ผลกระทบของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมโคต่อคุณภาพน้ำนมดิบ

นางสาว ศริญญา ฤกษ์อยู่สุข

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF *Streptococcus uberis* CAUSING INTRAMAMMARY INFECTION ON RAW MILK QUALITY

Miss Sarinya Rerk-u-suke

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 2008

Copyright of Chulalongkorn University

511485

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลกระทบของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมโคต่อคุณภาพน้ำนมดิบ
โดย	นางสาวศริญญา ฤกษ์อยู่สุข
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์ สัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.รัตนาภรณ์ พรหมาสา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.วิทยา สุริยาสถาพร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ น.สพ.ธีรพงศ์ ธีรภัทรสกุล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศริญญา ฤกษ์อยู่สุข : ผลกระทบของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมโคต่อคุณภาพน้ำนมดิบ. (EFFECTS OF *Streptococcus uberis* CAUSING INTRAMAMMARY INFECTION ON RAW MILK QUALITY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.น.สพ.ดร. กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร, 81 หน้า.

การศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมโคต่อคุณภาพน้ำนมดิบในฟาร์มโคนมรายย่อย ทั้งหมด 30 ฟาร์ม ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมในฟาร์มทุกสองเดือน จำนวน 5 ครั้งต่อฟาร์ม ช่วงเดือนเมษายน 2550 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2551 ตัวอย่างน้ำนมที่นำมาตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ 1)น้ำนมถังรวม ทำการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์ม และจำนวนเซลล์โซมาติก 2)น้ำนมรายเต้านมทุกเต้านม ในแม่โครีดน้ำนมที่ให้ผลบวกกับการทดสอบด้วยน้ำยาซี.เอ็ม.ที. เพื่อเพาะแยกเชื้อสาเหตุของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านม สำหรับเต้านมที่วินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ทำการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมที่ได้จากเต้านมดังกล่าว ทำการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์โซมาติกและองค์ประกอบของตัวอย่างน้ำนมจากเต้านมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* และจากเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อ ภายในแม่โคตัวเดียวกัน

การศึกษาพบค่าเฉลี่ยความชุกของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมระดับรายตัวโคและระดับรายเต้านม เท่ากับร้อยละ 20.56 และ 8.42 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมระดับรายตัวโคและระดับรายเต้านมเท่ากับร้อยละ 10.38 และ 4.88 ตามลำดับ ความชุกของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมทั้งระดับรายตัวโคและระดับรายเต้านมมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการศึกษา แต่อุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* มีค่าคงที่ อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติของค่าเฉลี่ยความชุกและอุบัติการณ์การติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ทั้งในระดับรายตัวโคและระดับรายเต้านมในแต่ละครั้งที่ทำการศึกษา ($p>0.05$) แม่โคที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านม มีค่าเฉลี่ยของการปลดปล่อยเชื้อออกมาในน้ำนม เท่ากับ 6,479 โคโลนีต่อมล. (พิสัย 160-56,000 โคโลนีต่อมล.) โดยสัดส่วนของจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่มาจากเต้านมแม่โคที่มีการติดเชื้อ เปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม เท่ากับร้อยละ 1.58 (พิสัยร้อยละ 0.000094-9.53) ความสัมพันธ์ของความชุกจากการเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมรายเต้านมกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ -0.3580 ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำนมที่มาจากเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อ ภายในแม่โคตัวเดียวกัน พบว่าองค์ประกอบของตัวอย่างน้ำนมที่มาจากเต้านมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่น จำนวนเซลล์โซมาติกสูงขึ้น ($p<0.0001$) ส่วนองค์ประกอบของน้ำตาลแลคโตส ($p<0.01$) ไขมัน ($p<0.01$) ของแข็งทั้งหมด ($p<0.01$) และสัดส่วนไขมันต่อโปรตีน ($p<0.01$) ลดลง การติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมก่อให้เกิดเต้านมอักเสบ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพเต้านมโคและองค์ประกอบน้ำนม แต่มีผลกระทบเพียงเล็กน้อยต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....ศริญญา ฤกษ์อยู่สุข.....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ สัตวแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร.....

ปีการศึกษา 2551

4975575931 : MAJOR VETERINARY MEDICINE

KEY WORD : *Streptococcus uberis* / INTRAMAMMARY INFECTION / PREVALENCE / INCIDENCE / MICROBIOLOGICAL QUALITY / MILK COMPOSITIONS / RAW MILK / DAIRY CATTLE

SARINYA RERK-U-SUKE : EFFECTS OF *Streptococcus uberis* CAUSING INTRAMAMMARY INFECTION ON RAW MILK QUALITY. THESIS PRINCIPAL ADVISOR : ASSOC. PROF. KITTISAK AJARIYAKHAJORN, Ph.D., 81 pp.

The study was conducted during April 2007 to February 2008 in 30 small dairy holders in order to investigate the effect of *Streptococcus uberis* causing intramammary infection on quality of raw milk. Milk samples from each farm were examined every two months. Milk samples consist of 1) bulk tank milk sample for standard plate count, coliform count and somatic cell count and 2) quarter milk sample for intramammary infection (IMI) for microbiological identification. *Streptococcus uberis* count was conducted in the quarter milk sample receiving from *Streptococcus uberis* IMI quarter. Somatic cell count and milk composition were analyzed in order to compare between IMI quarter and healthy quarter within the same cow.

The average cow and quarter prevalences of *Streptococcus uberis* IMI were 20.56 and 8.42%, respectively. The average cow and quarter incidence of *Streptococcus uberis* IMI of cow and quarter were 10.38 and 4.88%, respectively. Although prevalence of *Streptococcus uberis* IMI was declined but incidence was steady over the period of investigation. ANOVA revealed that prevalence and incidence have no statistically significant difference ($p>0.05$) in each times. The average of *Streptococcus uberis* shedding from IMI quarters was 6,479 cfu/ml (ranged 160-56,000 cfu/ml). The average of *Streptococcus uberis* shedding from IMI quarters in which contributing into farm's bulk tank milk was 1.58 % (0.000094-9.53%). However, this mastitis causing pathogen was less responsible for bacterial contamination in bulk tank milk than we have expected. The relation between prevalence of *Streptococcus uberis* IMI and total bacterial count in bulk tank milk sample was -0.3580 ($p<0.05$). This study indicated that *Streptococcus uberis* IMI had high somatic cells ($p<0.0001$). The milk composition from *Streptococcus uberis* IMIs were statistically significant difference from healthy quarters including percentages of lactose, fat, total solid and fat protein ratio ($p<0.01$). *Streptococcus uberis* causing mastitis significantly influenced on milk compositions. However, the impact on microbiological quality of bulk tank milk was low.

Department : Veterinary Medicine Student's Sarinya Rerk-u-suke

Field of Study : Veterinary Medicine Principal Advisor's Kittisak Ajariyakhajorn

Academic year ; 2008

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยมี รศ.น.สพ.ดร. กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รวมทั้ง ผศ.น.สพ. ธนศักดิ์ บุญเสริม ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์ข้อมูลได้รับความช่วยเหลือจาก ผศ. น.สพ.ดร. วิทยา สุริยาสถาพร เป็นอย่างดี การศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์การเก็บตัวอย่างน้ำนมจากฟาร์มเกษตรกรโคนมรายย่อยในเขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม สพ.ญ.อาภาภรณ์ เทพสิทธิ์ สำหรับความเอื้อเฟื้อในการช่วยเก็บตัวอย่างน้ำนมในฟาร์ม คุณสุกุมา สามงามนิ่ม สำหรับคำแนะนำในการตรวจวินิจฉัยชนิดเชื้อที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบ และ คุณไฉไล คูวัฒนานุกูล สำหรับคำแนะนำในการตรวจองค์ประกอบน้ำนม

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
ปัจจัยที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบ.....5
1.1 ปัจจัยจากเชื้อที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบ.....5
1.2 ปัจจัยจากตัวโค.....5
1.3 ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม.....6
ผลกระทบของปัญหาเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนม.....6
2.1 ผลกระทบทางเศรษฐกิจของฟาร์ม.....6
2.2 ผลกระทบต่อความปลอดภัยในอาหาร.....8
2.3 ผลกระทบต่อปัญหาสวัสดิภาพของสัตว์.....9
แหล่งที่อยู่ของเชื้อ *Streptococcus uberis*.....9
ความชุกของการเกิดเต้านมอักเสบจากเชื้อ *Streptococcus uberis*.....10
อณูระบาดวิทยาของเชื้อ *Streptococcus uberis*.....10
ผลของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมต่อคุณภาพน้ำนมดิบ.....11
องค์ประกอบของน้ำนมดิบที่ได้จากโคที่เป็นเต้านมอักเสบ.....11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3 วิธีการศึกษา....13
การคัดเลือกฟาร์ม....13
ระยะเวลาในการศึกษา....13
การเก็บตัวอย่างน้ำนมในฟาร์มโคนม....14
การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ....14
3.1 น้ำนมรายเต้านม (quarter milk sample)....14
3.2 น้ำนมถังรวม (bulk tank milk sample)....16
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ....17
4 ผลการศึกษา....18
1. ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดที่มีนัยสำคัญ เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมของฟาร์มโคนมรายย่อย....18
2. ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่มีนัยสำคัญเข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมในฟาร์มโคนมรายย่อย....21
3. ผลกระทบของจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ในตัวอย่างน้ำนม ที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม....24
4. ความสัมพันธ์ระหว่างความชุกของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ระดับรายเต้านมกับคุณภาพน้ำนมดิบถังรวมด้านจุลินทรีย์....26
5. การเปรียบเทียบองค์ประกอบน้ำนมของตัวอย่างน้ำนมที่ได้จากเต้านมที่มี การติดเชื้อ *Streptococcus uberis* กับตัวอย่างน้ำนมที่ได้จากเต้านม ที่ไม่มีการติดเชื้อในแม่โคตัวเดียวกัน....27
5 วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา....28
รายการอ้างอิง....35
ภาคผนวก....40
ภาคผนวก ก คุณภาพน้ำนมดิบ....41
ภาคผนวก ข การเก็บตัวอย่างและการตรวจตัวอย่างน้ำนมทางห้องปฏิบัติการ....42
ภาคผนวก ค ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมรายฟาร์ม....63
ภาคผนวก ง ร้อยละของเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่แพร่กระจาย สู่ถังน้ำนมรวมของฟาร์ม....76
ภาคผนวก จ ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องมาตรฐานการรับซื้อน้ำนมดิบ 10 พ.ย. พ.ศ. 2549....78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์....81

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 1 แนวทางกำหนดความมีนัยสำคัญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมของแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบ.....15
ตารางที่ 2 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของความชุกของเต้านมอักเสบจากเชื้อ *Streptococcus uberis* กับจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่นับได้ จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์ม จำนวนเซลล์โซมาติกและปริมาณน้ำนมทั้งหมดในถังน้ำนมรวม.....26
ตารางที่ 3 องค์ประกอบน้ำนมที่ได้จากเต้านมที่ติดเชื้อ *Streptococcus uberis* กับเต้านมปกติที่ไม่มีการติดเชื้อใด ๆ ภายในโคตัวเดียวกัน จำนวน 45 ตัว.....27
ตารางที่ 4 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายเต้านม จำนวน 30 ฟาร์ม.....74
ตารางที่ 5 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมระดับรายเต้านม จำนวน 30 ฟาร์ม.....75

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ **หน้า**

ภาพที่ 1 กลไกป้องกันตัวเองของโคต่อการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมทำให้เกิดเต้านมอักเสบ....6
ภาพที่ 2 ค่าเฉลี่ยของการสูญเสียทางเศรษฐกิจจากแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในระยะต้น (1-3 เดือนหลังคลอด) และระยะท้ายของระยะการให้น้ำนม (4-9 เดือนหลังคลอด)....8
ภาพที่ 3 ค่าเฉลี่ยของความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายตัวในฟาร์มโคนมรายย่อยจำนวน 30 ฟาร์ม จากการเก็บตัวอย่างจำนวน 5 ครั้ง....19
ภาพที่ 4 ค่าเฉลี่ยของความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนม ระดับรายเต้านมในฟาร์มโคนมรายย่อยจำนวน 30 ฟาร์ม จากการเก็บตัวอย่างจำนวน 5 ครั้ง....20
ภาพที่ 5 ค่าเฉลี่ยของความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนม ระดับรายตัวในฟาร์มโคนมรายย่อยจำนวน 30 ฟาร์ม จากการเก็บตัวอย่างจำนวน 5 ครั้ง....22
ภาพที่ 6 ค่าเฉลี่ยของความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนม ระดับรายเต้านมในฟาร์มโคนมรายย่อยจำนวน 30 ฟาร์ม จากการเก็บตัวอย่างจำนวน 5 ครั้ง....23
ภาพที่ 7 ร้อยละของจำนวนตัวอย่างและจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเต้าที่มีการติดเชื้อ....24
ภาพที่ 8 ร้อยละของจำนวนตัวอย่างและสัดส่วนเชื้อ *Streptococcus uberis* ต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม....25
ภาพที่ 9 การย้อมแกรมเพื่อวินิจฉัยแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบ....47

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เต้านมอักเสบในโคนมแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ 1) เต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ บริเวณเต้านมโคมีการบวม แดง ร้อน และน้ำนมที่รีดได้จะมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป เช่น สีของน้ำนมเปลี่ยนและน้ำนมเป็นตะกอน ทำให้น้ำนมที่รีดได้ไม่สามารถนำมาขายได้ และปริมาณน้ำนมที่ผลิตได้ยังลดลง ภายหลังจากหายจากภาวะดังกล่าวปริมาณน้ำนมกลับสู่ภาวะปกติช้า และอาจเป็นสาเหตุการคัดทิ้งโค และ 2) เต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการเต้านมมีลักษณะปกติ และน้ำนมที่รีดได้ไม่พบความผิดปกติจากการสังเกตด้วยตาเปล่า เมื่อนำน้ำนมมาวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการพบว่าองค์ประกอบของน้ำนมเปลี่ยนแปลง โดยองค์ประกอบน้ำนมที่ลดลง ได้แก่ แลคโตส ไขมัน ของแข็งไม่รวมมันเนย และเคซีน ส่วนองค์ประกอบในน้ำนมที่เพิ่มสูงขึ้น ได้แก่ จำนวนเซลล์โซมาติก Whey proteins คลอไรด์ โซเดียม ความเป็นกรด-ด่างของน้ำนมเปลี่ยนไป และกรดไขมันที่ทำให้น้ำนมมีกลิ่นเหม็นหืนทำให้ไม่เหมาะแก่การบริโภค ภาวะเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการทำให้น้ำนมที่แม่โคผลิตได้มีปริมาณลดลงและ องค์ประกอบภายในน้ำนมเปลี่ยนไป ส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อเรื้อรังภายในฝูง ทำให้เกิดผลกระทบระยะยาวในฟาร์ม

ที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบ แบ่งได้เป็น 2 แหล่ง คือ 1) เชื้อที่มาจากโคสู่โค (contagious mastitis pathogens) เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* และ 2) เชื้อที่มาจากสิ่งแวดล้อม (environmental mastitis pathogens) เช่น *Streptococcus uberis Corynebacterium bovis* coagulase-negative staphylococci *Escherichia coli Klebsiella spp.* ฯลฯ

ปัญหาเต้านมอักเสบในโคนม ปัจจุบันเชื้อที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่มาจากสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะเชื้อ *Streptococcus uberis* เป็นหนึ่งในห้าเชื้อแบคทีเรียหลักที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการ (James, 1999) พบได้มากถึงร้อยละ 90 ของเต้านมอักเสบที่เกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม environmental streptococci (Pankey et al.,1996; Zadok, 2002) *Streptococcus uberis* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมเรียงต่อกันเป็นสาย ให้ผลลบกับการทดสอบ catalase ให้ผลบวกกับการทดสอบ esculin ส่วน CAMP สามารถให้ผลทั้งบวกและลบ ให้ผลบวกกับการทดสอบ sodium hippurate และ inulin (NMC, 1999) ในประเทศไทยสามารถระบุชนิดเป็นเชื้อ *Streptococcus uberis* ได้ถึงร้อยละ 65 ของเต้านมอักเสบที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม และให้ผลลบกับการทดสอบ catalase (กิตติศักดิ์ และ สุกุมา, 2005)

เนื่องจากเชื้อ *Streptococcus uberis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มาจากสิ่งแวดล้อมสามารถติดต่อสู่โคได้ตลอดเวลาทั้งระยะรีดน้ำนม ระยะพักการรีดน้ำนม และระยะก่อนคลอดในโคสาว ต่างจากเชื้อที่มาจากโคสู่โคที่ติดต่อเฉพาะระยะรีดน้ำนมเท่านั้น ดังนั้นการควบคุมการติดต่อทำ

ได้ยาก อุบัติการณ์การติดเชื้อเข้าสู่เต้านมพบมากในช่วงต้นของระยะการให้น้ำนม ช่วงท้ายของระยะการรีดน้ำนม ช่วงต้นของระยะพักการรีดน้ำนม และช่วงก่อนคลอด โดยเฉพาะการติดเชื้อช่วงพักการรีดน้ำนมทำให้มีการติดเชื้อยาวนานถึงช่วงระยะการให้น้ำนม และทำให้เกิดเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการประมาณร้อยละ 65 ในช่วงต้นของระยะการรีดน้ำนม ในฟาร์มที่มีการจัดการฟาร์มที่ดี (Smith and Hogan, 1993; Hillerton and Berry, 2003; McDougall et al., 2004) ผลจากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการทำให้จำนวนเซลล์โซมาติกสูงกว่า 600,000 เซลล์ต่อมล. เป็นระยะเวลานานคล้ายกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Haas et al., 2002) และเชื้อยังสามารถแพร่กระจายออกมาทางน้ำนมสูงถึง 10^7 โคโลนีต่อมล. (James, 1999) เป็นสาเหตุทำให้จำนวนแบคทีเรียรวมในถังน้ำนมรวมสูง ส่วนเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการพบได้ร้อยละ 95 ของการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมที่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus uberis* และเป็นการติดเชื้อเรื้อรัง เนื่องจากเชื้อสามารถเกาะติดบริเวณที่มี fibronectin คือ ตำแหน่ง extra-celllular matrix และเยื่อบุผิวเต้านมได้ดี และเชื้อมีความทนต่อขบวนการกำจัดเชื้อจากเม็ดเลือดขาวและการเก็บกินของร่างกาย (Bradley, 2002) แม่โคมีระยะเวลาการติดเชื้อตั้งแต่ 20 วัน ถึง 9 เดือน ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อในฟาร์มเป็นระยะเวลานาน (McDougall et al., 2004) การรักษาเต้านมอักเสบแบบเรื้อรังด้วยยาปฏิชีวนะให้ผลตอบสนองต่อการรักษาเพียงร้อยละ 38.5 ส่วนการรักษาในช่วงพักการรีดน้ำนมสามารถลดอุบัติการณ์การติดเชื้อเข้าสู่เต้านมเฉพาะช่วงต้นของระยะพักการรีดน้ำนมเท่านั้น ไม่มีผลกับระยะก่อนคลอด (Smith and Hogan, 1993; Williamson et al., 1995)

เต้านมอักเสบจากเชื้อ *Streptococcus uberis* ในประเทศไทยยังขาดข้อมูลทางระบาดวิทยา การแพร่กระจายของเชื้อจากการติดเชื้อเข้าสู่เต้านม และผลกระทบของการติดเชื้อต่อคุณภาพน้ำนมดิบด้านจุลินทรีย์และองค์ประกอบน้ำนม จึงควรทำการศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและหาแนวทางในการแก้ไขปัญหาคุณภาพน้ำนมดิบด้านจุลินทรีย์และองค์ประกอบน้ำนม เพื่อยกระดับมาตรฐานคุณภาพน้ำนมดิบของไทย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของการเกิดเต้านมอักเสบจากเชื้อ *Streptococcus uberis* ในฟาร์มโคนมรายย่อย และศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมที่ได้จากแม่โคที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมจากเชื้อดังกล่าว ตลอดจนผลกระทบต่อคุณภาพน้ำนมดิบถังรวมด้านจุลินทรีย์ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ในถังนมรวมสูง และผลกระทบต่อองค์ประกอบของน้ำนม (ร้อยละของโปรตีน ไขมัน แลคโตส ของแข็งทั้งหมด ของแข็งไม่รวมมันเนย) และการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์โซมาติก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาความชุกของเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมในฟาร์มโคนมรายย่อย ในบริเวณพื้นที่ภาคกลาง จังหวัดนครปฐม
2. ศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมต่อคุณภาพน้ำนมดิบถังรวมด้านจุลินทรีย์ โดยการตรวจนับปริมาณเชื้อ *Streptococcus uberis* ในน้ำนมรายเต้าจากแม่โคที่ติดเชื้อ เพื่อหาสัดส่วนของเชื้อที่แพร่กระจายสู่ถังน้ำนมรวม และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความชุกของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ต่อคุณภาพน้ำนมดิบถังรวมด้านจุลินทรีย์ในระดับฟาร์ม
3. ศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ต่อคุณภาพน้ำนมดิบรายเต้าด้านองค์ประกอบน้ำนม (ร้อยละของโปรตีน ไขมัน แลคโตส ของแข็งทั้งหมด ของแข็งไม่รวมมันเนย และจำนวนเซลล์โซมาติก) ที่ได้จากเต้าที่ติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เปรียบเทียบกับเต้าไม่ติดเชื้อใด ๆ ภายในแม่โคตัวเดียวกัน

คำสำคัญ

สเตปโตคอคคัส ยูบีริส	*Streptococcus uberis*
การติดเชื้อเข้าสู่เต้านม	Intramammary infection
ความชุก	Prevalence
อุบัติการณ์	Incidence
คุณภาพด้านจุลินทรีย์	microbiological quality
องค์ประกอบน้ำนม	milk compositions
น้ำนมดิบ	raw milk
โคนม	dairy cattle

คำถามสำหรับการวิจัย

1. ปัญหาเต้านมอักเสบที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมในฟาร์มโคนมรายย่อย ของพื้นที่ภาคกลาง จังหวัดนครปฐมมีความชุกเท่าไร
2. ปริมาณเชื้อ *Streptococcus uberis* จากแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบในน้ำนมมีปริมาณเท่าไร และส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำนมดิบถังรวมด้านจุลินทรีย์หรือไม่
3. น้ำนมที่ได้จากเต้านมแม่โคที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมมีองค์ประกอบใดบ้างที่เปลี่ยนแปลง และมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลระบาดวิทยาของเต้านมอักเสบในโคนม แสดงความชุกและอุบัติการณ์ของเต้านมอักเสบที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมในฟาร์มที่มีปัญหาคุณภาพน้ำนมดิบด้านจุลินทรีย์
2. ข้อมูลผลกระทบของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบต่อคุณภาพน้ำนมดิบถังรวมด้านจุลินทรีย์ และองค์ประกอบน้ำนม (ร้อยละของโปรตีน ไขมัน แลคโตส ของแข็งทั้งหมด ของแข็งไม่รวมมันเนย และจำนวนเซลล์โซมาติก) เพื่อให้ความรู้และคำแนะนำแก่เกษตรกรถึงผลกระทบดังกล่าว
3. ข้อมูลคุณภาพน้ำนมดิบถังรวมด้านจุลินทรีย์และองค์ประกอบน้ำนมของฟาร์มโคนมรายย่อยเพื่อเป็นแนวทางกำหนดระดับมาตรฐานคุณภาพน้ำนมดิบด้านจุลินทรีย์และองค์ประกอบน้ำนมของไทย
4. แนวทางการแก้ไขปัญหาคุณภาพน้ำนมดิบถังรวมด้านจุลินทรีย์ และองค์ประกอบน้ำนมระดับฟาร์ม เพื่อยกระดับมาตรฐานคุณภาพน้ำนมดิบในไทย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เต้านมอักเสบเป็นภาวะความผิดปกติที่เกิดได้จากหลายปัจจัยร่วมกันโดยปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเต้านมอักเสบ มี 3 ปัจจัยหลัก ได้แก่

1. ปัจจัยจากเชื้อที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบ (microorganisms) เชื้อโรคที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบมีมากมายหลายชนิด เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

ที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบมี 2 ทาง คือ

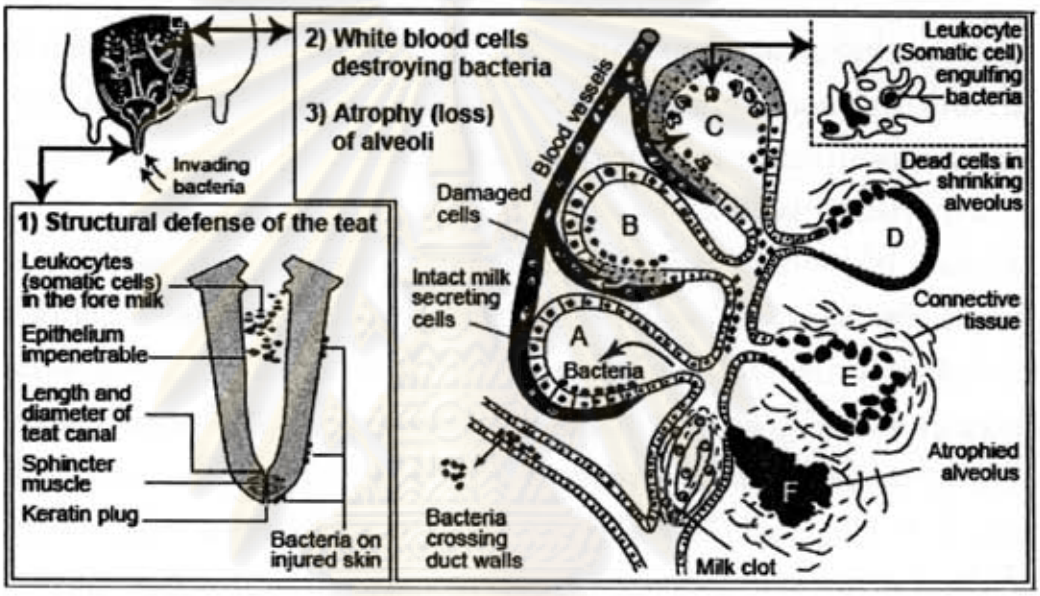
ก) เชื้อที่มาจากโคสู่โค (contagious mastitis pathogens) สามารถติดต่อในช่วงระยะรีดน้ำนมผ่านขั้นตอนการรีดน้ำนม เช่น เครื่องรีดน้ำนม มือคนรีดน้ำนม อุปกรณ์รีดน้ำนม และผ้าที่ใช้เช็ดเต้านม

ข) เชื้อที่มาจากสิ่งแวดล้อมสู่โค (environmental mastitis pathogens) เชื้อโรคมีที่มาจากสิ่งแวดล้อมที่โคอยู่ เช่น พื้นคอก วัสดุปูรอง แปลงหญ้า น้ำ และดิน สามารถติดต่อสู่โคได้ตลอดเวลา และทุกระยะ เช่น ระยะรีดน้ำนม ระยะพักการรีดน้ำนม และระยะก่อนคลอดในโคสาว

2. ปัจจัยจากตัวโค (host) การติดเชื้อเข้าสู่เต้านมจะเริ่มจากที่เชื้อโรคแพร่เข้าสู่ร่างกายโคผ่านทางรูเปิดหัวนม (teat orifice) และเพิ่มจำนวนที่ต่อมน้ำนม (mammary gland) ร่างกายจะมีกลไกในการต่อต้านเชื้อด่านแรก คือ กล้ามเนื้อเปิดปิดที่หัวนม (sphincter muscle) เป็นกลไกป้องกันเชื้อเข้าสู่ร่างกายในช่วงที่ไม่ได้ทำการรีดน้ำนม แต่ช่วงที่ทำการรีดน้ำนมรูหัวนมจะเปิดออกทำให้เชื้อโรคต่าง ๆ สามารถแพร่เข้าสู่เต้านมโคได้ เชื้อโรคเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะเกาะติดกับเนื้อเยื่อและทำการเพิ่มจำนวน ด่านที่สอง คือ เม็ดเลือดขาวทำหน้าที่เก็บกินและทำลายแบคทีเรีย ภายหลังจากแบคทีเรียทำลายเนื้อเยื่อภายในเต้านม แบคทีเรียจะกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อยในน้ำนม ถ้ากลไกดังกล่าวไม่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ ตัวเม็ดเลือดขาวจะเพิ่มจำนวนและเข้าสู่ท่อนมและถุงสร้างน้ำนม ทำให้เซลล์ในน้ำนมถูกทำลายจากสารพิษและสารก่อความระคายเคืองที่มาจากเม็ดเลือดขาว ซึ่งจะทำให้ร่างกายยิ่งเพิ่มจำนวนการซึมผ่านของเซลล์เม็ดเลือด กลไกดังกล่าวยิ่งทำให้มีเม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนสูงขึ้นในบริเวณที่ติดเชื้อ และเม็ดเลือดขาวยังสามารถเข้าไปบริเวณถุงสร้างน้ำนมเพื่อจับเชื้อโรค เม็ดเลือดขาวและเซลล์ในน้ำนมจะปิดล้อมและจับกัน กลไกดังกล่าวจะทำให้ของเหลว แร่ธาตุ และสารที่ทำให้เกิดการแข็งตัวรั่วออกมาบริเวณนี้ ทำให้เกิดการแข็งตัวของน้ำนมอุดตันบริเวณท่อนม และมีผลทำให้เกิดการแยกส่วนบริเวณที่ติดเชื้อออกจากบริเวณอื่น ๆ ถ้าร่างกายสามารถกำจัดเชื้อโรคได้หมดจะทำให้ไม่มีการติดเชื้อ บริเวณที่อุดตันนั้นจะถูกเปิดออกและสามารถผลิตน้ำนมได้ปกติ และองค์ประกอบของน้ำนมสามารถกลับสู่ปกติภายในระยะเวลาไม่กี่วัน ด่านที่สาม หากการติดเชื้อยังคงดำเนินอยู่เป็นระยะเวลานาน ๆ บริเวณดังกล่าวจะถูกปิด

ทำให้ไม่สามารถผลิตน้ำนมได้และถุงสร้างน้ำนมจะเริ่มหดตัว และสารจากเม็ดเลือดขาวจะทำให้บริเวณถุงสร้างน้ำนม บริเวณนั้นถูกทำลายอย่างสมบูรณ์และร่างกายจะสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันขึ้นมาทดแทน เกิดการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณที่ติดเชื้อ เพื่อควบคุมการติดเชื้อภายในเต้านม ถ้าการติดเชื้อยังคงดำเนินต่อไปจะทำให้จำนวนเซลล์โซมาติกเพิ่มจำนวนขึ้น และสัมพันธ์กับการผลิตน้ำนมที่ลดลงทำให้ได้ผลผลิตที่ลดลง (ภาพที่ 1) (Michel, 1996)

ภาพที่ 1 กลไกป้องกันตัวเองของโคต่อการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมทำให้เกิดเต้านมอักเสบ (Michel, 1996)



3. ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม และการจัดการที่โคอาศัยอยู่ (environment) สิ่งแวดล้อมที่โคอาศัยอยู่ โดยเฉพาะบริเวณที่โคล้มตัวลงนอน หรือบริเวณรีดน้ำนมมีการปนเปื้อนของเชื้อโรค หากเชื้อโรคสามารถเข้าสู่เต้านมจะทำให้เกิดปัญหาเต้านมอักเสบตามมาได้

ผลกระทบของปัญหาเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนม

<u>ผลกระทบทางเศรษฐกิจของฟาร์ม 4 ด้าน</u> ได้แก่

1. ราคาน้ำนม และคุณภาพน้ำนม น้ำนมเป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าของมนุษย์ การแปรรูปน้ำนมเพื่อนำมาบริโภคมีหลายรูปแบบ เช่น นมสดพาสเจอร์ไรซ์ นมยูเอชที และนมสดสเตอร์รีไรซ์ นอกจากนี้น้ำนมยังสามารถผ่านกระบวนการผลิตและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ชีส เนยสด ไอศกรีม โยเกิร์ต และวิปครีม จึงทำให้มีความต้องการปริมาณน้ำนมดิบเพิ่มสูงขึ้น เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตดังกล่าว เกิดการส่งเสริมการเลี้ยงโคนมมากขึ้น ทำให้ปริมาณน้ำนมดิบเข้าสู่กระบวนการผลิตมากเกินความต้องการ ราคาน้ำนมดิบเริ่มต่ำลง โรงงานรับซื้อสามารถซื้อน้ำนมได้ในราคาต่ำ เกิดการแข่งขันทางด้านคุณภาพสินค้า น้ำนมที่มีคุณภาพดีจะ

ถูกรับซื้อในราคาที่สูง ส่วนน้ำนมที่มีคุณภาพรองลงมาจะถูกรับซื้อในราคาต่ำลง โดยหลักเกณฑ์มาตรฐานทางด้านคุณภาพน้ำนมที่โรงงานรับซื้อ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์รวมในน้ำนม จำนวนเซลล์โซมาติก และค่าองค์ประกอบในน้ำนม

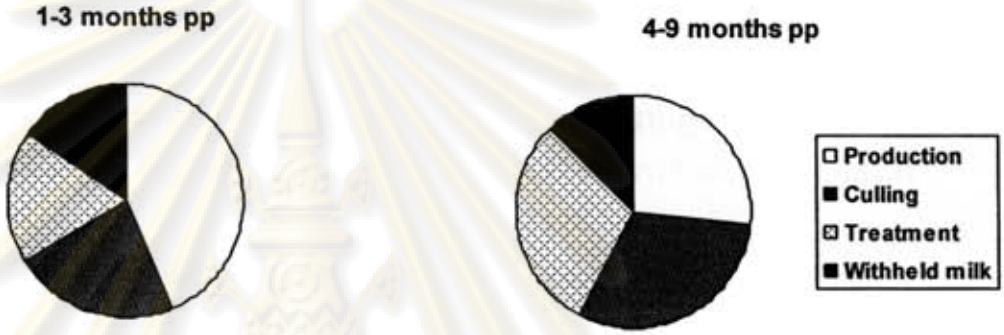
เต้านมอักเสบในโคนม คือ สภาวะที่มีขบวนการอักเสบภายในเต้านมโค ทำให้ระบบไหลเวียนโลหิตภายในเต้านมเสียไป ส่งผลเสียต่อองค์ประกอบน้ำนมที่ได้จากเต้าที่มีการอักเสบ โดยทำให้มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนในกระแสเลือด เซลล์เม็ดเลือด ปริมาณเกลือ อิมมูโนโกลบูลิน เอนไซม์ต่าง ๆ เช่น proteolytic และทำให้ปริมาณแลคโตส และเคซีนลดลง คุณภาพของไขมันเปลี่ยนไป ซึ่งองค์ประกอบของน้ำนมที่เปลี่ยนไป ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากนม ในระดับฟาร์มน้ำนมดิบที่มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนเซลล์โซมาติกในถังน้ำนมรวมสูง เมื่อตรวจสอบคุณภาพหน้าศูนย์รับน้ำนมเกษตรกรจะถูกตัดราคารับซื้อน้ำนม ส่งผลเสียต่อเศรษฐกิจของฟาร์ม ในระดับโรงงานน้ำนมแปรรูปที่ได้จากแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบจะไม่คงตัว มีกลิ่นหืน ความน่ากินลดลง ทำให้ความนิยมในการบริโภคน้ำนมแปรรูปลดลง นอกจากนี้องค์ประกอบภายในน้ำนมที่ลดลง เช่น เคซีน เมื่อนำน้ำนมดังกล่าวไปผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นชีส จะทำให้ได้ปริมาณชีสลดลง รสชาติและความคงตัวของชีสเปลี่ยนไป และต้องใช้ระยะเวลาในการผลิตที่นานขึ้น ส่วนไขมันที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อนำไปผลิตเป็นวิปครีม พบว่าต้องใช้ระยะเวลาในการตีเป็นวิปครีมนานกว่าปกติ ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขบวนการผลิตดังกล่าวหากมีกลิ่นและรสชาติที่เปลี่ยนไป ส่งผลกระทบต่ออายุการเก็บรักษาที่สั้นลงและความนิยมในการบริโภคลดลง ผู้บริโภคเป็นปัจจัยหลักทำให้อุตสาหกรรมการผลิตน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากน้ำนมพยายามผลิตสินค้าระดับคุณภาพดีเยี่ยม ที่มาของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต คือน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มเกษตรกร น้ำนมที่มีคุณภาพต่ำจากฟาร์มเป็นจุดเริ่มต้นของความสูญเสียตั้งแต่ระดับฟาร์มถึงผู้บริโภค (Ma et al., 2000; Santos et al., 2003) โรงงานผลิตจึงมีการตั้งเกณฑ์มาตรฐานในการรับซื้อน้ำนมดิบตามคุณภาพ โดยหลักเกณฑ์ที่ใช้ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์รวมในน้ำนม จำนวนเซลล์โซมาติก และค่าองค์ประกอบในน้ำนม ในประเทศไทยมาตรฐานดังกล่าวถูกระบุไว้ใน กรมปศุสัตว์ (P-DA-FARM-001; 2542) และสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช. 6003-2548) (ภาคผนวก ก)

2. ความสูญเสียที่เกี่ยวข้องกับการผลิต ภาวะเต้านมอักเสบมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำนมที่ผลิตได้ลดลง ความสูญเสียด้านนี้อาจไม่ได้รับความสนใจจากเกษตรกร เนื่องจากไม่รู้ปริมาณน้ำนมที่เสียไป แต่สามารถสังเกตได้จากต้นทุนค่าอาหารที่ใช้ในโคที่ให้ผลผลิตเท่าเดิม แต่ปริมาณน้ำนมที่ผลิตได้ลดลง เกิดช่องว่างหรือส่วนต่างของราคาอาหาร (รายจ่าย) กับปริมาณน้ำนมที่ขายได้ (รายรับ) จึงเป็นการสูญเสียรายได้ และโอกาสในการขายน้ำนมดิบแบบแฝง

3. ความสูญเสียเนื่องจากการรักษาโคที่เป็นเต้านมอักเสบ โดยเฉพาะเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการเป็นความสูญเสียที่เกษตรกรสามารถสังเกตได้ เช่น ค่าใช้จ่ายในการรักษา (ค่ายาปฏิชีวนะ ค่ารักษา) ค่าแรงงาน ความสูญเสียอันเนื่องมาจากการงดส่งน้ำนมเมื่อทำการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ และปริมาณน้ำนมที่ผลิตได้ลดลง หากมีความรุนแรงอาจทำให้แม่โคเสียชีวิต

หรือมีการคัดทิ้งแม่โค ถือเป็นความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรง จากกรณีศึกษาพบว่าแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในช่วงต้น และท้ายของระยะให้น้ำนมจะมีระดับของการสูญเสียทางเศรษฐกิจในด้านปริมาณน้ำนม (production) การคัดทิ้งแม่โค (culling) การรักษา (treatment) และการปฏิเสธการรับซื้อน้ำนม (withheld milk) (Henk, 2005) แสดงในภาพที่ 2

ภาพที่ 2 ค่าเฉลี่ยของการสูญเสียทางเศรษฐกิจจากแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในระยะต้น (1-3 เดือนหลังคลอด) และระยะท้ายของระยะการให้น้ำนม (4-9 เดือนหลังคลอด) (Henk, 2005)



4. ค่าใช้จ่ายในการซื้อโคทดแทนในฟาร์ม แม่โคที่มีปัญหาเต้านมอักเสบแบบเรื้อรังหรือแสดงอาการอย่างรุนแรงและเสียชีวิต ทำให้ต้องคัดทิ้งแม่โคและต้องซื้อโคสาวทดแทนเข้าฝูง ซึ่งส่วนต่างของราคาซื้อโคสาวท้องกับราคาขายแม่โคคัดทิ้ง ทำให้เกิดค่าใช้จ่ายในการซื้อโคสาวทดแทน และเกิดความสูญเสียด้านปริมาณน้ำนมที่เกิดจากการคัดทิ้งแม่โค 1 ตัวกับโคสาวทดแทน 1 ตัว ในระยะเวลา 5 ปี พบว่าปริมาณน้ำนมที่ควรจะได้หากแม่โคตัวนั้นยังอยู่จะสูงกว่าการคัดทิ้งแม่โคแล้วเลี้ยงโคสาวทดแทนเพิ่ม 1 ตัว

ความสูญเสียอันเนื่องมาจากภาวะเต้านมอักเสบในด้านต่าง ๆ ในประเทศนอร์เวย์ในช่วงปี ค.ศ. 1989-1999 พบว่าส่วนใหญ่เกิดจากภาวะเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ รองลงมาคือ การซื้อโคสาวทดแทน ความสูญเสียปริมาณผลผลิต และคุณภาพของน้ำนมดิบตามลำดับ แนวโน้มการสูญเสียสามารถลดลงได้ เพราะเกษตรกรให้ความสำคัญกับคุณภาพน้ำนมดิบในระดับดีเยี่ยมที่สามารถขายได้ในราคาสูง (Olav, 2000)

<u>ผลกระทบต่อความปลอดภัยในอาหาร (food safety)</u> การบริโภคน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากนมที่มีจำนวนเซลล์โซมาติกสูงมีความเสี่ยงต่อสุขภาพมนุษย์ เช่น

1. ความเสี่ยงในการได้รับเชื้อที่ก่อโรค จากภาวะเต้านมอักเสบที่เกิดจากเชื้อโรคทำให้จำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมเพิ่มสูงขึ้น เชื้อโรคที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบและสามารถก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Escherichia coli Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* สามารถติดต่อมาสู่มนุษย์ได้หากมีการบริโภคน้ำนมดิบที่ไม่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์

นอกจากนี้เชื้อ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ที่ก่อโรค Johne's disease ในโค และ โรค Crohn's disease ในมนุษย์ จากการศึกษาพบว่าเชื้อโรคดังกล่าวสามารถมีชีวิตรอดภายหลังจากผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ทำให้มนุษย์มีความเสี่ยงในการติดโรค Crohn's disease ได้

2. ความเสี่ยงในการได้รับสารพิษจากแบคทีเรีย กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ไม่สามารถทำลายสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมาได้ โดยเฉพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่สร้างสารพิษ enterotoxin ทำให้เกิดปัญหาสารพิษในอาหาร

3. ความเสี่ยงในการได้รับยาปฏิชีวนะที่ปนเปื้อนในน้ำนม จากการศึกษาพบความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์โซมาติกสูงกับยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม เนื่องจากโคที่เป็นเต้านมอักเสบโดยเฉพาะเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการที่ทำการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะชนิดสอดเข้าเต้านม หากเกษตรกรไม่งดส่งน้ำนมแม่โคตัวที่สอดยา (มีการส่งน้ำนมในเต้าที่ไม่ได้ทำการสอดยา) หรือมีระยะงดส่งนมไม่เหมาะสมกับยาปฏิชีวนะที่ใช้จะทำให้เกิดปัญหายาปฏิชีวนะตกค้างลงในน้ำนมได้ ผลเสียอย่างร้ายแรงที่ตามมาคือมนุษย์จะมีความเสี่ยงความไวต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้น (Joe, 2005)

<u>ผลกระทบต่อปัญหาสวัสดิภาพของสัตว์ (animal welfare)</u> ภาวะเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการทำให้แม่โคมีอาการปวด บวม ร้อน แดงบริเวณเต้านม และหากติดเชื้อเข้ากระแสเลือดอาจทำให้มีอาการไข้ และถ้ามีการอักเสบแบบรุนแรงอาจทำให้แม่โคเสียชีวิตได้ นอกจากนั้นการอักเสบแบบเรื้อรังภายในฟาร์มอาจทำให้เกษตรกรพิจารณาคัดทิ้งแม่โค ในประเทศอังกฤษได้มีการจัดตั้งองค์กร The Farm Animal Welfare Council's (FAWC) ขึ้นเพื่อดูแลสวัสดิภาพสัตว์ องค์กรได้ตั้งมาตรการ Animal Health and Welfare Strategy เพื่อจัดการผลกระทบของโรคในสัตว์ และตรวจสอบสวัสดิภาพของสัตว์ สาระสำคัญของปัญหาสวัสดิภาพสัตว์ที่เกี่ยวข้องกับโคนม คือ ภาวะเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ เนื่องจากพบอุบัติการณ์ของการเกิดเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการประมาณ 40 รายต่อ 100 ราย ได้มีแนวคิดในการรณรงค์ในเกษตรกรใช้ยาบรรเทาอาการไข้และลดการอักเสบโดยใช้ยาระงับปวด และยาปฏิชีวนะเพื่อให้สัตว์มีอาการเจ็บปวดน้อยที่สุดและสามารถหายจากภาวะเต้านมอักเสบได้อย่างรวดเร็ว (Maureen, 2005)

แหล่งที่อยู่ของเชื้อ *Streptococcus uberis*

งานวิจัยได้ศึกษาพบว่าสามารถแยกเชื้อ *Steptococcus uberis* ได้จากน้ำนมโคที่ติดเชื้อ สามารถพบเชื้อในสิ่งแวดล้อมที่โคอาศัยอยู่ เช่น น้ำ ดิน พื้นคอก วัสดุปูรอง (ฟาง ขี้เลื่อย และแกลบ) หญ้า มูลสัตว์ และแมลงวัน เชื้อสามารถอยู่บริเวณเต้านม ผิวหนัง ริมฝีปาก บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ของโค และหัวนม ซึ่งอาจเป็นปัจจัยโน้มนำที่ทำให้โคมีการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมได้ (NMC, 1999; Zadok et al., 2005)

ความชุกของการเกิดเต้านมอักเสบจากเชื้อ *Streptococcus uberis*

จากการศึกษาพบเชื้อ *Streptococcus uberis* ก่อให้เกิดภาวะเต้านมอักเสบได้ทั่วโลก เช่น สหรัฐอเมริกา ฟินแลนด์ สาธารณรัฐไอร์แลนด์ โปแลนด์ เยอรมนี นิวซีแลนด์ และอุรุกวัย ความชุกของภาวะเต้านมอักเสบประมาณร้อยละ 2.2 ในโคสาวท้องแรก และประมาณร้อยละ 12-19 ในแม่โค โดยความชุกเพิ่มสูงขึ้นในลำดับท้องที่เพิ่มขึ้น ระยะที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมสูง คือ ช่วงก่อนคลอด ช่วงต้นของระยะให้น้ำนม (ร้อยละ 49.5) และช่วงพักการให้นม (ร้อยละ 50.5) โดยร้อยละ 95 ของการติดเชื้อเป็นแบบไม่แสดงอาการ (Todhunter et al., 1995; Pankey et al., 1996; Jayarao et al., 1999; Gianneechini et al., 2002; Edward et al., 2003; Khan et al., 2003; Pitkälä et al., 2004; Damien et al., 2005; Tenhagen et al., 2006) สามารถพบการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมภายหลังคลอด 12.3 วัน และระยะเวลาการติดเชื้อมีระยะสั้นประมาณ 20 วัน ถึงระยะยาวประมาณ 9 เดือน ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อในฟาร์มเป็นระยะเวลานาน และเป็นการติดเชื้อเรื้อรัง (McDougall et al., 2004)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาเต้านมอักเสบในโคนมที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมและให้ผลลบกับการทดสอบ catalase สามารถระบุชนิดเชื้อเป็น *Streptococcus uberis* ได้มากถึง ร้อยละ65 (กิตติศักดิ์ และ สุกุมา, 2005)

อณูระบาดวิทยาของเชื้อ *Streptococcus uberis*

การศึกษาทางอณูระบาดวิทยา (Molecular Epidemiology) ของเต้านมอักเสบจากเชื้อ *Streptococcus uberis* โดยการสร้างลายพิมพ์สารพันธุกรรม (fingerprinting) ด้วยวิธี repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) ใช้ ERIC1R และ ERIC2 primer จาก 48 สายพันธุ์ จำนวนแถบประมาณ 3-11 ตำแหน่ง ขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 100 – 1,400 เบสแพร์ โดยรูปแบบลายพิมพ์สารพันธุกรรมส่วนใหญ่มีขนาด 200 และ 1,300 เบสแพร์ ความคล้ายกันของรูปแบบลายพิมพ์สารพันธุกรรมที่ระดับร้อยละ 90 สามารถสร้างลายพิมพ์สารพันธุกรรมได้ 28 รูปแบบ และจำแนกได้ 13 จำพวก (กิตติศักดิ์ และ อลงกร, 2005) ซึ่งพบว่ารูปแบบการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมมีความหลากหลายของสายพันธุ์

การศึกษาอณูระบาดวิทยาด้วยวิธี RAPD-fingerprint (random amplified polymorphic DNA) และวิธี PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) พบเต้าที่ติดเชื้อเรื้อรังเกิดจากเชื้อสายพันธุ์เดิม และการติดเชื้อซ้ำ สามารถเกิดได้ทั้งจากสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ใหม่ และการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมเต้าอื่นภายในโคตัวเดียวกัน ส่วนใหญ่มีลักษณะสายพันธุ์ที่เหมือนกัน บ่งชี้ว่าการติดต่อเชื้อเกิดจากสิ่งแวดล้อมสู่โค และการติดต่อจากโคสู่โคผ่านทางเครื่องรีดนม (Phuektes et al., 2001; Zadoks, 2002)

ผลของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมต่อคุณภาพน้ำนมดิบ

คุณภาพน้ำนมดิบด้านจุลินทรีย์ เต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ จากการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมสามารถแพร่เชื้อออกมาทางน้ำนมได้สูงถึง 10^7 โคโลนีต่อมล. (James, 1999) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมสูงกว่ามาตรฐาน (Hayes et al., 2001) และทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อภายในฝูงได้ นอกจากนั้นอุณหภูมิ และช่วงเวลาในการเก็บรักษาน้ำนมมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าภายใต้อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เชื้อ *Streptococcus uberis* สามารถเพิ่มจำนวนได้ตั้งแต่ 1.5 ถึง 3.5 log 10 โคโลนีต่อมล. ภายในช่วงเวลา 5 วัน และ ภายใต้อุณหภูมิที่มากกว่า 21 องศาเซลเซียส เชื้อ *Streptococcus uberis* สามารถเพิ่มจำนวนได้ภายในช่วงเวลา 3 ชั่วโมง (Dogan and Boor, 2004) ดังนั้นจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่ออกมาในน้ำนม ถึงแม้จะมีจำนวนน้อยแต่เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วอาจมีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำนมถังรวมของฟาร์ม และเพิ่มโอกาสในการแพร่กระจายของเชื้อได้

คุณภาพน้ำนมดิบด้านองค์ประกอบน้ำนมเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการจากเชื้อ *Streptococcus uberis* ทำให้มีจำนวนเซลล์โซมาติกสูงกว่า 600,000 เซลล์ต่อมล. และภายหลังจากการเกิดเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการยังสามารถให้จำนวนเซลล์โซมาติกสูงเป็นระยะเวลานานคล้ายกับเต้านมอักเสบจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Haas et al., 2002)

องค์ประกอบของน้ำนมดิบที่ได้จากโคที่เป็นเต้านมอักเสบ

น้ำนมโคที่ได้จากแม่โคที่มีภาวะเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ จะมีองค์ประกอบของน้ำนมเปลี่ยนแปลงไป โดยการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบน้ำนม ขึ้นอยู่กับการตอบสนองของขบวนการอักเสบ ส่วนระดับการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบน้ำนมขึ้นกับขบวนการพยาธิกำเนิดของเชื้อที่ก่อให้เกิดภาวะเต้านมอักเสบ และการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผิวเนื่องจากการติดเชื้อ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ได้แก่

1. การมีไอออน โปรตีน และเอนไซม์จากกระแสเลือดเข้าสู่น้ำนมเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเซลล์โซมาติก whey proteins ซีรัมอัลบูมิน อิมมูโนโกลบูลิน พลาสมิโนเจน γ-casein K-casein กรดไขมัน โซเดียม คลอไรด์ เอนไซม์ lipase lysozyme NAGase และพลาสมิน
2. การสร้างน้ำนมภายในเต้านมลดลง ทำให้เกิดการลดลงของแลคโตส ปริมาณน้ำนม ไขมัน α_{s1}casein β-casein แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส สังกะสี และโพแทสเซียม (Urech et al., 1999; Pyörälä, 2003)

การติดเชื้อเข้าสู่เต้านมโคเนื่องจากเชื้อ *Streptococcus uberis* ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบทั้งแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการ อาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำนมดิบด้านจุลินทรีย์และองค์ประกอบน้ำนม เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจของฟาร์ม เนื่องจากน้ำนมดิบมีปัญหาคุณภาพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ด้านจุลินทรีย์และองค์ประกอบน้ำนมต่ำ และปริมาณน้ำนมดิบลดลง ภาคอุตสาหกรรมการผลิตน้ำนมและการแปรรูปผลิตภัณฑ์ เมื่อนำน้ำนมดิบไปแปรรูปจะได้สินค้าที่คุณภาพต่ำ ปริมาณน้อย อายุการเก็บรักษาสั้น และ มีกลิ่นและรสชาติไม่น่าบริโภค ทำให้ไม่เป็นที่นิยมของผู้บริโภค

การศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมโคต่อคุณภาพน้ำนมดิบ อาจบ่งบอกว่าการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมจากเชื้อดังกล่าวนั้นมีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำนมด้านใดบ้าง และเกิดผลกระทบอย่างไร เพื่อเกิดแนวทางในการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อเข้าสู่เต้านม เนื่องจากเชื้อดังกล่าว และเพื่อยกระดับมาตรฐานคุณภาพน้ำนมดิบของไทย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีการศึกษา

การศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อ Streptococcus uberis เข้าเต้านมโคต่อคุณภาพน้ำนมดิบมีวิธีการศึกษา ดังนี้

การคัดเลือกฟาร์มโคนม

ทำการศึกษาในกลุ่มสมาชิกสหกรณ์กำแพงแสน ซึ่งมีสมาชิกสหกรณ์ผู้เลี้ยงโคนมทั้งหมด 314 ราย โดยเริ่มคัดเลือกฟาร์มที่เข้าศึกษาบนสมมุติฐานประมาณการณ์ความชุกของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ประมาณร้อยละ 20 โดยมีความผิดพลาดที่ยอมรับได้ร้อยละ 5 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จะได้จำนวนฟาร์มที่ต้องนำมาศึกษาอย่างน้อยเท่ากับ 25 ฟาร์ม ทำการคัดเลือกฟาร์มเพื่อเข้าทำการศึกษา โดยการตรวจกรองตัวอย่างน้ำนมถังรวม ณ ศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบสหกรณ์กำแพงแสน ตัวอย่างละ 30 มิลลิลิตร เพื่อนำไปตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยปฏิบัติตามวิธีการที่กำหนดไว้ใน Standard Methods for the Examination of Dairy Products เพื่อทำการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธี Standard plate count (SPC) (Houghtby et al., 1992) จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มโคไลฟอร์ม โดยวิธี Coliform count (CC) (Christen et al., 1992) และจำนวนเซลล์โซมาติก (Somatic cell count; SCC) โดยใช้เครื่องนับอนุภาค Coulter Counter ZM® (Hinz et al., 1992) เพื่อให้ได้ฟาร์มโคนมที่มีความน่าจะเป็นว่ามีปัญหาเต้านมอักเสบที่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus uberis* โดยมีเงื่อนไขในการคัดเลือกฟาร์มที่มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมมากกว่า 400,000 โคโลนีต่อมล. และหรือจำนวนเซลล์โซมาติกในถังน้ำนมรวมมากกว่า 500,000 เซลล์ต่อมล. จากเงื่อนไขดังกล่าวได้จำนวนฟาร์มที่เข้าศึกษาทั้งหมด 30 ฟาร์ม

ระยะเวลาในการศึกษา

ทำการศึกษาแบบ observational study โดยเข้าไปเก็บตัวอย่างน้ำนมในฟาร์มทุกสองเดือน จำนวน 5 ครั้งต่อฟาร์ม ระยะเวลาที่เข้าไปศึกษา ระหว่างเดือนเมษายน 2550 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2551 แบ่งเป็นช่วงระยะเวลาการเก็บตัวอย่างดังนี้

การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 เดือนเมษายนถึงกรกฎาคม 2550
การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 เดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม 2550
การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 เดือนสิงหาคมถึงตุลาคม 2550
การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 4 เดือนตุลาคมถึงธันวาคม 2550
การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 5 เดือนพฤศจิกายน 2550 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2551

การเก็บตัวอย่างน้ำนมในฟาร์มโคนม

ขั้นตอนการรีดน้ำนมและเก็บตัวอย่างน้ำนมในฟาร์ม

1. แม่โครีดน้ำนมทุกตัวในฟาร์มทำการเตรียมเต้านมก่อนทำการรีดน้ำนม โดยการล้างทำความสะอาดบริเวณเต้านมให้สะอาดด้วยน้ำเปล่า และเช็ดเต้านมให้แห้ง
2. รีดน้ำนมใส่ถาดตรวจ ซี.เอ็ม.ที. เพื่อหาภาวะเต้านมอักเสบในฟาร์ม แม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการจะสังเกตพบลักษณะเต้านมมีลักษณะบวม แดง ร้อน และน้ำนมที่รีดออกมาได้มีลักษณะที่ผิดปกติ เช่น เป็นก้อนหนอง มีเลือดปน ส่วนแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ ตรวจไม่พบความผิดปกติใด ๆ บริเวณเต้านมและน้ำนมที่รีดออกมาได้ แต่เมื่อทำการตรวจตัวอย่างน้ำนมด้วยน้ำยา ซี.เอ็ม.ที. จะให้ผลบวก ภายหลังจากการตรวจทำการจดบันทึกผลการตรวจทุกเต้าในแม่โครีดน้ำนมทุกตัว
3. ทำการรีดน้ำนมแม่โคตามปกติ และชั่งน้ำหนักน้ำนมรายตัวภายหลังจากการรีดน้ำนมและจดบันทึกปริมาณน้ำนมที่รีดได้รายตัว
4. น้ำนมที่รีดได้จากแม่โคแต่ละตัวจะเทใส่ในถังน้ำนมรวมของฟาร์ม
5. ภายหลังจากการรีดน้ำนมแม่โค ในกรณีที่พบว่าเป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการหรือ แม่โคที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ ซี.เอ็ม.ที.จะทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมรายเต้านมทั้ง 4 เต้านมทันที ภายหลังจากการรีดน้ำนมเสร็จ โดยเก็บตัวอย่างเต้าละ 15 มล. ด้วยวิธีปลอดเชื้อ เพื่อนำตัวอย่างน้ำนมไปตรวจวินิจฉัยเพาะแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบ (รายละเอียดการเก็บตัวอย่างน้ำนมแสดงในภาคผนวก ข)
6. ภายหลังจากการรีดน้ำนมเสร็จทุกตัว ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมถังรวม รายฟาร์ม ถังละ 30 มล. เพื่อใช้สำหรับการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์ม และจำนวนเซลล์โซมาติก (รายละเอียดการเก็บตัวอย่างน้ำนมแสดงในภาคผนวก ข)
7. ตัวอย่างน้ำนมทั้งรายเต้านมและถังรวมเก็บใส่ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง และส่งเข้าห้องปฏิบัติการทันที เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างน้ำนมที่ได้จากฟาร์มทั้งหมดนำมาตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ดังนี้

1. น้ำนมรายเต้านม (quarter milk sample)

1.1 การเพาะแยก และตรวจระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบตามการแนะนำของ National Mastitis council รายงานผลเป็นชนิดเชื้อจุลินทรีย์ และระดับความมีนัยสำคัญของการเป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบ (NMC, 1999) (รายละเอียดการเพาะเชื้อ

หาสาเหตุของเต้านมอักเสบ แสดงในภาคผนวก ข) โดยแนวทางกำหนดความมีนัยสำคัญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมของแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบ แสดงในตารางที่1 การศึกษาครั้งนี้พิจารณาเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการเพาะแยกและตรวจระบุวินิจฉัยว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมที่มีนัยสำคัญระดับ 3 และ 4 เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าความชุกและอุบัติการณ์ของการเกิดเต้านมอักเสบในฟาร์ม

ตารางที่ 1 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 เชื้อแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก จากการทดสอบทางชีวเคมี ให้ผลลบกับการทดสอบ catalase ให้ผลบวกหรือลบกับการทดสอบ CAMP และให้ผลบวกกับการทดสอบ esculin hydrolysis ที่มีนัยสำคัญระดับ 3 และ 4 จะทำการยืนยันผลการวินิจฉัยด้วยชุดตรวจชีวเคมีจำแนกชนิดเชื้อ API 20 STREP® (bioMérieux, France) รายงานผลเป็นชนิดเชื้อแบคทีเรีย เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าความชุกและอุบัติการณ์ของการเกิดเต้านมอักเสบในฟาร์ม

1.3 การตรวจนับจำนวนเซลล์โซมาติกจากเต้านมที่ติดเชื้อ *Streptococcus uberis* และเต้านมที่ไม่ติดเชื้อใด ๆ ในแม่โคตัวเดียวกัน โดยใช้เครื่องนับอนุภาค Coulter Counter ZM® (Hinz et al., 1992) รายงานผลเป็นเซลล์ต่อมล. (รายละเอียดการตรวจนับจำนวนเซลล์โซมาติกแสดงในภาคผนวก ข)

1.4 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย Environmental streptococci เฉพาะเต้านมที่ติดเชื้อ *Streptococcus uberis* (NMC, 1999) รายงานผลเป็น โคโลนีต่อมล. (รายละเอียดการตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย Environmental streptococci แสดงในภาคผนวก ข)

1.5 การตรวจหาองค์ประกอบในน้ำนมจากเต้านมที่ติดเชื้อ *Streptococcus uberis* และเต้านมที่ไม่ติดเชื้อใด ๆ ในแม่โคตัวเดียวกัน โดยใช้เครื่อง Milkoscan® 133B องค์ประกอบภายในน้ำนมที่ทำการตรวจ ได้แก่ ร้อยละของโปรตีน ไขมัน แลคโตส ของแข็งทั้งหมด ของแข็งไม่รวมมันเนย (รายละเอียดการตรวจหาองค์ประกอบในน้ำนมแสดงในภาคผนวก ข)

2. น้ำนมถังรวม (bulk tank milk sample)

2.1 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมถังรวม โดยวิธี Standard Plate Count (SPC) (Houghtby et al., 1992) รายงานผลเป็นโคโลนีต่อมล. (รายละเอียดการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมถังรวมอยู่ในภาคผนวก ข)

2.2 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มในน้ำนมถังรวม โดยวิธี Coliform count (CC) ด้วย violet red bile agar (VRBA) (Christen et al., 1992) รายงานผลเป็นโคโลนีต่อมล. (รายละเอียดการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มในน้ำนมถังรวมอยู่ในภาคผนวก ข)

2.3 การตรวจนับจำนวนเซลล์โซมาติก โดยใช้เครื่องนับอนุภาค Coulter Counter ZM® (Hinz et at., 1992) รายงานผลเป็นจำนวนเซลล์ต่อมล. (รายละเอียดการตรวจนับจำนวนเซลล์โซมาติกอยู่ในภาคผนวก ข)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ ดังนี้

1. น้ำนมรายเต้านมที่นำมาเพาะเชื้อตรวจทางห้องปฏิบัติการ นำมาคำนวณหาความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมระดับรายตัวและระดับรายเต้านมในทุกครั้งของการเก็บตัวอย่าง นำเสนอค่าเฉลี่ยของความชุกและอุบัติการณ์ในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่างในรูปแบบแผนภูมิแท่ง และวิเคราะห์ความแตกต่างในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่างด้วยวิธี Kruskal – Wallis One Way AOV ด้วยโปรแกรม Statistix® v.8.0 (เนื่องจากข้อมูลมีการกระจายตัวไม่ปกติจึงต้องวิเคราะห์แบบ non parametric)

2. จำนวนของเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่แพร่กระจายสู่ถังน้ำนมรวมในแต่ละฟาร์ม จากสมการ ร้อยละของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในทั้งน้ำนมรวม

$$\%\ SU\ sharing\ in\ BT = \frac{\sum_{i=1}^{n} (ESC \times mw \times 1{,}000) \times 100}{(SPC \times MW \times 1{,}000)}$$

เมื่อ

$\sum_{i=1}^{n}$ คือ ผลรวมของค่า (ESC x mw x 1,000) จากโคที่ติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ในฟาร์มตัวที่ 1 ถึง n

ESC คือ จำนวนแบคทีเรีย environmental streptococci ที่นับได้จากเต้าที่ติดเชื้อ *Streptococcus uberis* (โคโลนีต่อมล.)

mw คือ น้ำหนักน้ำนมโคตัวที่ติดเชื้อ *Streptococcus uberis* (กก.)

SPC คือ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม (โคโลนีต่อมล.)

MW คือ น้ำหนักน้ำนมรวมทั้งหมดของฟาร์ม (กก.)

3. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความชุกของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* กับคุณภาพน้ำนมดิบถังรวมด้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Spearman Rank Correlations ด้วยโปรแกรม Statistix v. 8.0 รายงานผลเป็นค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ พิจารณาความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p<0.05$

4. วิเคราะห์ความแตกต่างขององค์ประกอบน้ำนม ได้แก่ โปรตีน ไขมัน แลคโตส ของแข็งทั้งหมด ของแข็งไม่รวมมันเนย สัดส่วนของไขมันต่อโปรตีนในตัวอย่างน้ำนมที่ได้จากเต้านมโคที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus uberis* เปรียบเทียบกับเต้าที่ไม่ติดเชื้อใด ๆ ในแม่โคตัวเดียวกันด้วยวิธี Mixed procedure โดยใช้โปรแกรม SAS® 8.0.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการศึกษา

1. ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดที่มีนัยสำคัญเข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมของฟาร์มโคนมรายย่อย

จากการศึกษาฟาร์มโคนมรายย่อยทั้งหมด 30 ฟาร์ม เข้าไปเก็บตัวอย่างน้ำนมในฟาร์มทุกสองเดือน จำนวน 5 ครั้งต่อฟาร์ม โดยแบ่งช่วงระยะเวลาการเก็บตัวอย่างดังนี้

การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 เดือนเมษายนถึงกรกฎาคม 2550

การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 เดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม 2550

การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 เดือนสิงหาคมถึงตุลาคม 2550

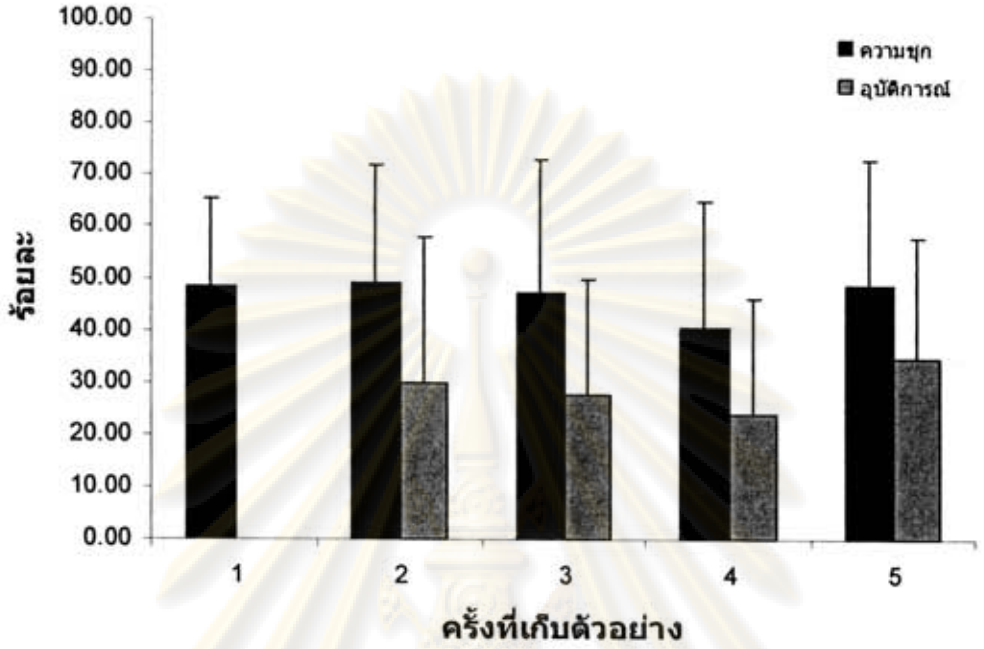
การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 4 เดือนตุลาคมถึงธันวาคม 2550

การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 5 เดือนพฤศจิกายน 2550 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2551

การศึกษามีประชากรแม่โครีดน้ำนมทั้งหมด 357 ตัว โดยมีจำนวนเต้านมที่รีดน้ำนมทั้งหมดเท่ากับ 1,399 เต้า มีค่าเฉลี่ยความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายตัวและระดับรายเต้านม แสดงในภาพที่ 3 และ 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

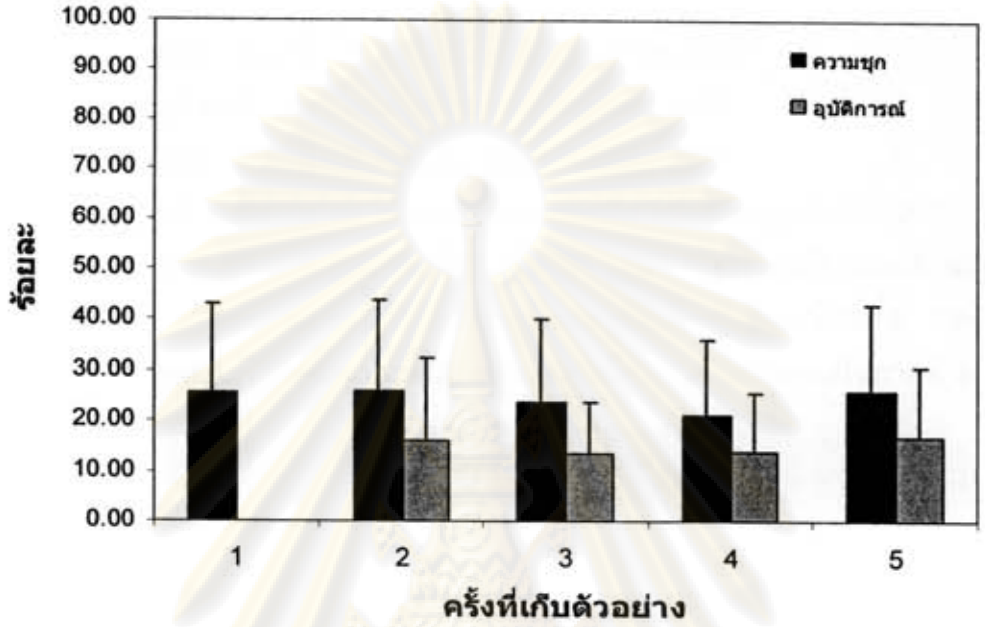
ภาพที่ 3 ค่าเฉลี่ยของความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายตัวในฟาร์มโคนมรายย่อยจำนวน 30 ฟาร์ม จากการเก็บตัวอย่างจำนวน 5 ครั้ง



ค่าเฉลี่ยของความชุกและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานครั้งที่ 1-5 เท่ากับ 48.32±17.01 49.13±22.65 47.32±25.82 40.50±24.43 และ 48.71±24.21 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของอุบัติการณ์และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานครั้งที่ 2-5 เท่ากับ 29.95±28.07 27.51±23.72 23.98±21.99 และ 34.65±23.42 ตามลำดับ แนวโน้มของค่าเฉลี่ยความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายตัวมีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการศึกษา เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Kruskal – Wallis One Way AOV ค่าเฉลี่ยความชุกและอุบัติการณ์การติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายตัวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละครั้งที่เก็บตัวอย่าง ($p>0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4 ค่าเฉลี่ยของความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนม ระดับรายเต้านมในฟาร์มโคนมรายย่อยจำนวน 30 ฟาร์ม จากการเก็บตัวอย่างจำนวน 5 ครั้ง



ค่าเฉลี่ยของความชุกและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานครั้งที่ 1-5 เท่ากับ 25.64±17.34 25.86±17.98 23.61±16.39 21.06±15.19 และ 25.89±17.05 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของอุบัติการณ์และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานครั้งที่ 2-5 เท่ากับ 16.15±16.16 13.54±10.08 13.91±11.77 และ 16.86±13.90 ตามลำดับ แนวโน้มของค่าเฉลี่ยความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายเต้านมมีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการศึกษา คล้ายกับระดับรายตัว แต่ร้อยละของระดับรายตัวจะมีค่าสูงกว่าร้อยละระดับรายเต้านม เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Kruskal – Wallis One Way AOV ค่าเฉลี่ยความชุกและอุบัติการณ์การติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายเต้านมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละครั้งที่เก็บตัวอย่าง ($p>0.05$) (รายละเอียดความชุกและอุบัติการณ์การติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายเต้านม ในฟาร์มโคนมรายย่อยทั้งหมดแสดงเป็นตารางในภาคผนวก ค)

จากการศึกษาความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด ที่มีนัยสำคัญเข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมของฟาร์มโคนมรายย่อยจำนวน 30 ฟาร์ม บ่งชี้ว่ามีความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแบบสม่ำเสมอ ตลอดระยะเวลาของการศึกษา เมื่อพิจารณาระดับรายตัวจะพบว่ามีค่าสูงกว่าระดับรายเต้านม บ่งบอกว่าปัญหาการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในฟาร์มและมีระดับความรุนแรงของการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมที่ต่ำ

2. ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่มีนัยสำคัญเข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมในฟาร์มโคนมรายย่อย

จากการศึกษาฟาร์มโคนมรายย่อยทั้งหมด 30 ฟาร์ม เข้าไปเก็บตัวอย่างน้ำนมในฟาร์มทุกสองเดือน จำนวน 5 ครั้งต่อฟาร์ม โดยแบ่งช่วงระยะเวลาการเก็บตัวอย่างดังนี้

การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 เดือนเมษายนถึงกรกฎาคม 2550

การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 เดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม 2550

การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 เดือนสิงหาคมถึงตุลาคม 2550

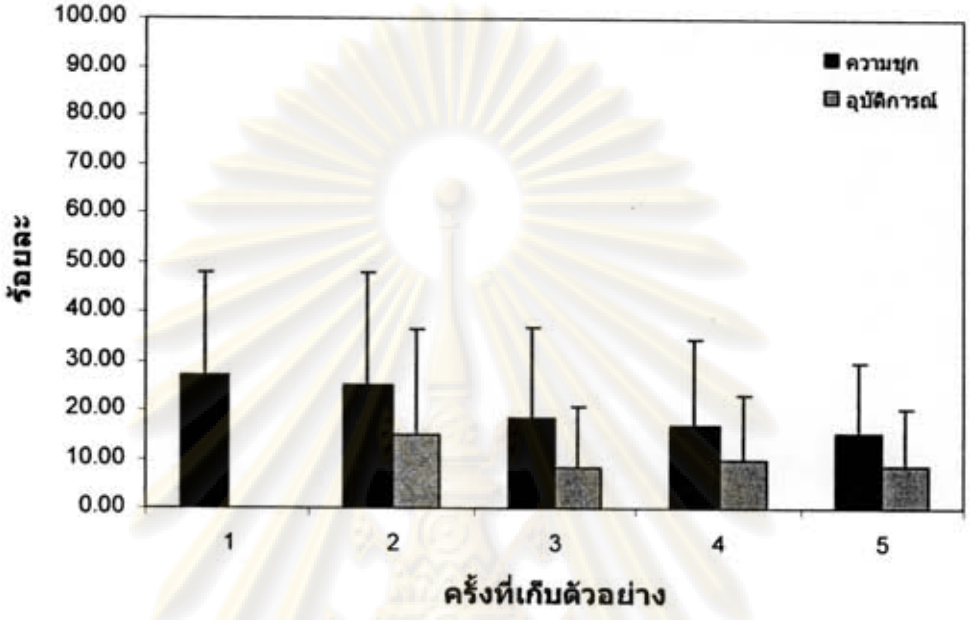
การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 4 เดือนตุลาคมถึงธันวาคม 2550

การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 5 เดือนพฤศจิกายน 2550 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2551

การศึกษามีประชากรแม่โครีดน้ำนมทั้งหมด 357 ตัว โดยมีจำนวนเต้านมที่รีดน้ำนมทั้งหมดเท่ากับ 1,399 เต้า มีค่าเฉลี่ยความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายตัวและระดับรายเต้านม แสดงในภาพที่ 5 และ 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

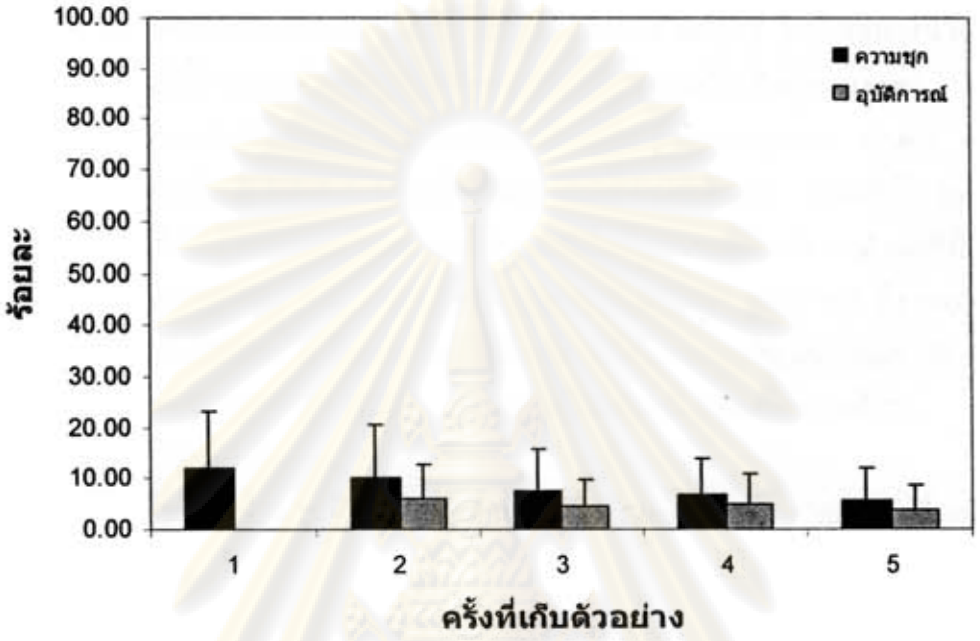
ภาพที่ 5 ค่าเฉลี่ยของความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนม ระดับรายตัวในฟาร์มโคนมรายย่อยจำนวน 30 ฟาร์ม จากการเก็บตัวอย่างจำนวน 5 ครั้ง



ค่าเฉลี่ยของความชุกและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานครั้งที่ 1-5 เท่ากับ 27.10±20.18 25.25±22.70 18.45±18.37 16.68±17.88 15.31±14.59 พบค่าเฉลี่ยของความชุกสูงสุดในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 (เดือนเมษายนถึงเดือนกรกฎาคม 2550) และมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ จนจบการศึกษา (เดือนมิถุนายน 2550 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2551) ส่วนค่าเฉลี่ยของอุบัติการณ์และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานครั้งที่ 2-5 เท่ากับ 14.84±21.52 8.37±12.38 9.72±13.53 8.59±11.98 พบค่าเฉลี่ยของอุบัติการณ์มีค่าสูงสุดในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 (เดือนมิถุนายนถึงเดือนสิงหาคม 2550) และมีแนวโน้มคงที่ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3-5 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Kruskal – Wallis One Way AOV ค่าเฉลี่ยความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายตัวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละครั้งที่เก็บตัวอย่าง ($p>0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 6 ค่าเฉลี่ยของความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนม ระดับรายเต้านมในฟาร์มโคนมรายย่อยจำนวน 30 ฟาร์ม จากการเก็บตัวอย่างจำนวน 5 ครั้ง



ค่าเฉลี่ยของความชุกและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานครั้งที่ 1-5 เท่ากับ 12.12±10.94 10.00±10.68 7.61±8.11 6.72±7.16 และ 5.70±6.11 พบค่าเฉลี่ยของความชุกสูงสุดในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 (เดือนเมษายนถึงเดือนกรกฎาคม 2550) และมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ จนจบการศึกษา (เดือนมิถุนายน 2550 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2551) ส่วนค่าเฉลี่ยของอุบัติการณ์และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในครั้งที่ 2-5 เท่ากับ 6.12±6.72 4.67±5.09 4.97±6.06 และ 3.77±4.94 มีค่าสูงสุดในครั้งที่ 1 (เดือน เมษายน ถึงเดือนกรกฎาคม 2550) และมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ จนจบการศึกษา (เดือนมิถุนายน 2550 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2551) คล้ายกับระดับรายตัว แต่ร้อยละของระดับรายตัวจะมีค่าสูงกว่าร้อยละระดับรายเต้านม เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Kruskal – Wallis One Way AOV ค่าเฉลี่ยของความชุกและอุบัติการณ์การติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายเต้านมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละครั้งที่เก็บตัวอย่าง ($p>0.05$) (รายละเอียดความชุกและอุบัติการณ์การติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายเต้านม ในฟาร์มโคนมรายย่อยทั้งหมดแสดงเป็นภาพและตารางในภาคผนวก ค)

จากการศึกษาความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่มีนัยสำคัญเข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมของฟาร์มโคนมรายย่อยจำนวน 30 ฟาร์ม จากค่าเฉลี่ยของความชุกที่ลดลงตลอดระยะเวลาการศึกษา บ่งชี้ว่ามีการติดเชื้อและมีการหายของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* แต่ค่าเฉลี่ยของอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่

เต้านมกลับมีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการศึกษา บ่งชี้ว่ามีการติดเชื้อใหม่เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมภายในฝูงในสัดส่วนคงที่ และเมื่อพิจารณาระดับรายตัวจะพบว่ามีค่าสูงกว่าระดับรายเต้านม บ่งบอกว่าปัญหาการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในฟาร์มและมีระดับความรุนแรงของการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมที่ต่ำ

3. ผลกระทบของจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ในตัวอย่างน้ำนมที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม

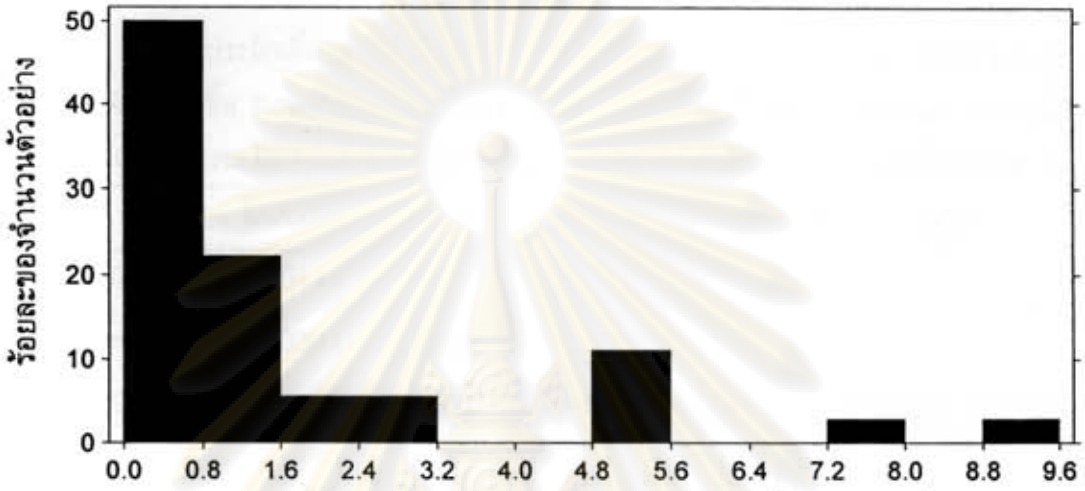
การศึกษาครั้งนี้พบแม่โครีดน้ำนมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่ได้รับการยืนยันผลการวินิจฉัยด้วยชุดตรวจชีวเคมีจำแนกชนิดเชื้อ API 20 STREP® (bioMérieux, France) และได้ทำการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ถูกปลดปล่อยจากเต้านมที่มีการติดเชื้อจำนวน 51 ตัวอย่าง พบจำนวนแบคทีเรียถูกปลดปล่อยออกมาจำนวน 160 ถึง 56,000 โคโลนีต่อมล. โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6,479 โคโลนีต่อมล. ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบจำนวนแบคทีเรียถูกปลดปล่อยออกมา 3,448 – 9,510 โคโลนีต่อมล. แสดงในภาพที่ 7

ภาพที่ 7 ร้อยละของจำนวนตัวอย่างและจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเต้าที่มีการติดเชื้อ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในเชิงสัดส่วนของจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* จากเต้าที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม โดยทำการเปรียบเทียบร้อยละของจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* กับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมของฟาร์ม พบสัดส่วนเชื้อ *Streptococcus uberis* ต่อจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมร้อยละ 0.000094 ถึง 9.53 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 1.58 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบสัดส่วนร้อยละ 0.78 – 2.37 แสดงในภาพที่ 8 (รายละเอียดของร้อยละของจำนวนเชื้อ

Streptococcus uberis ต่อจำนวนจุลินทรีย์ในถังน้ำนมรวมของฟาร์มโคนมรายย่อยแสดงเป็นตารางในภาคผนวก ง)

ภาพที่ 8 ร้อยละของจำนวนตัวอย่างและสัดส่วนเชื้อ *Streptococcus uberis* ต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม



จากการศึกษาพบจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเต้าที่มีการติดเชื้อที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบจำนวนแบคทีเรียถูกปลดปล่อยออกมา 3,448 – 9,510 โคโลนีต่อมล. เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมพบสัดส่วนเชื้อ *Streptococcus uberis* ต่อจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบสัดส่วนร้อยละ 0.78 – 2.37 จากการศึกษาพบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเต้านมที่มีการติดเชื้อดังกล่าวมีจำนวนไม่สูงมากนัก และผลจากการศึกษาในส่วนที่ 1 พบว่าระดับความรุนแรงของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ระดับรายเต้านมยังมีระดับความรุนแรงต่ำ เมื่อพิจารณาจากปัจจัยดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้ที่ทำให้สัดส่วนของเชื้อ *Streptococcus uberis* ต่อจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมมีสัดส่วนร้อยละที่ต่ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ความสัมพันธ์ระหว่างความชุกของการติดเชื้อ*Streptococcus uberis* ระดับรายเต้านมกับคุณภาพน้ำนมดิบถังรวมด้านจุลินทรีย์

ค่าความสัมพันธ์ของความชุกของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ระดับรายเต้านมกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์ม จำนวนเซลล์โซมาติก และปริมาณน้ำนมทั้งหมดในถังน้ำนมรวม วิเคราะห์ด้วย Spearman Rank Correlations แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของความชุกของเต้านมอักเสบจากเชื้อ *Streptococcus uberis* กับจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่นับได้ จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์ม จำนวนเซลล์โซมาติก และปริมาณน้ำนมทั้งหมดในถังน้ำนมรวม

	LOGIMI	LOGTPC	LOGCC	LOGSCC	MW
LOGTPC	-0.0442				
LOGCC	-0.0304	**0.6843****			
LOGSCC	0.0215	-0.0656	-0.1857		
MW	0.2491	**0.6098****	**0.7027****	-0.2523	
P	0.1620	**-0.3580***	-0.1935	0.2877	-0.2776

* ($p<0.05$) ** ($p<0.001$)

เมื่อ LOGIMI คือ ค่า log ของจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่นับได้จากแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบ

LOGTPC คือ ค่า log ของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม

LOGCC คือ ค่า log ของจำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มในถังน้ำนมรวม

MW คือ น้ำหนักน้ำนมรวมทั้งหมดของฟาร์มโคนมรายย่อย

P คือ ความชุกของเต้านมอักเสบระดับรายเต้านมจากเชื้อ *Streptococcus uberis*

การศึกษาครั้งนี้พบสหสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ ความสัมพันธ์ระหว่างความชุกจากการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมกับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในถังน้ำนมรวม เท่ากับ –0.3580 ($p<0.05$) ระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมกับจำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มในถังน้ำนมรวม เท่ากับ 0.6843 ($p<0.001$) ระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมกับปริมาณน้ำนมทั้งหมด เท่ากับ 0.6098 ($p<0.001$) ระหว่างจำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มในถังน้ำนมรวมกับปริมาณน้ำนมทั้งหมด เท่ากับ 0.7027 ($p<0.001$)

5. การเปรียบเทียบองค์ประกอบน้ำนมของตัวอย่างน้ำนมที่ได้จากเต้านมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* กับตัวอย่างน้ำนมที่ได้จากเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อในแม่โคตัวเดียวกัน

ความแตกต่างขององค์ประกอบน้ำนมที่ได้จากเต้านมที่ติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เทียบกับเต้านมที่ไม่ติดเชื้อภายในแม่โคตัวเดียวกัน จำนวน 45 คู่เต้านม โดยเป็นเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการจากการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* จำนวน 44 คู่เต้านม และแบบแสดงอาการจำนวน 1 คู่เต้านม แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของน้ำนมที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมจากเต้านมที่ติดเชื้อ *Streptococcus uberis* กับตัวอย่างน้ำนมจากเต้านมปกติที่ไม่มีการติดเชื้อใด ๆ ภายในแม่โคตัวเดียวกัน จำนวน 45 คู่เต้านม

องค์ประกอบ	ลิสต์สแควร์มีน		ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าคำนวนทางสถิติ	นัยสำคัญทางสถิติ
	เต้านมที่ติดเชื้อ	เต้านมปกติ			
คะแนนเซลล์โซมาติก*	7.24	4.13	0.27	-8.28	***< 0.0001***
โปรตีน	3.53	3.37	0.10	-2.01	*0.0509*
น้ำตาลแลคโตส	3.89	4.32	0.09	3.41	***0.0015***
ไขมัน	6.11	7.11	0.36	2.84	***0.0071***
ของแข็งไม่รวมมันเนย	8.14	8.40	0.14	1.97	*0.0560*
ของแข็งทั้งหมด	14.24	15.51	0.37	3.22	***0.0026***
สัดส่วนไขมันต่อโปรตีน	1.81	2.24	0.13	3.07	***0.0038***

* คะแนนเซลล์โซมาติก = 3 + log2 (จำนวนเซลล์โซมาติก/100,000) (Shook, 1993)

ตัวอย่างน้ำนมที่มาจากเต้านมซึ่งมีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* มีความแตกต่างขององค์ประกอบน้ำนมอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของค่าเซลล์โซมาติกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.0001$) และการลดลงของน้ำตาลแลคโตส ไขมัน ของแข็งทั้งหมด และสัดส่วนไขมันต่อโปรตีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำนมที่ได้จากเต้าปกติในแม่โคตัวเดียวกัน

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

1. ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดที่มีนัยสำคัญเข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมของฟาร์มโคนมรายย่อย

ตลอดช่วงการศึกษาพบค่าเฉลี่ยร้อยละความชุกของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมระดับรายตัวเท่ากับ 46.79 ระดับรายเต้านมเท่ากับ 24.41 ทั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา ของ Panky และคณะพบความชุกของเต้านมอักเสบในแม่โครีดนมท้องแรก พบมีความชุกของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมระดับรายตัว เท่ากับ 45.50 และระดับรายเต้านม เท่ากับ 18.70 (Panky et al., 1991) อาจเนื่องจากมีรูปแบบของการศึกษาในฟาร์มที่มีปัญหาค่าจำนวนเซลล์โซมาติกสูงอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้

ค่าเฉลี่ยร้อยละอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมระดับรายตัว เท่ากับ 29.02 และ 15.12 ซึ่งรูปแบบของความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมระดับรายตัวและระดับรายเต้านมมีลักษณะที่คล้ายกัน แต่ข้อมูลในการติดเชื้อจุลินทรีย์ระดับรายตัวมีร้อยละที่สูงกว่าระดับรายเต้านม บ่งบอกถึงการติดเชื้อจุลินทรีย์ในฟาร์มที่พบส่วนใหญ่เกิดเพียงตัวละเต้านมโดยเฉลี่ย

การศึกษาระบาดวิทยาในหลายประเทศ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาในรัฐนิวยอร์ก อิตาลี เนเธอร์แลนด์ สวิสเซอร์แลนด์ เบลเยียม พบว่าเต้านมอักเสบมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม coagulase negative staphylococci พบความชุกระหว่าง ร้อยละ 11.3 ถึง 50.6 (Wilson et al., 1997; Pankey et al., 1991; Ferguson et al., 2007; Smolders et al., 2005; Busato et al., 2000; Piepers et al., 2007) และมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* พบความชุกร้อยละ 2.6 ถึง 20.6 (Wilson et al., 1997; Pankey et al., 1991; Ferguson et al., 2007; Piepers et al., 2007; Smolders et al., 2005) และมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ร้อยละ 7.3 ถึง 19.4 (Wilson et al., 1997; Pankey et al., 1991; Ferguson et al., 2007; Busato et al., 2000)

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบการติดเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่เต้านมในระดับรายเต้านมมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus uberis* Coagulase negative staphylococci *Corynebacterium bovis Streptococcus agalactiae* และ *Staphylococcus aureus* เข้าสู่เต้านมเท่ากับร้อยละ 8.42 4.43 2.28 1.40 และ1.33 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาในแต่ละประเทศที่กล่าวมาข้างต้น

2. ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่มีนัยสำคัญเข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมในฟาร์มโคนมรายย่อย

ผลการศึกษาพบค่าความชุกและอุบัติการณ์การติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมระดับรายตัวและระดับรายเต้านมมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 20.56 และ 10.38 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมเท่ากับ 1.61 เต้านมต่อแม่โค จากการวินิจฉัยเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียที่มาจากการติดเชื้อเข้าสู่เต้านม สามารถเพาะแยกเชื้อ *Streptococcus uberis* ได้มากที่สุด ยืนยันว่าเชื้อ *Streptococcus uberis* เป็นหนึ่งในสามของเชื้อแบคทีเรียที่พบว่าเป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบ ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาในประเทศฟินแลนด์และเนเธอร์แลนด์ ที่พบว่าสาเหตุของเต้านมอักเสบเกิดจากการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* รองจากการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Coagulase negative staphylococci และ *Staphylococcus aureus* (Smolders et al., 2005; Koivula et al., 2007)

ความชุกของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมแม่โครีดน้ำนม พบว่ามีแนวโน้มลดลง แต่อุบัติการณ์ของการติดเชื้อใหม่มีแนวโน้มคงที่ หรือ ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยเฉพาะในช่วงท้ายของการศึกษา บ่งบอกว่าระยะเวลาของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* มีระยะเวลาที่สั้น อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษาครั้งนี้มีช่วงห่างของการเก็บตัวอย่างในฟาร์มห่างกันประมาณสองเดือน จึงไม่อาจบอกได้ว่าระยะเวลาของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* มีระยะเวลานานเท่าใด แต่การศึกษาก่อนหน้านี้กล่าวถึงระยะเวลาการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมที่สั้นที่สุดเท่ากับ 16 วัน (McDougall et al., 2004)

3. ผลกระทบของจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ในตัวอย่างน้ำนมที่ได้จากเต้านมที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม

การปลดปล่อยเชื้อแบคทีเรียจากแม่โคที่ติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านม มีค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่ถูกปลดปล่อยออกมาเท่ากับ 6,479 โคโลนีต่อมล. เมื่อเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนของจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* จากเต้านมที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมต่อจำนวนจุลินทรีย์รวมในถังน้ำนมรวม พบการปลดปล่อยเชื้อสู่ถังน้ำนมรวมของฟาร์มมีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 1.58 ซึ่งถือว่าเป็นสัดส่วนที่น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ Howard และคณะที่พบว่าชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่พบปนเปื้อนในถังน้ำนมรวม ส่วนใหญ่คือ พบเชื้อแบคทีเรีย aesculin positive streptococci ร้อยละ 48 เชื้อแบคทีเรีย coagulase negative staphylococci ร้อยละ 51 และแบคทีเรีย coliforms ร้อยละ 11 แต่การศึกษาครั้งนั้นไม่ได้ระบุว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม aesculin positive streptococci ที่พบในสัดส่วนที่สูงนั้นมาจากสิ่งแวดล้อมหรือมาจากแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบ (Howard, 2006) การศึกษาครั้งนี้บ่งบอกแนวโน้มของความน่าจะเป็นว่าเชื้อแบคทีเรีย aesculin positive streptococci ที่พบสัดส่วนที่สูงจากถังน้ำนมรวมมีที่มาจากสิ่งแวดล้อม

มากกว่ามีที่มาจากแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบ อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Rysanck และคณะ ได้แนะนำว่าหากพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Streptococcus uberis* ในถังน้ำนมรวมมีค่าสูง แต่ค่าเซลล์โซมาติกของถังน้ำนมรวมไม่สูงขึ้น บ่งบอกว่าเชื้อ *Streptococcus uberis* อาจปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมไม่ได้มาจากแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบ (Rysanck et al., 2007)

ถึงแม้ว่าการศึกษาในครั้งนี้พบสัดส่วนการปลดปล่อยจำนวนเชื้อที่มาจากเต้านมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* จากแม่โครีดน้ำนมสู่ถังน้ำนมรวมของฟาร์มมีเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด แต่อย่างไรก็ดีอาจพบมีสัดส่วนที่สูงถึงร้อยละ 9.8 ดังนั้นจำนวนโคและจำนวนเต้านมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ปริมาณน้ำนมจากแม่โครีดน้ำนมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านม และปริมาณน้ำนมรวมทั้งหมดของฟาร์ม มีผลต่อสัดส่วนของจำนวนเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่แพร่กระจายสู่ถังน้ำนมรวมเปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด อย่างไรก็ดีผลจากการศึกษาครั้งนี้พบเต้านมที่มีการติดเชื้อดังกล่าวมีค่าเฉลี่ยเซลล์โซมาติกสูงถึง 1,884,000 เซลล์ต่อมล. อาจเป็นสาเหตุทำให้จำนวนเซลล์โซมาติกในถังน้ำนมรวมสูง แตกต่างกับผลการศึกษาของ Jánosi และ Baltay ที่พบเชื้อแบคทีเรีย coagulase negative staphylococci ได้ถึงร้อยละ 41 ในถังน้ำนมรวม แต่กลับให้จำนวนเซลล์โซมาติกในถังน้ำนมรวมต่ำ (Jánosi and Baltay, 2004)

4. ความสัมพันธ์ระหว่างความชุกของการติดเชื้อ*Streptococcus uberis* ระดับรายเต้านมกับคุณภาพน้ำนมดิบถังรวมด้านจุลินทรีย์

การศึกษาครั้งนี้พบสหสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ สหสัมพันธ์ระหว่างความชุกจากการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมกับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในถังน้ำนมรวม เท่ากับ –0.3580 ($p<0.05$) ซึ่งมีความหมายว่าความชุกของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมที่ลดลง หรือในทางกลับกันในฟาร์มที่มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมต่ำ อาจพบความชุกของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมที่สูงในฟาร์ม

สหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมกับจำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มในถังน้ำนมรวม เท่ากับ 0.6843 ($p<0.001$) หมายความว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมที่สูงขึ้น มีความสัมพันธ์กับจำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มในถังน้ำนมรวมที่สูงขึ้นด้วย

สหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมกับปริมาณน้ำนมทั้งหมด เท่ากับ 0.6098 ($p<0.001$) หมายความว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมที่เพิ่มสูงขึ้น มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำนมทั้งหมดที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย

สหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มในถังน้ำนมรวมกับปริมาณน้ำนมทั้งหมด เท่ากับ 0.7027 ($p<0.001$) หมายความว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มในถังน้ำนมรวมที่เพิ่มสูงขึ้น มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำนมทั้งหมดที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย

จากค่าสหสัมพันธ์ดังกล่าว พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนสู่ถังน้ำนมรวมส่วนใหญ่มาจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์ม ซึ่งมีที่มาจากสุขศาสตร์การรีดน้ำนมที่ไม่ดี โดยเฉพาะในฟาร์มที่มีปริมาณน้ำนมทั้งหมดสูง จะมีจำนวนแม่โครีดน้ำนมมากทำให้ความใส่ใจทางสุขศาสตร์การรีดน้ำนมลดลง มีแนวโน้มทำให้จำนวนจุลินทรีย์กลุ่มโคไลฟอร์มเพิ่มสูงขึ้น และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมเพิ่มขึ้นตาม

ผลการศึกษาครั้งนี้ต่างจากการศึกษาของ Jayarao และคณะ ที่พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus uberis* กับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมเท่ากับ 0.648 ($p<0.05$) (Jayarao et al., 2004) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบค่าสหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus uberis* กับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมเท่ากับ -0.0442 ($p>0.05$) อาจเนื่องจากที่มาของตัวอย่างน้ำนมในการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus uberis* ต่างกัน โดยการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียเฉพาะเต้านมที่มีการติดเชื้อ แต่การศึกษาของ Jayarao และคณะทำการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียจากถังน้ำนมรวม ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus uberis* ที่อยู่ในถังน้ำนมรวมอาจมาจากเต้านมที่มีการติดเชื้อ หรือ มาจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม เช่น จากผิวหนังและปลายเปิดบริเวณหัวนมโค มูลสัตว์ และวัสดุปูรอง ซึ่งจากผลการศึกษาของ Jayarao และคณะ ได้อธิบายถึงจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus uberis* ที่พบสูงอาจเนื่องจากปัญหาการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม สุขศาสตร์การรีดน้ำนมในฟาร์ม

5. การเปรียบเทียบองค์ประกอบน้ำนมของตัวอย่างน้ำนมที่ได้จากเต้านมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมกับตัวอย่างน้ำนมที่ได้จากเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อของแม่โคตัวเดียวกัน

องค์ประกอบของน้ำนมที่ได้จากเต้านมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมมีจำนวนเซลล์โซมาติกที่สูงกว่าเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อ และมีร้อยละขององค์ประกอบของน้ำตาลแลคโตส ไขมัน ของแข็งทั้งหมด และสัดส่วนไขมันต่อโปรตีนต่ำกว่าเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) แตกต่างจากผลการศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium bovis* เข้าสู่เต้านมโค ที่พบว่าองค์ประกอบของน้ำนมที่ได้จากเต้านมที่ติดเชื้อไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อของแม่โคตัวเดียวกัน ($p>0.05$) มีเพียงปริมาณเซลล์โซมาติกเท่านั้นที่พบว่ามีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (LeVan et al., 1985)

การศึกษาครั้งนี้พบจำนวนเซลล์โซมาติกจากเต้านมที่มีการติดเชื้อสูงกว่าเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.0001$) ยืนยันผลการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านม ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบ คล้ายคลึงกับผลการศึกษาของ Djabri และคณะ ที่พบว่าเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* ทำให้จำนวนเซลล์โซมาติกสูงถึง 1,024,000 เซลล์ต่อมล. (Djabri et al., 2002) ซึ่งจำนวนเซลล์โซมาติกเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพ

น้ำนมที่สำคัญ ที่บ่งบอกถึงสุขภาพเต้านมโค ตัวโค และน้ำนมถังรวมของฟาร์ม (Hamann, 2005)

ในปัจจุบันหลักเกณฑ์การตัดเกรดและให้ราคาซื้อขายน้ำนมในประเทศไทย ใช้จำนวนเซลล์โซมาติกเป็นเกณฑ์ในการเพิ่มราคาในการรับซื้อน้ำนมดิบจากเกษตรกร โดยจำนวนเซลล์โซมาติกจากถังน้ำนมรวมถ้าน้อยกว่า 150,000 เซลล์ต่อมล.ได้ราคาเพิ่มขึ้น 0.20 บาทต่อกก. แต่ถ้ามากกว่า 700,000 เซลล์ต่อมล.ถูกตัดราคาลง 0.20 บาทต่อกก. (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องมาตรฐานการรับซื้อน้ำนมดิบ 10 พ.ย. พ.ศ. 2549 (ภาคผนวก จ)) น้ำนมที่ได้จากแม่โคในช่วงที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมมีค่าเซลล์โซมาติกสูง เป็นสาเหตุทำให้เกษตรกรโดนตัดราคาน้ำนมดิบ นอกจากนั้นขบวนการอักเสบยังส่งผลกระทบต่อการผลิตน้ำนมในระยะยาว โดยทำให้คุณภาพและปริมาณน้ำนมที่ควรผลิตได้ลดลง ซึ่งทำให้เกษตรกรมีรายได้ลดลง

องค์ประกอบของน้ำนมจากเต้านมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านม พบว่ามีร้อยละของน้ำตาลแลคโตสต่ำกว่าน้ำนมที่ได้จากเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อ เนื่องจากเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าไปทำลายบริเวณถุงสร้างน้ำนม มีผลทำให้ขบวนการสร้างน้ำตาลแลคโตสลดลง เมื่อน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมลดลงมีผลกับขบวนการออสโมซิสโมเลกุลของน้ำที่ถูกดึงเข้ามาในขบวนการสร้างน้ำนมลดลง ทำให้ปริมาณน้ำนมที่ผลิตได้ลดลง (Liisa and Hannu, 1995)

เนื่องจากตัวอย่างน้ำนมที่นำมาศึกษาครั้งนี้เป็นตัวอย่างน้ำนมที่เก็บภายหลังจากการรีดน้ำนม (post milking samples) ดังนั้นจึงพบว่าปริมาณร้อยละของไขมันและจำนวนเซลล์โซมาติกของตัวอย่างน้ำนมที่ได้ทั้งจากเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อ และเต้านมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* มีค่าสูงกว่าตัวอย่างน้ำนมทั่วไปที่เคยรายงานมา (Bruckmaier et al., 2004) อย่างไรก็ตามการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านม ทำให้เกิดเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการทำให้องค์ประกอบร้อยละของไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) คล้ายกับผลการศึกษาของ Houben และคณะ พบการลดลงของผลผลิตน้ำนมในระยะสั้นและยาวจากการติดเชื้อเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ และร้อยละขององค์ประกอบไขมันมีสัดส่วนที่ลดลง และร้อยละของโปรตีนมีสัดส่วนที่เพิ่มขึ้นหลังจากเป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (Houben et al., 1993)

องค์ประกอบของน้ำนมที่เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ ร้อยละน้ำตาลแลคโตส และร้อยละไขมันที่ลดลง มีผลทำให้ร้อยละของของแข็งทั้งหมดในน้ำนมลดลงด้วย ซึ่งร้อยละของของแข็งในน้ำนมเป็นหลักเกณฑ์ที่สำคัญในการตัดเกรด และให้ราคาในการซื้อขายน้ำนมดิบจากเกษตรกรของประเทศไทย โดยร้อยละของของแข็งทั้งหมดหากน้อยกว่า 12.0 ถูกตัดราคา 0.20 บาทต่อกก. แต่ถ้าเพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 12.90 เพิ่มราคา 0.20 บาทต่อกก. (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องมาตรฐานการรับซื้อน้ำนมดิบ 10 พ.ย. พ.ศ. 2549 (ภาคผนวก จ))

การศึกษาครั้งนี้พบว่าร้อยละของโปรตีนจากน้ำนมที่มาจากเต้านมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* มีค่ามากกว่าเต้านมที่ไม่มีการติดเชื้อ แต่ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) คล้ายกับผลการศึกษาของ Weaver และคณะ พบว่าร้อยละของโปรตีนของน้ำนมที่มาจากเต้านมอักเสบมีสัดส่วนที่เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากขบวนการอักเสบทำให้มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์โซมาติก และโปรตีนชนิด non-casein protein หรือ whey protein เช่น ซีรัมอัลบูมิน อิมมูโนโกลบูลิน และยังทำให้เนื้อเยื่อบริเวณที่ติดเชื้อเกิดความเสียหายและถูกทำลาย จำนวนเซลล์โซมาติกและ whey protein สามารถหลุดออกมาจากบริเวณดังกล่าวลงสู่น้ำนม ทำให้ตรวจพบร้อยละของโปรตีนที่เป็น whey protein เพิ่มสูงขึ้น (Weaver และ Kroger, 1976)

ผลการศึกษาของก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าองค์ประกอบน้ำนมที่เปลี่ยนแปลง เช่น ค่าเซลล์โซมาติกที่มากขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณของน้ำตาลแลคโตสและโพแทสเซียมที่ลดลง และการเพิ่มขึ้นของ whey protein โซเดียม และคลอไรด์ การนำไฟฟ้า และ NAGase องค์ประกอบที่เปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดสุขภาพเต้านมโค โดยเฉพาะการอักเสบแบบไม่แสดงอาการได้ (Hamann และ Krömker, 1997; Bansal et al., 2005)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมโคต่อคุณภาพน้ำนมดิบ ในฟาร์มที่มีปัญหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม หรือจำนวนเซลล์โซมาติกสูงกว่ามาตรฐาน พบว่าการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมระดับรายเต้านม อันดับหนึ่งร้อยละ 8.42 เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus uberis* จากผลการศึกษาความชุกของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าเต้านมโคทั้งในระดับรายตัวและระดับรายเต้ามีแนวโน้มลดลงตลอดระยะที่ทำการศึกษา แต่อุบัติการณ์การติดเชื้อ *Streptococcus uberis* กลับมีค่าคงที่ทั้งในระดับรายตัวและรายเต้านม บ่งบอกว่ามีการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมใหม่อย่างสม่ำเสมอในแม่โครีดน้ำนมภายในฟาร์ม โดยปริมาณเชื้อที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเต้านมที่มีการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวมพบมีสัดส่วนที่น้อย แต่อย่างไรก็ตามการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านม ส่งผลกระทบต่อสุขภาพเต้านมและองค์ประกอบของน้ำนมที่ผลิตได้ โดยทำให้จำนวนเซลล์โซมาติกเพิ่มสูงขึ้น และองค์ประกอบของน้ำนมในส่วนของน้ำตาลแลคโตส ไขมัน ของแข็งทั้งหมด และ สัดส่วนไขมันต่อโปรตีนมีปริมาณลดลง จากการศึกษาในครั้งนี้เมื่อพิจารณาค่าความชุกและอุบัติการณ์การติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนม พบความสูญเสียอย่างมากทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณของน้ำนมที่ผลิตได้ในฟาร์มรายย่อย เกษตรกรควรให้ความสำคัญและตระหนักปัญหาการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านม โดยวางมาตรการในการควบคุมและป้องกันปัญหาการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และ สุกุมา สามงามนิ่ม. 2005 (2548). การระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลมและให้ผลลบต่อการทดสอบ catalase ซึ่งแยกได้จากการติดเชื้อเต้านมของโคนม. บทคัดย่อการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 4 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 15 กุมภาพันธ์ 2548: 91.

กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และ อลงกร อมรศิลป์. 2005 (2548). อณูระบาดวิทยาของเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบในโคนม. บทคัดย่อการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 4 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 15 กุมภาพันธ์ 2548: 105.

ภาษาอังกฤษ

Bansal, B.K., Hamann, J., Grabowski, N.T., and Singh, K.B. 2005. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitis quarters, and its significance for mastitis diagnosis. J. Dairy. Res. 72: 144-152.

Bradley, A.J. 2002. Bovine mastitis: An evolving disease. Vet. J. 164: 116-128.

Bruckmaier, R.M., Ontsouka, C.E., and Blum, J.W. 2004. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. Vet. Med. Czech. 49: 283-290.

Busato, A., Trachsel, P., Schllibaum, M., and Blum, J.W. 2000. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. Prev. Vet. Med. 44: 205-220.

Christen, G.L., Davidson, P.M., McAllister, J.S., and Roth, L.A. 1992. Coliform and Other Indicator Bacteria. In : Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 16th ed. R.T. Marshall (ed.) Washington D.C.: American Public Health Association. 247-269.

Damien, J.B., Anne, M.H., Finola, C.L., and Michael, L.D. 2005. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in 15 dairy herds in the Republic of Ireland. Irish. Vet. J. 58: 333-337.

Djabri, B., Bareille, N., Beaudeau, F., and Seegers, H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. Vet. Res. 33: 335-357.

Dogan, B. and Boor, K.J. 2004. Growth characteristics of *Streptococcus uberis* in UHT-treated milk. J. Dairy. Sci. 87: 813–815.

Edward, M., Anna, K., Michal, K., and Krystyna, K. 2003. Prevalence of intramammary infections in pregnant heifers. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 47: 165-170.

Ferguson, J.D., Azzaro, G., Gambina, M., and Licitra, G. 2007. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily from 2000 to 2006. J. Dairy. Sci. 90: 5798-5813.

Gianneechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I., and Moreno, J.L. 2002. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. Acta. Vet. Scand. 43: 221-230.

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.

Hamann, J., and Krömker, V. 1997. Potential of specific milk composition variables for cow health management. Livestock. Product. Sci. 48: 201-208.

Hamann, J. 2005. Diagnosis of mastitis and indicators of milk quality. In: Mastitis In Dairy Production: Current Knowledge And Future Solutions. H. Hogéveen (ed.) Wageningen: Wageningen Academic. p.82-90.

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 raw milk. J. Dairy. Sci. 84: 292–298.

Henk, H. 2005. Mastitis is an economic problem. Proceedings of the 2005 British Mastitis Conference. Warwickshire, England. [Online]. Available: http://www.iah.bbsrc.ac.uk/BMC/2005/Papers%202005/

Hillerton, J.E. and Berry, E.A. 2003. The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. Vet. Clin. Food. Anim. 19: 157-169.

Hinz, C.W., Hein, G.L., Hinckley, L.S., Althaus, J., and Bengsch, H. 1992. Methods to Detect Abnormal Milk. In : Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 16th ed. R.T. Marshall (ed.) Washington D.C.: American Public Health Association. 334-338.

Houben, E.P., Dijkhuizen, A.A., Van Arendonk, J.M., and Huirne, B.M. 1993. Short- and long- term production losses and repeatability of clinical mastitis in dairy cattle. J. Dairy. Sci. 76: 2561-2578.

Houghtby, G.A., Maturin, L.J., and Koenig, E.K. 1992. Microbiological Count Methods. In : Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 16th ed. R.T. Marshall (ed.) Washington D.C.: American Public Health Association. 213-225.

Howard, P. 2006. Mastitis pathogens present in bulk tank milk from seven dairy herds in the Waikato region, New Zealand. NZ. Vet. J. 54: 41-43.

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

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. 46: 433–442.

Jayarao, B.M., Pillai, S.R., Sawant, A.A., Wolfgan, D.R., and Hegde, N.V. 2004. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial count. J. Dairy. Sci. 87: 3561-3573.

Jánosi, S.Z., and Baltay, Z.S. 2004. Correlation among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the California mastitis test and bacteriological status of the udder in dairy cows. Acta. Vet. Hung. 52: 173-183.

Joe, H. 2005. Human health risks associated with high SCC in milk. Proceedings of the 2005 British Mastitis Conference, Warwickshire, England. 21-24.

Khan, I.U., Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Lämmler, C., Wolter, W., and Zschöck, M. 2003. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. J. Vet. Sci. 3: 213–223.

Koivula, M., Pitkälä, A., Pyörälä. S., Mäntysaari, E.A. 2007. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in finland. Acta. Agriculturae. Scand. Section A. 57: 89-96.

LeVan, P.L., Eberhart, R.J., and Kesler, E.M. 1985. Effects of natural intramammary *Corynebacterium bovis* infection on milk yield and composition. J. Dairy. Sci. 68: 3329-3336.

Liisa, K., and Hannu, S. 1995. Milk composition. In: The Bovine Udder and Mastitis. M., Sandholm, T.H., Buzalski, L., Kaartinen, S., Pyörälä (ed.) University of Helsinki, Faculty of Veterinary Science, Helsinki.

Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D.M., Galton, D.M., Rudan, M.A., and Boor, K.J. 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. J. Dairy. Sci. 83: 264-274.

Maureen, H.M. 2005. Mastitis is a welfare problem. Proceedings of the 2005 British Mastitis Conference, Warwickshire, England. [Online]. Available: http://www.iah.bbsrc.ac.uk/BMC/2005/Papers%202005

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.

Michel, A.W. 1996. Mastitis: The disease and its transmission. Dairy Essentials – Lactation and Milking. [Online]. Available: http://www.babcock.wisc.edu/downloads/de/23.en.pdf

National mastitis council. 1999. In: Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis. revised ed. Wisconsin: W.D. Hoard and Sons Co. 1-222.

Olav, Ø. 2000. The cost of mastitis - an opportunity to gain more money. Proceeding of the 2000 British Mastitis Conference. 67-77.

Pankey, J.W., Drechsler, P.A., and Wildman, E.E. 1991. Mastitis prevalence in primigravid heifers at parturition. J. Dairy. Sci. 74: 1550-1552.

Pankey, J.W., Pankey, P.B., Barker, R.M., Williamson, J.H., and Woolford, M.W. 1996. The prevalence of mastitis in primiparous heifers in 11 Waikato dairy herds. N.Z. Vet. J. 44: 41-44.

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: 1460-1466.

Piepers, S., Meulemeester, L.D., Kruif, A.D., Opsomer, G., Barkema, H.W. and Vliegher, S.D. 2007. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. J. Dairy. Res. 74: 478-483.

Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., and Honkanen-Buzalski, T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001 prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J. Dairy. Sci. 87: 2433-2441.

Pyörälä, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Vet. Res. 34: 565-578.

Rysanck, D., Babak, V., and Zouharova, M. 2007. Bulk tank milk somatic cell count and sources of raw milk contamination with mastitis pathogens. Vet. Med. 52: 223-230.

Santos, M.V., Ma, Y., and Barbano, D.M. 2003. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. J. Dairy. Sci. 86: 2491-2503.

Smolders, E.A.A., Werf, J., Mortel, D., and Kijlstra, A. 2005. Udder Health, Treatments and Pathogens in Organic Dairy Herds in the Netherlands. In: Mastitis In Dairy Production: Current Knowledge And Future Solutions. H. Hogeveen (ed.) Wageningen: Wageningen Academic. p.248-253.

Shook, G. 1993. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count. Vet. Clin. North. Am. Food. Anima. Pract. 9: 579-581.

Smith, K.L. and Hogan, J.S. 1993. Environmental mastitis. Vet. Clin. Food. Anim. 9: 489-498.

Tenhagen, B.A., Koster, G., Wallmann, J., and Heuwieser, W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J. Dairy. Sci. 89: 2542-2551.

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

Urech, E., Puhan Z., and Schallibaum, M. 1999. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. J. Dairy. Sci. 82: 2402-2411.

Weaver, J.C., and Kroger, M. 1976. Protein, casein, and noncasein protein percentages in milk with high somatic cell counts. J. Dairy. Sci. 60: 878-881.

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.

Wilson, D.J., Gonzalez, R.N., and Das, H.H. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. J. Dairy. Sci. 80: 2592-2598.

Zadoks, R.N. 2002. Molecular and Mathematical Epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* Mastitis in Dairy Herds. (dissertation) University of Utrecht. 237 pp.

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.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

คุณภาพน้ำนมดิบในประเทศไทย

1. กำหนดโดยกรมปศุสัตว์ (P-DA-FARM-001; 2542)

องค์ประกอบน้ำนม

- ไขมัน มากกว่าร้อยละ 3.20
- โปรตีน มากกว่าร้อยละ 2.80
- ของแข็งไม่รวมไขมัน มากกว่าร้อยละ 8.25
- ของแข็งทั้งหมด มากกว่าร้อยละ 12.00

ความสะอาดและสารปนเปื้อนในน้ำนม

- จุดเยือกแข็งหรือค่าความถ่วงจำเพาะ
  - จุดเยือกแข็ง ควรมีค่าระหว่าง -0.520 ถึง -0.525
  - ความถ่วงจำเพาะที่ 20 องศาเซลเซียส มากกว่า 1.028
- ชั่วโมงการเปลี่ยนสีของเมธีลีนบลูมากกว่า 4 ชม. หรือ รีซาซูรินไม่น้อยกว่า 4.5 จุด อ่านผลที่ 1 ชม.
- จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด น้อยกว่า 400,000 โคโลนี/มล.
- จำนวนจุลินทรีย์โคไลฟอร์ม น้อยกว่า 10,000 โคโลนี/มล.
- จำนวนจุลินทรีย์ทนร้อน น้อยกว่า 1,000 โคโลนี/มล.
- จำนวนเซลล์โซมาติก น้อยกว่า 500,000 เซลล์/มล.
- ยาปฏิชีวนะให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วย Delvo test หรือ AM test หรือชุดทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2. กำหนดโดยมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช. 6003-2548)

คุณลักษณะ / ชั้นคุณภาพ	ดีมาก	ดี	มาตรฐาน
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (โคโลนีต่อมล.)	น้อยกว่า 200,000	200,000 – 400,000	400,000 – 600,000
จำนวนเซลล์โซมาติก (เซลล์ต่อมล.)	น้อยกว่า 200,000	200,000 – น้อยกว่า 350,000	350,000 – 500,000
ร้อยละของโปรตีน	มากกว่า 3.4	มากกว่า 3.2 – 3.4	3.0 – 3.2
ร้อยละของไขมัน	มากกว่า 4.0	มากกว่า 3.6 – 4.0	3.2 – 3.6
ร้อยละของของแข็งทั้งหมด	มากกว่า 12.7	มากกว่า 12.5 – 12.7	12.3 – 12.5

ภาคผนวก ข

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 ส่วนเต้าที่เป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการแนะนำให้เกษตรกรไม่รีดส่งขาย แต่รีดทิ้งด้วยมือ ภายหลังจากการรีดนมให้จุ่มหัวนมด้วยน้ำยาจุ่มเต้าทุกตัว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเพาะเชื้อเพื่อหาสาเหตุของเต้านมอักเสบ (NMC, 1999)

วัสดุและอุปกรณ์

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. 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 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

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนประกอบ (blood agar)

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อลงแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 1 ชม. แต่ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ไม่ต้องการใช้ทันทีให้เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเก็บได้ไม่เกิน 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

<u>วิธีการเตรียม Triple Sugar Iron Slants</u>

1. ชั่งสาร Triple sugar iron agar ปริมาณ 29.7 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 500 มล.
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มล. ปิดฝาขวดด้วยกระดาษฟอยด์ นำไปวางบนแท่นให้ความร้อนให้ละลายจนเดือด ปิดขวดแก้วรูปชมพู่ ด้วยสำลีและกระดาษฟอยด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

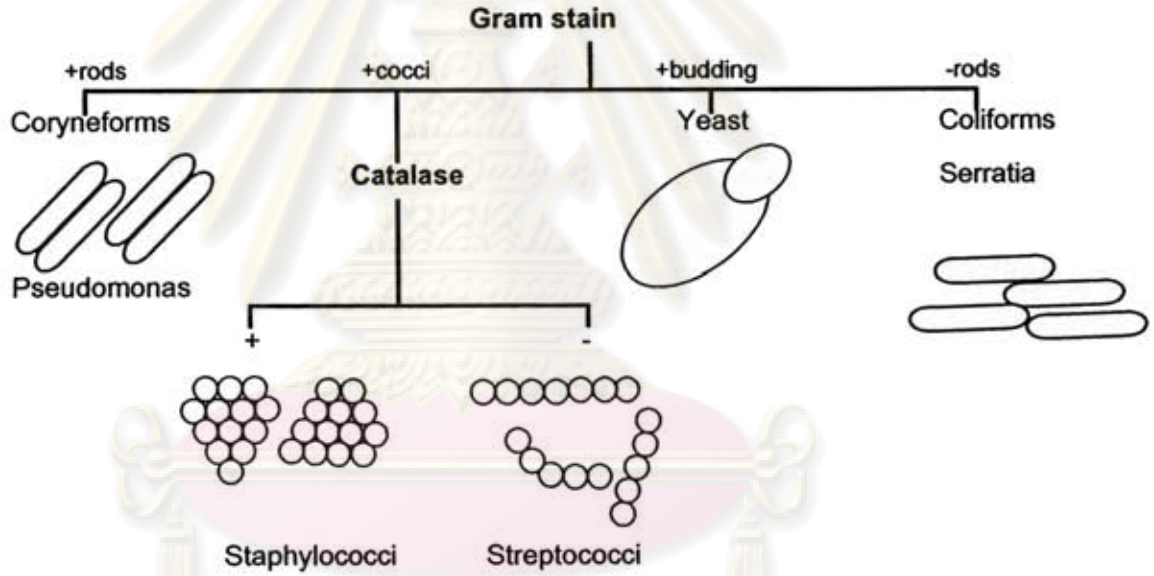
1. ชั่งสาร Motility test agar ปริมาณ 10 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 500 มล.
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มล. ปิดฝาขวดด้วยกระดาษฟอยด์ นำไปวางบนแท่นให้ความร้อนให้ละลายจนเดือด ปิดขวดแก้วรูปชมพู่ด้วยสำลีและกระดาษฟอยด์
3. เติมสาร 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) ปริมาตร 2.5 มล.
4. แบ่งสารละลายลงในหลอดทดลองขนาด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

การเพาะแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบ

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 15)

ภาพที่ 9 การย้อมแกรมเพื่อวินิจฉัยแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบ



7. แบคทีเรีย Streptococci Staphylococci และแบคทีเรียแกรมลบ จะถูกแยกเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนประกอบบนจานเพาะเชื้อใหม่ และนำเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 24 ชม. เพื่อให้ได้จำนวนโคโลนีเดี่ยว ๆ นำไปวินิจฉัยแยกชนิดด้วยการทดสอบชีวเคมีต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 องศาเซลเซียส ต่อจนเวลาที่ 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 หรือ มี red pigment บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ให้ผลบวกกับการทดสอบ Simmons Citrate agar มีการเคลื่อนที่บน Motility agar และบน Triple Sugar Iron ให้ผลเป็น K/A	*Serratia spp.*
	ให้โคโลนีแวววาว ไสแบบ metalic sheen บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ให้ผลบวกหรือลบกับการทดสอบ Simmons Citrate agar มีการเคลื่อนที่บน Motility agar และบน Triple Sugar Iron ให้ผลเป็น K/K	*Pseudomonas spp.*
	ให้โคโลนีไสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ให้ผลบวกหรือลบกับการทดสอบ Simmons Citrate agar มีการเคลื่อนที่บน Motility agar และบน Triple Sugar Iron ให้ผลเป็น K/AS+	*Proteus spp.*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 *Streptococcus uberis* ที่วินิจฉัยได้จากการทดสอบทางชีวเคมี จะทำการยืนยันผลการวินิจฉัยด้วยชุดตรวจชีวเคมีจำแนกชนิดเชื้อ API 20 STREP®(bioMérieux, France)

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย Environmental streptococci รายเต้านม (NMC, 1999)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องอบความดันไอน้ำ
2. เครื่องชั่งน้ำหนัก
3. ตู้อบบ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
4. โถใส่จานเพาะเชื้อ
5. จานเพาะเชื้อ
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Edwards Modified Medium (MEM) ปริมาณ 16.4 กรัม
8. น้ำกลั่น 400 มล.
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

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Edwards Modified Medium (MEM)

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Edwards Modified Medium (MEM) ปริมาณ 16.4 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 500 มล.
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มล. ปิดฝาขวดด้วยกระดาษฟอยด์ นำไปวางบนเครื่องกวนสารละลายให้ความร้อนให้ละลายจนเดือด ปิดขวดแก้วรูปชมพู่ ด้วยสำลีและกระดาษฟอยด์
3. นำเข้าเครื่องอบความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.ม. เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้ปราศจากเชื้อ
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อลงแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 1 ชม.
5. หลังจากแช่อาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิประมาณ 1 ชม. เติมเลือดแกะให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5% ลงใส่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าให้เข้ากันเบา
6. หลังจากเข้ากันดีแล้วให้เทใส่จานเพาะเชื้อจานละ 13-15 มล. ใช้ไฟลนบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อไล่ฟองอากาศ
7. รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวทำการคว่ำจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เพื่อทดสอบการปราศจากเชื้อในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. ก่อนนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนประกอบมาใช้ให้ผึ่งในตู้อบบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ไม่ควรมีการปนเปื้อนของเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย
9. นำจานเพาะเชื้อจำนวน 3 จานต่อหนึ่งตัวอย่างน้ำนม มาเขียนชื่อโค เต้า เบอร์ถังและระดับการเจือจางบริเวณจานเพาะเชื้อ โดยมีระดับการเจือจางที่ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}
10. ตัวอย่างน้ำนมที่เก็บจากฟาร์มนำมาเขย่าและดูดตัวอย่างน้ำนมด้วยเครื่องดูดปริมาณสาร ให้ได้น้ำนมปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 9 มล. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเขย่าผสมสารละลาย ประมาณ 15 วินาที เพื่อให้ตัวอย่างละลายเข้ากัน จะได้น้ำนมที่เจือจางแล้วความเข้มข้น 10^{-1} ทำซ้ำข้างต้นจนได้น้ำนมความเข้มข้นที่เจือจางแล้วความเข้มข้น 10^{-2}
11. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ ขนาด 0.01 มล. จุ่มลงในตัวอย่างน้ำนมที่เก็บได้ให้เต็มห่วงถ่ายเชื้อนำมาเขี่ยลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Edwards Modified Medium โดยตัวอย่างน้ำนมระดับความเข้มข้น 10^{0} ใช้ปริมาณน้ำนม 0.01 มล. จะเป็นตัวอย่างน้ำนมระดับความเข้มข้น 10^{-1} ส่วนตัวอย่างน้ำนมระดับความเข้มข้นที่เจือจางแล้ว 10^{-1} และ 10^{-2} จะเป็นตัวอย่างระดับความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-3} ตามลำดับ
12. รอจนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดอบบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชม.
13. นับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ ภายหลังการอบบ่มด้วยการนับมือ (manual counting) ให้ทำการจดบันทึกเบอร์ถัง และระดับการเจือจางที่นับได้ (วิธีการนับจำนวนแบคทีเรียคล้ายกับวิธีการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมถังรวม โดยวิธี Standard Plate Count (SPC)count (Houghtby et al., 1992))

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจนับจำนวนเซลล์โซมาติก โดยใช้เครื่องนับอนุภาค Coulter counter ZM® ในน้ำนมรายเต้านม และน้ำนมถังรวม (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®
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% 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจหาองค์ประกอบในน้ำนม โดยใช้เครื่อง Milkoscan® 133B ในตัวอย่างน้ำนมรายเต้านม

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตะแกรงใส่ขวดนม (rack)
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
3. เครื่องตรวจหาองค์ประกอบในน้ำนม (Milkoscan® 133B; AIS N. FOSS ELETRIC)
4. สารเคมี 0.1% triton X
5. สารเคมี 0.5% Non foaming stella
6. ตัวอย่างน้ำนมที่ต้องการตรวจวัด (ตัวอย่างน้ำนมต้องไม่มีตะกอนใดๆ ปนเปื้อนมา หรือไม่มีการตกตะกอนของโปรตีนน้ำนม)

วิธีการทดสอบ

1. เปิดเครื่อง Milkoscan® 133B ทิ้งไว้ก่อนการใช้งานนานประมาณ 1 ชม.
2. อุ่นตัวอย่างน้ำนม สารเคมี 0.1% triton X และ 0.5% Non foaming stella ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชม. การอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้เม็ดไขมันแตกตัวเป็นเม็ดเล็กๆ ทำให้ไขมันในน้ำนมละลายดีขึ้น ส่วนสารเคมีที่แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จะช่วยรักษาอุณหภูมิภายในเครื่องเมื่อทำการตรวจวัด
3. ทำการล้างเครื่อง เพื่อให้เครื่องสะอาดและไล่อากาศออกจากเครื่องให้หมดก่อนทำการวัด โดยใช้น้ำยา 0.1% triton X และ 0.5% Non foaming stella และน้ำยา 0.1% triton X อีกครั้ง
4. ทำการปรับเครื่องเพื่อให้เครื่องอ่านค่าต่าง ๆ เป็นศูนย์ โดยใช้น้ำยา 0.1% triton X ปริมาตร 40 มล.
5. ทำการใส่หมายเลขตัวอย่างที่วัด หมายเลขครั้งที่วัด และหมายเลขจำนวนตัวอย่างที่ใช้วัด พร้อมทั้งใส่วัน เดือน ปี ที่ใช้เครื่อง
6. ทำการตั้งค่าวิธีที่ใช้วัดตัวอย่าง
7. นำตัวอย่างน้ำนมที่ต้องการวัดใส่ในตะแกรง และนำตัวอย่างเข้าเครื่องตรวจวัดค่าองค์ประกอบภายในน้ำนม
8. ภายหลังจากการวัดตัวอย่างน้ำนม ให้ล้างเครื่องด้วยน้ำยา 0.1% triton X หลายๆ ครั้ง เพื่อให้เครื่องสะอาด
9. ทำความสะอาดอุปกรณ์ส่วนที่ใช้ดูด โดยฉีดน้ำกลั่นล้างคราบน้ำนมแล้วแช่อุปกรณ์ในสารละลาย 0.1% triton X
10. ผ่อนสายพานของเครื่องหลังการใช้งาน
11. ทำความสะอาดขวดใส่น้ำทิ้งที่ออกมาจากเครื่อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมถังรวม โดยวิธี Standard Plate Count (SPC) (Houghtby et al., 1992)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องอบความดันไอน้ำ
2. เครื่องชั่งน้ำหนัก
3. ตู้อบบ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
4. โถใส่จานเพาะเชื้อ
5. จานเพาะเชื้อ จำนวน 6 จาน
6. หลอดไปเปตแก้ว ขนาด 10 มล. จำนวน 5 หลอด
7. โถใส่หลอดไปเปตแก้ว
8. อุปกรณ์ช่วยดูด
9. เครื่องเขย่าผสมสารละลาย
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
11. อาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA) ปริมาตร 4.5 กรัม
12. น้ำกลั่นปริมาตร 200 มล.
13. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ปริมาตร 500 มล. เพื่อใช้ในการเจือจางน้ำนม
14. เครื่องดูดปริมาณสารปริมาตร 1000 มล. และ tips
15. หลอดทดลอง ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ขนาด 16x150 มล. จำนวน 50 หลอด
16. ตะแกรง ใส่หลอดทดลอง จำนวน 1 อัน
17. ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. จำนวน 1 อัน
18. ขวดแก้วดูแลน ขนาด 500 มล. จำนวน 1 ขวด
19. เครื่องกวนสารละลายให้ความร้อน

วิธีเตรียมสารและการทดสอบ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA จำนวน 4.5 กรัม ใส่ใน ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มล. นำไปวางบนเครื่องกวนสารละลายให้ความร้อน จนสารละลายเดือดและใส นำขวดแก้วรูปชมพู่มาปิดขวดด้วยสำลีและกระดาษฟอยด์ ทำการปิดฉลาก และเขียนชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อบนฉลาก
2. เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยชั่งสารโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มล. ปรับค่าพีเอช ด้วย 1 N ของ โซเดียมไฮดรอกไซด์จนได้ค่าพีเอช 7.2 จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มล. นำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยใช้สารละลายฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ปริมาตร 1.25 มล. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 1000 มล. นำเข้าเครื่องอบความดันไอน้ำ เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

3. เตรียมหลอดทดลองขนาด 16x150 มม. จำนวน 50 หลอด ใส่ในตะแกรงและปิดฝาหลอดด้วยจุกพลาสติกทั้งตะแกรง ทำการปิดฉลาก
4. เตรียมจานเพาะเชื้อ และหลอดไปเปตแก้วใส่ในโถ อย่างละ 1 โถ
5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หลอดทดลอง หลอดไปเปต และจานเพาะเชื้อ เข้าเครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15-30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อ ภายหลังการการฆ่าเชื้อให้เก็บอุปกรณ์ไว้ในที่มิดชิดป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อโรค
6. นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจะละลายหมด จากนั้นปรับอุณหภูมิให้ลดลงเหลือที่ระดับ 50 องศาเซลเซียส แช่อาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวจนกว่าจะใช้ในการ pour plate
7. ดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ด้วยอุปกรณ์ช่วยดูดและไปเปตแก้ว ขนาด 10 มล. ให้ได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 9 มล. ใส่ในหลอดทดลอง เพื่อทำการเจือจางน้ำนม
8. นำจานเพาะเชื้อจำนวน 3 จานต่อหนึ่งตัวอย่างน้ำนม มาเขียนเบอร์ถังและระดับการเจือจางบริเวณจานเพาะเชื้อ เช่น เบอร์ถัง 336 10^{-2}
9. ตัวอย่างน้ำนมที่เก็บจากฟาร์มนำมาเขย่า และดูดตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 1 มล. ด้วยเครื่องดูดปริมาณสารใส่ในหลอดที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 9 มล. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเขย่าผสมสารละลาย ประมาณ 15 วินาที เพื่อให้ตัวอย่างละลายเข้ากัน จะได้น้ำนมที่เจือจางแล้วความเข้มข้น 10^{-1} ทำซ้ำข้างต้นจนได้น้ำนมที่เจือจางแล้วความเข้มข้น 10^{-4}
10. เลือกน้ำนมระดับการเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} ตัวอย่างละ 1 มล. ใส่ในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อที่ 1 ทำการ pour plate โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 10-15 มล. ปิดฝาจานเพาะเชื้อ ทำการเขย่าเบาให้ตัวอย่างน้ำนมเข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ ระวังอย่าให้อาหารเลี้ยงเชื้อหกออกจากฝาจานเพาะเชื้อระหว่างเขย่า รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวจึงค่อยกลับจานเพาะเชื้อขึ้น แล้วนำเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใน 10 นาที ตั้งแต่อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว

<u>ข้อควรระวัง</u> ระยะเวลาตั้งแต่การเจือจางน้ำนมจนถึงการ pour plate จานเพาะเชื้อสุดท้ายไม่ควรใช้ระยะเวลาเกิน 20 นาที และอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่ใช้ควรแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ก่อนนำขึ้นมาเทใส่จานเพาะเชื้อ

11. ทำการอบบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48$\pm$3 ชม. ระวังอย่าให้มีความชื้นในตู้อบบ่มมากเกินไปเพราะมีผลกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรปรับการ

ระบายอากาศและระบบอากาศที่หมุนเวียนภายในตู้ เพื่อไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อสูญเสียน้ำหนักเกิน 15% ในช่วงที่อยู่ในตู้อบบ่มนาน 48 ชม.

12. การนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ ภายหลังการอบบ่มด้วยการนับมือ ให้ทำการจดบันทึกเบอร์ถัง 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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)

13. การคำนวณและการรายงานผล

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

ตัวอย่าง

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

เมื่อ N = จำนวนแบคทีเรียที่นับได้เป็นโคโลนีต่อมล.

$\sum C$ = 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

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)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มในน้ำนมถังรวม โดยวิธี Coliform count (CC) ด้วย Violet red bile agar (VRBA) (Christen et al., 1992)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องอบความดันไอน้ำ
2. เครื่องชั่งน้ำหนัก
3. หลอดที่ใช้ในการเจือจางน้ำนม
4. ตู้อบบ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
5. โถใส่จานเพาะเชื้อ
6. จานเพาะเชื้อ จำนวน 6 จาน
7. หลอดไปเปตแก้ว ขนาด 10 มล. จำนวน 5 หลอด
8. โถใส่หลอดไปเปตแก้ว
9. อุปกรณ์ช่วยดูด
10. เครื่องเขย่าผสมสารละลาย
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
12. อาหารเลี้ยงเชื้อ Violet red bile agar (VRBA) ปริมาตร 7.9 กรัม
13. น้ำกลั่นปริมาตร 200 มล.
14. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ปริมาตร 500 มล. เพื่อใช้ในการเจือจางน้ำนม
15. เครื่องดูดปริมาณสารปริมาตร 1000 มล. และ tips
16. หลอดทดลอง ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ขนาด 16x150 มล. จำนวน 50 หลอด
17. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง จำนวน 1 อัน
18. ขวดแก้วรูปชมพู่ ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำขนาด 250 มล. จำนวน 1 ขวด
19. ขวดแก้วดูแลน ขนาด 500 มล. จำนวน 1 ขวด
20. เครื่องกวนสารละลายให้ความร้อน

วิธีเตรียมสารและทดสอบ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ VRBA ปริมาตร 7.9 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มล. นำไปวางบนเครื่องกวนสารละลายให้ความร้อน จนสารละลายเดือดและใส นำขวดแก้วรูปชมพู่ มาปิดขวดด้วยกระดาษฟอยด์ ทำการปิดฉลาก และเขียนชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อบนฉลาก
2. เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยชั่งสารโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มล. ปรับค่าพีเอช ด้วย 1 N ของ โซเดียมไฮดรอกไซด์จนได้ ค่าพีเอช 7.2 จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มล. นำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยใช้สารละลายฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ ปริมาตร 1.25 มล. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 1000 มล. นำเข้าเครื่องอบความดันไอน้ำ เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

3. เตรียมหลอดทดลองขนาด 16x150 มม. จำนวน 50 หลอด ใส่ในตะแกรง และปิดฝาหลอดด้วยจุกพลาสติกทั้งตะแกรง ทำการปิดฉลาก
4. เตรียมจานเพาะเชื้อใส่ในโถ จำนวน 1 โถ และหลอดไปเปตแก้วใส่ในโถ จำนวน 1 โถ
5. นำสารละลาย สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หลอดทดลอง หลอดไปเปต และจานเพาะเชื้อ เข้าเครื่องความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15-30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อ ภายหลังการฆ่าเชื้อให้เก็บอุปกรณ์ไว้ในที่มิดชิดป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อโรค
6. นำอาหารเลี้ยงเชื้อ VRBA วางบนเครื่องกวนสารละลายให้ความร้อน จนสารละลายใส นำอาหารเลี้ยงเชื้อ VRBA มาอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการ pour plate
7. ดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ด้วยอุปกรณ์ช่วยดูดและไปเปตแก้ว ขนาด 10 มล. ให้ได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 9 มล. ใส่ในหลอดทดลอง เพื่อทำการเจือจางน้ำนม
8. นำจานเพาะเชื้อจำนวน 3 จานต่อหนึ่งตัวอย่างน้ำนม มาเขียนเบอร์ถัง และระดับการเจือจางบริเวณจานเพาะเชื้อ เช่น เบอร์ถัง 336 10^{-1}
9. ตัวอย่างน้ำนมที่เก็บจากฟาร์มนำมาเขย่าและดูดตัวอย่างน้ำนมด้วย เครื่องดูดปริมาณสาร ให้ได้น้ำนมปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอด สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 9 มล. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง เครื่องเขย่าผสมสารละลาย ประมาณ 15 วินาที เพื่อให้ตัวอย่างละลายเข้ากัน จะได้น้ำนมที่เจือจางแล้วความเข้มข้น 10^{-1} ทำซ้ำข้างต้นจนได้น้ำนมความเข้มข้นที่เจือจางแล้วประมาณ 10^{-2}
10. เลือกน้ำนมระดับการเจือจาง 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2} ตัวอย่างละ 1 มล. ใส่ในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อที่ 1 ทำการ pour plate โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ VRBA ลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 10-15 มล. ปิดฝาจานเพาะเชื้อ ทำการเขย่าเบา เพื่อให้ตัวอย่างน้ำนมละลายเข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ ระวังอย่าให้อาหารเลี้ยงเชื้อหกออกจากฝาจานเพาะเชื้อระหว่างเขย่า รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวเททับผิวหน้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ VRBA ประมาณ 3-4 มล. รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจึงค่อยกลับจานเพาะเชื้อขึ้น แล้วนำเข้าตู้อบบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใน 10 นาที ตั้งแต่อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว

<u>ข้อควรระวัง</u> ระยะเวลาตั้งแต่การเจือจางน้ำนมจนถึงการ pour plate จานเพาะเชื้อสุดท้ายไม่ควรใช้ระยะเวลาเกิน 20 นาที และอาหารเลี้ยงเชื้อ VRBA ที่ใช้ควรแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ก่อนนำขึ้นมาเทใส่จานเพาะเชื้อ

11. ทำการอบบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24$\pm$2 ชม. ระวังอย่าให้มีความชื้นในตู้อบบ่มมากเกินไปเพราะมีผลกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

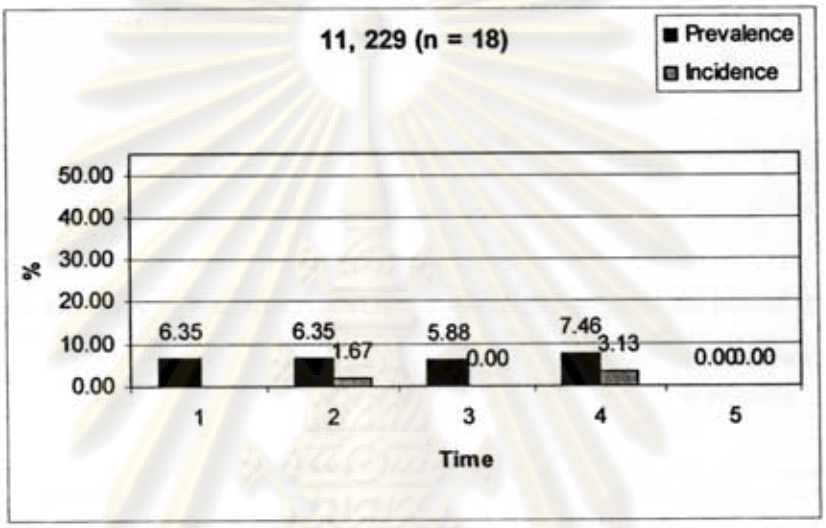
12. การนับจำนวนแบคทีเรีย ให้นับแบคทีเรียที่มีสีแดง ชมพูเข้มขนาดใหญ่กว่า 0.5 ซม.
13. การรายงานผล จะนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อในช่วง 15-150 โคโลนี
    a. จำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อมีค่า 15-150 โคโลนี ให้นับจำนวนแบคทีเรียที่นับได้คูณกลับด้วยระดับการเจือจางที่นับได้จะได้จำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มเป็นโคโลนีต่อมล.
    b. จำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อมีค่าน้อยกว่า 15 โคโลนี ให้นับจำนวนแบคทีเรียในระดับการเจือจางต่ำสุด และรายงานผล มีจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มน้อยกว่า 15 โคโลนีต่อมล.
    c. ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย ให้รายงานผล มีจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มน้อยกว่า 15 โคโลนีต่อมล.
    d. จำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อมีค่ามากกว่า 150 โคโลนี ให้นับจำนวนแบคทีเรียในระดับการเจือจางสูงสุดและรายงานผล มีจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มมากกว่า 150 โคโลนีที่ระดับการเจือจางสูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

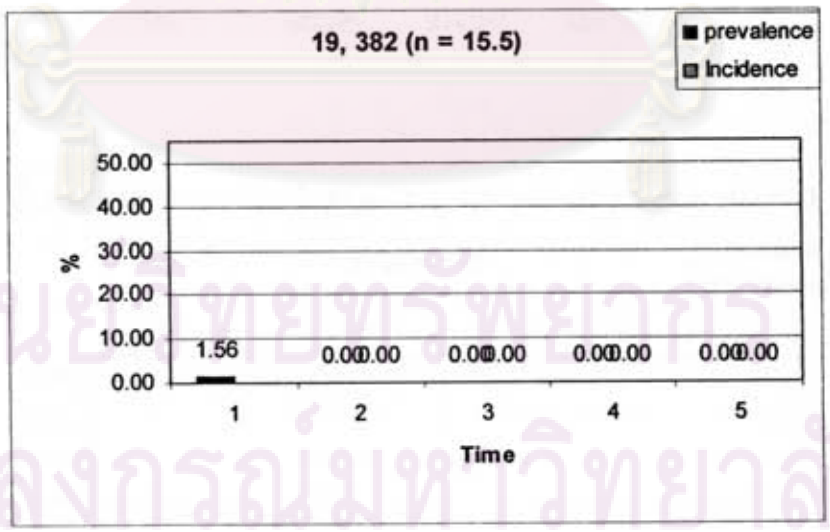
ภาคผนวก ค

ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านม แม่โครีดน้ำนมระดับรายเต้านมในแต่ละฟาร์ม

แผนภูมิแท่งที่ 1 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 11, 229

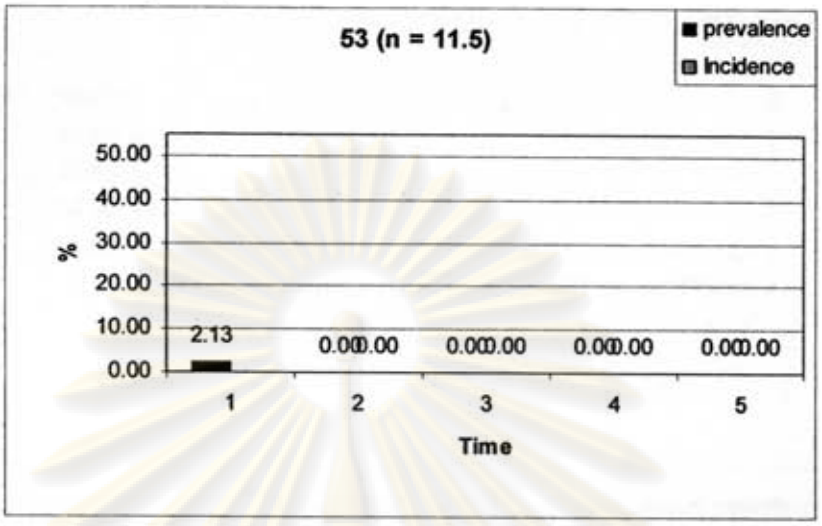


แผนภูมิแท่งที่ 2 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 19, 382

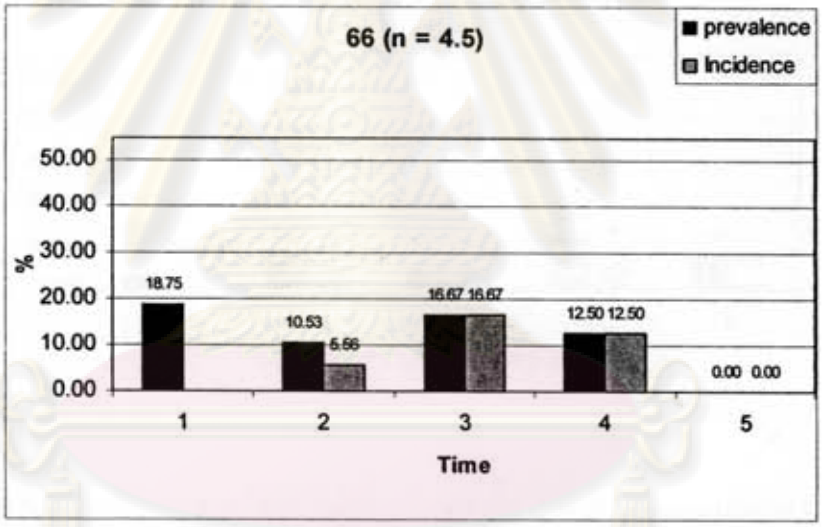


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

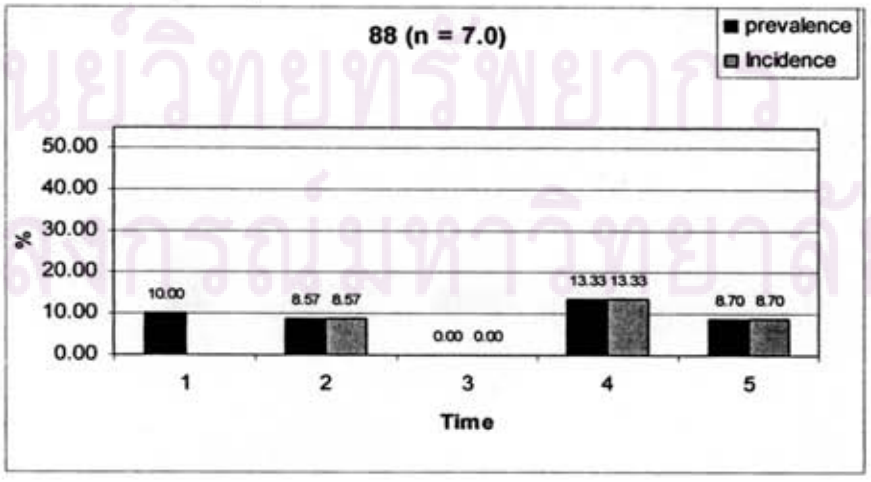
แผนภูมิแท่งที่ 3 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 53



แผนภูมิแท่งที่ 4 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 66

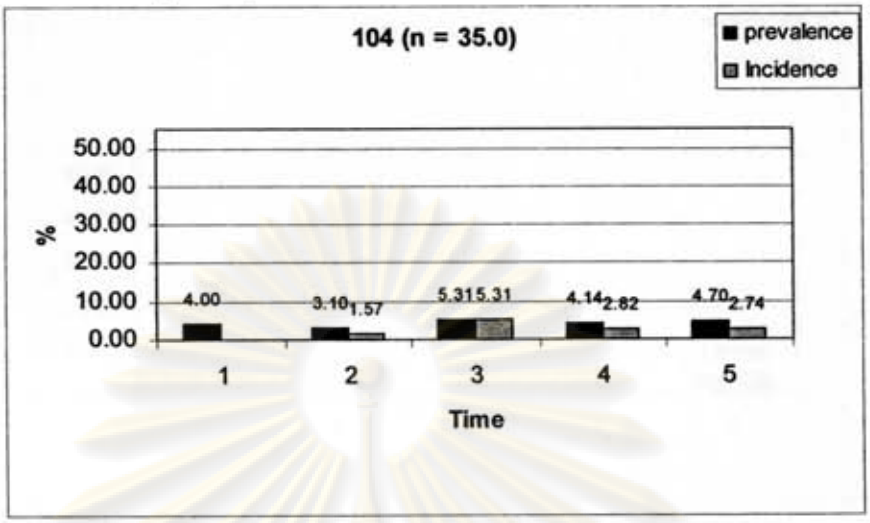


แผนภูมิแท่งที่ 5 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 88

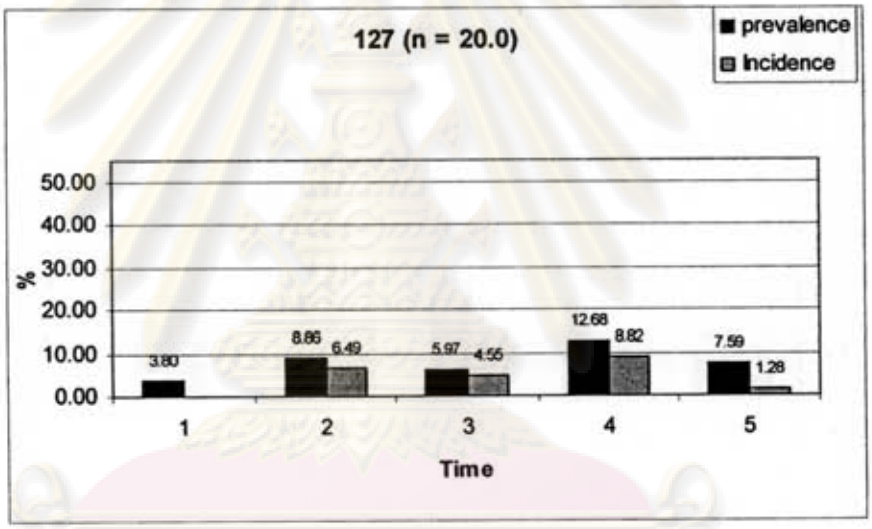


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

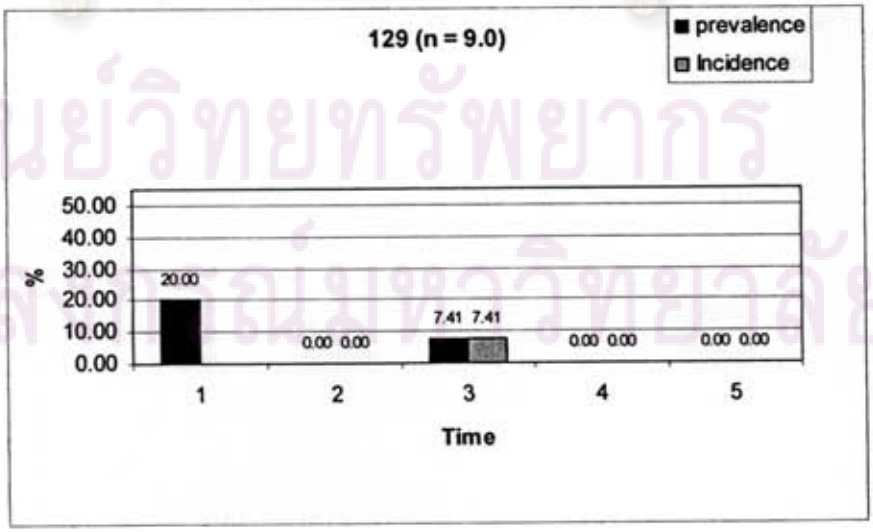
แผนภูมิแท่งที่ 6 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 104



แผนภูมิแท่งที่ 7 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 127

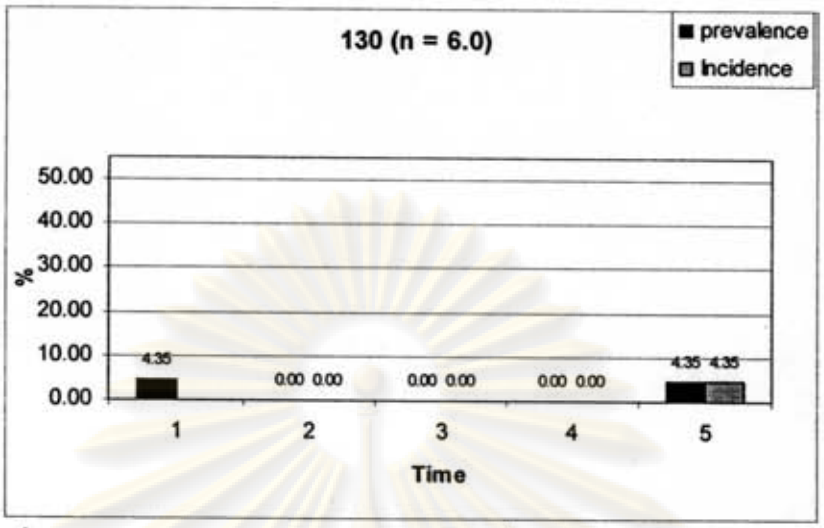


แผนภูมิแท่งที่ 8 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 129

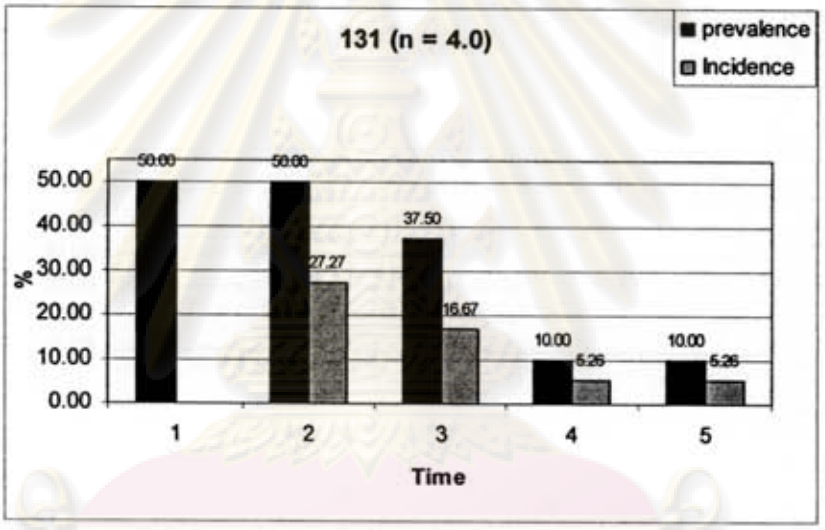


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

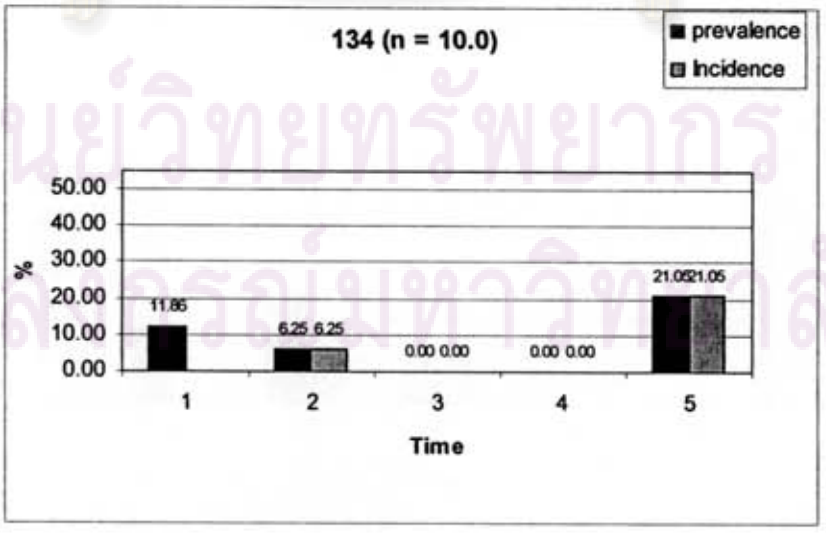
แผนภูมิแท่งที่ 9 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 130



แผนภูมิแท่งที่ 10 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 131

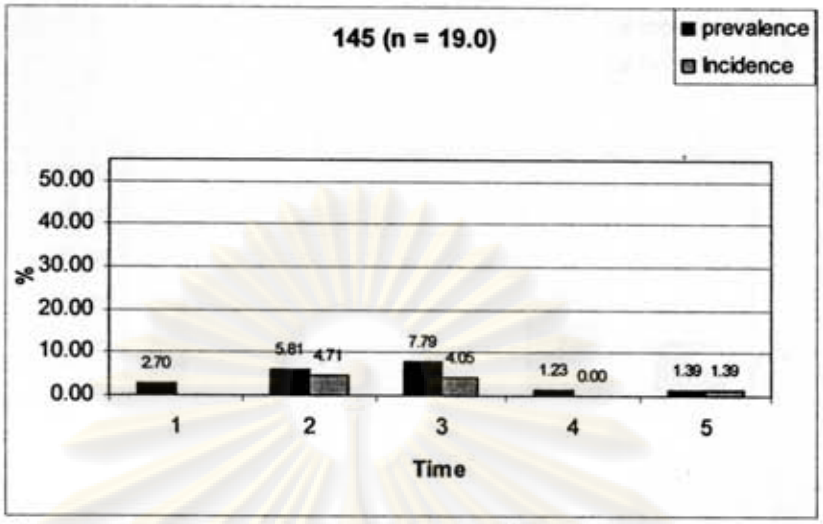


แผนภูมิแท่งที่ 11 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 134

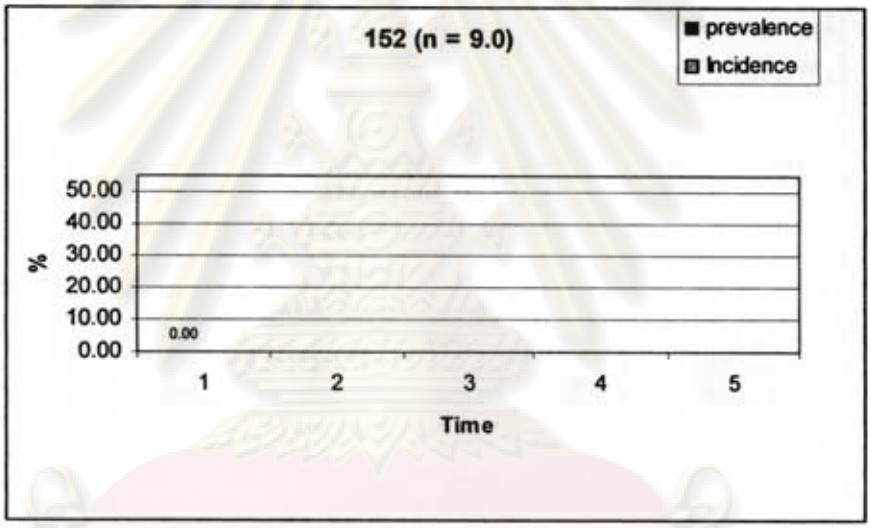


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

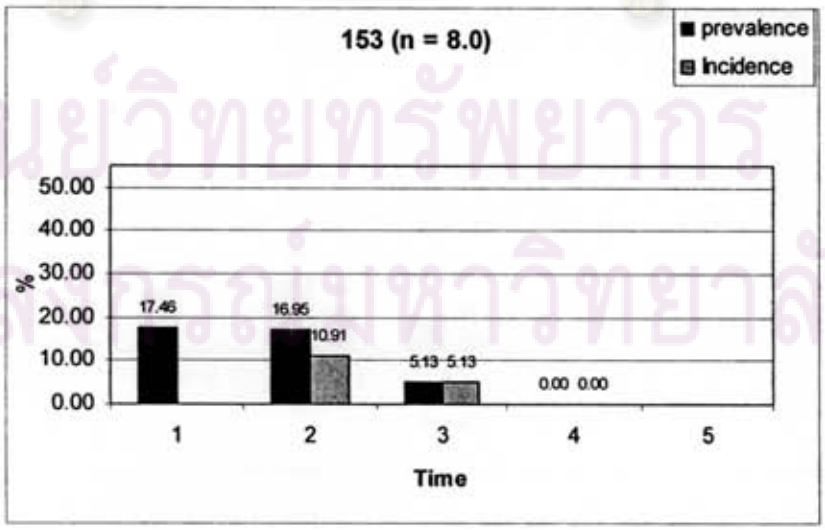
แผนภูมิแท่งที่ 12 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 145



แผนภูมิแท่งที่ 13 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 152

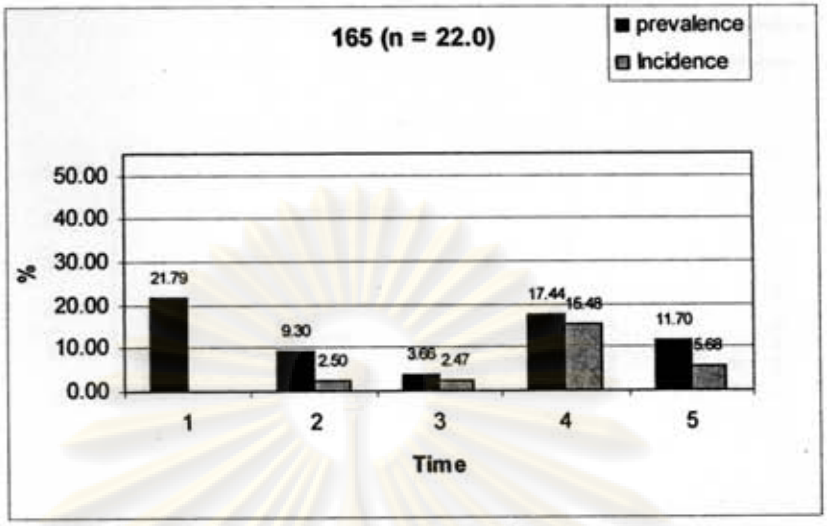


แผนภูมิแท่งที่ 14 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 153

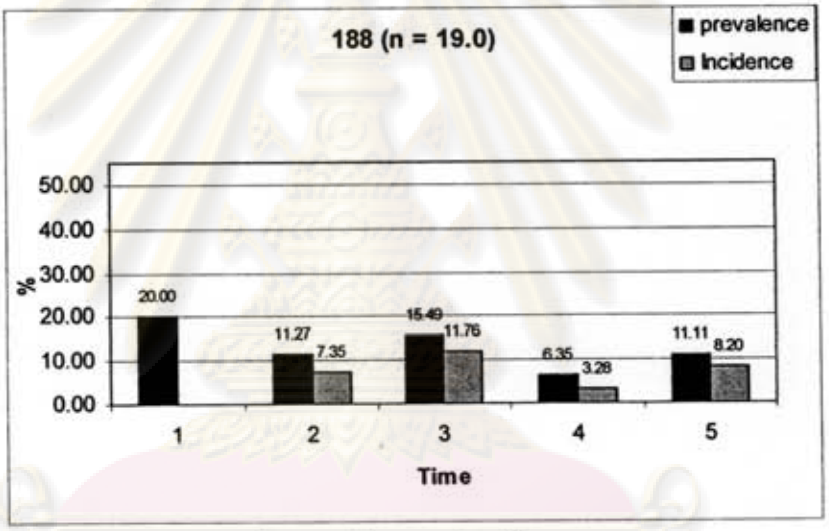


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

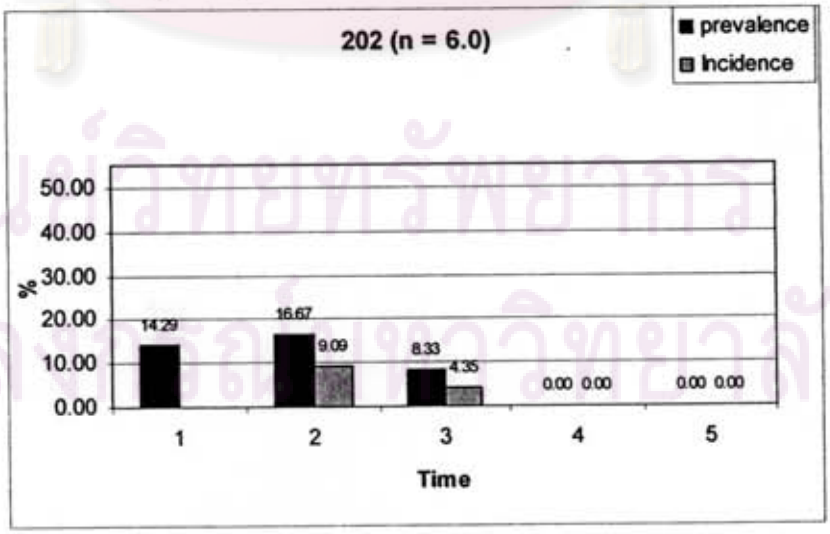
แผนภูมิแท่งที่ 15 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 165



แผนภูมิแท่งที่ 16 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 188

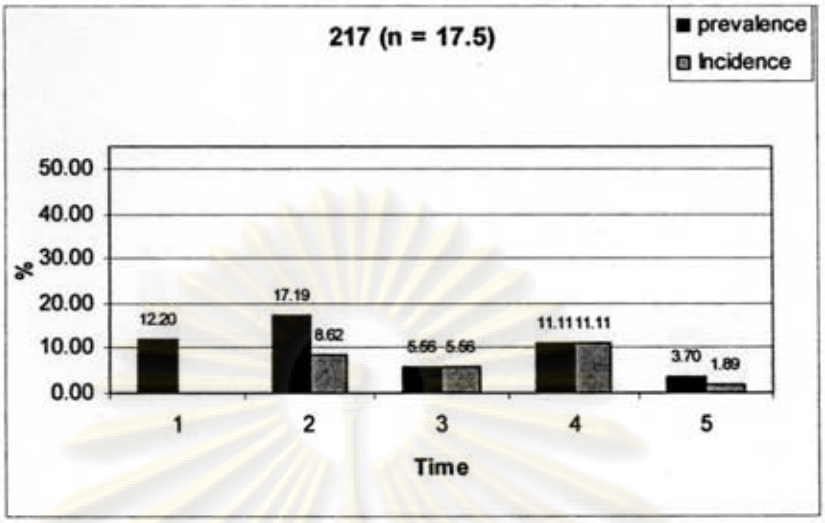


แผนภูมิแท่งที่ 17 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 202

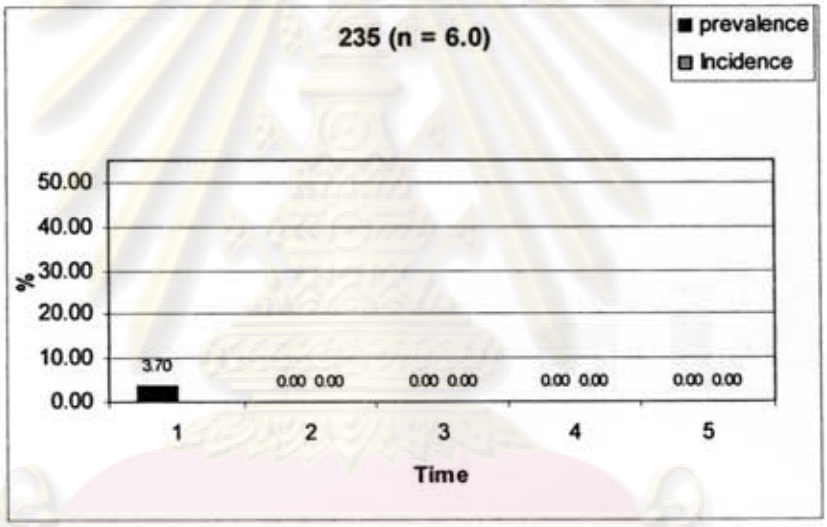


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

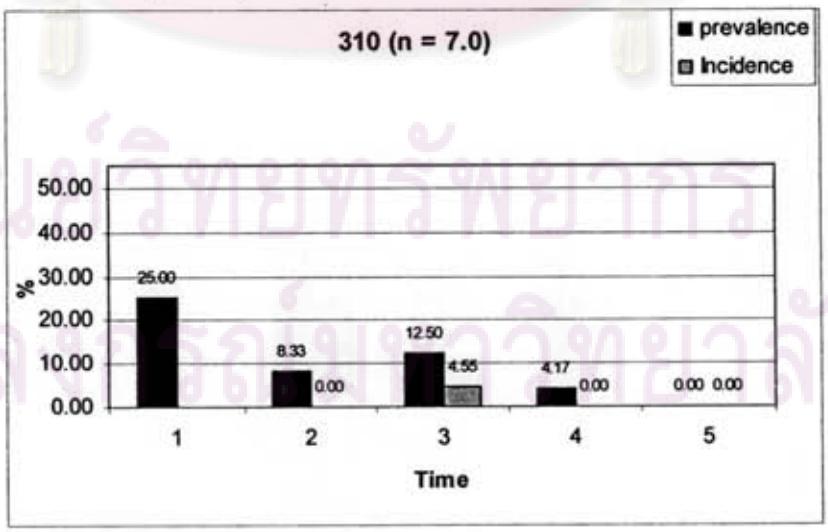
แผนภูมิแท่งที่ 18 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 217



แผนภูมิแท่งที่ 19 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 235

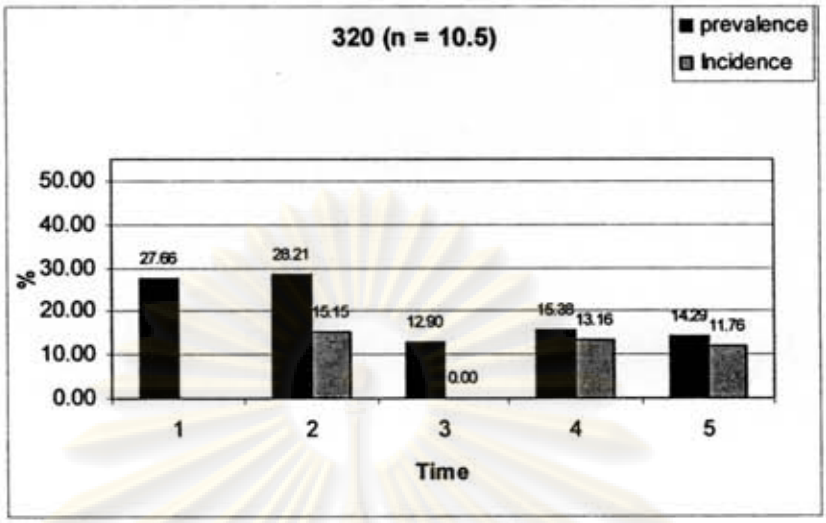


แผนภูมิแท่งที่ 20 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 310

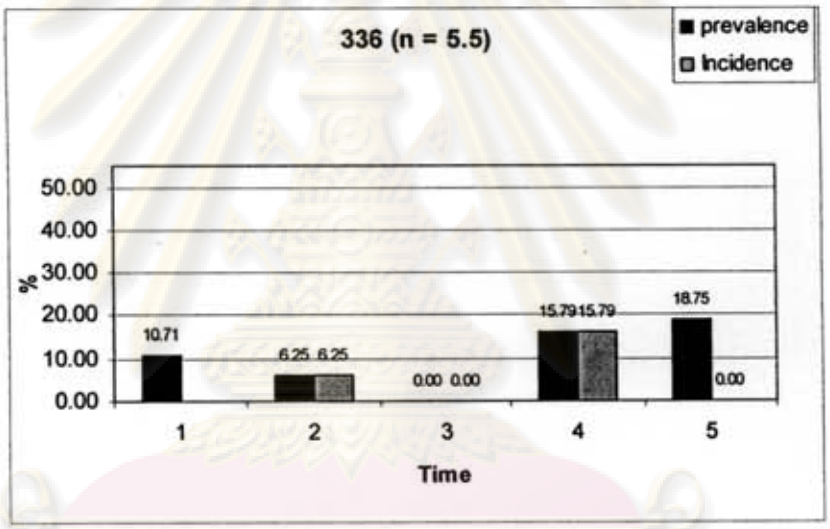


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

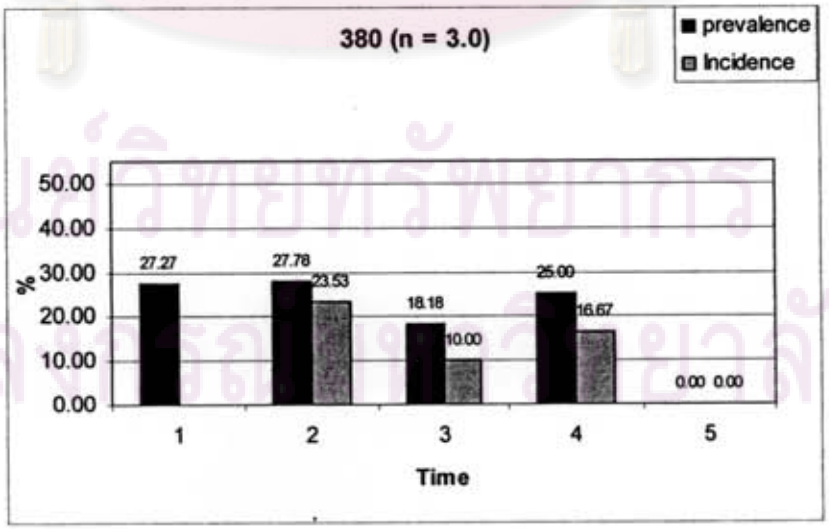
แผนภูมิแท่งที่ 21 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 320



แผนภูมิแท่งที่ 22 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 336

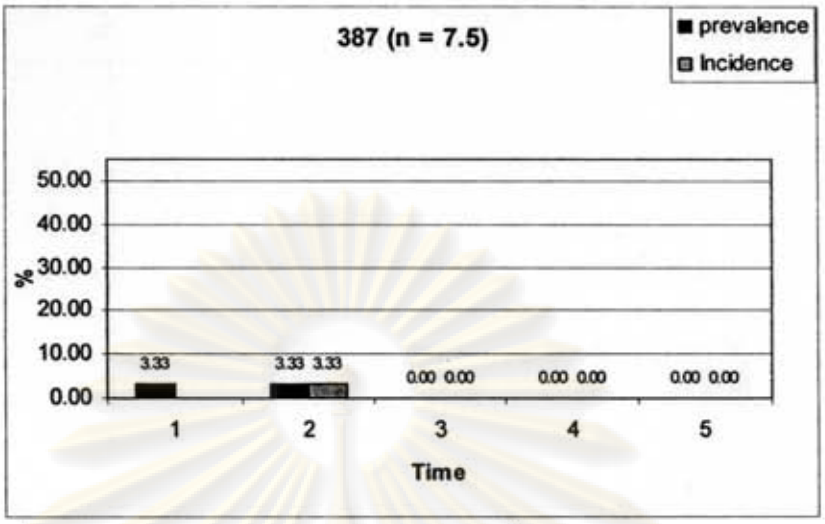


แผนภูมิแท่งที่ 23 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 380

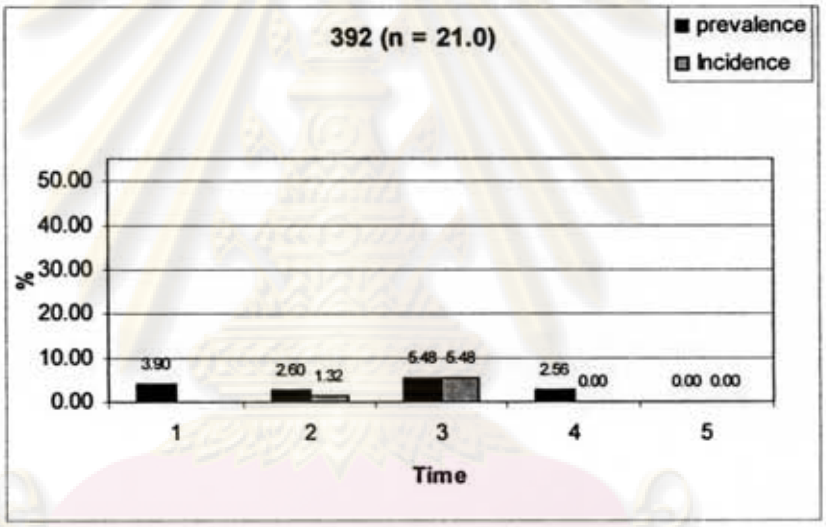


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

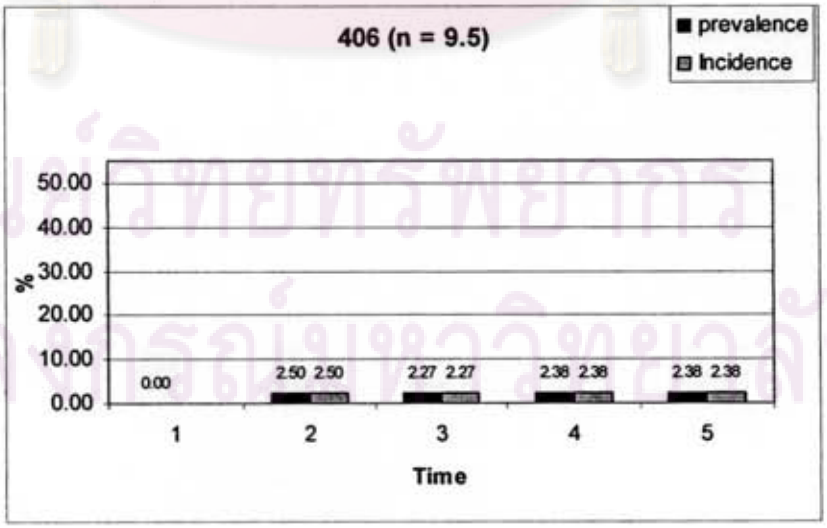
แผนภูมิแท่งที่ 24 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 387



แผนภูมิแท่งที่ 25 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 392

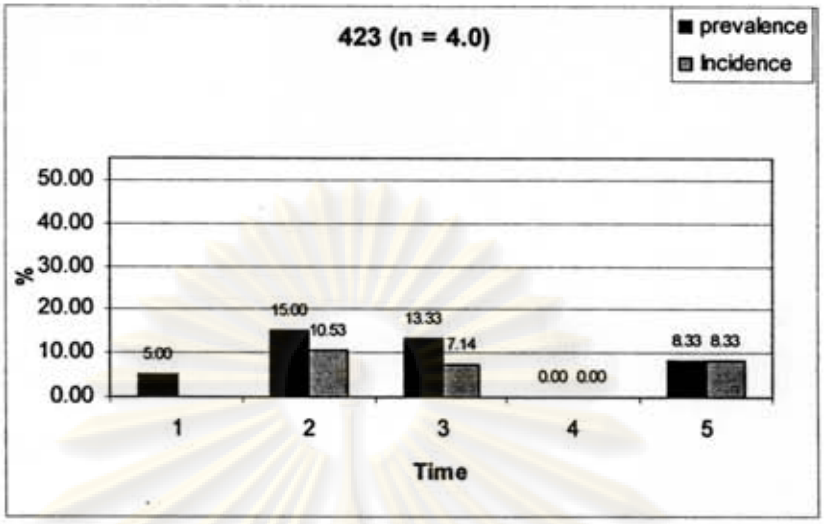


แผนภูมิแท่งที่ 26 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 406

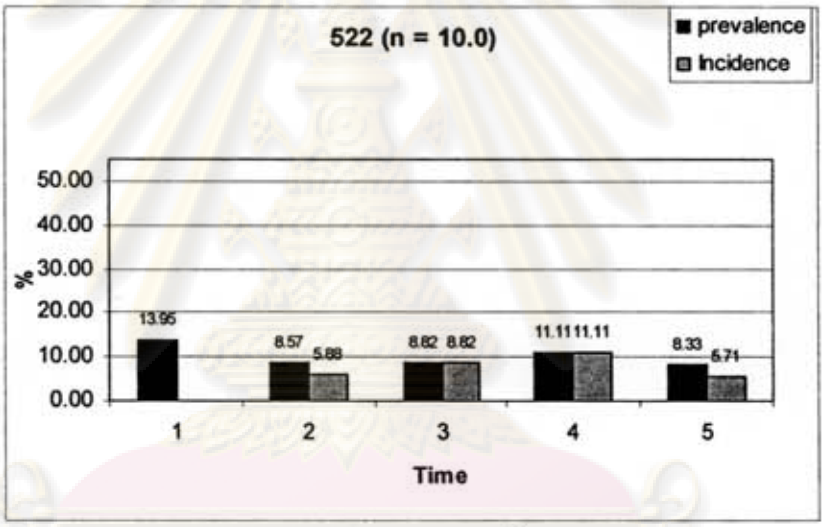


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

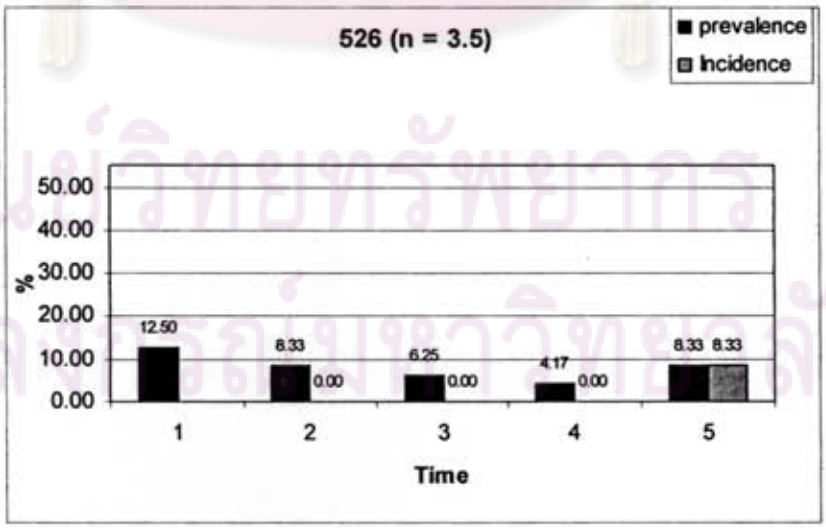
แผนภูมิแท่งที่ 27 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 423



แผนภูมิแท่งที่ 28 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 522

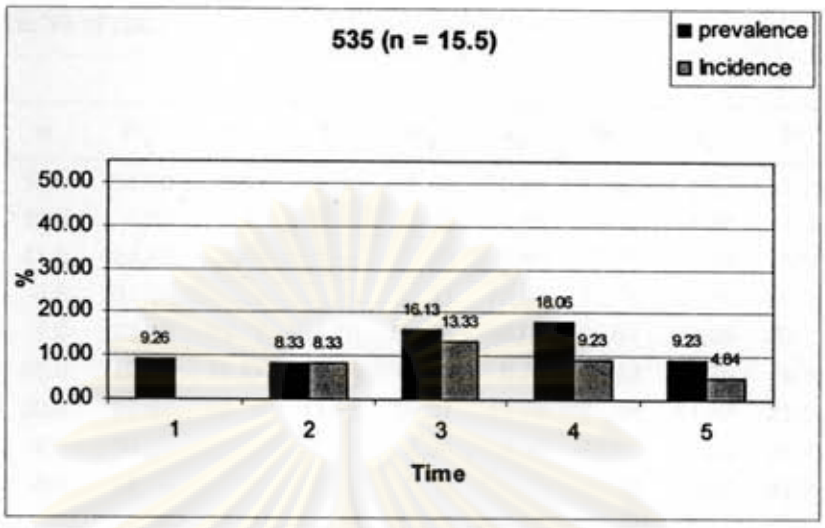


แผนภูมิแท่งที่ 29 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 526



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภูมิแท่งที่ 30 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เบอร์ถัง 535



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่เต้านมแม่โครีดน้ำนมระดับรายเต้านม จำนวน 30 ฟาร์ม

ID	n	P_1	P_2	I_2	P_3	I_3	P_4	I_4	P_5	I_5
11,229	18.0	12.69	12.69	3.50	5.88	0.00	13.43	9.37	3.79	3.79
19,382	15.5	4.68	16.17	16.17	1.56	1.56	3.12	1.58	8.33	6.77
53	11.5	14.89	11.62	9.52	27.50	23.68	2.08	2.08	15.90	15.90
66	4.5	31.25	31.57	7.14	33.33	20.00	18.75	18.75	20.00	20.00
88	7.0	23.33	45.71	38.70	58.06	38.09	56.67	38.09	39.13	6.67
104	35.0	12.00	16.27	10.74	10.34	5.79	13.42	9.79	4.79	3.47
127	20.0	27.84	28.73	11.42	25.37	13.79	23.94	11.47	21.51	7.46
129	9.0	34.28	21.73	21.73	14.81	8.00	42.85	39.39	31.42	14.28
130	6.0	17.39	9.67	9.67	5.26	0.00	5.26	0.00	17.39	17.39
131	4.0	100.00	93.75	80.00	58.33	23.07	30.00	22.22	45.00	26.67
134	10.0	23.72	6.25	6.25	21.42	18.51	0.00	0.00	63.15	63.15
145	19.0	5.40	19.76	15.85	32.46	25.71	11.11	2.70	19.44	13.43
152	9.0	17.14	.	.	.	.	.	.	.	.
153	8.0	25.39	18.64	7.69	10.25	2.78	16.36	11.53	.	.
165	22.0	30.76	31.39	10.60	20.73	8.45	32.55	19.44	25.53	14.63
188	19.0	29.41	22.53	9.83	36.61	22.41	23.80	11.11	33.33	22.22
202	6.0	21.43	20.83	5.00	29.17	15.00	6.25	6.25	0.00	0.00
217	17.5	34.14	31.25	15.38	12.96	12.96	33.33	29.41	24.07	12.76
235	6.0	14.81	12.50	8.69	4.16	0.00	5.00	0.00	10.00	5.26
310	7.0	25.00	16.67	9.09	12.50	12.50	12.50	12.50	25.00	22.58
320	10.5	48.93	43.58	21.42	58.06	31.57	33.33	10.34	40.00	25.00
336	5.5	28.57	18.75	7.14	6.25	6.25	15.78	15.78	31.25	15.38
380	3.0	31.81	55.55	50.00	40.90	13.33	55.00	40.00	.	.
387	7.5	36.67	46.67	20.00	25.80	14.81	32.25	16.00	57.14	33.33
392	21.0	20.77	9.09	6.67	17.80	14.28	17.94	11.11	2.35	1.19
406	9.5	12.50	22.50	20.51	11.36	4.87	9.52	9.52	28.57	23.07
423	4.0	20.00	20.00	5.88	33.33	16.67	18.75	7.14	25.00	10.00
522	10.0	37.20	28.57	13.79	35.29	26.67	38.88	31.25	61.11	46.15
526	3.5	12.50	8.33	0.00	6.25	0.00	8.33	4.34	16.67	16.67
535	15.5	14.81	29.16	26.08	29.03	12.00	30.55	12.28	29.23	8.00
min	3.0	4.7	6.3	0.0	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
mean	11.5	25.6	25.9	16.2	23.6	13.5	21.1	13.9	25.9	16.9
max	35.0	100.0	93.8	80.0	58.3	38.1	56.7	40.0	63.2	63.2

เมื่อ ID = เบอร์ถังสมาชิกสหกรณ์ n = จำนวนโครีดนม (ตัว) ($n = (n_1+n_5)/2$)
P = ความชุกครั้งที่ 1-5 I = อุบัติการณ์ครั้งที่ 2-5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ความชุกและอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Streptococcus uberis* เข้าสู่เต้านมระดับรายเต้านม จำนวน 30 ฟาร์ม

ID	n	P_1	P_2	I_2	P_3	I_3	P_4	I_4	P_5	I_5
11,229	18.0	6.35	6.35	1.67	5.88	0.00	7.46	3.13	0.00	0.00
19,382	15.5	1.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
53	11.5	2.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
66	4.5	18.75	10.53	5.56	16.67	16.67	12.50	12.50	0.00	0.00
88	7.0	10.00	8.57	8.57	0.00	0.00	13.33	13.33	8.70	8.70
104	35.0	4.00	3.10	1.57	5.31	5.31	4.83	2.82	4.70	2.74
127	20.0	3.80	8.86	6.49	5.97	4.55	12.68	8.82	7.59	1.28
129	9.0	20.00	0.00	0.00	7.41	7.41	0.00	0.00	0.00	0.00
130	6.0	4.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.35	4.35
131	4.0	50.00	50.00	27.27	37.50	16.67	10.00	5.26	10.00	5.26
134	10.0	11.86	6.25	6.25	3.57	3.57	0.00	0.00	21.05	21.05
145	19.0	2.70	5.81	4.71	7.79	4.05	1.23	0.00	1.39	1.39
152	9.0	0.00	.	.	.	.	.	.	.	.
153	8.0	17.46	16.95	10.91	5.13	5.13	0.00	0.00	.	.
165	22.0	21.79	9.30	2.50	3.66	2.47	17.44	15.48	13.83	7.95
188	19.0	20.00	11.27	7.35	15.49	11.76	6.35	3.28	11.11	8.20
202	6.0	14.29	16.67	9.09	8.33	4.35	0.00	0.00	0.00	0.00
217	17.5	12.20	17.19	8.62	7.41	7.41	11.11	11.11	3.70	1.89
235	6.0	3.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
310	7.0	25.00	8.33	0.00	12.50	4.55	4.17	0.00	0.00	0.00
320	10.5	27.66	28.21	15.15	12.90	0.00	15.38	13.16	14.29	11.76
336	5.5	10.71	6.25	6.25	0.00	0.00	15.79	15.79	18.75	0.00
380	3.0	27.27	27.78	23.53	18.18	10.00	25.00	16.67	.	.
387	7.5	3.33	3.33	3.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
392	21.0	3.90	2.60	1.32	5.48	5.48	2.56	0.00	0.00	0.00
406	9.5	0.00	2.50	2.50	2.27	2.27	2.38	2.38	2.38	2.38
423	4.0	5.00	15.00	10.53	13.33	7.14	0.00	0.00	8.33	8.33
522	10.0	13.95	8.57	5.88	8.82	8.82	11.11	11.11	8.33	5.71
526	3.5	12.50	8.33	0.00	6.25	0.00	4.17	0.00	8.33	8.33
535	15.5	9.26	8.33	8.33	16.13	13.33	18.06	9.23	9.23	4.84
min	3.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
mean	11.47	12.12	10.00	6.12	7.79	4.86	6.74	4.97	5.78	3.86
max	35.0	50.00	50.00	27.27	37.50	16.67	25.00	16.67	21.05	21.05

เมื่อ ID = เบอร์ถังสมาชิกสหกรณ์ n = จำนวนโครีดนม (ตัว) ($n = (n_1+n_5)/2$)

P = ความชุกครั้งที่ 1-5 I = อุบัติการณ์ครั้งที่ 2-5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ร้อยละของเชื้อ *Streptococcus uberis* ที่แพร่กระจายสู่ถังน้ำนมรวมของฟาร์ม

farm ID	MW	log BT TPC	log BT SU	% SU	log BT CC	% CC	log BT SCC
11, 229	77.50	9.29	8.27	**9.529976**	1.60	0.16	3.92
66	9.80	8.61	7.34	5.335277	2.40	0.60	5.12
88	17.90	9.76	7.81	1.117668	1.38	0.01	6.38
104	179.00	10.02	7.40	0.237133	4.03	18.14	5.31
104	152.40	11.11	8.03	0.081877	2.40	0.03	5.79
127	48.60	10.72	7.10	0.024347	4.36	2.15	5.94
127	67.60	10.97	7.75	0.059353	3.08	0.09	5.21
131	14.10	9.75	7.67	0.819858	.	.	6.29
131	11.50	8.98	7.08	1.265584	0.48	0.00	6.18
131	13.00	8.85	6.84	0.962238	1.11	0.02	6.19
134	9.70	9.14	7.41	1.888185	3.03	0.76	6.74
145	90.70	9.43	8.13	4.966031	3.08	4.00	5.82
153	39.00	9.73	6.13	0.025088	2.78	0.43	5.68
165	66.90	9.83	7.97	1.395229	3.66	4.60	5.46
165	56.10	9.75	7.78	1.079245	3.49	3.10	5.54
188	51.00	10.68	7.89	0.163254	3.58	0.40	4.92
188	46.20	10.11	7.41	0.200085	3.96	3.31	5.88
188	49.70	10.26	7.01	0.056001	2.30	0.05	5.78
202	21.10	9.27	7.73	2.891350	1.98	0.11	6.18
217	54.10	10.01	6.72	0.051484	3.11	0.68	5.65
310	21.80	10.28	6.85	0.036489	0.78	0.00	5.15
320	21.00	8.80	7.66	7.246704	0.70	0.02	6.03
320	25.50	8.75	6.80	1.123061	2.02	0.48	5.92
320	30.30	8.69	7.42	5.388364	2.00	0.63	5.76
392	67.60	10.94	6.28	0.002189	.	.	5.40
392	50.80	10.23	7.32	0.122464	4.23	5.02	4.74
392	45.70	10.90	7.26	0.023109	5.46	16.66	5.16
392	60.60	11.93	6.65	0.000534	6.00	7.13	5.66
406	24.20	10.71	4.68	**0.000094**	3.04	0.05	5.40
423	4.90	7.40	6.08	4.841937	.	0.00	5.73
522	25.70	9.31	7.36	1.125448	4.18	19.37	5.65
522	20.90	9.55	6.64	0.123895	3.06	0.68	5.58
526	35.80	8.62	6.92	1.976794	2.30	1.71	4.98
526	18.70	8.18	6.60	2.634185	2.03	1.33	5.00
535	63.50	10.25	6.61	0.022742	3.88	2.71	5.28
535	59.50	10.67	7.43	0.057153	4.42	3.34	5.84

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อ farm ID คือ เบอร์สมาชิกสหกรณ์ MW คือ น้ำหนักน้ำนมถังรวม (กก.)
log BT TPC คือ ค่า log ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังน้ำนมรวม
log BT SU คือ ค่า log ของจำนวนแบคทีเรีย *Streptococcus uberis* ในถังน้ำนมรวม
% SU คือ ร้อยละของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus uberis* ที่แพร่กระจายสู่ถังน้ำนมรวม
log BT CC คือ ค่า log ของจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มในถังน้ำนมรวม
% CC คือ ร้อยละของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคไลฟอร์มที่แพร่กระจายสู่ถังน้ำนมรวม
log BT SCC คือ ค่า log ของจำนวนเซลล์โซมาติกในถังน้ำนมรวม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องมาตรฐานการรับซื้อน้ำนมดิบ 10 พ.ย. พ.ศ. 2549

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

เรื่อง มาตรฐานการรับซื้อน้ำนมดิบ

.....

โดยที่ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์เห็นเป็นการสมควรในการกำหนดมาตรฐานการรับซื้อน้ำนมดิบ ซึ่งจะใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาการรับซื้อ และราคารับซื้อน้ำนมดิบให้ใช้เป็นเกณฑ์เดียวกันกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จึงได้ออกประกาศกำหนดมาตรฐานการรับซื้อน้ำนมดิบไว้ดังต่อไปนี้

๑. คุณภาพทั่วไปของน้ำนมดิบ ซึ่งจะใช้เป็นเกณฑ์พิจารณาการรับซื้อ

๑.๑. เป็นน้ำนมดิบที่รีดได้จากแม่โคโดยตรงไม่มีการสกัดหรือผสมสารชื่นใดในน้ำนมดิบ

๑.๒. น้ำนมดิบที่ส่งถึงผู้ซื้อจะต้องเก็บรักษาไว้ไม่เกิน ๒๔ ชั่วโมง

๑.๓. น้ำนมดิบต้องมีสี กลิ่น รส ตามธรรมชาติ

๑.๔. อุณหภูมิของน้ำนมดิบต้องไม่เกิน ๘ องศาเซลเซียส ณ หน้าโรงงาน

๑.๕. ความถ่วงจำเพาะตรวจโดย Lactodensimeter มีค่าระหว่าง ๑.๐๒๖ – ๑.๐๓๐ ที่ ๒๐ องศาเซลเซียส หรือ ระหว่าง ๑.๐๒๘ – ๑.๐๓๔ ที่ ๑๕ องศาเซลเซียส

๑.๖. ไม่มีการตกตะกอนของโปรตีน เมื่อทดสอบด้วย Ethyl alcohol test ที่ความเข้มข้นร้อยละ ๗๕ ในอัตราส่วน ๑ : ๑ โดยปริมาตร

๑.๗. ไม่มีการจับตัวกันเป็นก้อนโดยวิธีการต้ม (Clot on boiling test)

๑.๘. ตรวจด้วย Methylene blue test เกินกว่า ๔ ชั่วโมง หรือ Resazurin test ๑ ชั่วโมง ไม่ต่ำกว่า ๔.๕ point วิธีใดวิธีหนึ่ง

๑.๙. มีค่าความเป็นกรดไม่เกิน ๐.๑๖ ของกรดแลคติค (Lactic acid) ค่า pH ๖.๖๐ – ๖.๘๐

๑.๑๐. ต้องตรวจไม่พบสารปฏิชีวนะ โดยการตรวจเบื้องต้น เช่น วิธี Delvo test หรือเทียบเท่าหรือสูงกว่า

๑.๑๑. ไม่พบสารตกค้างที่เป็นพิษ เช่น ยาฆ่าแมลง และสารพิษจากเชื้อรา ในเกณฑ์ปริมาณที่ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) กำหนดหรือตามมาตรฐานสากล

/๑.๑๒. ไม่พบ..

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๑.๑๒. ไม่พบสารปนเปื้อนอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide), คลอรีน หรือ อื่นๆ

๑.๑๓. จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบโดยการตรวจด้วยวิธี Direct Microscopic Count ไม่มากกว่า ๑,๕๐๐,๐๐๐ กลุ่มต่อ ลบ.ซม. ซึ่งจะบังคับใช้หลักเกณฑ์ข้อนี้ตั้งแต่วันที่ ๑ มีนาคม ๒๕๔๙ เป็นต้นไป

๒. องค์ประกอบของน้ำนมดิบ ซึ่งจะใช้เป็นเกณฑ์การพิจารณาด้านราคา

๒.๑. กำหนดราคาตามปริมาณของแข็งรวม (Total Solids : TS) ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงตามปริมาณของแข็งรวม ที่วิเคราะห์ได้ ดังนี้

ร้อยละของปริมาณของแข็งรวม (TS) น้อยกว่า๑๒.๐๐ ลดลง ๐.๒๐ บาทต่อ กก.
ร้อยละของปริมาณของแข็งรวม(TS) ๑๒.๐๐ - ๑๒.๒๙ ลดลง ๐.๑๐ บาทต่อ กก.
ร้อยละของปริมาณของแข็งรวม(TS) ๑๒.๓๐ – ๑๒.๕๙ เพิ่มขึ้น ๐.๐๐ บาทต่อ กก.
ร้อยละของปริมาณของแข็งรวม(TS) ๑๒.๖๐ – ๑๒.๘๙ เพิ่มขึ้น ๐.๑๐ บาทต่อ กก.
ร้อยละของปริมาณของแข็งรวม(TS) มากกว่าหรือเท่ากับ ๑๒.๙๐ เพิ่มขึ้น ๐.๒๐ บาทต่อ กก.

๓ คุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์

๓.๑. จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบโดยการตรวจด้วยวิธี Standard Plate Count (SPC) มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของราคา ดังนี้

น้อยกว่า ๑๕๐,๐๐๐ โคโลนี ต่อ ลบ.ซม. เพิ่มขึ้น ๐.๒๐ บาท/กก.
๑๕๐,๐๐๐ – ๓๐๐,๐๐๐ โคโลนี ต่อ ลบ.ซม. เพิ่มขึ้น ๐.๑๐ บาท/กก.
๓๐๐,๐๐๑ – ๕๐๐,๐๐๐ โคโลนี ต่อ ลบ.ซม. เพิ่มขึ้น ๐.๐๐ บาท/กก.
๕๐๐,๐๐๑ – ๗๐๐,๐๐๐ โคโลนี ต่อ ลบ.ซม. ลดลง ๐.๑๐ บาท/กก.
มากกว่า ๗๐๐,๐๐๐ โคโลนี ต่อ ลบ.ซม. ลดลง ๐.๒๐ บาท/กก.

๓.๒. จำนวนเม็ดเลือดขาว (Somatic Cell Count) มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของราคา ดังนี้

น้อยกว่า ๑๕๐,๐๐๐ เซลล์ ต่อ ลบ.ซม. เพิ่มขึ้น ๐.๒๐ บาท/กก.
๑๕๐,๐๐๐ – ๓๐๐,๐๐๐ เซลล์ ต่อ ลบ.ซม. เพิ่มขึ้น ๐.๑๐ บาท/กก.
๓๐๐,๐๐๑ – ๕๐๐,๐๐๐ เซลล์ ต่อ ลบ.ซม. เพิ่มขึ้น ๐.๐๐ บาท/กก.
๕๐๐,๐๐๑ – ๗๐๐,๐๐๐ เซลล์ ต่อ ลบ.ซม. ลดลง ๐.๑๐ บาท/กก.
มากกว่า ๗๐๐,๐๐๐ เซลล์ ต่อ ลบ.ซม. ลดลง ๐.๒๐ บาท/กก.

๔. จุดเยือกแข็ง (Freezing Point)

ค่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี Cryoscopic Method ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ สูงกว่าหรือเท่ากับ -๐.๕๒๐ องศาเซลเซียส จะมีการลดลงของราคา ดังนี้

/- ๐.๕๑๙...

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

-๐.๕๑๙ ถึง -๐.๕๑๕	องศาเซลเซียส	ลดลง ๐.๑๐ บาท/กก.
-๐.๕๑๔ ถึง -๐.๕๑๐	องศาเซลเซียส	ลดลง ๐.๒๐ บาท/กก.
อุณหภูมิสูงกว่า -๐.๕๑๐	องศาเซลเซียส	ลดลง ๑.๐๐ บาท/กก. หรือ ส่งคืน

สหกรณ์/ศูนย์รวมนม

ประกาศ ณ วันที่ ๑๐ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๔๙

(นายรุ่งเรือง อิศรางกูร ณ อยุธยา)
รัฐมนตรีช่วยว่าการฯ ปฏิบัติราชการแทน
รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศริญญา ฤกษ์อยู่สุข เกิดเมื่อวันที่ 15 มกราคม 2524 จบการศึกษา สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2548 เข้าทำงานเป็นผู้ช่วยวิจัยให้กับอาจารย์นายสัตวแพทย์ธีรวัฒน์ สว่างจันทร์อุทัย ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ รศ.น.สพ.ดร.กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นระยะเวลา 1 ปี หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย