



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ อนุระบาดวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย  
กลุ่ม Streptococci จากสิ่งแวดล้อมที่ก่อให้เกิดต้านมอักเสบในโคนม

โดย     นายกิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร

ธันวาคม 2550

สัญญาเลขที่ TRG4580086

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ อนุবাদวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย  
กลุ่ม Streptococci จากสิ่งแวดล้อมที่ก่อให้เกิดต้านมอักเสบในโคนม

นายกิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร

ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## สารบัญ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| กิตติกรรมประกาศ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | i      |
| คำย่อ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1      |
| Abstract                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 2      |
| งานวิจัย                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |        |
| บทนำ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 3      |
| วัตถุประสงค์                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 3      |
| ระเบียบวิธีการวิจัย                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 3      |
| ผลการศึกษา                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 6      |
| บทวิจารณ์                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 12     |
| เอกสารอ้างอิง                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 14     |
| <br>Output จากโครงการวิจัย                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <br>16 |
| <br>ภาคผนวก (สำเนา)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <br>17 |
| 1. ผลงานตีพิมพ์และการเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |        |
| 1.1 <u>Mastitis in small dairy holders of Nakhonpathom province, Thailand</u> Proceedings: <b><i>The 11<sup>th</sup> International Symposium of the Word Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology</i></b> , November 9-13, 2003. P122-123.                                                                      |        |
| 1.2 <u>อนุธรรบาดวิทยาของเชื้อ <i>Streptococcus uberis</i> ที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบในโคนม</u> <b><i>ประมวลเรื่องเต็มการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30</i></b> จัดโดยสัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทรัลพลาซา กรุงเทพฯ วันที่ 10-11-12 พฤศจิกายน 2547 หน้า 207-213                                |        |
| 1.3 <u>การระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลมและให้ผลลบต่อการทดสอบ catalase ซึ่งแยกได้จากการติดเชื้อเต้านมของโคนม</u> <b><i>ประมวลเรื่องเต็มการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30</i></b> จัดโดยสัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทรัลพลาซา กรุงเทพฯ วันที่ 10-11-12 พฤศจิกายน 2547 หน้า 52-59 |        |
| 1.4 <u>Antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci bacteria causing mastitis in province, Thailand</u> Proceedings: <b><i>The 11<sup>th</sup> International Symposium of the Word Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology</i></b> , November 9-13, 2003. P120-121.                                     |        |

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณหน่วยงานและบุคคลากรที่ให้การสนับสนุนดังต่อไปนี้

1. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัย
2. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการ
3. เจ้าของฟาร์มเกษตรผู้เลี้ยงโคนมสหกรณ์โคนมกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่อนุญาตให้เข้าทำการศึกษาและเก็บตัวอย่าง

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ เลขที่ TRG4580086  
ชื่อโครงการ อนุธรรบาดิทยาของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Streptococci จากสิ่งแฉดล้ดมที่ก่อให้เกดเต้านมอ้กเสบในโคนม  
ชื่อนักวิจัยและสถาบัน: นายกิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร  
ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Email address: kittisak\_cu@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 1 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2545 ถึงวันที่ 30 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2547

เต้านมอ้กเสบเป็นปัญหาลำคัญต่อสุขภาพของโคนมซึ่งมีผลกระทบต่อผลผลิตและคุณภาพน้ำนมที่ผลิตได้ Streptococci จากสิ่งแฉดล้ดมเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญในการก่อให้เกดเต้านมอ้กเสบทั้งแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการ ในประเทศไทยขาดข้อมูลด้านธรรบาดิทยาของเชื้อในกลุ่มนี้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม streptococci จากสิ่งแฉดล้ดมที่เป็นสาเหตุของเต้านมอ้กเสบในโคนม และศึกษาประยุกต์ใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบ repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) เพื่อศึกษาอนุธรรบาดิทยาของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ ทำการศึกษาระหว่าง ปี พ.ศ. 2545-2546 ในฟาร์มโคนมรายย่อยจำนวน 6 ฟาร์ม ในเขต อ.กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยเข้าตรวจเต้านมแม่โครีดนมเพื่อประเมินสถานภาพปัญหาเต้านมอ้กเสบและเก็บตัวอย่างน้ำนมเดือนละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 10 ครั้ง พบว่าจำนวนเฉลี่ยแม่โครีดนมในฟาร์มอยู่ระหว่าง 8.8 ถึง 18.9 ตัว ไม่พบวาลความชุกของเต้านมอ้กเสบมีความแตกต่างระหว่างฟาร์ม (0-14.3%) แต่พบวาระดับเต้านมอ้กเสบแบบไม่แสดงอาการสูงในทุกฟาร์ม (10.5-75.0%) ซึ่งพบว่า coagulase negative staphylococci (19.6-44.2%) และ environmental streptococci (13.7-48.4%) เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อเข้าสู่เต้านม และพบว่า *Streptococcus uberis* เป็น environmental streptococci ที่พบมากที่สุด จากการศึกษาอนุธรรบาดิทยาของเชื้อ *Streptococcus uberis* ทั้งหมด 48 สายพันธุ์ โดยวิธีสร้างลายพิมพ์สารพันธุกรรมด้วยวิธี repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) ซึ่งใช้ ERIC1R และ ERIC2 primers พบว่าจำแนกลายพิมพ์สารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียนี้ได้ 28 รูปแบบ ซึ่งสามารถจำแนก 13 จำพวก (Discriminatory index=0.87) ผลการศึกษาชี้ให้เห็นวาลความหลากหลายของ *Streptococcus uberis* ที่ก่อให้เกดปัญหาเต้านมอ้กเสบในโคนม ทั้งนี้ถึงผลกระทบต่อปัญหาดังกล่าวต่อสุขภาพโคนมและคุณภาพน้ำนม ตลอดจนข้อมูลเชิงลึกทางธรรบาดิทยาในเชิงปัจจัยเสี่ยงและแนวทางป้องกันควรได้รับการศึกษาต่อไปในอนาคต

คำหลัก อนุธรรบาดิทยา สเตรปโตค็อกคัส ยูเบอริส เต้านมอ้กเสบ โคนม

## Abstract

---

**Project code:** TRG4580086

**Project title:** Molecular epidemiology of environmental streptococci causing mastitis in dairy cattle

**Investigator:** Kittisak Ajariyakhajorn

**Email address:** kittisak\_cu@yahoo.com

**Project period:** July 1<sup>st</sup>, 2002 to June 30<sup>th</sup>, 2004

Mastitis is an important health problem in dairy cattle in which affects their milk quality and production. Environmental streptococci is the major group of bacteria that causing both subclinical and clinical mastitis. There is not sufficient epidemiological data of these bacteria in Thailand. This investigation aims to isolate, identify, and collect environmental streptococci causing mastitis in dairy cattle in which majority of these bacteria were subjected to sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) for subtyping. During 2002-2003, we investigated mastitis in six small dairy herds in NakhonPathom Province. Veterinarian monthly regular visit was performed in order to examine mastitis status for ten times in each farm. The averages of milking cows were 8.8 to 18.9. There was no difference of clinical mastitis prevalence among herds (0-14.3%). However, prevalence of subclinical mastitis seems to be high in all herds (10.5-75.0%). Environmental *Streptococcus* spp. and coagulase negative *Staphylococcus* spp. are major responsible pathogens for mastitis in all herds. *Streptococcus uberis* is the majority of environmental streptococci isolated from mastitis cows. Molecular epidemiological investigation using repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) with ERIC1R and ERIC2 primers was able to distinguish 48 isolates of *Streptococci uberis* into 28 rep-PCR electrophoretic patterns in which were differentiated into 13 rep-PCR subtypes (Discriminatory index=0.87) There was a diversity of genotypic groups of *Streptococcus uberis* causing mastitis. Effects of *Streptococcus uberis* on animal health, production, risk factors associated with mastitis, and control measurements are importance to be further studies.

**Keywords:** Molecular epidemiology, *Streptococcus uberis*, Mastitis, Dairy cattle

## 1. บทนำ: ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เต้านมอักเสบเป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพของโคนมซึ่งมีผลกระทบต่อทั้งผลผลิตและคุณภาพน้ำนมที่ผลิตได้ ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่อวงการโคนมทั่วโลก (DeGraves and Fetrow, 1993) แม้ประเทศไทยจะมีนโยบายการส่งเสริมและสนับสนุนให้มีการเลี้ยงโคนมเพื่อลดและทดแทนการนำเข้าผลิตภัณฑ์นมมาเป็นเวลานานกว่า 30 ปีแล้ว แต่การผลิตโคนมยังคงมีประสิทธิภาพต่ำ เนื่องจากมีปัญหาเต้านมอักเสบอย่างกว้างขวาง

Streptococci จากสิ่งแวดล้อมเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญในการก่อให้เกิดเต้านมอักเสบทั้งแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการ (Jones and Swisher, 1998) ในประเทศไทยขาดข้อมูลด้านระบาดวิทยาของเชื้อในกลุ่มนี้ ซึ่งส่งผลให้ขาดความเข้าใจที่ถูกต้องในการวางแผนป้องกันและรักษา ด้วยความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีด้านอนุวิทย์าร่วมด้วยหลักการทางระบาดวิทยาทำให้ในการศึกษาติดตามเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบสามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว ตลอดจนสามารถให้ข้อมูลที่เป็นองค์ความรู้ใหม่ในเชิงระบาดวิทยาของโรคเต้านมอักเสบได้ เช่น แหล่งที่มาของเชื้อในการระบาด สถานะภาพการติดเชื้อเรื้อรัง การติดต่อถ่ายทอดจูล์ชีพของเชื้อ เป็นต้น

การศึกษาดังนี้ นอกจากเป็นการศึกษาเพื่อเก็บรวบรวมเชื้อกลุ่ม streptococci ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในประเทศแล้ว ยังเป็นการพัฒนาและประยุกต์ใช้วิธีปฏิบัติทางจุลชีววิทยาแบบ repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) (รูปที่ 2) ที่ทำให้สามารถเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (DNA fingerprinting) ของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบได้ ด้วยข้อมูลทั้งหมดนี้จะสามารถทำให้เราเข้าใจระบาดวิทยาของโรคได้ดีขึ้นและสามารถนำข้อมูลมาใช้ในการวางแผนการป้องกันและรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อช่วยลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจในการส่งเสริมการเลี้ยงโคนมในประเทศ

## 2. วัตถุประสงค์

2.1 แยกและระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม streptococci จากสิ่งแวดล้อมที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบในโคนม และจัดตั้ง culture collection ของเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทย

2.2 พัฒนารูปแบบปฏิบัติทางจุลชีววิทยาแบบ Repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) ที่สามารถหาและเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (DNA fingerprinting) ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้

## 3. ระเบียบวิธีการวิจัย

### 3.1 การคัดเลือกฟาร์มโคนมที่เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในระหว่าง ปี พ.ศ. 2545-2546 ฟาร์มโคนมรายย่อยจำนวน 6 ฟาร์ม ในเขต อ.กำแพงแสน จังหวัดนครปฐมได้คัดเลือกเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยผู้วิจัยจะเข้าตรวจเยี่ยมฟาร์ม เก็บข้อมูล ตรวจสอบ

เต้านมแม่โคริตนมเพื่อประเมินสถานภาพปัญหาเต้านมอักเสบและเก็บตัวอย่างน้ำนมเดือนละ 1 ครั้ง การตรวจเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (Subclinical mastitis) ใช้น้ำยา California mastitis test (CMT)

### 3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำนมและเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย

ตัวอย่างน้ำนมจากโคที่เป็นเต้านมอักเสบจะทำการเก็บหลังจากการรีดนมเสร็จ การเก็บตัวอย่างน้ำนมจากโคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (clinical mastitis) ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมก่อนการให้การรักษาทุกครั้ง ส่วนการเก็บตัวอย่างน้ำนมจากโคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (subclinical mastitis) ทำการเก็บ เดือนละหนึ่งครั้งหลังจากที่ได้รับการตรวจสอบโดยการทดสอบให้ผลบวกต่อน้ำยาซีเอ็มที (California Mastitis test)

ก่อนการเก็บตัวอย่างน้ำนมได้ทำความสะอาดเต้านมและเช็ดที่ปลายหัวนมด้วยสำลีจุ่มแอลกอฮอล์ 70% และรีดนมทั้ง 2 – 3 ครั้ง จึงทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมโดยการรีดด้วยมือให้ได้ น้ำนมประมาณ 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเก็บตัวอย่างน้ำนม เก็บรักษาตัวอย่างน้ำนมในกระติกน้ำแข็ง แล้วนำกลับมาแช่ตู้เย็น

การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียและการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย

ก่อนการตรวจ เขย่าน้ำนม เพื่อให้มีการผสมทั่วกันทั้งขวด นำน้ำนมปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร ไปเขี่ยลงบนแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Trypticase soy agar ที่มีเมดิโกลิตแดงของแคะผสมในปริมาณ 5% (ปริมาตร/ปริมาตร) นำแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อไปอบบ่มในตู้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย และแสดงปริมาณเป็น Colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิลิตร โดยพิจารณาถึงความสำคัญของแบคทีเรียที่พบต่อการการเป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบตามหลักเกณฑ์ของ National Mastitis Council (1999)

เชื้อที่เจริญเติบโตและมีลักษณะบนอาหารเลี้ยงเชื้อคล้ายโคโลนีของ streptococci มีรูปร่างกลมติดสี่แกรมบวก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และให้ผลลบต่อการทดสอบ catalase จะทำการทดสอบโดยใช้ชุดตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีสำเร็จของเชื้อกลุ่ม streptococci (API Strep ®) เพื่อจำแนกชนิด

จัดเก็บ Culture collection ของเชื้อ streptococci ทุกสายพันธุ์ (isolates) ที่แยกได้และจำแนกชนิด (specie) แล้ว จะนำมาเพาะเพิ่มจำนวนและเก็บไว้ใน Brain heart infusion borth ที่มีส่วนผสมของ 20% glycerol และเก็บรักษาไว้ในตู้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

### 3.3 Repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR)

การแยกสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้ใน Culture collection ถูกนำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด trypticase soy agar ที่มีเมดิเล็ดแดงแคะ 5 % โดยปริมาตร ในตู้อบบ่ม ที่อุณหภูมิ



37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเชื้อแบคทีเรียใส่หลอด ชนิด polypropylene microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วจึงทำการปั่นล้างด้วยสารละลาย 1M NaCl 2 ครั้ง และด้วยสารละลาย Tris-EDTA (TE) อีก 2 ครั้ง เซลล์แบคทีเรียจะละลายอยู่ในสารละลาย TE ที่มี เอนไซม์ Lysostaphin จำนวน 20 หน่วย และเอนไซม์ RNase A ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 mg/ml หลังจากนำส่วนผสมทั้งหมดในหลอด microcentrifuge tube แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ นาน 30 นาที ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม SDS ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 mg/ml และแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ นาน 10 นาที ณ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นเติมเอนไซม์ Proteinase K ที่ระดับความเข้มข้น 0.4 mg/ml และแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ นาน 1 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แยกสกัดสารพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ phenol และสารละลายผสมระหว่าง phenol-chloroform-isomyl alcohol ในสัดส่วน 25:24:1 จากนั้นตกตะกอน DNA โดยสารละลาย 3M ammonium acetate และ absolute ethanol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ตรวจประเมินคุณภาพและปริมาณของ DNA ที่ได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis และโดยใช้ UV spectrophotometer

วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบ Repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR)

นำ genomic DNA ของแบคทีเรียจำนวน 100 ng มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยมี ส่วนประกอบของ primers ของแต่ละตัวเท่ากับ 1  $\mu$ M dNTP เท่ากับ 200  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub> เท่ากับ 3mM และเอนไซม์ DNA polymerase จำนวน 2.5 หน่วย ในสารละลายรวมปริมาตร 25  $\mu$ L โดย กำหนดอุณหภูมิและขั้นตอนของเครื่อง thermal cycler ดังนี้ ระยะเริ่ม denaturation (94 °C นาน 5 นาที) ตามด้วย 35 รอบของขั้นตอนที่ 94 °C นาน 30 วินาที 50 °C นาน 3 นาที 72 °C นาน 2 นาที และตามด้วยขั้นตอนสุดท้ายที่ 72 °C นาน 7 นาที ทุกครั้งจะมีหลอดควบคุมที่ให้ผลลบโดยในหลอดปฏิกิริยาจะไม่มีสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิดในกลุ่ม environmental streptococci อาจต้องมีการปรับเปลี่ยนโดยการเปลี่ยนชนิดของ primer และสัดส่วนขององค์ประกอบสารในปฏิกิริยา (optimization) แบ่งสารที่ได้ 10  $\mu$ L จากแต่ละตัวอย่าง มาดำเนินการตามขั้นตอนของวิธี electrophoresis ใน 2% agarose gels ที่มี ส่วนประกอบ 1 x TAE และ ethidium bromide 0.5  $\mu$ g และใช้กำลังไฟฟ้าที่ 85 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง โดยที่ทุกครั้งจะใช้ 123 bp DNA ladder เป็นตัวทำเครื่องหมายหนึ่งช่องในเจล ทำการถ่ายรูปเจลภายใต้แสง UV โดย gel documentation system และทำการเก็บรูปภาพของเจลที่มี fingerprints ในรูปดิจิทัลไฟล์ (TIF) สำหรับการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

### 3.4 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์

ศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อโดยวิธีการดูตำแหน่งของ band และคำนวณ similarity coefficients สายพันธุ์เชื้อที่มี similarity coefficient > 90 % จะถือเป็นเชื้อสายพันธุ์

เดียวกัน ผลของ Rep-PCR เมื่อนำมาตรวจสอบใน 2.0% agarose gel electrophoresis จะได้ banding pattern หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากนั้นนำ banding pattern ของเชื้อแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ Cluster analysis ได้จากการคำนวณค่า percentage of similarity ในแต่ละคู่ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยยึดหลักการเปรียบเทียบขนาดของ band หลังจากคำนวณค่า Percentage of similarity แล้ว cluster analysis ระหว่างเชื้อสามารถทำได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ETDIV และ ETCLUS การคำนวณความสามารถในการจำแนก (Discrimination index) ของวิธีการหาลายพิมพ์สามารถคำนวณได้จากสูตรของ Hunter and Gaston (9)

#### 4. ผลการศึกษา

ตารางที่ 1 สถานภาพเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนม ระหว่าง ปี 2545-2546

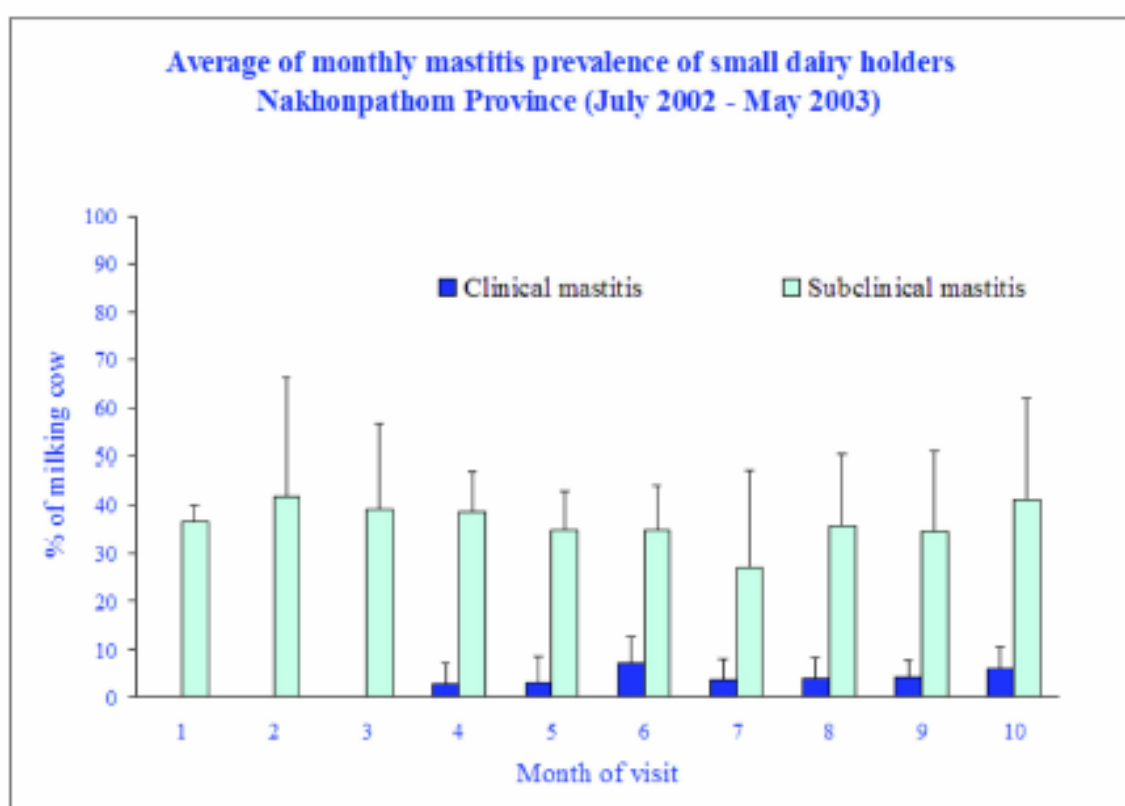
| ฟาร์ม                                                                             | 1           | 2           | 3           | 4           | 5           | 6           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| จำนวนเฉลี่ยแม่โครีดนม*                                                            | 8.8± 2.5    | 9.5± 1.2    | 11.9 ±1.0   | 14.2 ±1.0   | 17.2± 1.9   | 18.9 ±3.9   |
| พิสัยความชุกต่อเดือน (%)                                                          |             |             |             |             |             |             |
| เต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ                                                          | 0 - 8.3     | 0 -10.0     | 0 -10.0     | 0 -14.3     | 0 -10.5     | 0 -13.6     |
| เต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ                                                       | 14.3 - 60.0 | 20.0 - 75.0 | 25.0 - 66.7 | 7.69 - 46.7 | 10.5 - 60.0 | 22.7 - 64.3 |
| จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อเข้าสู่เต้านม (Intramammary Infection)(%) ** |             |             |             |             |             |             |
| <b><i>Streptococcus agalactiae</i></b>                                            | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           |
| Environmental <i>Streptococcus</i> spp.                                           | 44.1        | 30.2        | 27.1        | 32.0        | 13.7        | 48.4        |
| <b><i>Staphylococcus aureus</i></b>                                               | 0           | 0           | 3.5         | 5.3         | 11.8        | 0           |
| Coagulasenegative <i>Staphylococcus</i> spp.                                      | 17.6        | 44.2        | 36.5        | 32.0        | 19.6        | 30.9        |
| <i>E. coli</i>                                                                    | 0           | 0           | 0           | 2.7         | 0           | 0.8         |
| <i>Klebsiella</i> spp.                                                            | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 4.8         |
| Yeast                                                                             | 0           | 2.3         | 0           | 1.3         | 0           | 0           |
| <i>Corynebacterium bovis</i>                                                      | 38.2        | 9.3         | 12.9        | 24.0        | 33.3        | 13.5        |
| <i>Pseudomonas</i> spp.                                                           | 0           | 14.0        | 0           | 0           | 0           | 0           |
| Other                                                                             | 0           | 0           | 20.0        | 2.7         | 21.6        | 1.6         |

\* Mean ± SD

\*\* Percentage of pathogen isolated from both clinical and subclinical mastitic milk samples

(Ajariyakhajorn et al., 2003 <sup>a</sup>)

ฟาร์มโคนมรายย่อย 6 ฟาร์มที่ทำการศึกษามีแมโครดินนมเฉลี่ยต่อเดือน ระหว่าง 8.8 ถึง 18.9 ตัว ไม่พบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความชุกเต้านมอักเสบระหว่างฟาร์มที่ทำการศึกษา แต่พบว่าเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการมีความแตกต่างระหว่างเดือนที่เข้าตรวจฟาร์ม ( $p < 0.02$ ) (รูปที่ 1) อย่างไรก็ตามพบว่าทุกฟาร์มมีความชุกของเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการในระดับสูงและบางเดือนสูงถึง 75% (ฟาร์มที่ 2) ไม่พบมีการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในฟาร์มที่ศึกษา แต่พบมีการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในฟาร์มที่ 5 และ 6 เชื้อ *Streptococcus* spp. และ coagulase negative *Staphylococcus* spp. เป็นสองกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักในการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมอักเสบในทุกฟาร์ม ถึงแม้ว่าบางฟาร์มอาจมี *Corynebacterium bovis* เป็นสาเหตุหลักปนอยู่ด้วย (ฟาร์มที่ 1, 4 และ 5) (ตารางที่ 1)



**Figure 1 :** Average monthly mastitis prevalence in six small dairy holders of Nakhonpathom province (% of milking cow on the day of visit; mean  $\pm$  SD)

**Note :** ANOVA: two factor without replication  
**Clinical mastitis**  
 Difference among herd ( $P = 0.06$ )  
 Difference among month of visit ( $P = 0.02$ )  
**Subclinical mastitis**  
 Difference among herd ( $P = 0.099$ )  
 Difference among month of visit ( $P = 0.87$ )

รูปที่ 1 ความชุกเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและแบบไม่แสดงอาการ ในระยะ 10 เดือนที่ศึกษา ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความชุกเต้านมอักเสบระหว่างฟาร์มทั้งหกฟาร์ม (Ajariyakhajorn et al., 2003<sup>a</sup>)

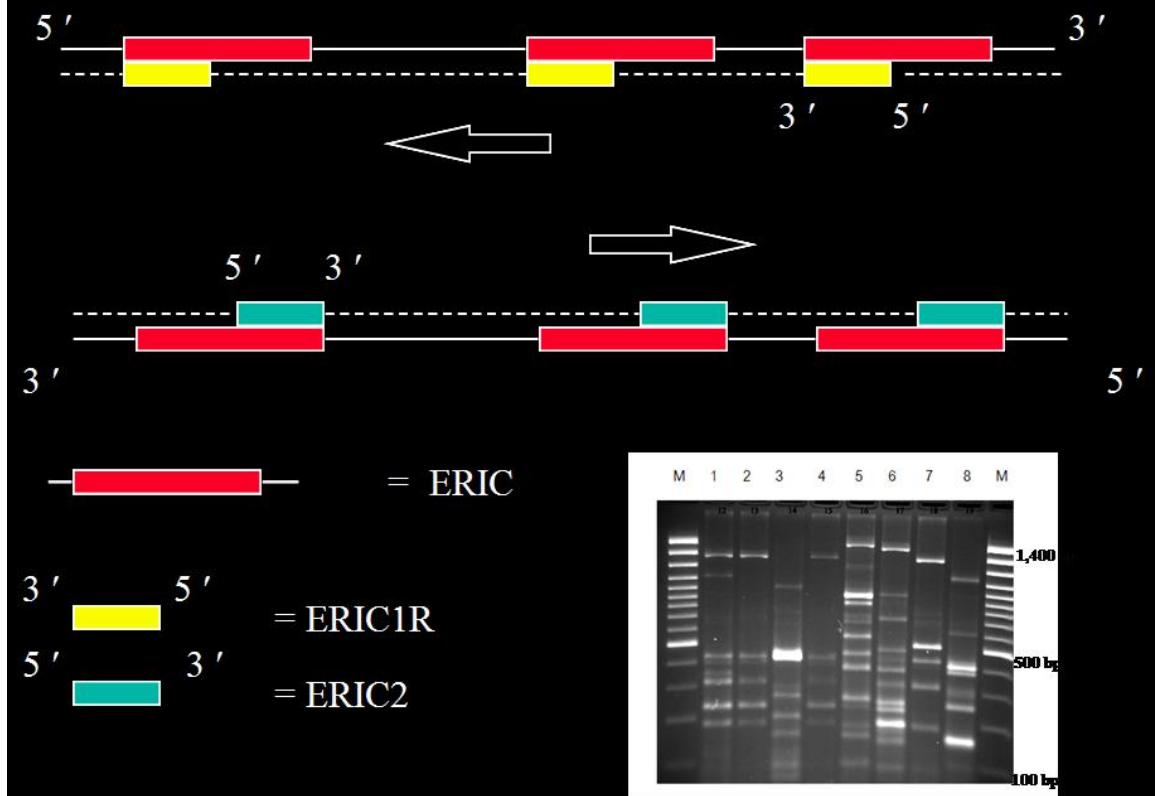
**ตารางที่ 2** การตรวจระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบ ด้วยชุดตรวจสอบคุณลักษณะทางชีวเคมีสำเร็จรูป API 20 STREP®

| ชนิดเชื้อ                      | จำนวนตัวอย่างเชื้อ |
|--------------------------------|--------------------|
| <i>S. uberis</i>               | 70                 |
| <i>S. agalactiae</i>           | 3                  |
| <i>S. dys. dysgalactiae</i>    | 8                  |
| <i>S. acidominimus</i>         | 4                  |
| <i>S. bovis</i> II             | 5                  |
| <i>S. bovis</i> I              | 5                  |
| <i>S. porcinus</i>             | 5                  |
| <i>S. dys. equisimilis</i>     | 4                  |
| <i>S. suis</i> II              | 2                  |
| <i>E. faecalis</i>             | 2                  |
| <i>E. faecium</i>              | 2                  |
| <i>E. durans</i>               | 3                  |
| Strep. Group L                 | 1                  |
| <i>Leuconostoc</i> spp.        | 1                  |
| ไม่สามารถจำแนกระบุชนิดเชื้อได้ | 9                  |

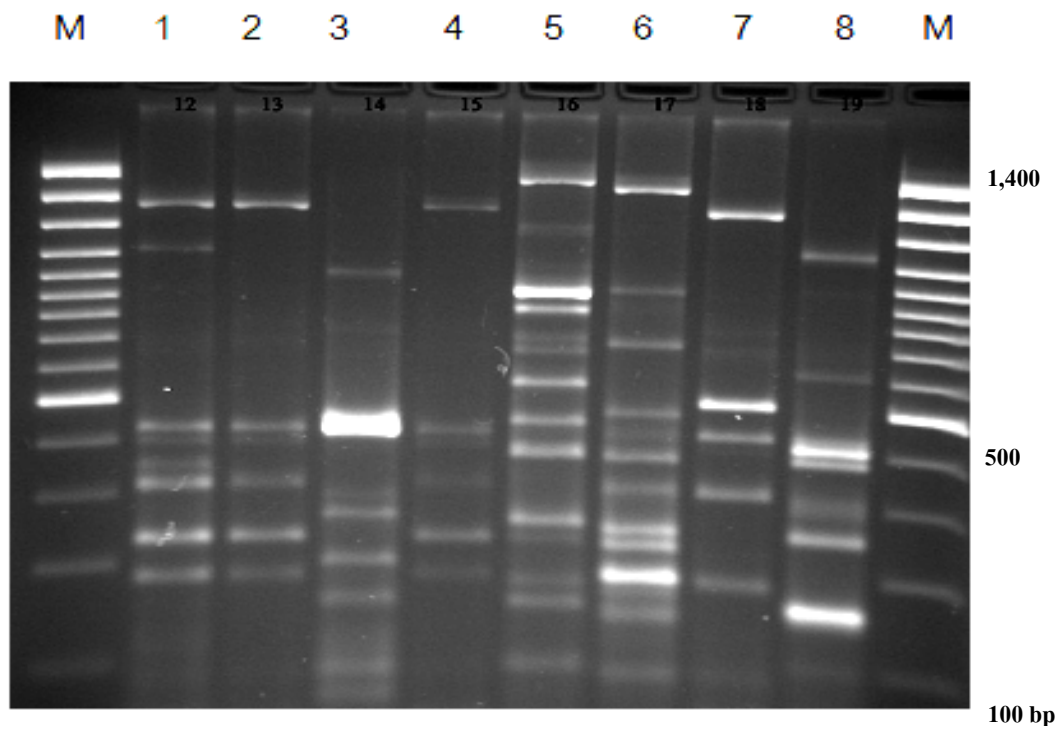
(กิตติศักดิ์ และ สุกมา 2547)

พบว่า *Streptococcus uberis* มากที่สุดในกลุ่มแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบ (65%; 70/124) ซึ่งคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีความแตกต่างหลากหลายได้ถึง 21 แบบของผลการตรวจด้วยชุดตรวจสอบคุณลักษณะทางชีวเคมีสำเร็จรูป API 20 STREP® อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อเกือบทุกสายพันธุ์ต้องมีความสามารถในการย่อยสลาย aesculin และสามารถผลิตเอ็นไซม์  $\beta$ -glucuronidase ได้

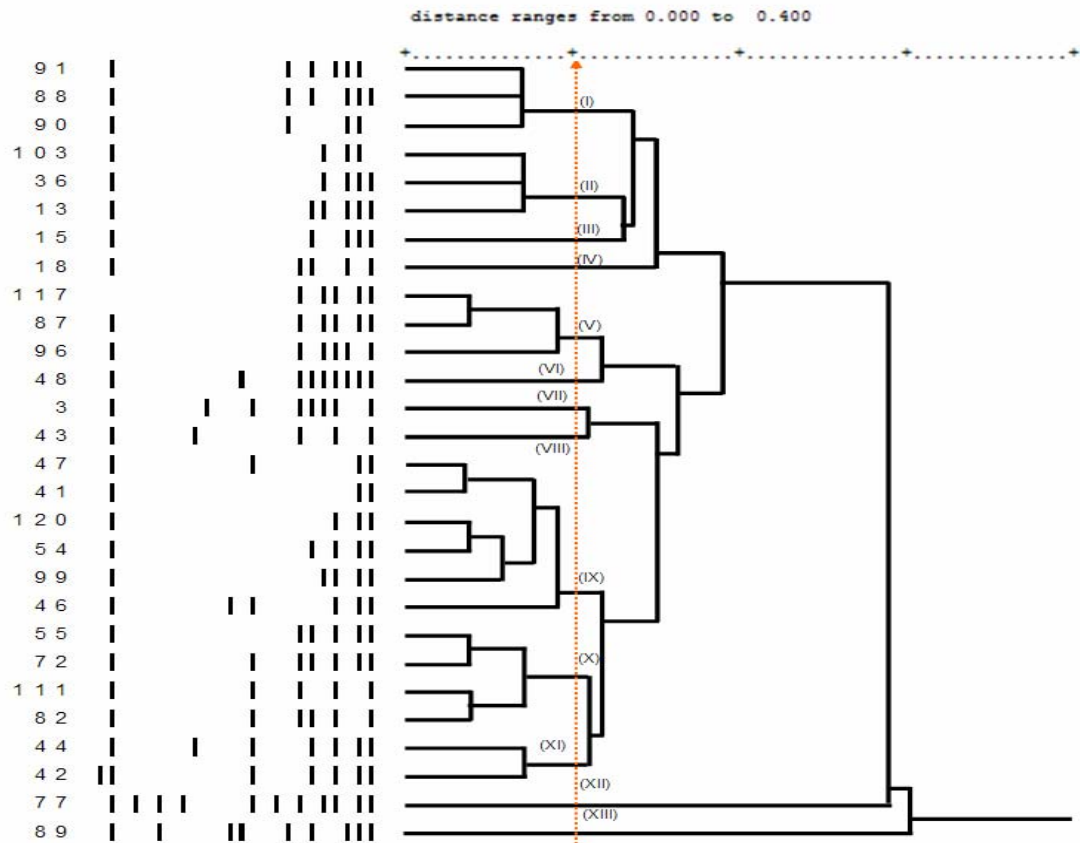
## Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR)



รูปที่ 2 repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) ที่ใช้ primers: ERIC1R และ ERIC2



รูปที่ 3 รูปแบบลายพิมพ์สารพันธุกรรมของ *S. uberis* ที่ได้จากวิธี rep-PCR โดยใช้ ERIC primers M=100 bp DNA ladder, 1-8 เป็น *S. uberis* ที่มีความแตกต่างกัน (กิตติศักดิ์ และ อลงกร, 2547)



**รูปที่ 4** Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์เชื้อ โดยกำหนดให้เชื้อที่มี similarity coefficient > 90 % จะถือเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน ดังนั้นลายพิมพ์สารพันธุกรรมของ *S. uberis* ที่ได้จากวิธี rep-PCR โดยใช้ ERIC primers สามารถจำแนกได้ 28 รูปแบบลายพิมพ์สารพันธุกรรมซึ่งสามารถจำแนกออกเป็น 13 จำพวก (I-XIII) (Discriminatory index = 0.87) (กิตติศักดิ์ และ อลงกร, 2547)

พบว่า repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) ที่ใช้ primers: ERIC1R และ ERIC2 สามารถสร้างลายพิมพ์สารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียได้ 28 รูปแบบจากทั้งหมด 48 สายพันธุ์ ลายพิมพ์สารพันธุกรรมที่ได้มีจำนวนแถบประมาณ 3 ถึง 11 ตำแหน่ง โดยมีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 100 – 1,400 คู่เบส ทั้งนี้พบว่าที่ขนาด 200 และ 1,300 คู่เบสมีอยู่ในส่วนมากของรูปแบบลายพิมพ์สารพันธุกรรมที่ได้ (รูปที่ 3) เมื่อกำหนดความคล้ายกันของรูปแบบลายพิมพ์สารพันธุกรรมที่ระดับ 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่า 28 รูปแบบลายพิมพ์สารพันธุกรรมสามารถจำแนกออกเป็น 13 จำพวก (รูปที่ 4) rep-PCR โดยใช้ ERIC primers สามารถให้รูปแบบลายพิมพ์สารพันธุกรรมที่สามารถแสดงความแตกต่างของเชื้อ *S. uberis* ได้สูง (Discriminatory index = 0.87) กลุ่มเชื้อที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความหลากหลาย (diversity) และพบว่ามีลักษณะความแตกต่างของสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. uberis* แต่ละสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนม

## 5. บทวิจารณ์

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม streptococci ที่มาจากสิ่งแวดล้อมเป็นกลุ่มสำคัญที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในโคนมได้ประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้จะมีการจัดการฟาร์มที่ดี (Bramley, 1990) การติดเชื้อเข้าสู่เต้านมโดยเชื้อในกลุ่มนี้ พบว่าเกิดได้ตลอดระยะเวลาการให้นม แต่ในต่างประเทศพบว่ามักพบสูงในช่วงของการพักรีดนม (dry period) และพบว่าผลกระทบของฤดูกาลก็มีส่วนในการเพิ่มอัตราการติดเชื้อ แม้ส่วนใหญ่ช่วงระยะเวลาของการอักเสบจะสั้น (Todhunter et al., 1994) แต่พบมีการติดเชื้ออย่างเรื้อรังภายในเต้านมได้เป็นระยะเวลานาน ซึ่งอาจเป็นแหล่งของการแพร่เชื้อภายในฟาร์ม (Ajariyakhajorn, 1998) ในประเทศสวีเดนช่วงปี ค.ศ. 1988-1993 พบว่าเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการประมาณ 31.5-36.6% และ 21.9-27.6% ของแบบไม่แสดงอาการเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม streptococci ที่แหล่งที่มาจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ *Streptococcus uberis* *S. dysagalactiae* *Enterococcus* spp เป็นต้น (Schällibaum, 1995) เชื้อที่เป็นสาเหตุสำคัญในกลุ่มนี้ที่พบมาก คือ *Streptococcus uberis* ซึ่งพบก่อปัญหาได้ทั่วไปในฟาร์มโคนม (Bramley, 1984) ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ของประเทศไทยครั้งนี้พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม streptococci ที่แหล่งที่มาจากสิ่งแวดล้อมเป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบสูงถึง 13.7 ถึง 48.4% ซึ่งจำแนกระบุชนิดเชื้อ *Streptococcus uberis* ได้มากที่สุดเช่นกัน

โดยในยุคแรกๆได้มีงานวิจัยศึกษาพบว่า *Streptococcus uberis* มีแหล่งที่มาจากสิ่งแวดล้อมเนื่องจากสามารถแยกเชื้อนี้ได้จากผิวหนังบริเวณเต้านม (Cullen, 1966) สามารถแยกเชื้อ *Streptococcus uberis* ได้จากน้ำนมโคที่ติดเชื้อ สามารถพบเชื้อในสิ่งแวดล้อมที่โคอาศัยอยู่ เช่น น้ำดิน พื้นคอก วัสดุปรอง หย้า มูลสัตว์ และแมลงวัน และเชื้อสามารถ colonized บริเวณเต้านม ผิวหนัง ริมฝีปาก บริเวณสืบพันธุ์ของโค และหัวนม ซึ่งอาจเป็นปัจจัยโน้มนำที่ทำให้โคมีการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมได้ (NMC, 1999, Zadok et al., 2005)

การศึกษาดูระบาดวิทยาของเชื้อ *Streptococcus uberis* โดยวิธีอาศัย repetitive sequence based polymerase chain reaction (rep-PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีหลักการว่า โดยทั่วไปสิ่งมีชีวิตจำพวก prokaryote จะมีส่วนของการเรียงตัวของสารทางพันธุกรรมที่มีลักษณะซ้ำๆกันแบบ repeating intergenic sequences หากมีการออกแบบ primer ที่สามารถจับและขยายเรียงต่อลำดับสารพันธุกรรมระหว่างช่วงดังกล่าวได้ ก็สามารถก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่หลังจากผ่าน gel electrophoresis จะสามารถให้รูปแบบลายพิมพ์สารพันธุกรรม (DNA fingerprinting) ได้ (Versalovic, 1991) การศึกษาครั้งนี้ใช้ ERIC1R และ ERIC2 primer ในการจำแนก *Streptococcus uberis* 48 สายพันธุ์ โดยกำหนดให้มีความคล้ายกันของรูปแบบลายพิมพ์สารพันธุกรรมที่ระดับ 90% สามารถสร้างลายพิมพ์สารพันธุกรรมได้ 28 รูปแบบ และจำแนก (subtyping) ได้ 13 จำพวก ที่บ่งบอกถึงความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อในกลุ่มนี้ และอาจสอดคล้องกับลักษณะที่สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปไม่โดดเด่นเพียงกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง นอกจากนี้วิธีนี้ยังพบว่า วิธี RAPD-



fingerprint (random amplified polymorphic DNA) ก็สามารถใช้จำแนกเชื้อชนิดนี้ได้ผลในลักษณะเดียวกัน (Zadoks, 2002)

การแพร่กระจายของเชื้อ *Streptococcus uberis* จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการสามารถแพร่เชื้อออกมาทางน้ำนมได้สูงถึง  $10^7$  cfu/มล. (James, 1999) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้มีแบคทีเรียรวมในถึงน้ำนมสูงกว่ามาตรฐาน (Hayes et al., 2001) และทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อภายในฝูงได้ ซึ่งอุณหภูมิและช่วงเวลาในการเก็บรักษาน้ำนม ภายใต้อุณหภูมิ  $10^{\circ}\text{C}$  เชื้อ *Streptococcus uberis* สามารถเพิ่มจำนวนได้ตั้งแต่ 1.5 ถึง 3.5 log 10 cfu/mL ภายใน 5 วัน และภายใต้อุณหภูมิที่มากกว่า  $21^{\circ}\text{C}$  เชื้อ *Streptococcus uberis* สามารถเพิ่มจำนวนได้ภายใน 3 ชั่วโมง (Dogan and Boor, 2004) ดังนั้นจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่ออกมาในน้ำนมถึงแม้จะมีจำนวนน้อยแต่เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วอาจมีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำนมถึงรวมของฟาร์ม นอกจากนี้เต้านมอักเสบแบบแสดงอาการจากเชื้อ *Streptococcus uberis* จะให้น้ำนมมีค่าเซลล์โซมาติกสูงกว่า 600,000 เซลล์ต่อมล. และภายหลังจากการเกิดเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการยังสามารถให้ปริมาณเซลล์โซมาติกสูงเป็นระยะเวลานาน (Haas et al., 2002)

การศึกษาในขั้นต่อไปถึงความแตกต่างและหลากหลายของ *Streptococcus uberis* ในการก่อให้เกิดเต้านมอักเสบ และผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของน้ำนมที่เปลี่ยนไป นอกจากนี้การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการก่อให้เกิดเต้านมอักเสบระหว่างสายพันธุ์ ตลอดจนการศึกษาหาแนวทางการป้องกัน เช่น การทำวัคซีน และแนวทางการรักษาโดยใช้ยาที่มีประสิทธิภาพจะช่วยลดปัญหาเต้านมอักเสบและความสูญเสียได้

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าวิธี rep-PCR โดยใช้ ERIC primers สามารถให้รูปแบบลายพิมพ์สารพันธุกรรมที่สามารถแสดงความแตกต่างของเชื้อ *S. uberis* ได้สูง (Discriminatory index = 0.87) และแสดงให้เห็นว่ากลุ่มเชื้อที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความหลากหลาย (diversity) และพบว่ามีลักษณะความแตกต่างของสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. uberis* แต่ละสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนม

## 6. เอกสารอ้างอิง

1. Bramley, A. J. 1990. Environmental mastitis. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings: 158-170.
2. Todhunter, D. A., Smith, K. L., and Hogan, J. S. 1994. Environmental streptococcal mastitis. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings. 92-95.
3. Ajariyakhajorn K. 1998. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* intramammary infection in dairy cattle. Ph.D. Thesis, 1998 University of Minnesota St. Paul, Minnesota. USA (195 pages)
4. Schällibaum, M. 1995. Switzerland: Mastitis pathogens 1988-1993. Mastitis newsletter 20: 31.
5. Bramley, A. 1984. *Streptococcus uberis* udder infection-a barrier to reducing mastitis. Incidence. Br. Vet. J. 140: 328-335.
6. Cullen, G.A. 1966. The ecology of *Streptococcus uberis*. Br. Vet. J. 122: 333-339.
7. Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacteria genomes. Nucleic Acids Res. 24:6823-6831.
8. Kapur, V., W. M. Sischo, R. S. Greer, T. S. Whittam, and J. M. Musser. 1995. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. J. Clin. Microbiol. 33:376-380.
9. Hunter, P.R., and Gaston, M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. 26 (11): 2465-2466.
10. K. Ajariyakhajorn, S. Samngamniam, T. Boonserm, C. Inchaisri, T. Thirapasakun, R.J. Farnsworth "Mastitis in small dairy holders of Nakhonpathom province, Thailand" Proceedings: The 11 th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology, November 9-13, 2003. P122-123.
11. กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และ อลงกร อมรศิลป์ " อนุระบาดวิทยาของเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบในโคนม" ประมวลเรื่องเต็มการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30 จัดโดย สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทรัลพลาซา กรุงเทพฯ วันที่ 10-11-12 พฤศจิกายน 2547 หน้าที่ 207-213

12. กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และ สุกมา สามงามน้อม “การระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลมและให้ผลลบต่อการทดสอบ catalase ซึ่งแยกได้จากการติดเชื้อเต้านมของโคนม” ประมวลเรื่องเติมการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30 จัดโดยสัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทรัลพลาซา กรุงเทพฯ วันที่ 10-11-12 พฤศจิกายน 2547 หน้า 52-59
13. National mastitis council. 1999. Laboratory and field handbook on bovine mastitis. W.D. Hoard and Sons Co. Wisconsin.
14. Zadoks, R.N., Tikofsky, L.L., Boor, K.J. 2005. Ribotyping of *Streptococcus uberis* from a dairy's environment, bovine feces and milk. Vet. Microb. 109: 257–265
15. Zadoks, R.N. 2002. Molecular and mathematical epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis in dairy herds. (dissertation) University of Utrecht. 237 pp.
16. James, A.L. 1999. *Streptococcus uberis*: A Permanent Barrier to the Control of Bovine Mastitis? Vet. J. 157: 225–238
17. Hayes, M.C., Ralyea, R.D., Murphy, S.C., Carey, N.R., Scarlett, J.M., and Boor, K.J. 2001. Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank milk. J. Dairy. Sci. 84: 292–298.
18. Dogan, B., and Boor, K.J. 2004. Growth Characteristics of *Streptococcus uberis* in UHT-Treated Milk. J. Dairy. Sci. 87: 813–815.
19. Haas, Y.D., Barkema, H.W., and Veerkamp, R.F. 2002. Genetic parameters of pathogen-specific incidence of clinical mastitis in dairy cows. Anim. Sci. 74: 233-242.
20. DeGraves, F J and Fetrow, J (1993). Economics of mastitis and mastitis control. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 9, 421-434.
21. Jones, G.M. and Swisher, Jr J. M 1998. Environmental Streptococcal and Coliform Mastitis Virginia Cooperative Extension PUBLICATION 404-234 [online]  
<http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-234/404-234.pdf>

## 1. ผลงานตีพิมพ์และการเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1.1 K. Ajariyakhajorn, S. Samngamnim, T. Boonserm, C. Inchaisri, T. Thirapasakun, R.J. Farnsworth "Mastitis in small dairy holders of Nakhonpathom province, Thailand" Proceedings: *The 11<sup>th</sup> International Symposium of the Word Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology*, November 9-13, 2003. P122-123.

1.2 กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และ อลงกร อมรศิลป์ " อนุระบาดวิทยาของเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบในโคนม" *ประมวลเรื่องเต็มการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30* จัดโดย สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทรัลพลาซา กรุงเทพฯ วันที่ 10-11-12 พฤศจิกายน 2547 หน้า 207-213

1.3 กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และ สุกุม สามงามนิม "การระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลมและให้ผลลบต่อการทดสอบ catalase ซึ่งแยกได้จากการติดเชื้อเต้านมของโคนม" *ประมวลเรื่องเต็มการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30* จัดโดยสัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ณ โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทรัลพลาซา กรุงเทพฯ วันที่ 10-11-12 พฤศจิกายน 2547 หน้า 52-59

1.4 K. Ajariyakhajorn and S. Samngamnim "Antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci bacteria causing mastitis in province, Thailand" Proceedings: *The 11<sup>th</sup> International Symposium of the Word Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology*, November 9-13, 2003. P120-121.

## 2. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

### 2.1 เชิงวิชาการ

2.1.1 การพัฒนาการเรียนการสอน คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้านการตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบทางห้องปฏิบัติการ สำหรับการสอนนิสิตชั้นปีที่ 5-6

2.1.2 พัฒนาโครงงานวิจัยต่อเนื่องสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2.1 หัวข้อวิทยานิพนธ์ เรื่อง ผลกระทบของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมโคต่อคุณภาพน้ำนมดิบ

2.1.2.2 หัวข้อวิทยานิพนธ์ เรื่อง ผลของอิมมูโนโกลบูลินจีต่อการทำงานของนิวโทรฟิลในการต่อต้านเชื้อสเตรปโตคอกคัส ยูเบอริสที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบ

2.1.2.3 พัฒนาการสร้าง Collection การเก็บรักษาเชื้อ *Streptococcus uberis* ระยะยาว