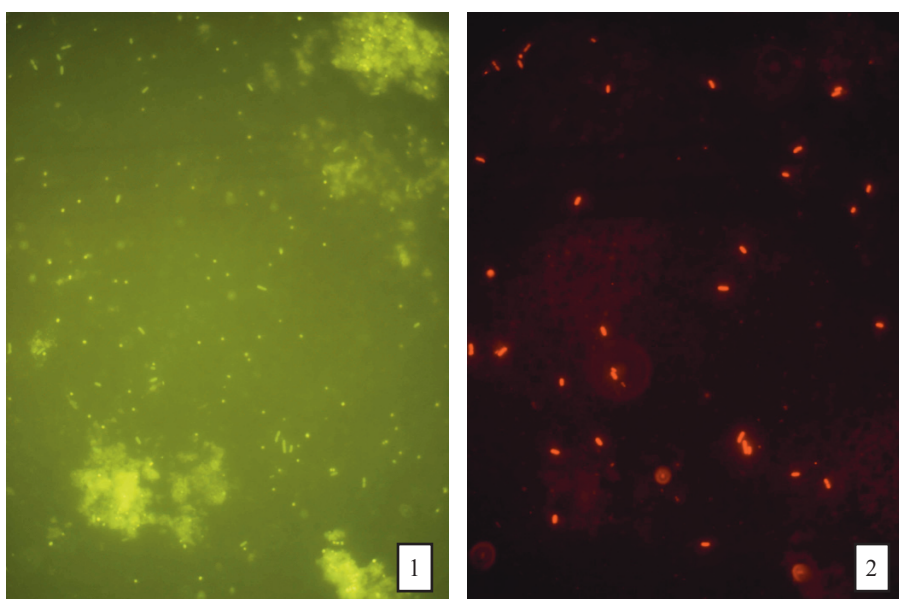
เมื่อนำปริมาณเซลล์แบคทีเรียและเซลล์โซมาติกที่ตรวจนับในแต่ละวิธีการมาเปรียบเทียบกับเครื่องมือที่ใช้ในแต่ละวิธีการตรวจนับ ค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่าง ระยะเวลาและตัวอย่างที่ตรวจพบ (ตารางที่ 6) กล่าวได้ว่า วิธีการย้อมเซลล์ด้วยสี methylene blue มีความเหมาะสมต่อการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกและเซลล์แบคทีเรียพร้อมๆกัน เนื่องจากสามารถตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกและเซลล์แบคทีเรียได้ในการย้อมเพียงครั้งเดียว

อีกทั้งค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างก็ต่ำมาก เมื่อเทียบกับการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 ที่ไม่สามารถตรวจปริมาณแบคทีเรียได้ อย่างไรก็ตามเมื่อต้องการตรวจเฉพาะปริมาณเซลล์โซมาติกเพียงอย่างเดียว การตรวจนับปริมาณเซลล์โซมาติกโดยการย้อมเซลล์ด้วยสี methylene blue ใช้เวลานานกว่าการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 แต่เมื่อต้องการตรวจปริมาณเซลล์แบคทีเรียเพียงอย่างเดียว วิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยสี DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Gunasekera และคณะ (2003) เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากมีโปรแกรมที่สามารถตรวจปริมาณเซลล์แบคทีเรียได้โดยอัตโนมัติ เช่น โปรแกรม ImageProPlus (Media Cybernetics, USA) เป็นต้น ทำให้สามารถทำการตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียได้รวดเร็วมากขึ้น อย่างไรก็ตามมีข้อจำกัดสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ต้องลงทุนซื้ออุปกรณ์วิเคราะห์ราคาแพงและต้องมีการได้รับการถ่ายทอดเทคนิคการวิเคราะห์จากผู้มีประสบการณ์ก่อน

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบผลการตรวจสอบแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคเดินมอีกเสบด้วยวิธีการทางชีวเคมีและเทคนิค FISH

เชื้อแบคทีเรียที่เติมลงในน้ำนมดิบ	ผลการตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี			ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH		
	<i>Strep. Spp.</i>	<i>Strep. Spp.</i>	<i>E. coli</i>	EUB (mix)	LGC (mix)	GAM42a
<i>Stap. spp.</i>	Yes	No	No	Yes	Yes	No
<i>Strep. Spp.</i>	No	Yes	No	Yes	Yes	No
<i>E. coli</i>	No	No	Yes	Yes	No	Yes
<i>Stap. spp.</i> + <i>E. coli</i>	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Strep. Spp.</i> + <i>E. coli</i>	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

หมายเหตุ *E. coli* = *Escherichia coli* *Stap. spp.* = *Staphylococcus spp.* *Strep. spp.* = *Streptococcus sp*



รูปที่ 3 การตรวจสอบแบคทีเรียในน้ำนมด้วยเทคนิค FISH เมื่อเติมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ 2 ชนิดในตัวอย่างน้ำนม (*Escherichia coli* และ *Staphylococcus spp.*) (1) เมื่อตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอโพรบสำหรับแบคทีเรียทั้งหมด (EUBmixed) ติดฉลากด้วยสาร Fluorescein เรืองแสงสีเขียว (2) เมื่อตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอโพรบ GAM42a (ติดฉลากด้วยสาร CY3 เรืองแสงสีแดง) ซึ่งจะติดกับ *S. aureus* แต่ไม่ติดกับ *E. coli*

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาพบว่า การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกและแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคการย้อมเซลล์ด้วยสี methylene blue มีประสิทธิภาพสูงในการปฏิบัติงาน เนื่องจากสามารถศึกษาปริมาณเซลล์โซมาติกและแบคทีเรียได้พร้อมกันในการย้อมเพียงครั้งเดียว ขณะที่วิธีการตรวจหาปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 ไม่สามารถทำได้ อีกทั้งการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกโดยวิธีย้อมสีดังกล่าวมีต้นทุนค่าใช้จ่ายที่ใช้ต่อตัวอย่างต่ำกว่าแต่ก็มีความคลาดเคลื่อนสูงมากขึ้นอยู่กับผู้วิเคราะห์ ทั้งนี้การเลือกใช้วิธีการใดในการศึกษาควรคำนึงถึงวัตถุประสงค์ของการปฏิบัติงาน แต่หากต้องการตรวจเฉพาะปริมาณเซลล์แบคทีเรียเพียงอย่างเดียวการย้อมสีเซลล์ด้วยสี DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Gunasekera และคณะ (2003) เป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถลดข้อจำกัดทางด้านระยะเวลาที่ใช้และมีความแม่นยำสูงและเหมาะสมกับการงานวิเคราะห์ที่มีตัวอย่างนมดิบจำนวนมาก ส่วนการใช้เทคนิค FISH ที่พัฒนาขึ้น มีแนวโน้มที่จะใช้ตรวจชนิดของแบคทีเรียในน้ำนมดิบ และสามารถลดข้อจำกัดของเทคนิคการตรวจชนิดของแบคทีเรียโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อได้ ส่งผลให้สามารถทำการรักษาและป้องกันโรคเต้านมอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพและทันทั่วทั้ง อย่างไรก็ตามเพื่อให้การตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบมีประสิทธิภาพสูงสุดจึงยังคงต้องพัฒนาเทคนิค FISH ให้มีความถูกต้องและแม่นยำสามารถนำไปใช้ได้จริงในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์คุณภาพน้ำนมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานต่อไปนี้ ได้แก่ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่กรุณาสนับสนุนทุนในการทำวิจัย สหกรณ์โคนม จังหวัดพัทลุง จำกัด ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านเทคนิคและสนับสนุนเครื่อง

Somacount 150 และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ได้เอื้อเฟื้อ สถานที่วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- พนัส ธรรมกิริยวงศ์. 2537. โรคเต้านมอักเสบและแนวทางการป้องกัน. วารสารโค-กระบือ. 17(3): 32-47.
- วาสนา ไชยศรี อ้อมอุทัย ทอที รักษ์พงษ์ ตาใจ กิตติกร บุญศรี จรัญลักษณ์ ยวงกาศ สุวิทย์ โชตินันท์ วัฒนา มานิตย์ ขวัญชาย เครือสุคนธ์ วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา วีระวรรณ ดิวนันทกร สุวิชัย โรจนเสถียร ประสทธิ ธรวาทิจรกุล ประมินทร์ วินิจกุล. (2545). ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจน้ำนมด้วยน้ำยาทดสอบโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการที่ผลิตเองกับปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมโค. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสภาสัตวบาล สัตวศาสตร์ สัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 3. 28-29 มกราคม 2545. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. หน้า 457-464.
- สุนิรัตน์ เอี่ยมละมัย. (2544). โรคเต้านมอักเสบและสุขภาพของเต้านมในโค. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- สุนิรัตน์ เอี่ยมละมัย อนนตชัย ชัยยศวิทยากุล สุวลักษณ์ ศรีสุภา สุธิดา จันทรลูน อภิรมย์ เจริญไชย ปริญญา พันฤทธิ และวัชรกร ไหลสกุล (2549). การตรวจนับเซลล์โซมาติกในน้ำนมโคโดยเครื่อง DeLaval cell counter. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการโคนม 2549 “อุตสาหกรรมโคนมไทยกับการแข่งขันในอนาคตและการปรับตัวของเกษตรกร” 21-22 สิงหาคม 2549 ณ คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 99-101.

- สำนักงานวิทยาศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 9. (2548). เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาแนวทางการปรับปรุงคุณภาพน้ำนมดิบ ครั้งที่ 1. 15-16 มีนาคม 2548 ณ ห้องประชุมสหกรณ์โคนมพัทลุง จำกัด จังหวัดพัทลุง. หน้า 1-12.
- อริญ จันทร์สุน. (2544). การตรวจนับโซมาติกเซลล์ในน้ำนมด้วยกล้องจุลทรรศน์. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R. J., Chirholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1919-1925.
- Amann, R.I., Fuchs, B.M. and Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by Fluorescence *In Situ* hybridisation. Current Opinion in Biotechnology. 12: 231-236.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59: 143-169.
- Amann, R.I., Fuchs, B.M. and Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. Current Opinion in Biotechnology. 12: 231-236,
- Bhushan, J. (2000). Bovine Mastitis. Department of Veterinary Science Pennsylvania State University. USA.
- Clarke, R. G. and Pinder, A. C. (1998). Improved detection of bacteria by flow cytometry using a combination of antibody and viability markers. J. Appl. Microbiol. 84:577-584.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H. and Wagner, M. (1999). The domain specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. Syst. Appl. Microbiol. 22: 434-444.
- FIL/IDF. (1984). Recommended methods for somatic cell counting in milk. Bulletin No. 168. Belgium Franes, 19 p.
- Gunasekera, T. S., Dorsch, M. R., Slade, M. B. and Veal, D. A. (2003). Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence *in situ* hybridization using ribosomal RNA directed probes. Appl. Environ. Microbiol. 94: 936-945.
- Meier, H., Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1999). Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of Gram positive bacteria with low DNA G+C content. Syst. Appl. Microbiol. 22: 186-196.
- Philpot, W.N. and Nickerson, S.C. (1991). Mastitis: Counter Attack. Babson Bros. Co. Illinois. USA., 150 p.
- Sorhaug, T. and Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products quality aspects. Tren. Food Sci. Tech. 8: 35- 41.
- Wei Yu, K., Walter, Dodds, B. Katherine, N. Jeannie, S. and Eric, A. (1995). Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total fluorescence dyes. Environmental Microbiology. 913: 3367-3372.
- William, L., Robert, C. J., Harmon, O., Leary, J. and Jack, M A. (2002). Mastitis and Its Control. Kentucky University.