สถานการณ์โรคเต้านมอักเสบของโคนม ในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง และการพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบในโคนม

วิทยานิพนธ์

ของ

มงคล ประทุมมณี

เสนอต่อมหาวิทยาลัยทักษิณ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ตุลาคม 2548

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยทักษิณ

ISBN 974-451-771-9

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยทักษิณได้

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)

..... กรรมการ
(อาจารย์สุชาติ สุขสถิตย์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไชยวรรณ วัฒนจันทร์)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)

..... กรรมการ
(อาจารย์สุชาติ สุขสถิตย์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไชยวรรณ วัฒนจันทร์)

..... กรรมการเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมภพ อินทสุวรรณ)

..... กรรมการเพิ่มเติม
(อาจารย์นพดล ศุกระกาญจน์)

มหาวิทยาลัยทักษิณ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยทักษิณได้

..... รักษาการตำแหน่งคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. สมศักดิ์ โชคนุกูล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ชื่อ-สกุลผู้ทำวิทยานิพนธ์: นายมงคล ประทุมมณี

ชื่อวิทยานิพนธ์: สถานการณ์โรคเต้านมอักเสบของโคนม ในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง และการพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบในโคนม

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา: ชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ / บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยทักษิณ

ปี พ.ศ. 2548

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นุกูล อินทระสังขา
อาจารย์สุชาติ สุขสถิตย์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไชยวรรณ วัฒนจันทร์

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาสถานการณ์ของโรคเต้านมอักเสบที่เกิดขึ้นในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2546 – เดือนมีนาคม 2547 และความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณแบคทีเรียสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบ ในแต่ละระดับและปริมาณของปริมาณเซลล์โซมาติกที่ได้จากการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 ในน้ำนมดิบจากถังรวมนม จำนวน 78 ฟาร์มและเต้านมจำนวน 63 เต้า รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม ได้แก่ ยางไลเนอร์ ถังรวมนม ถังรีดนม ผ้าเช็ดเต้านมและน้ำที่ใช้ล้างเต้านม กับปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบ จากฟาร์มจำนวน 18 ฟาร์ม ในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง อีกทั้งต้องการเปรียบเทียบเทคนิคที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันกับเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจปริมาณเซลล์โซมาติก ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย และการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในน้ำนมดิบ

ผลการศึกษาสถานการณ์ของโรคเต้านมอักเสบที่เกิดขึ้นใน อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง พบว่า ในปี พ.ศ. 2546 เกษตรกรสามารถควบคุมการเกิดโรคเต้านมอักเสบภายในฟาร์มและสามารถส่งน้ำนมดิบที่มีมาตรฐานให้กับสหกรณ์โคนมพัทลุงได้ดีกว่าปี พ.ศ. 2545 โดยพิจารณาจากปริมาณน้ำนมดิบของฟาร์มที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานเพิ่มมากขึ้น ขณะที่การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบในแต่ละระดับเซลล์โซมาติก พบว่า ปริมาณเซลล์โซมาติกไม่สามารถระบุปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ที่มีรายงานว่าเป็นเชื้อสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ โดยพบปริมาณแบคทีเรีย 2 จีนัสดังกล่าวเพียงร้อยละ 3 ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบน

อาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะเดียวกันปริมาณเซลล์โซมาติกก็ไม่สามารถระบุการตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp.ในน้ำนมดิบที่ได้จากถังรวมนมและเต้านมได้ แต่สามารถบ่งชี้การผ่านเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดในน้ำนมดิบจากเต้านมได้

สำหรับผลการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบจากฟาร์มของเกษตรกรกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียจีนัส *Streptococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. รวมถึงการตรวจพบแบคทีเรีย 2 จีนัสดังกล่าว ในน้ำนมดิบและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม พบว่า น้ำนมดิบมีปริมาณแบคทีเรีย 2 กลุ่มดังกล่าวมากกว่าปริมาณที่พบในปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม และปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. ที่พบในน้ำนมดิบมีความสัมพันธ์กับปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบ ขณะที่การตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบสัมพันธ์กับยางไลเนอร์

การเปรียบเทียบเทคนิคที่นิยมในปัจจุบันกับเทคนิคที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ตรวจปริมาณเซลล์โซมาติก ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย และการจำแนกกลุ่มหรือชนิดของแบคทีเรียในน้ำนมดิบ พบว่าวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบ คือ การตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 เพราะเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำและรวดเร็ว แต่มีข้อด้อยคือค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างสูงและเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง ขณะที่เทคนิคการนับจำนวนเซลล์โซมาติกด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมเซลล์ด้วยสี Methylene blue มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 นอกจากนั้นการย้อมด้วยสี Methylene blue ยังมีจุดเด่นอีกประการหนึ่ง คือ สามารถนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียร่วมด้วยได้ในการย้อมสีเพียงครั้งเดียว ทำให้มีค่าใช้จ่ายน้อยและเป็นทางเลือกที่เหมาะสม สำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไปในการตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบ ส่วนการใช้เทคนิค Fluorescence *In Situ* hybridization (FISH) ที่พัฒนาขึ้น มีแนวโน้มที่จะใช้ตรวจกลุ่มหรือชนิดของแบคทีเรียในน้ำนมดิบที่เกี่ยวข้องกับโรคเต้านมอักเสบ เนื่องจากให้ผลสอดคล้องกับเทคนิคการตรวจชนิดของแบคทีเรียโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถลดข้อจำกัดของเทคนิคดังกล่าวที่ให้ผลล่าช้าและอาจผิดพลาดได้ ส่งผลให้การรักษาและป้องกันโรคเต้านมอักเสบสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพและทันท่วงที

Student's Name: Mr Mongkol Pratummanee

Thesis Title: Occurrence of Mastitis Disease in Dairy Farms at Papayom District, Phatthalung Province and Development of Mastitis Diagnostic Techniques for Dairy Cow

Masters of Science (Biology)

Faculty of Science /Graduate School, Thaksin University

Year 2005

Thesis Advisors: Assistant Professor Dr. Nugul Intrasungkha

Lecturer Suchart Suksathit

Assistant Professor Dr. Chaiyawan Wattannachant

Abstract

This research aimed to study the current occurrence of mastitis in dairy farms at Papayom district, Phatthalung province from October 2003 to March 2004. The relationship between some numbers and types of bacteria causing mastitis and quantity of somatic cells enumerated by Somacount 150 from 78 raw milk samples in composite tank and 68 samples directly collected from cow's udder. In addition the relationship between main bacteria causing mastitis and environmental factors relating to milking process, namely, liner rubber, milk container, bucket, cloth and wash water were also studied from 18 diary farms. The comparison of conventional methods (namely, California Mastitis Test, Methylene blue reduction test, direct somatic cell count, viable plate count and screening for main bacteria genus causing mastitis) and the newly modified methods (namely, Methylene blue staining, DAPI staining and FISH technique) for mastitis detection were conducted.

The results showed that in 2004, the farmers can control mastitis situation much better than in 2003 as more farms could produce high quality of raw milk to center of milk collection, Phatthalung diary cooperative. It was found that the main bacteria causing mastitis at different somatic cell numbers did not relate to the amount of total bacteria grown on culture media, neither for the *Staphylococcus* spp. nor *Streptococcus* spp. detected in milk container and cow's udder. However, the amount of somatic cells indicated the high milk quality compared to the raw milk quality standard for highest number of coliform bacteria allowed to present in raw milk.

Moreover, it was found that there was some correlation between the numbers of total bacteria and the levels was in relation of milk production capacity per day. Also the amount of *Staphylococcus* spp. from raw milk related to the level of farm capacity in milk production per day, whereas the amount of *Streptococcus* spp. detected in raw milk related to those detected in liner rubber.

The development of same mastitis diagnostic methods were also conducted and compared. It was proposed that the methylene blue staining could be an alternative method for mastitis and milk quality test as it was shown similar efficiency detection with low operational cost and less sophisticated equipment compared to the Somacount 150. The latter method, although showed the highest performance in terms of accuracy and rapidness but due to high investment cost for small scale laboratory. Also the Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) technique was exhibited the high potential to be a method of choice to detect mastitis, as its rapidness and accuracy compared to the conventional methods.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นุกูล อินทระสังขา ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์สุชาติ สุขสถิตย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไชยวรรณ วัฒนจันทร์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมภพ อินทสุวรรณ และ อาจารย์ นพดล ศุกระกาญจน์ กรรมการเพิ่มเติม ที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำแนวทางในการศึกษาค้นคว้า รวมถึงช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของรูปเล่มวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถเสร็จสมบรูณ์ได้

ขอขอบคุณอาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ทุกท่านที่ได้ให้ประสบการณ์และถ่ายทอดความรู้ จนผู้วิจัยสามารถมีวันนี้ได้

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยทักษิณ ที่กรุณามอบทุนวิจัย เพื่อนำมาใช้จ่ายสำหรับอุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณสหกรณ์โคนม จังหวัดพัทลุง จำกัด ที่เอื้อเฟื้อข้อมูลปริมาณน้ำนมดิบที่นำมาใช้ผลิตนมพร้อมดื่ม อีกทั้งยังช่วยอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านเทคนิคและสนับสนุนเครื่อง Somacount 150

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ได้เอื้อเฟื้อ สถานที่ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสมพงศ์ โอทอง เพื่อนๆ และน้องๆ ในภาควิชาชีววิทยาที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติๆ ที่คอยช่วยเหลือทั้งทางด้านการเงินและคอยเป็นกำลังใจให้ด้วยดีเสมอมา

มงคล ประทุมมณี

ตุลาคม 2548

สารบัญ

หน้า

ใบรับรองวิทยานิพนธ์……..…….... (1)
บทคัดย่อ……..…. (2)
Abstract……..….. (4)
กิตติกรรมประกาศ…… (6)
สารบัญ…….…….…… (7)
บัญชีตาราง…….…... (8)
บัญชีภาพประกอบ……(11)
บทที่ 1 บทนำ…… 1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง…….. 4
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย…….…… 18
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผล…….. 29
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ……..……. 58
บรรณานุกรม……..... 62
ภาคผนวก……. 70
ประวัติย่อผู้วิจัย……. 83

บัญชีตาราง

ตารางที่		หน้า
1	มาตรฐานน้ำนมดิบที่ยอมรับให้มีการปนเปื้อนของกับจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบของแต่ละประเทศ/องค์กรระหว่างประเทศ	6
2	รายงานการตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเต้านมอักเสบในที่ต่างๆ ของประเทศไทย ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน	7
3	ข้อมูลการสำรวจสภาวะโรคเต้านมอักเสบจากเขตปศุสัตว์ต่างๆ พ.ศ. 2537	10
4	ความสัมพันธ์ของระดับ CMT อาการของโรคเต้านมอักเสบและปริมาณเซลล์โซมาติก	14
5	ความสัมพันธ์ระหว่าง CMT เซลล์โซมาติก เชื้อแบคทีเรียและผลผลิตน้ำนมที่เสียไป	15
6	DNA Probe ที่ใช้ในการทดลองตรวจสอบกลุ่มของแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH	27
7	จำนวนสมาชิก ปริมาณน้ำนมดิบ และจำนวนโคนม ของสหกรณ์โคนมพัทลุง จำกัด ประจำเดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548	29
8	สถานการณ์ของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุงจากการตรวจด้วยเทคนิคต่างๆ	32
9	จำนวนตัวอย่างที่พบในปริมาณเซลล์โซมาติกระดับต่างๆ จากการตรวจด้วยน้ำยา CMT การตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 และความสอดคล้องของผลทดสอบทั้ง 2 วิธี	33
10	ร้อยละของฟาร์ม (จำนวนฟาร์ม/ฟาร์มทั้งหมดในแต่ละระดับเซลล์โซมาติก) ที่ตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. น้ำนมดิบจากถังรวมนมตามระดับเซลล์โซมาติก	34
11	เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียเฉลี่ยที่พบในน้ำนมดิบจากถังรวมนมกับระดับเซลล์โซมาติก	35
12	ร้อยละของฟาร์ม (จำนวนฟาร์ม/ฟาร์มทั้งหมดในแต่ละระดับเซลล์โซมาติก) ที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำนมดิบจากถังรวมนมตามระดับเซลล์โซมาติก	36

13 ร้อยละของฟาร์ม (จำนวนฟาร์ม/ฟาร์มทั้งหมดในแต่ละระดับเซลล์โซมาติก) ที่ตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. น้ำนมดิบจากเต้านมตามระดับเซลล์โซมาติก 38

14 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียเฉลี่ย ที่พบในตัวอย่างน้ำนมดิบจากเต้านมกับกลุ่มอาการของโรคเต้านมอักเสบที่จำแนกจากปริมาณเซลล์โซมาติก(ในตารางที่ 4) 39

15 ร้อยละของฟาร์ม (จำนวนฟาร์ม/ฟาร์มทั้งหมดในแต่ละระดับเซลล์โซมาติก) ที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำนมดิบจากถังรวมนมตามระดับเซลล์โซมาติก 40

16 ร้อยละของแบคทีเรียสาเหตุโรคเต้านมอักเสบที่พบต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อจำแนกตามกลุ่มอาการของโรคเต้านมอักเสบและปริมาณเซลล์โซมาติก 41

17 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในตัวอย่างน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม โดยแบ่งกลุ่มตามปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบของฟาร์ม 44

18 ปริมาณ *Staphylococcus* spp.ที่พบในตัวอย่างน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม โดยแบ่งกลุ่มตามปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบของฟาร์ม 44

19 ปริมาณ *Streptococcus* spp.ที่พบในตัวอย่างน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม โดยแบ่งกลุ่มตามปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบของฟาร์ม 44

20 ร้อยละของการตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. จากน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมโดยแบ่งกลุ่มตามปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบของฟาร์ม 45

21 ร้อยละของการตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Streptococcus* spp. จากน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมโดยแบ่งกลุ่มตามปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบของฟาร์ม 45

22 ร้อยละของฟาร์ม (จำนวนฟาร์ม) ที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำนมดิบจากถังรวมนมตามปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบของฟาร์ม 49

23 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์โซมาติก (mean ± SD) ในน้ำนมดิบ จากการนับด้วย 3 วิธี 51

24 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์แบคทีเรีย (mean ± SD) ในน้ำนมดิบ จากการนับด้วยเทคนิคต่างๆ 53

25 เปรียบเทียบข้อมูลความเหมาะสมของเครื่องมือ ค่าใช้จ่าย ระยะเวลา และตัวอย่างที่สามารถตรวจได้ของแต่ละวิธีการ 55

26	เปรียบเทียบประสิทธิภาพการจำแนกกลุ่มแบคทีเรียในน้ำนมดิบระหว่างการทดสอบทางชีวเคมีกับการใช้เทคนิค FISH	56
27	แสดงการแปลผลปริมาณเซลล์โซมาติกจากการทดสอบด้วย California Mastitis Test	72
28	การเตรียม Hybridization buffer	74
29	การเตรียม Wash buffer ที่ระดับความเข้มข้นของ Formamide ต่างๆ	75
30	ค่าดัชนีปริมาณแบคทีเรียที่เป็นไปได้มากที่สุด (Most Probable Index) แบบ 3-3-3 ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร	77

บัญชีภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิตและองค์ประกอบของน้ำนม	7
2	กลไกการทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบของจุลินทรีย์	9
3	กลไกการทำงานของเครื่องรีดนม	11
4	ขั้นตอนเบื้องต้น เพื่อแยกแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบ ด้วยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี	20
5	แผนภูมิสรุปขั้นตอนการดำเนินการศึกษา	28
6	จำนวนตัวอย่างน้ำนมดิบ (ร้อยละ) จากถังรวมนม จำนวน 78 ฟาร์ม ในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ที่พบในเซลล์โซมาติกระดับต่างๆ	31
7	สิ่งแวดล้อมบริเวณฟาร์มโคนม	36
8	ผลการจำแนกกลุ่มอาการของโรคเต้านมอักเสบตามวิธีการของพนัส (2537) จากการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 ในฟาร์มโคนมอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง	37
9	ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ในแต่ละระดับอาการของโรคเต้านมอักเสบ	42
10	ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดที่พบในน้ำนมดิบและปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมในกลุ่มฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตแตกต่างกัน	47
11	ปริมาณ *E. coli* ที่พบในน้ำนมดิบและปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมในกลุ่มฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตแตกต่างกัน	48
12	เซลล์โซมาติกที่ได้จากการย้อมด้วยสี Methylene blue และ DAPI	51
13	เซลล์แบคทีเรียที่นับได้จากวิธีการต่างๆ	54
14	เซลล์แบคทีเรียในน้ำนมดิบที่เติมเชื้อกลุ่ม *E. coli และ Staphylococcus* spp	58
15	เซลล์แบคทีเรียในน้ำนมดิบที่เติมเชื้อกลุ่ม *E. coli และ Staphylococcus* spp	58
16	การตรวจปริมาณ total coliform และ *E.coli* ด้วยวิธีแบบ Most probable number (MPN)	76

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันอาชีพการเลี้ยงโคนมได้แพร่หลายไปสู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย และนับวันมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากคนไทยได้ให้ความสำคัญกับสุขภาพและเข้าใจคุณค่าทางโภชนาการของน้ำนมมากขึ้น ทำให้ปริมาณน้ำนมที่ผลิตได้ภายในประเทศไม่เพียงพอต่อความต้องการ ส่งผลให้มีการนำเข้าผลิตภัณฑ์นมจากต่างประเทศมูลค่าปีละไม่ต่ำกว่า 12,871 ล้านบาท ทำให้มีการส่งเสริมการเลี้ยงโคนมขึ้นใน 40 จังหวัดทั่วประเทศ สำหรับภาคใต้มีจังหวัดที่ได้รับส่งเสริมจำนวน 4 จังหวัด คือ ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี และพัทลุง (สำนักงานสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 9, 2548) โดยจังหวัดพัทลุงเป็นจังหวัดที่มีการเลี้ยงโคนมมากเป็นอันดับหนึ่ง และมีอำเภอป่าพะยอมเป็นอำเภอที่มีการเลี้ยงโคนมมากที่สุด (สหกรณ์โคนมจังหวัดพัทลุง, 2546) แม้ว่าการเลี้ยงโคนมจะเป็นอาชีพที่ได้รับความนิยม แต่การเลี้ยงโคนมก็มีปัญหาหลายประการ เช่น พันธุกรรม อาหารและการให้อาหาร การจัดการเลี้ยงดูและการจัดการสุขภาพ เป็นต้น โดยทางด้านสุขภาพของโคนม ปัญหาโรคเต้านมอักเสบ (Mastitis) ถือได้ว่าเป็นปัญหาที่สำคัญมาก เพราะส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของน้ำนมดิบ (Bhushan, 2000) โดยรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ พบว่าส่วนใหญ่ระบุว่าเกิดจากแบคทีเรีย โดยเฉพาะจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. (สุณีรัตน์, 2541; William *et al.*, 2002) สำหรับวิธีการตรวจแบคทีเรียน้ำนมดิบที่นิยมใช้กันอยู่เป็นการตรวจเพื่อบ่งชี้คุณภาพน้ำนม ผลิตภัณฑ์นม และอายุการเก็บรักษา (Sorhaug and Stepaniak, 1997; Clarke and Pinder, 1998)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาสถานการณ์ของการเกิดโรคเต้านมอักเสบในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง และศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร Trypticase Soya Agar (heterotrophic bacteria plate count) ปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. จีนัส *Streptococcus* spp. แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total coliform bacteria) และ *Escherichia coli* ทั้งจากตัวอย่างน้ำนมดิบในถังรวมนมและเต้านมของแม่โค รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียดังกล่าวที่พบในน้ำนมดิบจากถังรวมนมกับปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม ด้วยเทคนิคการศึกษาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture-dependent technique) ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับรายงานการศึกษาอื่นๆ อีกทั้งยังต้องการพัฒนาเทคนิคการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการตรวจด้วยเครื่องนับปริมาณเซลล์โซมาติกอัตโนมัติ “Somacount 150” ที่มีต้นทุนการลงทุนและค่าใช้จ่ายต่ำกว่า รวมถึงต้องการพัฒนาเทคนิคการตรวจ

ปริมาณและกลุ่มของแบคทีเรียโดยไม่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture-independent technique) เพื่อลดข้อจำกัดของเทคนิคการศึกษาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลล่าช้าและอาจผิดพลาดได้ โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกที่จะพัฒนาเทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) ที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาปริมาณและกลุ่มของแบคทีเรียที่สนใจ โดยเลือกใช้นิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (oligonucleotides probe) ที่จำเพาะกับกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับการศึกษาและวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบในโคนม ส่งผลให้การรักษาและป้องกันโรคเต้านมอักเสบมีความถูกต้องและรวดเร็วมากขึ้น ทำให้สามารถแก้ไขปัญหาโรคเต้านมอักเสบในโคนม และลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำนมดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อช่วยให้เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมมีความเป็นอยู่ดีขึ้น อีกทั้งยังทำให้คนไทยมีโอกาสได้บริโภคนมที่ความปลอดภัยและราคาถูกเพิ่มมากขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาสถานการณ์ของโรคเต้านมอักเสบในโคนมของอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง และความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียสาเหตุโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบ ทั้งจากถังรวมนมจากเต้านมของแม่โค และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม
2. เปรียบเทียบเทคนิคการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบจากแม่โครีดนมที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคที่นิยมใช้ในปัจจุบัน
3. เปรียบเทียบเทคนิคการตรวจปริมาณและกลุ่มของแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมที่พัฒนาขึ้นกับการตรวจปริมาณและกลุ่มของแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาสถานการณ์ของโรคเต้านมอักเสบจากถังเก็บน้ำนมรวมเกษตรกรที่ศูนย์รับน้ำนมดิบ อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2547
2. ศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในแม่โครีดนม ทั้งที่พบในน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม โดยเลือกชนิดแบคทีเรียที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเต้านมอักเสบ 4 ชนิด คือ *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* และแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด ด้วยเทคนิคการศึกษาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. ศึกษาการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยน้ำยา California Mastitis Test (CMT) การตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 การย้อมสี Methylene blue และการย้อมด้วยสารเรืองแสง 4′, 6-diamidino 2-phenylindole (DAPI)

4. ศึกษาการนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดโดยในน้ำนมดิบ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ การย้อมสี Methylene blue การย้อมสารเรืองแสง DAPI และการตรวจกลุ่มของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)

สถานที่และระยะเวลาการทำวิจัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ และฟาร์มโคนมของเกษตรกรในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2546 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

1. สถานการณ์ปัจจุบันและแนวโน้มการเลี้ยงโคนมในประเทศไทย

การเลี้ยงโคนมในประเทศไทยมีมานานแล้ว แต่การเลี้ยงโคนมเพื่อผลิตน้ำนมเชิงการค้าเริ่มอย่างจริงจังเมื่อปี พ.ศ. 2505 (เกษตรและพิเชษ, 2531) เนื่องจากการที่ประเทศไทยเป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (World Trade Organization : WTO) ที่มีข้อตกลงให้ประเทศไทยเปิดการค้าเสรีสินค้าประเภทนมและผลิตภัณฑ์นมตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ส่งผลให้เกิดการแข่งขันทางการค้าระหว่างประเทศ และมีผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม โดยเฉพาะการปรับตัวทางด้านการพัฒนาความรู้และการพัฒนาฟาร์ม เพื่อให้น้ำนมดิบที่ผลิตออกมาจากฟาร์มมีคุณภาพตามมาตรฐานสากลและสามารถแข่งขันในตลาดโลกได้ การเลี้ยงโคนมของประเทศไทยได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการพัฒนาที่ผ่านมาประสบความสำเร็จในด้านการเพิ่มจำนวนเกษตรกร ปริมาณโคนม และการกระจายพื้นที่การเลี้ยงโคนม แต่ความสำเร็จในการพัฒนาคุณภาพน้ำนมดิบและประสิทธิภาพการให้ผลผลิตของโคนมยังอยู่ในระดับต่ำ โดยประสิทธิภาพการให้ผลผลิตของโคนมเฉลี่ยทั้งประเทศมีเพียง 10-11 กิโลกรัม/ตัว/วัน (ฉลอง, 2546) การอยู่รอดของอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนม ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตทั้งด้านปริมาณผลผลิตและองค์ประกอบของน้ำนม ซึ่งเป็นตัวกำหนดรายได้ของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม โดยราคาน้ำนมดิบจะเปลี่ยนแปลงไปตามองค์ประกอบของน้ำนม (Philpot, 2001) น้ำนมที่คุณภาพดีเหมาะแก่การบริโภคต้องมีปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนน้อย มีปริมาณเม็ดเลือดขาวหรือเซลล์โซมาติกต่ำ และปราศจากสารตกค้าง (ธนู, 2543; สุณีรัตน์, 2542) ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในอนาคตจำเป็นต้องมีความรู้ในด้านการจัดการฟาร์มเป็นอย่างดี เพื่อให้น้ำนมดิบที่ผลิตได้เป็นไปตามประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องมาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงคุณภาพ การจัดการสิ่งแวดล้อม และ การคุ้มครองผู้บริโภคให้สอดคล้องกับข้อตกลงขององค์การการค้าโลก

จากข้อมูลในปี พ.ศ. 2545 ของกรมปศุสัตว์ พบว่าประเทศไทยมีเกษตรกรที่เลี้ยงโคนม 24,679 ครอบครัว มีจำนวนโคนมรวมทั้งสิ้น 343,812 ตัว เป็นแม่โคให้นมจำนวน 177,525 ตัว โคสาวและโครุ่นจำนวน 166,277 ตัว มีปริมาณน้ำนมดิบที่ผลิตได้รวม 660,297 ตัน ขณะที่ข้อมูลปริมาณการบริโภคนมพร้อมดื่มของคนไทยมีจำนวน 1.5 – 1.6 ล้านตัน/ปี จะเห็นว่าปริมาณการ

บริโภคนมไม่สอดคล้องกับความสามารถการผลิตน้ำนมภายในประเทศ และนับวันแนวโน้มความต้องการบริโภคนมของคนไทยเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ทำให้ต้องมีการนำเข้าผลิตภัณฑ์นมจากต่างประเทศคิดเป็นมูลค่า 12,871 ล้านบาท/ปี ซึ่งถ้ารวมมูลค่าธุรกิจที่เกี่ยวข้องกับนมและผลิตภัณฑ์นมทั้งระบบจะมีมูลค่าสูงถึง 22,000 ล้านบาท/ปี ที่ทำให้เกิดการสร้างอาชีพและสร้างความมั่นคงต่อระบบเศรษฐกิจและสังคมของชาติ (สำนักงานสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 9, 2548)

การส่งเสริมการเลี้ยงโคนมในประเทศมีส่วนทำให้การนำเข้าน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมจากต่างประเทศลดลง (วิบูลวรรณ, 2547) เพิ่มโอกาสให้คนไทยจะได้มีโอกาสบริโภคอาหารที่มีประโยชน์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากจุดเด่นของอาหารประเภทน้ำนมคือ ดื่มง่าย ย่อยง่าย มีกระบวนการเตรียมการบริโภคไม่ยุ่งยาก (ณรงศักดิ์, 2541) เหมาะสมกับสังคมเมืองที่ต้องทำงานแข่งขันกับเวลา อีกทั้งยังเป็นการช่วยให้เกษตรกรในชนบทมีความเป็นอยู่ที่ดีขึ้น ปัจจุบันผลตอบแทนของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมหลังจากหักต้นทุนการผลิตแล้วคือ 3.51 บาท/กิโลกรัม (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544) และเป้าหมายที่กำหนดไว้ในแผนพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 9 พ.ศ. 2545 – 2549 ที่จะเพิ่มอัตราการให้นมของแม่โคเฉลี่ยทั้งประเทศจาก 10 กิโลกรัม/ตัว/วันเป็น 14 กิโลกรัม/ตัว/วัน ในปี พ.ศ. 2549 ซึ่งจะทำให้เกษตรกรมีรายได้จากการเลี้ยงโคนมวันละ 30 ถึง 50 บาท/ตัว ซึ่งข้อมูลจากกรมปศุสัตว์พบว่า จังหวัดพัทลุงเป็นจังหวัดที่มีการเลี้ยงโคนมมากเป็นอันดับหนึ่งของภาคใต้ ในปี พ.ศ. 2547 มีเกษตรกรที่เลี้ยงโคนมและมีน้ำนมดิบจำหน่าย 328 ครอบครัว มีโคนมรวม 4,380 ตัว เป็นแม่โคให้นม 1,628 ตัว โคแห้งนม 609 ตัว โคสาวและโครุ่น 2,083 ตัว สามารถผลิตน้ำนมดิบได้ 17.29 ตัน/วัน (สำนักงานสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 9, 2547) โดยอำเภอป่าพะยอมสามารถผลิตน้ำนมดิบได้มากที่สุด คือ 4.94 ตัน/วัน คิดเป็นร้อยละ 28.59 ของปริมาณการผลิตน้ำนมดิบทั้งหมดของจังหวัด (สหกรณ์โคนมจังหวัดพัทลุง, 2546)

2. เกณฑ์การพิจารณาคุณภาพน้ำนมดิบทางจุลชีววิทยา

การที่ประเทศไทยเป็นสมาชิกองค์การการค้าโลก ทำให้การแข่งขันทางด้านการตลาดของสินค้าประเภทนมสูงขึ้น จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาการผลิตน้ำนมดิบให้มีคุณภาพสูงขึ้น เพื่อให้สามารถแข่งขันกับคู่แข่งทางการค้าอื่นได้ จากข้อมูลการศึกษา พบว่ามาตรฐานน้ำนมดิบของแต่ละประเทศมีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) โดยประเทศไทยกำหนดมาตรฐานที่จะยอมรับให้มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (total coliform bacteria) ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบสูงกว่าประเทศอื่น หรืออาจกล่าวได้ว่ามาตรฐานน้ำนมดิบของประเทศไทยต่ำกว่าหลายประเทศที่มี

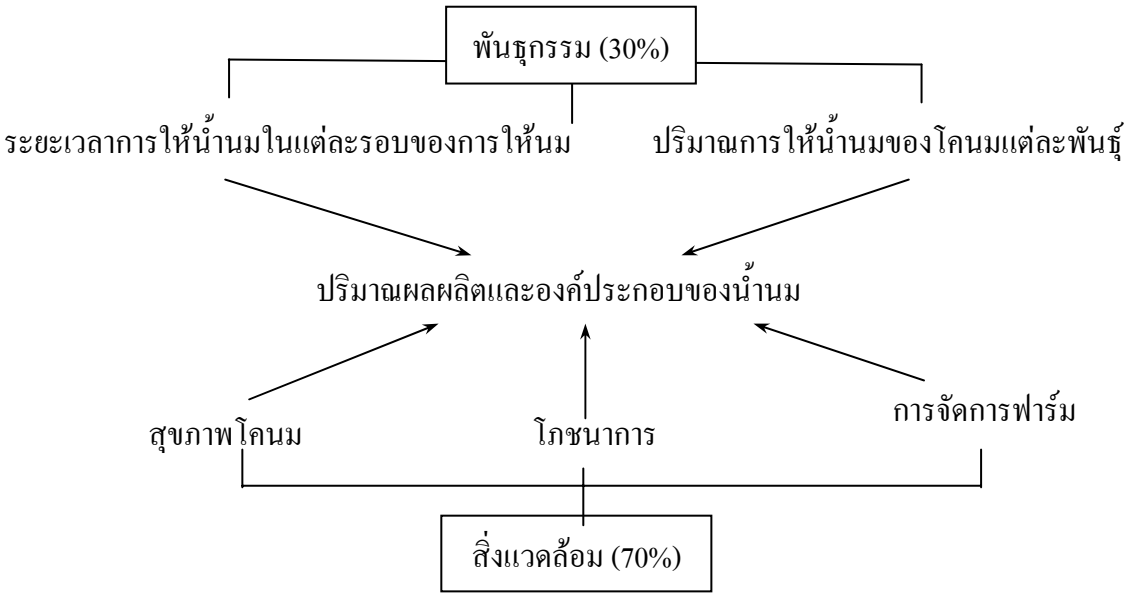
การส่งออกน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมเป็นหลัก เมื่อพิจารณามาตรฐานที่เกิดจากการตกลงร่วมกันขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) กับองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nation : FAO) พบว่าการกำหนดมาตรฐานของปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดโดยใช้วิธีการ Most probable number (MPN) ซึ่งแตกต่างจากมาตรฐานอื่นที่ใช้ค่าการตรวจสอบแบคทีเรียเป็นค่า colony forming unit (CFU)

ตารางที่ 1 มาตรฐานคุณภาพน้ำนมดิบที่ยอมรับให้มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบของแต่ละประเทศ/องค์กรระหว่างประเทศ

มาตราฐานของประเทศ/องค์กร	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด	ปริมาณจุลินทรีย์ทนร้อน	ปริมาณ total coliform	อ้างอิง
ไทย	400,000 (CFU/ml)	1,000 (CFU/ml)	10,000 (CFU/ml)	กรมปศุสัตว์(2542)
เดนมาร์คและสวีเดน	100,000 (CFU/ml)	5,000 (CFU/ml)	1,000 (CFU/ml)	วิพิชญ์ (2546)
ออสเตรเลีย	150,000 (CFU/ml)	30,000 (CFU/ml)	10 (CFU/ml)	วิพิชญ์ (2546)
FAO และ WHO	200,000 (CFU/ml)	-	10 (MPN/ml)	Foodstuffs, Cosmetics and Disinfectant Act (1972)

3. ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำนมและปริมาณผลผลิตน้ำนมของแม่โครีดนม

ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพและประสิทธิภาพการให้ผลผลิตน้ำนมดิบของแม่โครีดนม มาจาก 2 ประเด็นใหญ่ๆ คือ สิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม โดยพบว่าร้อยละ 30 มาจากพันธุกรรม ได้แก่ ปริมาณการให้น้ำนมของโคนมแต่ละพันธุ์และระยะเวลาให้น้ำนมแต่ละรอบ (stage of lactation) ขณะที่ร้อยละ 70 มาจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การจัดการฟาร์ม (management) โภชนาการ (nutrition) และสุขภาพของโค (health status of the cow) ดังสรุปในภาพที่ 1 โดยเฉพาะปัจจัยสิ่งแวดล้อมจะทำให้โคนมป่วยเป็นโรคติดต่อ เช่น โรคปากและเท้าเปื่อย (foot and mouth disease) โรคแท้งติดต่อ (brucellosis) โรคเต้านมอักเสบ (mastitis) เป็นต้น จากรายงานการศึกษาของสุณีรัตน์ (2546) ระบุว่าโรคที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพน้ำนมมากที่สุดคือ โรคเต้านมอักเสบ ซึ่งสร้างปัญหาให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม เพราะนอกจากทำให้คุณภาพของน้ำนมลดลงแล้ว ยังทำให้สูญเสียรายได้ เนื่องจากปริมาณน้ำนมที่รีดได้ลดลงและต้องงดส่งนมที่ได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ สอดคล้องกับรายงานของ William *et al.* (2002) ที่ระบุว่าการเกิดโรคเต้านมอักเสบทำให้เกษตรกรมีต้นทุนการผลิตเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 8,500 บาท/เดือน/โคนมหนึ่งตัว เนื่องจากผลผลิตน้ำนมที่ลดลง น้ำนมที่ต้องทิ้งเนื่องจากมีคุณภาพต่ำ ค่าใช้จ่ายในการรักษา และแรงงานที่เพิ่มขึ้นเพื่อดูแลโคที่เป็นโรค



ภาพที่ 1 ปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิตและองค์ประกอบของน้ำนม (Kennelly, 2000; ฉลอง, 2546)

4. จุลินทรีย์กับการเกิดโรคเต้านมอักเสบ (mastitis) ในโคนม

การเกิดโรคเต้านมอักเสบขึ้นอยู่กับปัจจัยทั้งทางกายภาพและชีวภาพ ปัจจัยทางกายภาพ เช่น ฤดูกาล สภาพโรงเรือน การดูแลด้านสุขลักษณะและความสะอาดของอุปกรณ์และโรงเลี้ยงไม่ดี การรีดนมไม่ถูกวิธี เป็นต้น และปัจจัยทางชีวภาพ เช่น ลักษณะหัวนม สุขภาพของโคนม พันธุกรรม เป็นต้น ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ลุกลามเข้าสู่เต้านมก่อให้เกิดการอักเสบของเต้านมขึ้น จากการศึกษารายงานวิจัยส่วนใหญ่ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคเต้านมอักเสบในแม่โครีดนมของประเทศไทยตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน คือ แบคทีเรีย โดยพบแบคทีเรีย 2 จีนัสหลัก คือ จีนัส *Staphylococcus* spp. โดยเฉพาะ *Staphylococcus aureus* และจีนัส *Streptococcus* spp. โดยเฉพาะ *Streptococcus agalactiae* ดังตารางที่ 2 ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวมีที่มาจาก 2 แหล่ง คือ

4.1. แบคทีเรียที่มีแหล่งที่มาจากตัวโคด้วยกันเอง เป็นแบคทีเรียที่ถ่ายทอดมาจากโคสู่โค เช่น ถ่ายทอดผ่านทางผ้าที่ใช้ทำความสะอาดเต้านมก่อนการรีดนม มือของผู้รีดนมหรือเครื่องรีดนม เป็นต้น ได้แก่ แบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* (อนุชิต, 2545; Shem *et al.,* 2001)

4.2. แบคทีเรียที่มาจากสิ่งแวดล้อม เป็นแบคทีเรียที่มาจากดิน คอก อาหารสัตว์ น้ำ เป็นต้น ได้แก่ แบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., (นิมิต, 2540)

ตารางที่ 2 รายงานการตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเต้านมอักเสบในที่ต่างๆ ของประเทศไทย ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

เชื้อจุลินทรีย์ที่พบ										สถานที่	เอกสารอ้างอิง
Stap. aureus,	*Strep. agalactiae*	*Stap.* spp.	*Strep.* spp.	*E. coli*	*Stap. uberis*	*M.* spp.	*B.* spp.	*K.* spp.	*P. asaeruginosa*		
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ชวนิศดากรและคณะ(2510)
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ราชบุรี	ธีรพงค์และคนอื่นๆ (2529)
+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย	สุณีรัตน์ (2529)
+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	ภาคใต้	สุภลักษณ์และคนอื่นๆ (2536)
+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	นิมิตและคนอื่นๆ (2537)
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	ภาคใต้	วาสนาและคนอื่นๆ(2538)
-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ขอนแก่น	ศีลธรรมและคนอื่นๆ(2539)
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	มวกเหล็ก	สุณีรัตน์ (2541)
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	พัทลุง	พรพิมล (2545)
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ขอนแก่น	อรัญและคนอื่นๆ (2546)

หมายเหตุ.

Stap.aureus คือ *Staphylococcus aureus* *Strep.agalactiae* คือ *Streptocoocuc agalactiae*

Stap. spp. คือ *Staphylococcus* spp. *Strep.* spp. คือ *Streptococcus* spp.

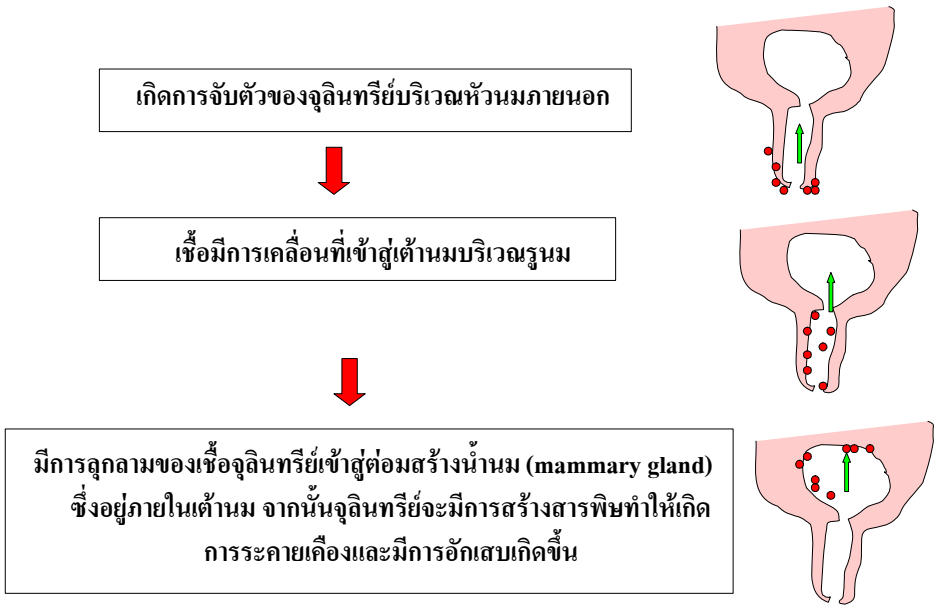
E. coli คือ *Escherichia coli* *Stap. uberis* คือ *Staphylococcus uberis*

M. spp. คือ *Micrococcus* spp. *B.* spp. คือ *Bacillus* spp.

K. spp. คือ *Klebsiella* spp. *P. asaeruginosa* คือ *Pseudomonas aeruginosa*

+ คือ เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในรายงานแต่ละครั้ง

กลไกการทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ เริ่มต้นจากการที่เชื้อแบคทีเรียสัมผัสกับเต้านมผ่านทางตัวกลาง เช่น เครื่องรีดนม มือผู้รีด น้ำล้างเต้านม ผ้าเช็ดเต้านม เป็นต้น (Arestrup *et al.*, 1995; William *et al.*, 2002) จากนั้นเชื้อแบคทีเรียจะเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเต้านมผ่านทางรูนม (teat canal) แล้วมีการลุกลามเข้าสู่ต่อมสร้างน้ำนม (mammary gland) และสร้างสารพิษทำให้เกิดการระคายเคืองจนเกิดการอักเสบขึ้นภายในเต้านม (Bhushan, 2000) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กลไกการทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบของจุลินทรีย์ (Bhushan, 2000)

5. อาการของโรคเต้านมอักเสบ

จากรายงานวิจัยของ Philpot and Nickerson (1991) พบว่าการเกิดโรคเต้านมอักเสบสามารถแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ ชนิดที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรคเต้านมอักเสบ ซึ่งส่งผลต่อสุขภาพของแม่โค เต้านม และคุณภาพน้ำนมดิบแตกต่างกัน คือ

5.1. แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (clinical mastitis) แม่โคจะมีไข้และเต้านมบวมแดง น้ำนมที่รีดออกมาจะมีลักษณะเป็นลิ่ม ตะกอน หรือใส (ชวนิศนดากร, 2540) หากมีการอักเสบอย่างรุนแรงท่อนมจะเกิดการอักเสบ ซึ่งอาจส่งผลให้ไม่สามารถรีดนมจากเต้านมนั้นได้อีก และอาจมีการลุกลามไปยังหัวนมอื่นๆ หรือทำให้เกิดการอักเสบขึ้นที่บริเวณช่องคลอดและขาหนีบของแม่โค ทำให้แม่โคเสียชีวิตในที่สุด (สุณีรัตน์, 2544)

5.2. แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ(subclinical mastitis) จะพบว่าเต้านมและน้ำนมที่รีดได้มีลักษณะปกติเมื่อมองด้วยตาเปล่า แต่จะมีเชื้อจุลินทรีย์แฝงอยู่ภายในเต้านมทำให้ปริมาณน้ำนมดิบที่รีดได้ลดลง และปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือที่เรียกกันทั่วไปว่าเซลล์โซมาติก (somatic cell) ในน้ำนมเพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune response) เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายโดย phagocytosis (Roitt *et al*., 1998) ทำให้แม่โครีดนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบมีอาการทุเลาลงและเต้านมเข้าสู่สภาพปกติ (Hogan *et al*., 1992)

จากรายงานการศึกษาของทัศนีย์ (2537) พบว่าโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการจะมีโอกาสพบได้มากกว่าแบบแสดงอาการหลายเท่าดังแสดงในตารางที่ 3 สอดคล้องกับรายงานของ Philpot และ Nickerson (2000) ที่พบว่า การเกิดโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการจะมีความชุกชุนมากกว่าแบบแสดงอาการ

ตารางที่ 3 ข้อมูลการสำรวจสภาวะโรคเต้านมอักเสบจากเขตปศุสัตว์ต่างๆในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2537 (ทัศนีย์, 2537)

อาการเต้านมอักเสบ	ค่าร้อยละเฉลี่ยของโคนมแต่ละเขตปศุสัตว์ (สำรวจร้อยละ 10 ของโคนมทั่วประเทศ)									เฉลี่ย (ร้อยละ)
	เขตปศุสัตว์									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
แสดงอาการ	0.00	1.67	13.70	10.30	17.47	12.29	1.64	2.86	0.58	6.72
ไม่แสดงอาการ	62.39	59.83	86.90	89.70	58.74	54.19	60.19	24.00	31.58	58.6

6. การรีดนมกับปัญหาโรคเต้านมอักเสบ

การที่เชื้อจุลินทรีย์จะเข้าสู่เต้านมได้ รูนม (teat canal) ต้องเปิดออก ช่วงที่มีการเปิดออกของรูนมส่วนใหญ่คือ ขั้นตอนการรีดนม จึงกล่าวได้ว่าการรีดนมมีโอกาสที่เชื้อจุลินทรีย์จะเข้าสู่เต้านมและก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบได้มากที่สุด การรีดนมในปัจจุบันสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ การรีดนมด้วยมือและการรีดนมด้วยเครื่องรีดนม ซึ่งมีรายละเอียดแต่ละวิธีดังนี้

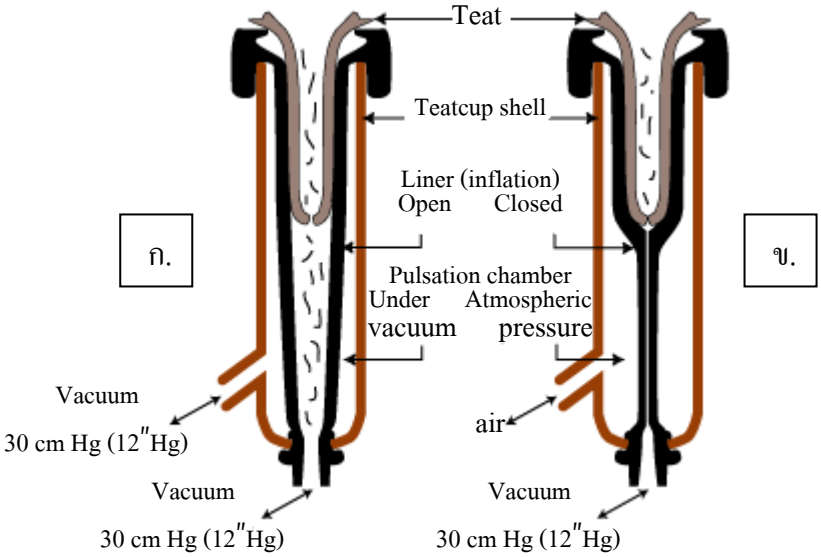
6.1. การรีดนมด้วยมือ

เป็นวิธีการที่มีการใช้กันมาตั้งแต่สมัยโบราณ เป็นวิธีการที่สะดวกและไม่ใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ซับซ้อน โดยการใช้ซอกนิ้วหัวแม่มือกับนิ้วชี้บีบรัดโคนของหัวนม เพื่อปิดกั้นไม่ให้น้ำนมในท่อนม

ไหลกลับคืนไปในเต้านม จากนั้นใช้นิ้วมือที่เหลืออีก 3 นิ้ว บีบไล่นมในท่อหัวนมออกทางปลายหัวนมให้เกิดแรงดันภายในจนดันกล้ามเนื้อวงแหวนปลายหัวนมเปิดออก จากนั้นคลายนิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ออก จะทำให้น้ำนมที่อยู่ในโพรงเก็บน้ำนมไหลลงมาที่ท่อหัวนมพร้อมที่จะถูกรีดต่อไป ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนกว่าน้ำนมหมดเต้า ขณะรีดนมผู้รีดนมต้องใช้มือที่แห้งและน้ำนมต้องไม่เลอะตามฝ่ามือหรือแขน การที่ผู้รีดนมบางคนรีดนมด้วยมือเปียกหรือเอาน้ำนมทามือนับว่าเป็นการปฏิบัติที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีโอกาสเข้าสู่เต้านมได้ง่ายขึ้น (วิพิชญ์ , 2546)

6.2. การรีดนมด้วยเครื่องรีดนม (milking machine)

เป็นวิธีที่มีหลักการทำงานเลียนแบบการดูดนมของลูกโค โดยการสร้างสุญญากาศขึ้น เพื่อดูดนมออกมาจากเต้านม ซึ่งเครื่องรีดนมมีปลอกรูปทรงกระบอก 2 ชั้น ชั้นนอกเป็นกระบอกโลหะ (teatcup shell) ส่วนชั้นในเป็นยางอ่อน (liner) หรือที่ชาวบ้านเรียกว่า ยางไลเนอร์ ตรงกลางภายในช่องยางอ่อนเป็นช่องที่ใช้สำหรับสวมหัวนม ซึ่งน้ำนมจะไหลออกมาทางนี้ แรงสุญญากาศภายในช่องนี้จะเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ทำให้กระบอกดูดนมติดกับหัวนมตลอดเวลา โดยแรงสุญญากาศนี้จะเกิดเป็นจังหวะทำให้เกิดการดูดสลับกับการปล่อย ซึ่งการปล่อยหมายถึงอากาศภายนอกเข้าสู่ช่องว่างระหว่างกระบอกโลหะกับยางไลเนอร์ ทำให้ยางไลเนอร์ไปบีบหัวนมเพื่อให้น้ำนมไหลออกมา เมื่อเปลี่ยนจากการปล่อยเป็นการดูดยางไลเนอร์จะถูกแรงดูดทำให้ยางไลเนอร์ขยายออกแล้วน้ำนมจะไหลจากโพรงเก็บน้ำนมลงมาแทนที่ท่อหัวนม (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของเครื่องรีดนม

ก. คือ การปล่อยอากาศภายนอกเข้าสู่ช่องว่างระหว่างกระบอกโลหะกับยางไลเนอร์

ข. คือ การดูดอากาศออกจากช่องว่างระหว่างกระบอกโลหะกับยางไลเนอร์

เครื่องรีดนมถูกสร้างขึ้น เพื่อให้เกิดความสะดวก ช่วยผ่อนแรงแก่ผู้รีดและสะอาดกว่าการรีดด้วยมือ เนื่องจากน้ำนมถูกรีดออกจากหัวนมเข้าสู่ถังนมโดยตรงและฝุ่นละอองหรือสิ่งสกปรกไม่สามารถตกลงในถังรีดนมแบบการรีดนมด้วยมือ อย่างไรก็ตามถ้าปฏิบัติไม่ถูกวิธีจะเกิดอันตรายต่อเต้านมได้มากกว่าการรีดนมด้วยมือ โดยเฉพาะเมื่อเครื่องรีดนมทำงานในขณะที่เต้านมไม่มีน้ำนมเป็นสาเหตุให้หัวนมเกิดการชอกช้ำภายใน อาจเป็นเหตุให้เกิดโรคเต้านมอักเสบขึ้น นอกจากนี้การทำความสะอาดเครื่องรีดนมที่ไม่ถูกต้อง น้ำนมที่ได้จะสกปรกมากกว่าการรีดด้วยมือ โดยรายงานการศึกษาของสุเมธ (2543) พบว่า เกษตรกรส่วนใหญ่ไม่ค่อยเปลี่ยนยางไลเนอร์ที่หมดอายุการใช้งาน ซึ่งมีการแตกเป็นร่องเล็กๆและเกษตรกรบางรายไม่ถอดชิ้นส่วนอุปกรณ์ออกมาทำความสะอาดอย่างทั่วถึง เช่น วาล์วเปิด-ปิดลมถ้วยรวมนมและยางไลเนอร์ เป็นต้น อันเป็นแหล่งสะสมของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้มีโอกาสเกิดการระบาดของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มเพิ่มสูงขึ้น

7. การตรวจคุณภาพน้ำนมดิบที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบของโคนม

การตรวจคุณภาพน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมนับเป็นขั้นตอนที่มีความจำเป็นในการปรับปรุงคุณภาพน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมให้ดีขึ้น เพราะการตรวจเป็นตัวบ่งชี้ถึงสภาวะสุขลักษณะของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมนั้นๆว่าดีหรือไม่ สำหรับการทดสอบคุณภาพน้ำนมดิบที่นิยมใช้ตรวจสอบโรค เต้านมอักเสบได้แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนการตรวจคุณภาพน้ำนมเบื้องต้น และขั้นตอนการตรวจคุณภาพน้ำนมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

7.1. ขั้นตอนการตรวจคุณภาพน้ำนมเบื้องต้น

เป็นการตรวจคุณภาพน้ำนม ณ จุดรับน้ำนมของเกษตรกร โดยเจ้าหน้าที่จากบริษัทผลิตนมพร้อมดื่มต้องทำการตรวจคุณภาพทันที เพื่อใช้เป็นเกณฑ์การตัดสินว่าจะรับซื้อน้ำนมนั้นเป็นวัตถุดิบในการผลิตหรือไม่ เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำนมดิบที่มีคุณภาพต่ำไปปะปนกับน้ำนมคุณภาพดี วิธีการตรวจคุณภาพน้ำนมเบื้องต้นจะเป็นวิธีการตรวจอย่างง่ายๆ รวดเร็ว และไม่เป็นอุปสรรคต่อการปฏิบัติงานของศูนย์รวมนม วิธีการตรวจที่นิยมในปัจจุบันมีอยู่ 2 วิธี คือ การตรวจโดยใช้ประสาทสัมผัสและการตรวจการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

7.1.1. การตรวจโดยใช้ประสาทสัมผัส (organoleptic tests)

เป็นการตรวจคุณสมบัติทางกายภาพเบื้องต้นของน้ำนม เกี่ยวกับรส กลิ่น สี และความเป็นเนื้อเดียวกันของน้ำนม โดยน้ำนมจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการเท่านั้นที่มีคุณสมบัติดังกล่าวแตกต่างจากน้ำนมคุณภาพดีอย่างชัดเจน แม้ว่าจะเป็นวิธีการที่รวดเร็วและง่าย

ที่สุด แต่ผลที่ได้มีความผิดพลาดสูงเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ ที่สำคัญผู้ทดสอบต้องมีความชำนาญเป็นพิเศษจึงจะทำให้ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือ (William *et al.*, 2002)

7.1.2. การตรวจการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (alcohol test)

เป็นวิธีการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมเบื้องต้นที่นิยมใช้กันทั่วไป เพราะ เป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก สะดวกและรวดเร็ว (วิพิชญ์, 2546) ประโยชน์ของการตรวจการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ คือ ทำให้ทราบว่าน้ำนมมีคุณภาพเหมาะสมที่จะนำไปผลิตนมพร้อมดื่มหรือไม่ เพราะแอลกอฮอล์จะทำให้โปรตีนในน้ำนมแปรสภาพไป โดยเฉพาะ casein เกิดการแข็งตัว (coagulation) ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการทำงานของจุลินทรีย์ในน้ำนม ที่ทำให้น้ำนมมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น หรือมีอิออนของแคลเซียมและแมกนีเซียมในน้ำนมมากเกินไป อย่างไรก็ตามการตรวจสอบการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์มีโอกาสเกิดผลบวกเทียมได้สูง เนื่องจากความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานในการตรวจผล และการใช้เอธิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นสูงหรือต่ำเกินไป

7.2. การตรวจคุณภาพน้ำนมในห้องปฏิบัติการ

การตรวจคุณภาพน้ำนมในห้องปฏิบัติการเป็นการตรวจอย่างละเอียด เพื่อต้องการทราบว่าน้ำนมมีคุณภาพอย่างไรและเหมาะที่นำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ใด อีกทั้งยังสามารถบอกถึงมาตรฐานการจัดการฟาร์มและความเสี่ยงต่อการระบาดของโรคเต้านมอักเสบของแม่โคในฟาร์มได้ ซึ่งวิธีการที่นิยมใช้ในปัจจุบันมีอยู่ 3 วิธี คือ การตรวจ Methylene blue reduction test การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนม และการตรวจเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุสำคัญของการเกิดโรคเต้านมอักเสบ ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

7.2.1. การตรวจ Methylene blue reduction test

วิธีการนี้เป็นการศึกษาปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมทางอ้อม โดยอาศัยการวัดการทำงานของแบคทีเรียในน้ำนม โดยเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก ด้วยการเติม Methylene blue ลงในน้ำนมและวัดระยะการเปลี่ยนสีหลังจากบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม เชื้อแบคทีเรียในน้ำนมจะผลิตเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารที่เป็นองค์ประกอบของน้ำนม โดยเอนไซม์จะนำไฮโดรเจนอิออนจากสารในน้ำนมไปยังสารตัวรับ ซึ่งการเติม Methylene blue ลงในน้ำนม เพื่อให้เป็นตัวรับไฮโดรเจนอิออน โดย Methylene blue จะแย่งจับไฮโดรเจนอิออนกับตัวรับที่มีในน้ำนม ทำให้ Methylene blue มีปริมาณลดลงจึงเกิดการเปลี่ยนสี อัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สร้างขึ้น ทำให้ใช้บ่งชี้ถึงจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำนมได้ โดยการเปลี่ยนสี

อย่างรวดเร็ว แสดงว่ามีเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมจำนวนมาก (วิพิชญ์, 2546) แต่จากรายงานการศึกษาของอรัญและคนอื่นๆ (2546) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจคุณภาพน้ำนมจากถังรวมนมด้วยวิธี Methylene blue reduction test การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติก การตรวจปริมาณและชนิดแบคทีเรีย พบว่า วิธี Methylene blue reduction test ที่ใช้ตรวจสอบคุณภาพน้ำนมในถังรวมนมไม่สามารถใช้บ่งชี้การเกิดโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมได้

7.2.2. การตรวจนับปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนม

การติดเชื้อจุลินทรีย์ของเต้านมทำให้ปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบเพิ่มมากขึ้น (สุณีรัตน์, 2542) ซึ่งการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจด้วยน้ำยา California mastitis test (CMT) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจทางอ้อมที่ง่ายและรวดเร็ว โดยดูความหนืดของน้ำนมที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากสารเคมีในน้ำยา CMT มีคุณสมบัติในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์โซมาติก เมื่อเซลล์โซมาติกแตกออกจะทำให้น้ำนมมีความหนืดเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปการตรวจนับปริมาณเซลล์โซมาติกโดยตรงมี 2 วิธีการ คือ การนับตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ซึ่งเป็นวิธีการดั้งเดิมที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย (อรัญ, 2544) และการใช้เครื่องตรวจนับอัตโนมัติ เช่น Somacount 150 ซึ่งความสัมพันธ์ของระดับ CMT ปริมาณเซลล์โซมาติก และอาการโรคเต้านมอักเสบนั้นแสดงไว้ในตารางที่ 4 อย่างไรก็ตามรายงานของสุณีรัตน์ (2544) พบว่าร้อยละ 60 ของตัวอย่างที่มีปริมาณเซลล์โซมาติก สูงกว่า 500,000 เซลล์/มิลลิลิตร ไม่สามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่สาเหตุของโรคเต้านมอักเสบได้ ทำให้การตรวจโรคเต้านมอักเสบ จำเป็นต้องตรวจเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเต้านมอักเสบร่วมด้วยผลที่ได้จึงจะถูกต้อง สอดคล้องกับรายงานของกิตติกรและคนอื่นๆ (2545) ที่พบว่า การศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมกับการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ ทำให้สามารถวินิจฉัยและควบคุมโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของระดับ CMT อาการโรคเต้านมอักเสบและปริมาณเซลล์โซมาติก ดัดแปลงจาก พนัส (2537); วาสนาและคนอื่นๆ (2545)

ระดับ CMT	อาการโรคเต้านมอักเสบ	Somatic cell (cell/ml)
0	ไม่มีอาการ (ปกติ)	< 200,000
T	เริ่มมีอาการ	200,000-500,000
1	ระดับน้อย	500,000-1,000,000
2	ระดับมาก	>1,000,000

7.2.3. การตรวจเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุสำคัญของการเกิดโรคเต้านมอักเสบ

สุณีรัตน์ (2541) และ William *et al.* (2002) รายงานผลการศึกษาปริมาณเซลล์โซมาติกร่วมกับการศึกษาชนิดแบคทีเรียในน้ำนม และผลกระทบจากการสูญเสียผลผลิตน้ำนมดิบที่มีคุณภาพต่ำอันเนื่องมาจากการเกิดโรคเต้านมอักเสบ โดยพบว่าที่ระดับเซลล์โซมาติก 500,000 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งในปัจจุบันใช้เป็นเกณฑ์ชี้วัดว่าเป็นน้ำนมดิบที่ได้จากโคที่ปกตินั้น มีการสูญเสียน้ำนมดิบคุณภาพต่ำจากการเกิด โรคเต้านมอักเสบไปแล้วถึงร้อยละ 9 ของปริมาณน้ำนมที่ควรผลิตได้ ทำให้การตรวจชนิดแบคทีเรียในน้ำนมดิบ สามารถบ่งบอกปริมาณน้ำนมดิบที่ต้องสูญเสียไปจากเกิดโรคเต้านมอักเสบได้ดีกว่าการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติก (ตารางที่ 5) อีกทั้งยังระบุการเกิดโรคเต้านมอักเสบได้ดีกว่า เนื่องจากรายงานวิจัยส่วนใหญ่ได้ระบุว่า การเกิดโรคเต้านมอักเสบมีสาเหตุสำคัญจากเชื้อแบคทีเรีย (พรพิมล, 2545; อนุชิต, 2545; Shem *et al.,* 2001)

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง CMT เซลล์โซมาติก เชื้อแบคทีเรีย และผลผลิตน้ำนมที่เสียไป ดัดแปลงจาก สุณีรัตน์ (2541) และ William *et al.* (2002)

ระดับ CMT	จำนวนโซมาติกเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	เชื้อแบคทีเรียที่พบ	ผลผลิตน้ำนมที่สูญเสียไป (ร้อยละของปริมาณที่ควรผลิตได้)
0	100,000	total coliform bacteria	3
	200,000		6
T	300,000	total coliform *bacteria*, *Staphylococcus aureus*	7
	400,000		8
	500,000		9
1	600,000	total coliform bacteria , *Staphylococcus aureus* , *Streptococcus* spp., *Streptococcus agalactiae,*	10
	700,000		
	800,000	total coliform bacteria , *Staphylococcus aureus* , *Streptococcus* spp.	11
	900,000		
	1,000,000		12
2	1,200,000	total coliform bacteria , *Staphylococcus aureus* , *Streptococcus* spp., *Streptococcus agalactiae, Bacillus* spp.	>12

8. วิธีการศึกษาประชากรแบคทีเรีย

ปัจจุบันการศึกษาประชากรแบคทีเรียสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การศึกษาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture-dependent methods) และไม่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture-independent methods) การศึกษาวิธีแรกเป็นการนำแบคทีเรียที่อยู่ในตัวอย่างมาเลี้ยงให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการนับจำนวนและสังเกตลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้น แต่การศึกษาประชากรแบคทีเรียด้วยวิธีการดังกล่าวยังมีข้อจำกัด โดยแต่ละโคโลนีที่พบอาจมาจากหลายเซลล์ที่จับตัวกันเป็นกลุ่มก้อน ทำให้ปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจได้มีปริมาณน้อยกว่าความเป็นจริง เนื่องจากมีรายงานวิจัยเป็นจำนวนมากที่พบว่ามีประชากรแบคทีเรียเพียงร้อยละ 1 ของแบคทีเรียทั้งหมดเท่านั้นที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และชนิดที่เจริญอาจไม่ใช่แบคทีเรียกลุ่มเด่นในสภาพแวดล้อมหรือเป็นสาเหตุที่แท้จริงในการก่อให้เกิดโรค แต่เป็นชนิดที่เจริญได้ดีในสภาวะห้องทดลองบนอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น (Amann *et al*., 1995; Eilers *et al*., 2000; Bianchi and Giuliano, 1996) แม้ว่าจะมีการใช้อาหารที่เหมาะสม อาจจะพบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้มากที่สุดไม่เกินร้อยละ 15 ของแบคทีเรียทั้งหมดเท่านั้น (Wagner *et al*., 1995)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคการศึกษาประชากรแบคทีเรีย โดยไม่อาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นเพื่อแก้ไขข้อจำกัดของวิธีการศึกษาด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีด้วยกันหลายวิธีการ เช่น การนับตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมเซลล์ด้วยสีหรือสารเรืองแสง การใช้ Flow cytometry และเทคนิคที่อาศัยข้อมูลจากลำดับเบสบนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA approach technique) เช่น Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Fluorescence *In Situ* hybridization (FISH) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการศึกษาประชากรแบคทีเรียมากกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ (Manz *et al*., 1992)

วิธีการศึกษาปริมาณเซลล์แบคทีเรียโดยการใช้เครื่อง Flow cytometry ที่อาศัยการทำให้เซลล์ที่ได้รับการติดเครื่องหมายเป็นสีย้อมเรืองแสงเคลื่อนที่ผ่านตัวตรวจจับ (detector) ทางหลอดเล็กๆ (Flow cell) เพื่อนับปริมาณเซลล์ที่มีในตัวอย่าง ซึ่งวิธีการนี้มีการนำมาใช้เมื่อ 20-30 ปีมาแล้ว (Veal *et al.*, 2000) โดย Gunasekera *et al.* (2000) และ Gunasekera *et al.* (2002) ได้นำเอาวิธีการดังกล่าวมาใช้ตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกและแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนม ร่วมกับการตรวจปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า การใช้เครื่อง Flow cytometry สามารถตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกและปริมาณแบคทีเรียได้ โดยปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจได้มีปริมาณมากกว่าการตรวจด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

การใช้ Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้เป็นล้านชุดภายในเวลาเพียง 3-4 ชั่วโมง (สุรินทร์, 2545) โดย Fernandez *et al.* (1998) ได้นำวิธีการดังกล่าวมาใช้ศึกษาแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในแกะ ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเต้านมอักเสบในแกะคือ แบคทีเรียจีนัส *Streptococcus parasanguinis* ขณะที่การศึกษาของ Alexandre *et al.* (2000) ที่นำเทคนิคนี้มาใช้ตรวจชนิดของแบคทีเรียในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบร่วมกับการทำ Southern blot และการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติก พบว่า ปริมาณเซลล์โซมาติกมีความสัมพันธ์กับการตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม

เทคนิค Fluorescence *In Situ* hybridization (FISH) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์ประชากรของแบคทีเรีย (Aoi *et al.*, 2000) และเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมในการศึกษาประชากรแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ระบบบำบัดน้ำเสีย แหล่งน้ำธรรมชาติ เป็นต้น (Amann *et al*., 2001) โดยอาศัยข้อมูลเกี่ยวกับ Ribosomal RNA ในสิ่งมีชีวิตเพื่อออกแบบ Oligonucleotides ให้มีความจำเพาะกับสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ซึ่ง Oligonucleotides ดังกล่าวจะมีการติดฉลากสารเรืองแสง เพื่อเป็นตัวบ่งชี้การจับตัวกันของ Oligonucleotides กับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายภายในเซลล์ โดยเรียก Oligonucleotides ที่มีการติดฉลากสารเรืองแสงว่า “ Probe” ซึ่งวิธีการนี้สามารถใช้นับจำนวน หรือจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นได้อย่างสะดวก รวดเร็ว เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้โดยตรงคล้ายกับการย้อมสีเซลล์แบคทีเรีย ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอีพิฟลูออเรสเซนส์ (Epifluorescence microscopy) หรือ กล้อง Confocal Scanning Laser Microscopy (CSLM) จะสามารถมองเห็นการเรืองแสงของ Probe ที่จำเพาะเจาะจงกับแบคทีเรียกลุ่มนั้นๆได้

รายงานการศึกษาของ Gunasekera *et al*. (2003) ที่ใช้เทคนิค FISH ในการตรวจสอบแบคทีเรียจีนัส *Pseudomonas* spp. ในตัวอย่างน้ำนมร่วมกับการทำ PCR พบว่า เทคนิค FISH สามารถจำแนกชนิดของ *Pseudomonas* spp. ได้ไม่แตกต่างกับการทำ PCR แต่การทำ FISH ในน้ำนมจำเป็นต้องกำจัดโปรตีนและไขมันก่อน เพื่อให้การนับจำนวนมีความถูกต้องมากขึ้น เนื่องจากโปรตีนและไขมันสามารถเกิดการเรืองแสงได้เอง (autofluorescence) (Effie *et al*., 2001)

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Trypticase Soya Agar (Merck Ltd., Germany)

1.2 Mannitol Salt Phenol-red Agar (Merck Ltd., Germany)

1.3 KF Streptococcus Agar (Merck Ltd., Germany)

1.4 Fluorocount Lauryl Sulfate Broth (Merck Ltd., Germany)

2. สารเคมี

2.1 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Fluka, Switzerland)

2.2 Triton x – 100 (Fluka, Switzerland)

2.3 Protease from *Bacillus* sp. (Sigma, Germany)

2.4 Oligonucleotide probe (Thermoelectron , Germany)

2.5 4′,6-diamidino 2- phenylindole (Sigma, Germany)

3. อุปกรณ์

3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่าง (Bright field microscope; Olympus CH 20, Japan)

3.2 กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Epifluorescence microscope; Olympus BX51, Japan)

3.3 กล้องถ่ายภาพ Cooled CCD Digital Camera (Olympus DP50, Japan)

3.4 Viewfinder Lite software version 1 (Olympus, Japan)

3.5 เครื่องมือตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกอัตโนมัติ (Somacount® 150, USA)

3.6 ตู้บ่มเชื้อ Hybridiser (TECHNE , England)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาสถานการณ์ปัจจุบันของโรคเต้านมอักเสบ และความสัมพันธ์ของแบคทีเรียสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมของฟาร์มโคนม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง

การศึกษานี้ต้องการสำรวจข้อมูลเบื้องต้น เพื่อหาแนวทางการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยและเพื่อการป้องกันโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนม โดยเลือกกลุ่มตัวอย่างฟาร์มโคนมของเกษตรกร อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1.1 ศึกษาสถานการณ์ของโรคเต้านมอักเสบ

การศึกษาสถานการณ์ปัจจุบันและการระบาดของโรคเต้านมอักเสบในโคนมของเกษตรกร อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง เพื่อต้องการทราบความเข้าใจของเกษตรกรในการส่งน้ำนมดิบให้แก่สหกรณ์โคนม จังหวัดพัทลุง และเปรียบเทียบวิธีการจำแนกโรคเต้านมอักเสบในถังรวมนมที่ใช้ในปัจจุบันว่ามีความสอดคล้องกันมากน้อยเพียงใด โดยกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาครั้งนี้ คือ ฟาร์มโคนมของสมาชิกสหกรณ์โคนม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง จำนวน 78 ฟาร์ม โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

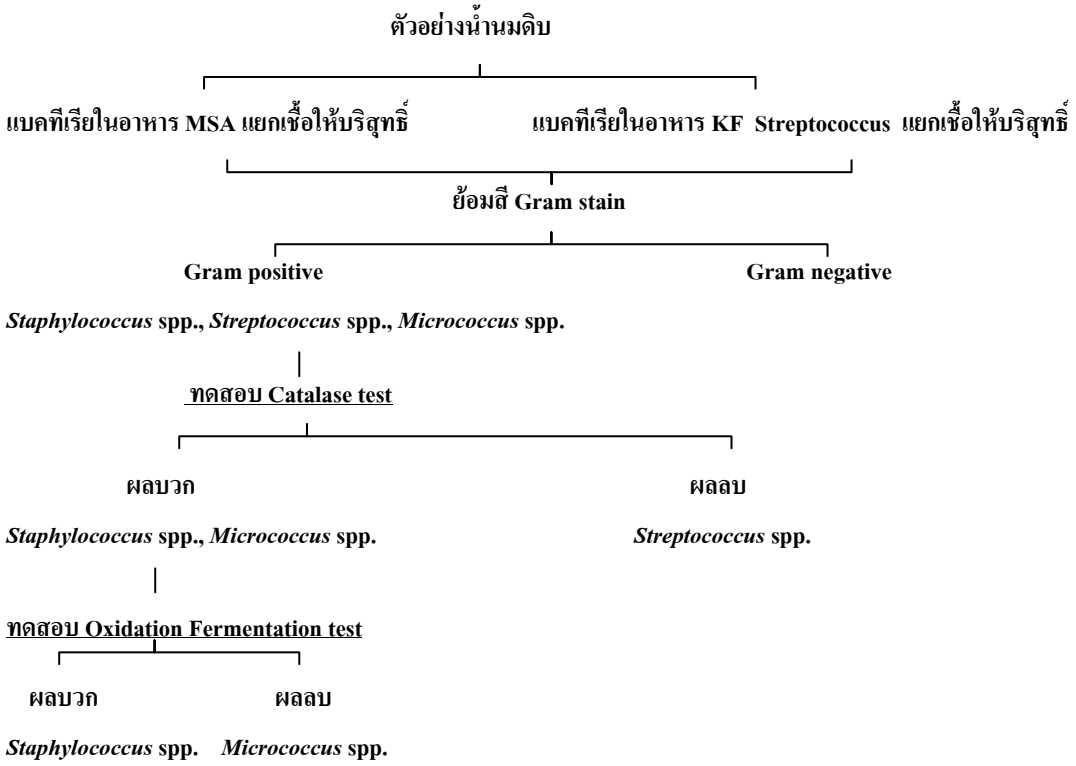
1.1.1 การเก็บตัวอย่าง

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

1.1.2 การจำแนกอาการของโรคเต้านมอักเสบ

นำตัวอย่างน้ำนมดิบมาตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกเบื้องต้นด้วยน้ำยา California mastitis test (CMT) และส่งตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 ที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร ร่วมกับทดสอบ Alcohol test ทดสอบ Methylene blue reduction test (ภาคผนวก ก) ตรวจชนิดและปริมาณของแบคทีเรียด้วยวิธีการเกลี่ยตัวอย่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (spread plate) โดยใช้อาหาร Tryptic Soya Agar (TSA) ในการตรวจปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ขณะที่แบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. ใช้อาหาร Mannitol Salt Phenol-red Agar (MSA) และจีนัส *Streptococcus* spp. ใช้อาหาร KF Streptococcus Agar นำโคโลนีที่เจริญใน

อาหาร MSA และ KF Streptococcus Agar ทำการพิสูจน์อัตลักษณ์เบื้องต้น (identification) ด้วยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ตามวิธีการจัดหมวดหมู่ (classification) ของ Bergey's Manual of Determinative Microbiology 9th edition (Holt *et al.*, 1994) ดังแสดงสรุปในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ขั้นตอนเบื้องต้น เพื่อแยกแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบด้วยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

ขณะที่การตรวจปริมาณแบคทีเรียโคโลฟอร์มทั้งหมด (total coliform bacteria) และ *Escherichia coli* ใช้อาหาร Fluorocount Lauryl Sulfate Broth ด้วยวิธีแบบ Most probable number (MPN) ของ George and Jackson (1998) ดังแสดงในภาคผนวก ง

1.1.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของวิธีการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบ โดยการตรวจ Methylene blue reduction test กับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร TSA ปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. และทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับเซลล์โซมาติกกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร TSA ปริมาณแบคทีเรียจีนัส

Staphylococcus spp. และ *Streptococcus* spp. ด้วยโปรแกรม SAS System (1982) ด้วยคำสั่ง Proc GLM/LSMEANS/PDIFF (ภาคผนวก จ)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของวิธีการตรวจโรคเต้านมอักเสบทั้ง 4 แบบ ได้แก่ การทดสอบ Alcohol test การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยน้ำยา California mastitis test (CMT) การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 และการตรวจจุลินทรีย์สาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบด้วยโปรแกรม SAS System (1982) ด้วยคำสั่ง Proc CATMOD (ภาคผนวก จ)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับเซลล์โซมาติก กับการตรวจพบแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp. และ *Staphylococcus* spp. ร่วมกับ *Streptococcus* spp. และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับเซลล์โซมาติก กับการผ่านเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร TSA ปริมาณแบคทีเรียโคโลฟอร์มทั้งหมด ปริมาณ *E. coli* และปริมาณแบคทีเรียโคโลฟอร์มทั้งหมดร่วมกับ *E. coli* ด้วยโปรแกรม SAS System (1982) ด้วยคำสั่ง Proc FREQ (ภาคผนวก จ)

1.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบ

การศึกษานี้ใช้น้ำนมดิบจากเต้านมของแม่โครีดนมในทุกกลุ่มอาการของโรคเต้านมอักเสบเพื่อศึกษาอัตราส่วนและความสัมพันธ์ของแบคทีเรียสาเหตุโรคเต้านมอักเสบในแต่ละกลุ่มอาการ ซึ่งมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1.2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากเต้านมแม่โครีดนมของฟาร์มสมาชิกสหกรณ์โคนม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2547 ถึงเดือนพฤษภาคม 2547 จำนวน 63 ตัวอย่าง เก็บจากเต้านมปกติและเต้านมที่เป็นโรค โดยสังเกตลักษณะเต้านมและน้ำนมเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกเบื้องต้นร่วมกับการทดสอบ California mastitis test (CMT) ซึ่งน้ำนมดิบจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบได้จากเต้านมที่มีลักษณะบวมแดง น้ำนมที่รีดออกมาจะมีลักษณะเป็นตะกอน หรือใส และระดับ CMT ต้องมากกว่า 1 ขณะที่เต้านมปกติจะต้องไม่มีอาการดังกล่าวและระดับ CMT ต้องไม่เกิน 1 (ชวนิศนดากร, 2540) เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง

1.2.2 การจำแนกอาการของโรคเต้านมอักเสบ

นำตัวอย่างน้ำนมดิบมาตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 (Bentley Instruments Inc, USA) โดยแบ่งกลุ่มน้ำนมดิบตามอาการโรคเต้านมอักเสบที่จำแนกด้วย

ปริมาณเซลล์โซมาติก ออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มโคปกติ กลุ่มที่เริ่มมีอาการโรคเต้านมอักเสบ กลุ่มโรคเต้านมอักเสบระดับน้อย และกลุ่มโรคเต้านมอักเสบระดับมาก

1.2.3 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ

ทำการตรวจชนิดและปริมาณแบคทีเรียเช่นเดียวกับข้อ 1.1.2

1.2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับเซลล์โซมาติกกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร TSA ปริมาณแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ด้วยโปรแกรม SAS System (1982) ด้วยคำสั่ง Proc GLM/LSMEANS/PDIFF (ภาคผนวก จ)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับเซลล์โซมาติก กับการตรวจพบแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp. และ *Staphylococcus* spp. ร่วมกับ *Streptococcus* spp. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับเซลล์โซมาติก กับการผ่านเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร TSA ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด ปริมาณ *E. coli* และปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด ร่วมกับ *E. coli* ในแต่ละระดับเซลล์โซมาติกด้วยโปรแกรม SAS System (1982) ด้วยคำสั่ง Proc FREQ (ภาคผนวก จ)

1.3 ศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียสาเหตุโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมกับสภาพแวดล้อม

เก็บตัวอย่างจากน้ำนมดิบและปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมได้แก่ ยางไลเนอร์ ถังรวมนม ถังรีดนม ผ้าเช็ดเต้านมและน้ำล้างเต้านม โดยแบ่งกลุ่มฟาร์มตามปริมาณผลผลิต เพื่อต้องการทราบว่าฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตที่ต่างกัน มีผลต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบอย่างไร และเพื่อศึกษาตัวกลางในการแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมเข้าสู่เต้านม โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1.3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากฟาร์มสมาชิกสหกรณ์โคนม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2547 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2548 จำนวน 18 ฟาร์ม แบ่งเป็นกลุ่มฟาร์มที่ให้ผลผลิตน้อยกว่า 50 กิโลกรัม/วัน กลุ่มฟาร์มที่ให้ผลผลิตระหว่าง 50 ถึง 100 กิโลกรัม/วัน และฟาร์มที่ให้ผลผลิตมากกว่า 100 กิโลกรัม/วัน ทำการคัดเลือกฟาร์มแต่ละกลุ่มแบบสุ่ม โดยแต่ละฟาร์มจะเก็บตัวอย่างจาก 6 แหล่ง คือ น้ำนมดิบ ยางไลเนอร์ ถังรวมนม ถังรีดนม ผ้าเช็ดเต้านมและน้ำล้างเต้านม โดยน้ำนมดิบเก็บจากถังรวมนมของแต่ละฟาร์ม จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดเก็บตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ ขณะที่ ยางไลเนอร์ ถังรวมนม ถังรีดนม และผ้าเช็ดเต้านม เก็บก่อนการรีดนม ด้วยวิธีการ Swab คือใช้สำลีพันปลายไม้ปลอดเชื้อ Swab เป็นพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร (10 x10

เซนติเมตร) เก็บในหลอดทดลองที่บรรจุ 0.1% Peptone water 10 มิลลิลิตร และน้ำที่ใช้ล้างเต้านม เก็บจำนวน 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง

1.3.2 ขั้นตอนการตรวจหาชนิดและปริมาณแบคทีเรีย

ใช้วิธีการเหมือนข้อ 1.2.3

1.3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร TSA ปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบ ยางไลเนอร์ ถังรวมนม ถังรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม น้ำล้างเต้านม และปริมาณผลผลิตด้วยโปรแกรม SAS System (1982) ด้วยคำสั่ง Proc GLM/LSMEANS/PDIFF (ภาคผนวก จ)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการตรวจพบแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบ ยางไลเนอร์ ถังรวมนม ถังรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม และน้ำล้างเต้านมกับปริมาณผลผลิต และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในการผ่านเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร TSA ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำนมดิบกับปริมาณผลผลิตด้วยโปรแกรม SAS System (1982) ด้วยคำสั่ง Proc FREQ (ภาคผนวก จ)

2. การศึกษาเปรียบเทียบการใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคที่นิยมใช้ในปัจจุบันเพื่อตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกของน้ำนมดิบ

เพื่อต้องการให้เทคนิคการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้น้ำนมดิบที่มีคุณภาพแตกต่างกัน ทำให้การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกแตกต่างกัน เนื่องจากปริมาณเซลล์โซมาติกมีผลต่อคุณภาพน้ำนมดิบ

2.1 การเก็บตัวอย่าง

นำตัวอย่างจากข้อ 1.1.1 มาจัดกลุ่มน้ำนมดิบตามระดับเซลล์โซมาติกที่ส่งตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 ที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร เป็นเกณฑ์ในการแบ่งระดับเซลล์โซมาติก โดยแบ่งเป็นกลุ่มน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกน้อยกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร กลุ่มน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกระหว่าง 200,000–500,000 เซลล์/มิลลิลิตร และกลุ่มน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกมากกว่า 500,000 เซลล์/มิลลิลิตร โดยเลือกมากลุ่มละ 3 ตัวอย่าง

2.2 การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบ

การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกจะแบ่งออกเป็น 3 วิธีการ คือ

2.2.1 การตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150

นำตัวอย่างน้ำนมดิบในข้อ 2.1 ที่ต้องการวัดปริมาณเซลล์โซมาติกมาเข้าเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำเข้าเครื่อง Somacount 150 โดยเครื่องจะย้อมเซลล์โซมาติกที่อยู่ในน้ำนมด้วยสีเรืองแสง Ethidium bromide โดยที่ Ethidium bromide จะจับกับ DNA ของเซลล์โซมาติก จากนั้นเครื่องจะนำน้ำนมดังกล่าวเข้าสู่ Flow cell เพื่อตรวจนับปริมาณเซลล์โซมาติก โดยใช้ Helium- Neon laser เป็นแหล่งกำเนิดแสง และใช้ Photomultiplier Detector เป็นตัวตรวจนับจำนวน อ่านผลปริมาณเซลล์โซมาติกจากหน้าจอของเครื่อง (Bentley Instrument, 1998) โดยตรวจตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

2.2.2 การนับตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยย้อมเซลล์ด้วยสี Methylene blue

ทำการพัฒนาสไลด์ที่ใช้ โดยนำสไลด์ต้มในน้ำที่ผสม Detergent ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปเคลือบด้วยสารละลาย Gelatin 0.1 % ที่ผสมด้วย Chromium potassium sulfate 0.01% ที่ร้อน นำมาผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำตัวอย่างในข้อ 2.1 จำนวน 10 ไมโครลิตร มาเกลี่ยให้ทั่วสไลด์ผึ่งให้แห้ง แล้วทำการย้อมเซลล์ด้วยสี Methylene blue ตามวิธีการของสุณีรัตน์ (2544) นำสไลด์ที่ย้อมสีแล้ว มานับปริมาณเซลล์ในแต่ละรอย Smear ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จำนวน 30 Fields โดยนับเฉพาะเซลล์ที่สามารถมองเห็นในพื้นที่ของ Objectives lens เกินครึ่งเซลล์ และเลือก Fields ในการนับแบบสุ่มให้กระจายทั่วพื้นที่รอย Smear ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ 1 ตัวอย่างจะทำการ Smear 5 ครั้ง (จำนวนซ้ำ) แล้วนำปริมาณเซลล์ที่ได้มาคำนวณตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณเซลล์ (cell/ml)} = \frac{(A_1 + A_2 \ldots + A_n) \times 1000 \times B}{30 \times n \times C \times D}$$

n	คือ	จำนวนซ้ำ
$A_1, A_2 \ldots, A_n$	คือ	ปริมาณเซลล์ที่นับได้ในแต่ละซ้ำ
B	คือ	พื้นที่ Smear ตัวอย่าง (ตารางไมโครเมตร)
C	คือ	พื้นที่ของ Objectives lens (ตารางไมโครเมตร)
D	คือ	ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการ Smear (ไมโครลิตร)

2.2.3 การนับตรงด้วยกล้องอีพิฟลูออเรสเซนต์ โดยย้อมสีเซลล์ด้วย DAPI

นำตัวอย่างในข้อ 2.1 จำนวน 5 ไมโครลิตร มาเกลี่ยให้ทั่วสไลด์ จากนั้นจุ่มสไลด์ใน Ethanol 50% 80% 98% อย่างละ 3 นาทีตามลำดับ ผึ่งให้แห้ง จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย DAPI ที่มีความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามธีการของ Wei Yu *et al.* (1995) เพื่อให้สี DAPI ไปจับตัวกับ DNA ภายในเซลล์ แล้วตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Epifluorescence microscope; Olympus BX51) แล้วถ่ายภาพด้วยกล้อง Cooled CCD Digital Camera Olympus DP50 นับปริมาณเซลล์และคำนวณผลเหมือนข้อ 2.2.2 โดยตรวจตัวอย่างละ 5 ซ้ำ

2.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเทคนิคการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบแต่ละวิธีการด้วยโปรแกรม SAS System (1982) ด้วยคำสั่ง Proc GLM/LSMEANS/PDIFF (ภาคผนวก จ)

3. การศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคที่นิยมในปัจจุบันเพื่อตรวจปริมาณและชนิดแบคทีเรียในน้ำนมดิบ

เพื่อต้องการให้เทคนิคการตรวจปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้น้ำนมดิบที่มีคุณภาพแตกต่างกัน ทำให้การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกแตกต่างกัน เนื่องจากปริมาณเซลล์โซมาติกมีผลต่อคุณภาพน้ำนมดิบ

3.1 เปรียบเทียบเทคนิคที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เพื่อตรวจปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบ

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่างจากข้อ 2.1

3.1.2 การตรวจปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบ

การตรวจปริมาณแบคทีเรียออกแบ่งเป็น 4 วิธีการด้วยกัน คือ

3.1.2.1 การตรวจปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร

นำตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Trypticase Soya Agar (TSA) โดยใช้ 0.1% Peptone water ในการเจือจางตัวอย่างน้ำนมดิบ

3.1.2.2 การนับตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยย้อมสีเซลล์ด้วยสี Methylene blue

ใช้วิธีการเหมือนข้อ 2.2.2

3.1.2.3 การนับตรงด้วยกล้องอีพิฟลูออเรสเซนต์ โดยการย้อมสีเซลล์ด้วย DAPI

ใช้วิธีการเหมือนข้อ 2.2.3.

3.1.2.4 การนับตรงด้วยกล้องอีพิฟลูออเรสเซนต์โดยการย้อมสีเซลล์ด้วย DAPI ตามวิธีที่ปรับปรุงขึ้น

นำตัวอย่างน้ำนมดิบมากำจัดโปรตีนและไขมัน ตามวิธีการที่พัฒนาจากวิธีการของ Gunasekera *et al*. (2003) โดยใช้ตัวอย่างน้ำนมดิบจำนวน 1 มิลลิลิตร เติมด้วย 100 ไมโครลิตร ของ Savinase และ 100 ไมโครลิตรของ 0.1% Triton X 100 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 30 - 45 นาที เติม 800 ไมโครลิตร ของ 0.15 M NaCl ปั่นที่ 14,000 rpm เวลา 10 นาที ดูดส่วนบนทิ้ง นำตะกอนด้านล่าง ซึ่งมีเซลล์แบคทีเรียอยู่ เติมด้วย 1 มิลลิลิตร ของ 0.15 M NaCl จากนั้นทำการย้อมเซลล์ด้วย DAPI นับปริมาณเซลล์และคำนวณผลเหมือนข้อ 2.2.2

3.1.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเทคนิคการตรวจปริมาณเซลล์แบคทีเรียในน้ำนมดิบด้วยโปรแกรม SAS System (1982) ด้วยคำสั่ง Proc GLM/LSMEANS/ PDIFF (ภาคผนวก จ)

3.2 การเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจชนิดแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบ

3.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

เติมแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบที่ปราศจากเชื้อโดย หลอดที่ 1 เติมเชื้อ *Escherichia coli* หลอดที่ 2 เติมเชื้อ *Staphylococcus* spp. หลอดที่ 3 เติมเชื้อ *Streptococcus* spp. หลอดที่ 4 เติมเชื้อ *Escherichia coli* กับเชื้อ *Staphylococcus* spp หลอดที่ 5 เติมเชื้อ *Escherichia coli* กับเชื้อ *Streptococcus* spp. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2 การตรวจชนิดแบคทีเรียในน้ำนมดิบ

การตรวจชนิดแบคทีเรียจะทำการเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับการพิสูจน์อัตลักษณ์เบื้องต้น (identification) ด้วยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ตามการจัดหมวดหมู่ (classification) ของ Bergey's Manual of Determinative Microbiology 9th edition (Holt *et al.*, 1994) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบันกับเทคนิค FISH

3.2.2.1 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

ใช้วิธีการเหมือนข้อ 1.2.3

3.2.2.2 การทำเทคนิค FISH

นำตัวอย่างนมมากำจัดโปรตีนและไขมัน เหมือนวิธีการในข้อ3.1.2.4 จากนั้นนำตัวอย่างจำนวน 5 ไมโครลิตร มาทำเทคนิค FISH ตามวิธีการของ Amann *et al*. (1995) โดยไฮบริไดส์ด้วย Probe เพื่อให้ Probe เข้าไปจับตัวกับสายนิวคลิโอไทด์เป้าหมายภายในเซลล์ จากนั้นล้าง Probe ที่ไม่จับตัวหรือจับกันอย่างไม่จำเพาะออก ตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Epifluorescence microscope; Olympus BX51) และถ่ายภาพด้วยกล้อง Cooled CCD Olympus DP50 ซึ่ง Probe ที่ใช้ศึกษาได้แก่ Probe EUB mixed, LGC mixed และGAM 42a (ตารางที่ 6)

3.2.3 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเทคนิคการตรวจชนิดแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบ

เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของการตรวจพบเชื้อ โดยเทคนิคการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับการตรวจสอบอัตลักษณ์เบื้องต้น (identification) โดยปฏิกิริยาทางชีวเคมี ตามการจัดหมวดหมู่ (classification) ของ Bergey's manual of determinative microbiology 9th edition (Holt *et al*., 1994) กับเทคนิค FISH

ตารางที่ 6 DNA Probe ใช้ในการทดลองตรวจสอบกลุ่มของแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH

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

หมายเหตุ * % Formaldehyde ใช้ใส่ใน hybridization buffer

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผล

การศึกษาสถานการณ์และการระบาดของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 ถึง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2547 โดยศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียสาเหตุโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบแต่ละระดับอาการจากถังรวมนมและเต้านมของแม่โค โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังรวมนมของเกษตรกร อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง จำนวน 78 ฟาร์ม รวมถึงน้ำนมดิบจากเต้านมแม่โคที่ปกติและเป็นโรคเต้านมอักเสบระดับอาการต่างๆ จำนวน 63 เต้า อีกทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียดังกล่าวที่พบในน้ำนมดิบและปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม จากฟาร์มจำนวน 18 ฟาร์ม ได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

1. ศึกษาสถานการณ์ปัจจุบันของโรคเต้านมอักเสบ และความสัมพันธ์ของแบคทีเรียสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบกับสภาพแวดล้อมของฟาร์มโคนม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง

ประเทศไทยได้กำหนดจังหวัดที่ต้องการส่งเสริมการเลี้ยงโคนมขึ้น 40 จังหวัด ภาคใต้มีจังหวัดที่ได้รับการส่งเสริมจำนวน 4 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี และพัทลุง โดยจังหวัดพัทลุงนับเป็นจังหวัดที่มีการเลี้ยงโคนมมากที่สุดในภาคใต้ คือ มีจำนวน 328 ราย ใน 6 อำเภอ สามารถผลิตน้ำนมดิบได้ 17.3 ตัน/วัน โดยอำเภอป่าพะยอมสามารถผลิตน้ำนมดิบได้เป็นอันดับหนึ่ง ผลิตน้ำนมดิบได้ 4.9 ตัน/วัน คิดเป็นร้อยละ 28.5 ของปริมาณการผลิตน้ำนมดิบทั้งหมดของจังหวัด (สำนักงานสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 9, 2548) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จำนวนสมาชิก ปริมาณน้ำนมดิบ และจำนวนโคนม ของสหกรณ์โคนมพัทลุง จำกัด ประจำเดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548 (บัญชา สัจจาพันธ์, ติดต่อส่วนตัว)

กลุ่มสมาชิก (อำเภอ)	จำนวนสมาชิก (ราย)	ปริมาณน้ำนมดิบ (กิโลกรัม/วัน)	แม่โครีดนม (ตัว)	แม่โคแห้งนม (ตัว)	โคสาวโครุ่นและลูกโค (ตัว)
ท่ามิหรำ	39	2,574	242	101	272
ท่าแค	68	2,580	278	113	442
ป่าพะยอม	76	4,939	407	144	467
ลำปำ	64	4,358	393	160	546
เขาชัยสน	42	1,586	178	91	227
บางแก้ว	39	1,249	127	50	129
รวม	328	17,285	1,628	609	2,146

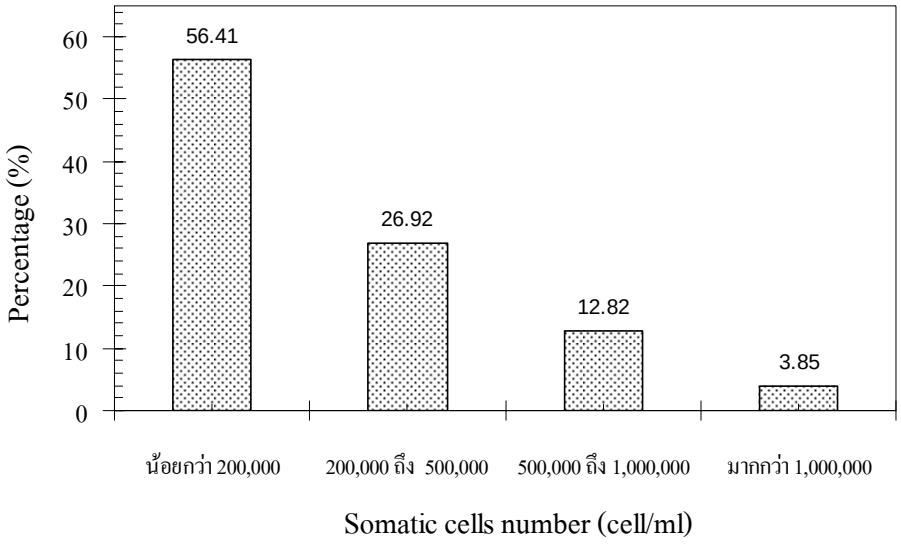
1.1. สถานการณ์โรคเต้านมอักเสบที่เกิดขึ้นในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง

จากผลการศึกษาปริมาณเซลล์โซมาติกในตัวอย่างน้ำนมดิบ จากถังรวมนมของเกษตรกร อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง จำนวน 78 ฟาร์ม ด้วยเครื่อง Somacount 150 เพื่อศึกษาสถานการณ์ปัจจุบันของโรคเต้านมอักเสบในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง เนื่องจากน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจะมีปริมาณเซลล์โซมาติกมากกว่าแม่โคปกติ (พนัส, 2547) ทำให้แบ่งกลุ่มน้ำนมดิบได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกน้อยกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร กลุ่มน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกระหว่าง 200,000 ถึง 500,000 เซลล์/มิลลิลิตร กลุ่มน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกระหว่าง 500,000 - 1,000,000 เซลล์/มิลลิลิตร และกลุ่มน้ำนมดิบที่มีจำนวนเซลล์โซมาติกมากกว่า 1,000,000 เซลล์/มิลลิลิตร ผลการศึกษาพบกลุ่มน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกน้อยกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร จำนวน 44 ตัวอย่าง (ร้อยละ 56.4) กลุ่มน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกระหว่าง 200,000 - 500,000 เซลล์/มิลลิลิตร จำนวน 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 26.9) กลุ่มน้ำนมดิบที่มีปริมาณโซมาติกเซลล์ระหว่าง 500,000 - 1,000,000 เซลล์/มิลลิลิตร จำนวน 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 12.8) และกลุ่มน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกมากกว่า 1,000,000 เซลล์/มิลลิลิตร จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.9) ดังแสดงในภาพที่ 8

จากผลการศึกษาดังกล่าว พบจำนวนตัวอย่างน้ำนมที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกน้อยกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกว่าน้ำนมดิบมาจากโคที่เป็นปกติ คิดเป็นร้อยละ 56.4 ของสมาชิกทั้งหมด ขณะที่มีตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังรวมนมผ่านเกณฑ์มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 (กรมปศุสัตว์, 2542) ที่กำหนดให้ปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 500,000 เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 83.3 ของสมาชิกทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาของพรพิมล (2545) ที่ศึกษาปริมาณเซลล์โซมาติกในตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังรวมนมของฟาร์มเกษตรกร อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ในปี พ.ศ. 2545 ที่รายงานว่า จำนวนตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังรวมนมของฟาร์มเกษตรกร อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ที่มีปริมาณของเซลล์โซมาติกน้อยกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร ร้อยละ 28 ของสมาชิกทั้งหมด และมีจำนวนตัวอย่างน้ำนมดิบผ่านเกณฑ์มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 ร้อยละ 46 ของสมาชิกทั้งหมด

จากข้อมูลการศึกษาของพรพิมล (2545) ทำให้ทราบว่า การเลี้ยงโคนมของเกษตรกร อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ในปี พ.ศ. 2546 นั้น เกษตรกรสามารถควบคุมสถานการณ์การเกิดของโรคเต้านมอักเสบภายในฟาร์มได้ดีกว่าปี พ.ศ. 2545 เนื่องจากปี พ.ศ. 2546 พบจำนวนตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติมากกว่าเมื่อเทียบกับข้อมูลในปี พ.ศ. 2545 และพบว่าเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม

อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง มีความรู้ในการผลิตน้ำนมดิบที่มีมาตรฐานส่งขายแก่สหกรณ์โคนมจังหวัดพัทลุง เพื่อเป็นวัตถุดิบการผลิตนมพร้อมดื่มดีกว่าปี พ.ศ. 2545 ทั้งนี้เนื่องจากสหกรณ์โคนมจังหวัดพัทลุง จำกัด มีการจัดส่งสัตวแพทย์เข้าไปแก้ไขปัญหา และให้ความรู้เกี่ยวกับการเลี้ยงโคนมที่ถูกสุขลักษณะแก่เกษตรกร อีกทั้งยังเข้มงวดต่อคุณภาพของน้ำนมดิบของเกษตรกรที่ส่งขายให้ตรงตามที่มาตรฐานกำหนด ทำให้เกษตรกรเอาใจใส่ต่อการเลี้ยงโคนมให้เป็นไปตามมาตรฐานและสามารถผลิตน้ำนมดิบที่มีคุณภาพได้เพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 6 จำนวนตัวอย่างน้ำนมดิบ (ร้อยละ) จากถังรวมนม จำนวน 78 ฟาร์ม ในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ที่พบในปริมาณเซลล์โซมาติกระดับต่างๆ

จากผลการศึกษาการทดสอบ Methylene blue reduction test จากตัวอย่างน้ำนมดิบในถังรวมนมของเกษตรกร พบว่ามีจำนวน 14 ฟาร์ม (ร้อยละ17.9) ที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 โดยการทดสอบ Methylene blue reduction test เป็นการศึกษาปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำนมทางอ้อม เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. พบว่าการทดสอบ Methylene blue reduction test ไม่สามารถบ่งบอกถึงปริมาณปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำนมดิบได้ ($P>0.05$)

จากผลการศึกษาการระบาดของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มของเกษตรกร อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง โดยการตรวจด้วยวิธีการที่ต่างกัน ได้แก่ การทดสอบการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกเบื้องต้นด้วยน้ำยา California mastitis test (CMT) การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 และการตรวจจุลินทรีย์สาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบ (ตารางที่ 8) พบว่า ทั้ง 4 วิธีการมีประสิทธิภาพในการตรวจแตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยการตรวจจุลินทรีย์สาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบที่รายงานการศึกษาเกี่ยวกับโรคเต้านมอักเสบของโคนมส่วนใหญ่ระบุว่าเป็นแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. พบฟาร์มที่เสี่ยงต่อการระบาดของโรคเต้านมอักเสบจำนวน 58 ฟาร์ม (ร้อยละ 74.4) การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 พบฟาร์มเสี่ยงต่อการระบาดของโรคเต้านมอักเสบจำนวน 34 ฟาร์ม (ร้อยละ 43.6) และการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกเบื้องต้นด้วยน้ำยา CMT พบฟาร์มที่เสี่ยงต่อการระบาดของโรคเต้านมอักเสบจำนวน 18 ฟาร์ม (ร้อยละ 23.1) ขณะที่การทดสอบการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ พบฟาร์มเสี่ยงต่อการะบาดของโรคเต้านมอักเสบเพียง 1 ฟาร์ม (ร้อยละ 1.3) เท่านั้น เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจการระบาดของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์ม พบว่า การตรวจจุลินทรีย์สาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบ เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจการระบาดของโรคมากที่สุด ขณะที่การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกเบื้องต้นด้วย CMT และการทดสอบการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ มีประสิทธิภาพเป็นอันดับที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 สถานการณ์ของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง จากการตรวจด้วยเทคนิคต่างๆ

เทคนิคในการตรวจ	**เสี่ยงต่อการระบาด**	**ไม่เสี่ยงต่อการระบาด**
การตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์	1 ฟาร์ม (ร้อยละ 1.28)	77 ฟาร์ม (ร้อยละ 98.72)
ระดับปฏิกิริยา CMT	18 ฟาร์ม (ร้อยละ 23.08)	60 ฟาร์ม (ร้อยละ 76.92)
ปริมาณเซลล์โซมาติก	34 ฟาร์ม (ร้อยละ 43.59)	44 ฟาร์ม (ร้อยละ 56.41)
เชื้อสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบ	58 ฟาร์ม (ร้อยละ 74.36)	20 ฟาร์ม (ร้อยละ 25.64)

หมายเหตุ ระดับปฏิกิริยา CMT ในน้ำนมดิบของโคนมปกติต้องไม่เกิน ระดับ T (พนัส, 2537; วาสนา, 2545)
เซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบของโคนมปกติต้องไม่เกิน 500,000 cell/ml (พนัส, 2537; วาสนา, 2545)
การทดสอบการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์น้ำนมดิบของโคนมปกติต้องไม่ตกตะกอน (วิพิชญ์, 2546)
ไม่พบเชื้อสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบของโคนมปกติ (สุณีรัตน์, 2544)

ผลการศึกษาการระบาดของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มเกษตรกร ด้วยวิธีการแตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าทุกวิธีการมีความสามารถในการตรวจโรคเต้านมอักเสบได้ แต่ว่าวิธีการแต่ละแบบให้ผลไม่สอดคล้องกัน ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดและความแม่นยำของแต่ละเทคนิคมีความแตกต่างกัน จากรายงานวิจัยของวิพิชญ์ (2546) พบว่าการตรวจการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ให้ผลการทดสอบที่มีความคลาดเคลื่อนสูง โดยมีสาเหตุมาจากความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานในการตรวจผล และการใช้แอลกอฮอล์ ที่มีความเข้มข้นสูงหรือต่ำเกินไป

สำหรับผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยน้ำยา CMT ที่เป็นการทดสอบเชิงคุณภาพที่ง่ายและรวดเร็วกับการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 ที่เป็นการตรวจเชิงปริมาณด้วยเครื่องตรวจนับอัตโนมัติ พบว่า การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยน้ำยา CMT ให้ผลการตรวจตรงกับการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 จำนวน 50 ตัวอย่าง (ร้อยละ 64.1) ขณะที่ 28 ตัวอย่าง (ร้อยละ 53.9) ให้ผลไม่สอดคล้องกัน (ตารางที่ 9) ทำให้การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยน้ำยา CMT มีโอกาสให้ผลการวินิจฉัยโรคที่ไม่ถูกต้อง ส่งผลให้การรักษาผิดพลาด อย่างไรก็ตามการตรวจ CMT ยังจำเป็นต่อเกษตรกร เนื่องจากราคาถูก ตรวจง่าย และใช้เวลาน้อย

ตารางที่ 9 จำนวนตัวอย่างที่พบในปริมาณเซลล์โซมาติกระดับต่างๆ จากการตรวจด้วยน้ำยา CMT และ การตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 และความสอดคล้องของผลการทดสอบทั้ง 2 วิธี

ระดับเซลล์โซมาติก (cell/ml)	CMT (ตัวอย่าง)	Somacount 150 (ตัวอย่าง)	ความสอดคล้องกันระหว่าง CMT กับ Somacount 150 (ตัวอย่าง)
< 200,000	60	44	43 (ร้อยละ 55.13)
200,00 –500,000	16	21	6 (ร้อยละ 7.69)
500,000-1,000,000	2	10	1 (ร้อยละ 1.28)
> 1,000,000	0	3	0 (ร้อยละ 0.00)
รวม	78	78	50 (ร้อยละ 64.10)

สำหรับผลการตรวจแบคทีเรียสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ จีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบจากถังรวมนมจำนวน 78 ฟาร์ม พบว่า มีการตรวจพบแบคทีเรียดังกล่าวจำนวน 58 ฟาร์ม โดยน้ำนมดิบที่มีเซลล์โซมาติกน้อยกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร พบจำนวน 35 ฟาร์ม น้ำนมดิบที่มีเซลล์โซมาติกระหว่าง 200,000-500,00 เซลล์/มิลลิลิตร พบจำนวน 13 ฟาร์ม ขณะที่น้ำนมดิบที่มีเซลล์โซมาติกระหว่าง 500,000-1,000,00 เซลล์/มิลลิลิตร พบจำนวน 7 ฟาร์ม และน้ำนมดิบที่มีเซลล์โซมาติกมากว่า 1,000,000 เซลล์/มิลลิลิตร พบจำนวน 3

ฟาร์ม เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติ พบว่า ปริมาณเซลล์โซมาติกไม่สามารถระบุการพบแบคทีเรียสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบจากถังรวมนมได้ (P>0.05)

ตารางที่ 10 ร้อยละของฟาร์ม (จำนวนฟาร์ม/ฟาร์มทั้งหมดในแต่ละระดับเซลล์โซมาติก) ที่ตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp ในน้ำนมดิบจากถังรวมนม ตามระดับเซลล์โซมาติก

เชื้อจุลินทรีย์ที่พบ	จำนวนเซลล์โซมาติก (เซลล์/มล.)			
	< 200,000	200,000-500,000	500,000-1,000,000	>1,000,000
Stap. spp.	13.64 (6/44)	9.52 (2/21)	0.00 (0/10)	0.00 (0/3)
Strep. spp.	27.27 (12/44)	23.81 (5/21)	40.00 (4/10)	0.00 (0/3)
Stap. spp.+ *Strep.* spp.	38.64 (17/44)	28.57 (6/21)	30.00 (3/10)	100.00 (3/3)
รวม	79.55 (35/44)	61.90 (13/21)	70.00 (7/10)	100.00 (3/3)

หมายเหตุ *Stap.* spp. คือ *Staphylococcus* spp. *Stre. p* spp. คือ *Streptococcus* spp.

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของสุณีรัตน์ (2544) ที่พบว่าปริมาณเซลล์โซมาติกไม่สามารถบ่งบอกการระบาดของโรคเต้านมอักเสบได้อย่างถูกต้อง ทำให้จำเป็นต้องตรวจแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบร่วมด้วย เพื่อใช้เป็นของข้อมูลในการตัดสินการระบาดของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนม

ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. พบว่า น้ำนมดิบมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณเฉลี่ยสูงกว่า 10^6 CFU/มิลลิลิตร ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 (กรมปศุสัตว์, 2542) ที่กำหนดให้มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 4 X 10^5 CFU/มิลลิลิตร (กรมปศุสัตว์, 2542) ขณะที่ปริมาณแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. มีค่าเฉลี่ยของปริมาณที่พบในช่วง 10^4 – 10^5 CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 11) เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์กันทางสถิติของปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวกับระดับเซลล์โซมาติก พบว่า การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกไม่สามารถบ่งบอกปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวในน้ำนมดิบได้ (P>0.05)

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียเฉลี่ยที่พบในน้ำนมดิบจากถังรวมนมกับระดับเซลล์โซมาติก

Somatic cell (cell/ml)	Total bacteria* (CFU/ml)	*Staphylococcus* spp.** (CFU/ml)	*Streptococcus* spp. *** (CFU/ml)
< 200,000	$3.47x10^{6\,(ก)}$	$2.08x10^{5\,(ข)}$	$1.11x10^{5\,(ค)}$
200,00 –500,000	$2.70x10^{6\,(ก)}$	$9.25x10^{4\,(ข)}$	$5.03x10^{4\,(ค)}$
500,000-1,000,000	$2.10x10^{6\,(ก)}$	$1.28x10^{5\,(ข)}$	$4.45x10^{4\,(ค)}$
> 1,000,000	$5.87x10^{6\,(ก)}$	$8.53x10^{4\,(ข)}$	$7.07x10^{4\,(ค)}$

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

* คือ ใช้วิธีการ Spread plate บนอาหาร TSA

** คือ ใช้วิธีการ Spread plate บนอาหาร MSA

*** คือ ใช้วิธีการ Spread plate บนอาหาร KF Streptococcus Agar

ผลการศึกษา การผ่านเกณฑ์มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดในน้ำนดิบจากถังรวมนม และการผ่านเกณฑ์มาตรฐานจุลชีววิทยาอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2536 ของปริมาณ *E.coli* ในน้ำนดิบจากถังรวมนม พบว่า ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดจำนวน 54 ฟาร์ม (ร้อยละ 69.2) ขณะที่ปริมาณ *E. coli* ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดจำนวน 30 ฟาร์ม (ร้อยละ 38.6) ดังแสดงในตารางที่ 12 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติในการผ่านเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และปริมาณ *E. coli* กับระดับเซลล์โซมาติก พบว่า ปริมาณเซลล์โซมาติกไม่สามารถบ่งชี้การผ่านเกณฑ์มาตรฐานของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวได้ ($P>0.05$)

จากผลการศึกษากล่าวได้ว่า เกษตรกรอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ยังขาดความรู้และความเอาใจใส่เกี่ยวกับการรักษาสุขลักษณะภายในฟาร์มและระหว่างการรีดนม (ภาพที่ 9) ทำให้พบน้ำนมดิบที่มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด ไม่ผ่านมาตรฐานสูงถึงร้อยละ 69.2 ของฟาร์มทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงโคนมในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง เป็นการเลี้ยงกันเองภายในครอบครัว ทำให้ขาดแคลนแรงงานในการรักษาความสะอาดของฟาร์ม

ภาพที่ 7 สิ่งแวดล้อมบริเวณฟาร์มโคนม

ก. แม่โครีดนมที่ยืนแช่ในมูลโคบริเวณที่รีดนม

ข. มูลโคที่ตั้งทิ้งไว้บริเวณที่รีดนม

ตารางที่ 12 ร้อยละของฟาร์ม (จำนวนฟาร์ม/ฟาร์มทั้งหมดในแต่ระดับเซลล์โซมาติก) ที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำนมดิบจากถังรวมนม ตามระดับเซลล์โซมาติก

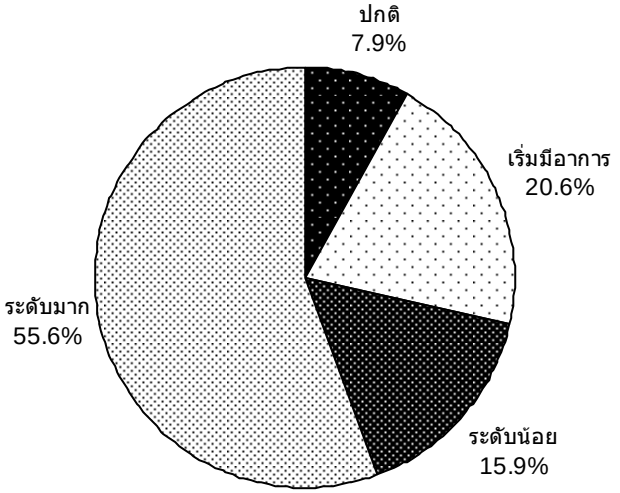
แบคทีเรีย	**ระดับเซลล์โซมาติก (เซลล์/มล.)**				**รวม**
	< 200,000	**200,000-500,000**	**500,000-1,000,000**	**>1,000,000**	
แบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)					
ไม่ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	43.59 (34/78)	15.38 (12/78)	6.41 (5/78)	3.85 (3/78)	69.23 (54/78)
ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	12.82 (10/78)	11.54 (9/78)	6.41 (5/78)	0 (0/78)	30.77 (24/78)
แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (MPN/ml)					
ไม่ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	38.46 (30/78)	17.95 (14/78)	8.97 (7/78)	3.85 (3/78)	69.23 (54/78)
ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	17.95 (14/78)	8.97 (7/78)	3.85 (3/78)	0.00 (0/78)	30.77 (24.78)
E. coli (MPN/ml)					
ไม่ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	19.23 (15/78)	12.82 (10/78)	5.13 (4/78)	1.28 (1/78)	38.46 (30/78)
ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	37.18 (29/78)	14.10 (11/78)	7.69 (6/78)	2.56 (2/78)	61.54 (48/78)

หมายเหตุ มาตรฐานปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ที่ในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 400,000 CFU/ml (กรมปศุสัตว์, 2542)
มาตรฐานแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด ที่ในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 10,000 CFU/ml (กรมปศุสัตว์, 2542)
มาตรฐาน *E. coli* ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 50 MPN/ml (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2536)

1.2. ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียสาเหตุโรคเต้านมอักเสบที่พบในน้ำนมดิบของแม่โครีดนม

1.2.1 การจำแนกอาการโรคเต้านมอักเสบตามปริมาณเซลล์โซมาติก

ผลการศึกษาปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 ในน้ำนมดิบจากเต้านมแม่โครีดนมของฟาร์มเกษตรกร อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง จำนวน 63 เต้า จาก 24 ฟาร์ม พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มโคนมได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มโคปกติที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบน้อยกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร มีจำนวน 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.9) กลุ่มโคที่เริ่มมีอาการโรคเต้านมอักเสบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบระหว่าง 200,000–500,000 เซลล์/มิลลิลิตร จำนวน 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20.6) และกลุ่มโคเป็นโรคเต้านมอักเสบระดับน้อยที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบระหว่าง 500,000 – 1,000,000 เซลล์/มิลลิลิตร จำนวน 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15.9) และกลุ่มที่เป็นโรคเต้านมอักเสบระดับมากที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบมากกว่า 1,000,000 เซลล์/มิลลิลิตร จำนวน 35 ตัวอย่าง (ร้อยละ 55.6) ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 8 ผลการจำแนกกลุ่มอาการของโรคเต้านมอักเสบตามวิธีของพนัส (2537) จากการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 ในฟาร์มโคนม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง

ผลการตรวจแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ที่เป็นแบคทีเรียสาเหตุหลักของการเกิดโรคเต้านมอักเสบกับระดับเซลล์โซมาติก พบว่า ในทุกระดับเซลล์โซมาติกสามารถตรวจพบแบคทีเรียดังกล่าวได้ โดยน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกน้อยกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร ตรวจพบแบคทีเรียดังกล่าวจำนวน 5 ฟาร์ม น้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกระหว่าง 200,000-500,00 เซลล์/มิลลิลิตร ตรวจพบแบคทีเรียดังกล่าวจำนวน 12 ฟาร์ม ขณะที่น้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกระหว่าง 500,000-1,000,00 เซลล์/มิลลิลิตร ตรวจพบแบคทีเรียดังกล่าวจำนวน 8 ฟาร์ม และน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกมากว่า 1,000,000 เซลล์/มิลลิลิตร ตรวจพบแบคทีเรียดังกล่าวจำนวน 25 ฟาร์ม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของนิมิตและคนอื่นๆ (2537) พรพิมล (2545) อรัญและคนอื่นๆ (2546) Shem *et al.* (2001) และ William *et al.* (2002) ที่รายงานว่า สามารถพบแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำนมดิบจากแม่โครีดนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบได้ แต่ผลการศึกษาครั้งนี้มีการตรวจพบแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำนมดิบจากเต้านมโคนมปกติด้วย (ตารางที่ 13) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติ พบว่า การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกไม่สามารถระบุการตรวจพบแบคทีเรียสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบน้ำนมดิบได้ ($P>0.05$)

ตารางที่ 13 ร้อยละของฟาร์ม (จำนวนฟาร์ม/ฟาร์มทั้งหมดในแต่ระดับเซลล์โซมาติก) ที่ตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp ในน้ำนมดิบจากเต้านม ตามระดับเซลล์โซมาติก

เชื้อจุลินทรีย์ที่พบ (ร้อยละ)	จำนวนเซลล์โซมาติก (เซลล์/มล.)			
	< 200,000	200,000-500,000	500,000-1,000,000	>1,000,000
Stap. spp.	20.00 (1/5)	30.77 (4/13)	50.00 (5/10)	25.71 (9/35)
Strep. spp.	0.00 (0/5)	7.69 (1/13)	0.00 (0/10)	8.57 (3/35)
Stap. spp.+ *Strep.* spp.	80.00 (4/5)	53.85 (7/13)	30.00 (3/10)	37.14 (13/35)
รวม	100.00 (5/5)	92.31 (12/13)	80.00 (8/10)	71.43 (25/35)

หมายเหตุ *Stap.* spp. คือ *Staphylococcus* spp. *Strep.* spp. คือ *Streptococcus* spp.

1.2.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบ

ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคเต้านมอักเสบ พบว่า ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีปริมาณอยู่ระหว่าง 10^8 - 10^9 CFU/มิลลิลิตร

ซึ่งไม่ผ่านมาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย ในทุกระดับเซลล์โซมาติก ขณะที่แบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. มีปริมาณอยู่ระหว่าง 10^5 - 10^6 CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 14) เมื่อทำการเปรียบเทียบการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp ด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติ พบว่า การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกไม่สามารถบ่งบอกถึงปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำนมดิบได้ (P>0.05)

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียเฉลี่ย ที่พบในตัวอย่างน้ำนมดิบจากเต้านมกับกลุ่มอาการของโรคเต้านมอักเสบที่จำแนกจากปริมาณเซลล์โซมาติก (ในตารางที่ 4)

กลุ่มอาการโรคเต้านมอักเสบ	Total bacteria* (CFU/ml)	*Staphylococcus* spp.** (CFU/ml)	*Streptococcus* spp.*** (CFU/ml)
ปกติ	$1.54x10^{9\,(ก)}$	$9.43x10^{6\,(ข)}$	$2.57x10^{6\,(ค)}$
เริ่มมีอาการ	$9.92x10^{8\,(ก)}$	$1.66x10^{6\,(ข)}$	$3.09x10^{6\,(ค)}$
ระดับน้อย	$1.39x10^{9\,(ก)}$	$5.53x10^{6\,(ข)}$	$4.50x10^{5\,(ค)}$
ระดับมาก	$9.20x10^{8\,(ก)}$	$3.93x10^{6\,(ข)}$	$3.48x10^{6\,(ค)}$

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

* คือ ใช้วิธีการ Spread plate บนอาหาร TSA

** คือ ใช้วิธีการ Spread plate บนอาหาร MSA

*** คือ ใช้วิธีการ Spread plate บนอาหาร KF Streptococcus Agar

เมื่อพิจารณาผลการศึกษา การผ่านเกณฑ์มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดในน้ำนมดิบจากเต้านมแม่โครีดนม และการผ่านเกณฑ์มาตรฐานจุลชีววิทยาอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2536 ของปริมาณ *E. coli* ในน้ำนมดิบจากเต้านมแม่โครีดนม พบว่า ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานในทุกตัวอย่าง ขณะที่ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดและปริมาณ *E. coli* ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานน้อยมาก คือ 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 9.5) และ 23 ตัวอย่าง (ร้อยละ 36.5) ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 15 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติในการผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และปริมาณ *E. coli* กับระดับเซลล์โซมาติก พบว่า ปริมาณเซลล์โซมาติกไม่สามารถบ่งบอกการผ่านเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและปริมาณ *E. coli* ในน้ำนมดิบจากเต้านมของแม่โครีดนมได้ ($P>0.05$) แต่ปริมาณเซลล์โซมาติกสามารถบ่งชี้การผ่านเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดในน้ำนมดิบจากเต้านมแม่โครีดนมได้ ($P<0.05$) โดยน้ำนมดิบที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกสูง จะส่งผลให้น้ำนมดิบไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542

ตารางที่ 15 ร้อยละของฟาร์ม (จำนวนฟาร์ม/ฟาร์มทั้งหมดในแต่ละระดับเซลล์โซมาติก) ที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำนมดิบจากถังรวมนม ตามระดับเซลล์โซมาติก

แบคทีเรีย	จำนวนเซลล์โซมาติก (เซลล์/มล.)				รวม
	< 200,000	200,000-500,000	500,000-1,000,000	>1,000,000	
Total bacteria (CFU/ml)					
ไม่ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	7.94 (5/63)	20.63 (13/63)	15.87 (10/63)	55.56 (35/63)	100 (63/63)
ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	0.00 (0/63)	0.00 (0/63)	0.00 (0/63)	0.00 (0/63)	0.00 (0/63)
แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด * (MPN/ml)					
ไม่ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	0.00 (0/63)	1.59 (1/63)	3.17 (2/63)	4.76 (3/63)	9.52 (6/63)
ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	7.94 (5/63)	19.05 (12/63)	12.70 (8/63)	50.79 (32/63)	90.48 (57/63)
E. coli (MPN/ml)					
ไม่ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	3.17 (2/63)	7.94 (5/63)	6.35 (4/63)	19.05 (12/63)	36.51 (23/63)
ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	4.76 (3/63)	12.70 (8/63)	9.52 (6/63)	36.51 (23/63)	63.49 (40/63)

หมายเหตุ * แสดงว่ามีความแตกต่างกันในแนวนอน ($P < 0.05$)

มาตรฐาน Total bacteria ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 400,000 CFU/ml (กรมปศุสัตว์, 2542)

มาตรฐาน แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด ที่ในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 10,000 CFU/ml (กรมปศุสัตว์, 2542)

มาตรฐาน *E. coli* ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 50 MPN/ml (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2536)

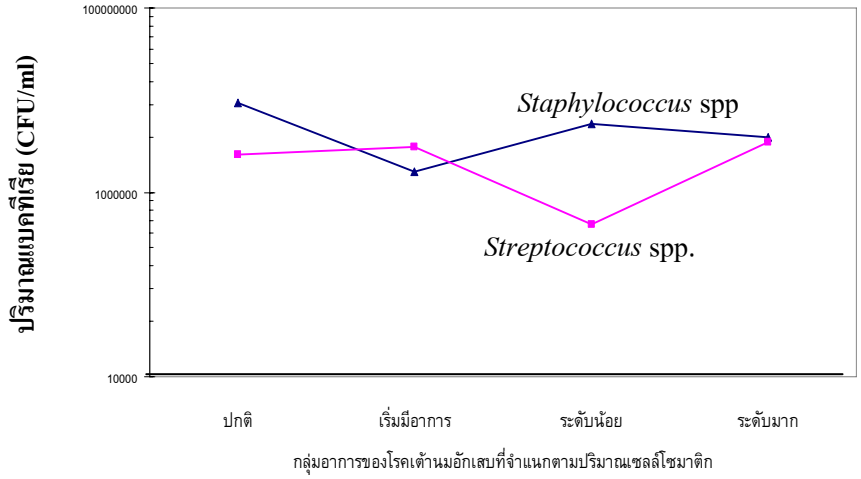
1.2.3 อัตราส่วนและความสัมพันธ์ของแบคทีเรียทั้งหมดกับแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบที่พบในน้ำนม

จากผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. เมื่อนำปริมาณแบคทีเรีย 2 จีนัสดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ปริมาณแบคทีเรียทั้ง 2 จีนัสนี้มีปริมาณน้อยมาก โดยมีปริมาณเพียงร้อยละ 3 ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น (ตารางที่ 16) กล่าวได้ว่า อาจจะมีเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ อีกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม เนื่องจากมีแบคทีเรียอีกร้อยละ 97 ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ได้ทำการจัดจำแนกชนิด อีกทั้งการศึกษาครั้งนี้ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดได้มาจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร ทำให้ปริมาณแบคทีเรียที่ได้บนอาหารอาจไม่ตรงตามความเป็นจริง เนื่องจากแบคทีเรียที่จับตัวเป็นกลุ่มก้อนและมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ไม่เจริญหรือเจริญได้ไม่ดีบนอาหารที่ใช้ในการศึกษานี้ ทำให้ชนิดที่เติบโตอาจไม่ใช่จุลินทรีย์กลุ่มเด่นในสภาพแวดล้อมหรือเป็นสาเหตุของโรคอย่างแท้จริง แต่เป็นชนิดที่มีการปรับตัวให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี (Amann *et al*., 1995; Eilers *et al*., 2000)

ตารางที่ 16 ร้อยละของแบคทีเรียสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบที่พบต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อจำแนกตามกลุ่มอาการของโรคเต้านมอักเสบและปริมาณเซลล์โซมาติก

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

ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคเต้านมอักเสบทำให้ทราบความสัมพันธ์ของแบคทีเรียดังกล่าวในแต่ละระดับอาการ โดยพบจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. มีจำนวนเพิ่มขึ้นและลดลงสลับกัน (ภาพที่ 11) โดยมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) สาเหตุที่ทำให้พบแบคทีเรียดังกล่าวในทุกระดับอาการของโรคเต้านมอักเสบ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) จึงทำให้ตรวจพบได้ในทุกกลุ่มอาการของโรคเต้านมอักเสบ



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ในแต่ละระดับอาการของโรคเต้านมอักเสบ

1.3 ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมกับสภาพแวดล้อม

ผลการศึกษาพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำนมดิบมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 10^6 – 10^7 CFU/มิลลิลิตร โดยทุกกลุ่มฟาร์มไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 และจากการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อกับปริมาณผลผลิต พบว่าปริมาณผลผลิตไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำนมดิบ ($P>0.05$) ขณะที่ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำนมดิบกับปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมทั้ง 5 แห่งในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ ยางไลเนอร์ ถังรวมนม ถังรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม น้ำล้างเต้านม พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมไม่มีผลต่อปริมาณในน้ำนมดิบ ($P>0.05$) โดยน้ำนมดิบมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม (ตารางที่ 17) เนื่องจากการขนส่งน้ำนมดิบจากฟาร์มเกษตรกรไปยังศูนย์รับซื้อน้ำนมดิบมีระยะทางไกลทำให้ต้องใช้เวลานาน อีกทั้งยังขนส่งในอุณหภูมิปกติ ทำให้ปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบเพิ่มปริมาณสูงขึ้น

ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ที่พบในน้ำนมดิบกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม พบว่าปริมาณแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ที่พบในปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวที่พบในน้ำนมดิบ ($P>0.05$) และผลการเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตกับปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ที่พบในน้ำนมดิบและปัจจัย

สิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม พบว่า ปริมาณผลผลิตไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Streptococcus* spp. ที่พบในน้ำนมดิบและปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม ($P>0.05$) แสดงในตารางที่ 19 ขณะที่ปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. ที่พบในน้ำนมดิบของฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตมากกว่า 100 กิโลกรัม/วัน มีปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. น้อยกว่ากับฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตน้อยกว่า 50 กิโลกรัม/วัน ($P<0.05$) และปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวที่พบในถังรวมนมของฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตมากกว่า 50 กิโลกรัม/วัน มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้น้อยกว่ากับฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตน้อยกว่า 50 กิโลกรัม/วัน ($P<0.05$) แสดงในตารางที่ 18 เนื่องจากฟาร์มที่ปริมาณผลผลิตน้อยกว่า 50 กก/วัน เป็นฟาร์มที่เพิ่มเริ่มทำการเลี้ยงโคนม จึงยังขาดความรู้ความเข้าใจในการเลี้ยงโคนม ทำให้พบแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบมากกว่าฟาร์มที่มีการเลี้ยงมานานแล้ว ทำให้ฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตน้อยกว่า 50 กิโลกรัม/วัน มีโอกาสที่จะเกิดจากระบาดของโรคเต้านมอักเสบได้สูงกว่าฟาร์มที่ให้ผลผลิตมากกว่า อีกทั้งฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตน้อยกว่า 50 กิโลกรัม/วัน มีการทำอาชีพอื่นๆร่วมกับอาชีพการเลี้ยงโคนม ทำให้ไม่สามารถเอาใจใส่ดูแลฟาร์มโคนมได้ดีเท่าที่ควร

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการตรวจพบแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบ ยางไลเนอร์ ถังรวมนม ถังรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม และน้ำล้างเต้านม พบว่าการตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. ในถังรวมนมมีความสัมพันธ์กับการตรวจพบในถังรีดนม ($P<0.05$) ดังตารางที่ 20 ขณะที่การตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบมีความสัมพันธ์กับการตรวจพบในยางไลเนอร์ ($P<0.05$) และการตรวจพบในผ้าเช็ดเต้านมมีความสัมพันธ์กับที่พบในน้ำล้างเต้านม ($P<0.05$) ดังตารางที่ 21 เนื่องจากผลิตภัณฑ์คลอรีนเกษตรกรนำมาใช้มีคุณภาพต่ำและแหล่งน้ำใช้ของเกษตรกรมีการปนเปื้อนสารอินทรีย์สูง ทำให้ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของคลอรีนลดลง (สมพงศ์และคนอื่นๆ, 2547) ส่งผลให้ทุกกลุ่มฟาร์มมีโอกาสเสี่ยงต่อการระบาดของโรคเต้านมอักเสบ อย่างไรก็ตามการเกิดโรคเต้านมอักเสบมีโอกาสจากผ้าเช็ดเต้านมน้อยกว่ายางไลเนอร์ เนื่องจากยางไลเนอร์มีราคาแพงทำให้เกษตรกรไม่ยอมเปลี่ยนยางไลเนอร์ที่เสื่อมคุณภาพ ทำให้ยางไลเนอร์ดังกล่าวเป็นแหล่งสะสมและหลบซ่อนของแบคทีเรียสาเหตุสำคัญของโรคเต้านมอักเสบ อีกทั้งยางไลเนอร์เป็นส่วนที่มีการสัมผัสกับบริเวณเต้านมโดยตรงในช่วงการรีดนม ส่งผลให้แบคทีเรียเข้าไปภายในเต้านมทำให้เกิดการอักเสบและเป็นพาหะอย่างดีที่จะนำแบคทีเรียดังกล่าวไปยังแม่โคตัวอื่นๆในฝูง อย่างก็ตามจากการที่พบว่า แบคทีเรียจีนัส *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบสามารถระบุการพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในยางไลเนอร์ได้ ทำให้การตรวจแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำนมดิบสามารถใช้เป็นข้อมูล เพื่อแจ้งเตือนเกษตรกรได้ว่า ยางไลเนอร์ที่ใช้มีโอกาสทำให้เกิดการระบาดของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มได้

ตารางที่ 17 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม โดยแบ่งตามปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบของฟาร์ม

กลุ่มฟาร์ม	ยางไลเนอร์ (CFU/100 cm^2)	ถังรวมนม (CFU/100 cm^2)	ถังรีดนม (CFU/100 cm^2)	ผ้าเช็ดเต้านม (CFU/100 cm^2)	น้ำล้างเต้านม (CFU/100 cm^2)	น้ำนมดิบ (CFU/ml)
ผลผลิตน้อยกว่า 50 กก. (n = 6)	424,100	288,224	19,782	35,021	42,831	8,422,000
ผลผลิตระหว่าง 50-100 กก. (n = 6)	389,840	84,735	58,410	1,733	219,714	9,944,700
ผลผลิตมากกกว่า 100 กก. (n = 6)	162,179	119,664	22,899	13,570	20,840	5,709,100

ตารางที่ 18 ปริมาณ *Staphylococcus* spp. ในตัวอย่างน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม โดยแบ่งตามปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบของฟาร์ม

กลุ่มฟาร์ม	ยางไลเนอร์ (CFU/100 cm^2)	ถังรวมนม (CFU/100 cm^2)	ถังรีดนม (CFU/100 cm^2)	ผ้าเช็ดเต้านม (CFU/100 cm^2)	น้ำล้างเต้านม (CFU/100 cm^2)	น้ำนมดิบ (CFU/ml)
ผลผลิตน้อยกว่า 50 กก. (n = 6)	10,054	17,845	1,105	5	120	68,890
ผลผลิตระหว่าง 50-100 กก. (n = 6)	2,487	36	2,195	10	58	39,840
ผลผลิตมากกกว่า 100 กก. (n = 6)	1,998	1,636	445	220	100	2,031

ตารางที่ 19 ปริมาณ *Streptococcus* spp. ในตัวอย่างน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม โดยแบ่งตามปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบของฟาร์ม

กลุ่มฟาร์ม	ยางไลเนอร์ (CFU/100 cm^2)	ถังรวมนม (CFU/100 cm^2)	ถังรีดนม (CFU/100 cm^2)	ผ้าเช็ดเต้านม (CFU/100 cm^2)	น้ำล้างเต้านม (CFU/100 cm^2)	น้ำนมดิบ (CFU/ml)
ผลผลิตน้อยกว่า 50 กก. (n = 6)	2251	6	0	0	1	132824
ผลผลิตระหว่าง 50-100 กก. (n = 6)	5086	2	62	36	1	11626
ผลผลิตมากกกว่า 100 กก. (n = 6)	638	411	0	9743	1	907

ตารางที่ 20 ร้อยละ (จำนวนฟาร์ม) ของการตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. จากตัวอย่างน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม โดยแบ่งตามปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบของฟาร์ม

กลุ่มฟาร์ม	ยางไลเนอร์		ถังรวมนม		ถังรีดนม		ผ้าเช็ดเต้านม		น้ำล้างเต้านม		น้ำนมดิบ	
	พบ	ไม่พบ	พบ	ไม่พบ	พบ	ไม่พบ	พบ	ไม่พบ	พบ	ไม่พบ	พบ	ไม่พบ
ผลผลิตน้อยกว่า 50 กก. (n = 6)	27.78 (5)	5.56 (1)	33.33 (6)	0.00 (0)	27.78 (5)	5.56 (1)	16.67 (3)	16.67 (3)	27.78 (5)	5.56 (1)	33.33 (6)	0.00 (0)
ผลผลิตระหว่าง 50-100 กก. (n = 6)	33.33 (6)	0.00 (0)	27.78 (5)	5.56 (1)	22.22 (4)	11.11 (2)	22.22 (4)	11.11 (2)	33.33 (6)	0.00 (0)	33.33 (6)	0.00 (0)
ผลผลิตมากกกว่า 100 กก. (n = 6)	33.33 (6)	0.00 (0)	27.78 (5)	5.56 (1)	22.22 (4)	11.11 (2)	16.67 (3)	16.67 (3)	33.33 (6)	0.00 (0)	33.33 (6)	0.00 (0)
รวม	94.44 (17/18)	5.56 (1/18)	88.89 (16/18)	11.11 (2/18)	72.22 (13/18)	27.78 (5/18)	55.56 (10/18)	44.44 (8/18)	94.44 (17/18)	5.56 (1/18)	100.00 (18/18)	0.00 (0/18)

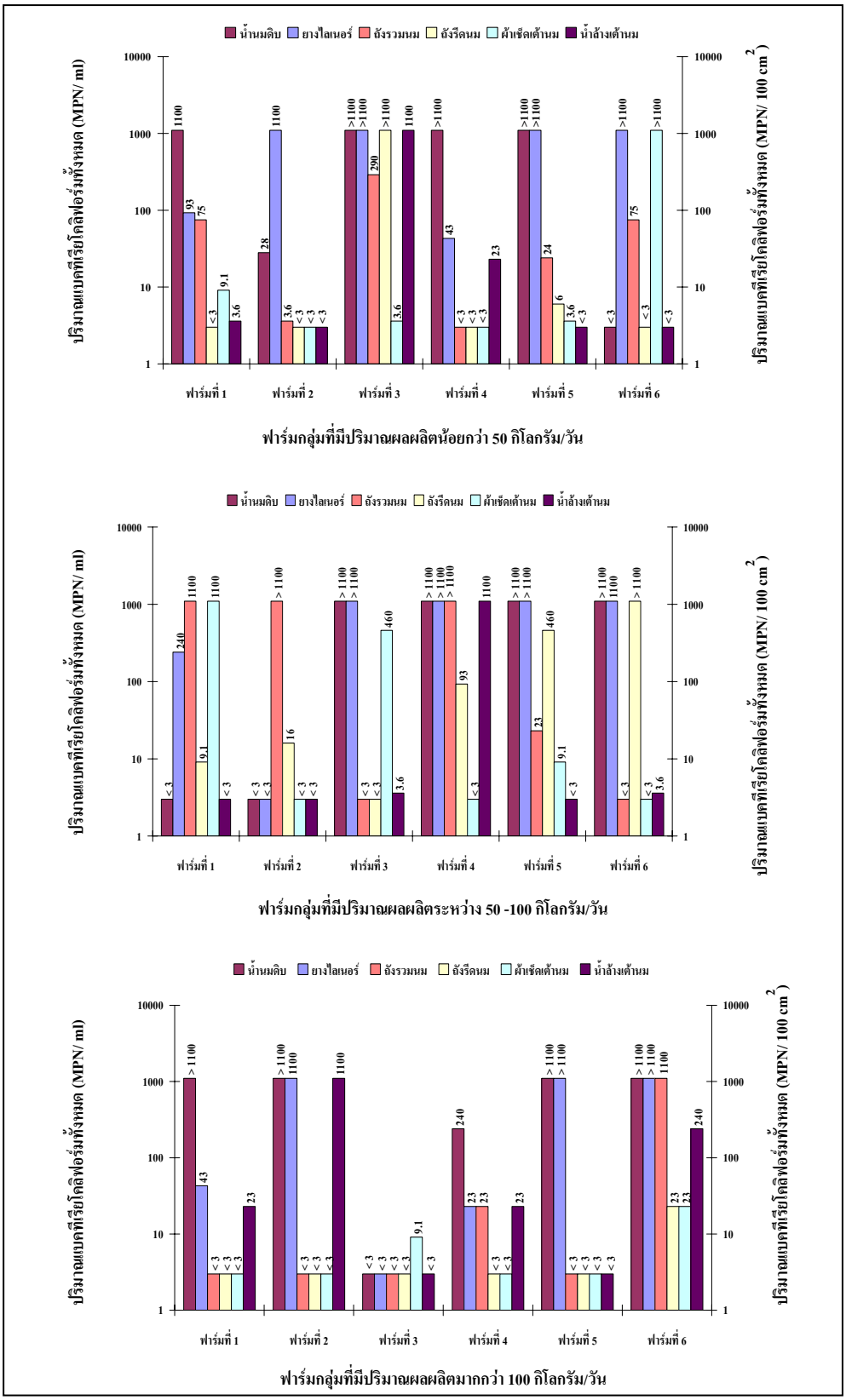
ตารางที่ 21 ร้อยละ (จำนวนฟาร์ม) ของการตรวจพบ ในจีนัส *Streptococcus* spp. จากตัวอย่างน้ำนมดิบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม โดยแบ่งตามปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบของฟาร์ม

กลุ่มฟาร์ม	ยางไลเนอร์		ถังรวมนม		ถังรีดนม		ผ้าเช็ดเต้านม		น้ำล้างเต้านม		น้ำนมดิบ	
	พบ	ไม่พบ	พบ	ไม่พบ	พบ	ไม่พบ	พบ	ไม่พบ	พบ	ไม่พบ	พบ	ไม่พบ
ผลผลิตน้อยกว่า 50 กก. (n = 6)	27.78 (5)	5.56 (1)	11.11 (2)	22.22 (4)	0.00 (0)	33.33 (6)	0.00 (0)	33.33 (6)	5.56 (1)	27.78 (5)	27.78 (5)	5.56 (1)
ผลผลิตระหว่าง 50-100 กก. (n = 6)	27.78 (5)	5.56 (1)	11.11 (2)	22.22 (4)	5.56 (1)	27.78 (5)	11.11 (2)	22.22 (4)	5.56 (1)	27.78 (5)	27.78 (5)	5.56 (1)
ผลผลิตมากกกว่า 100 กก. (n = 6)	22.22 (4)	11.11 (2)	11.11 (2)	22.22 (4)	0.00 (0)	33.33 (6)	5.56 (1)	27.78 (5)	5.56 (1)	27.78 (5)	33.33 (6)	0.00 (0)
รวม	77.78 (14/18)	22.22 (4/18)	33.33 (6/18)	66.67 (12/18)	5.56 (1/18)	94.44 (17/18)	16.67 (3/18)	83.33 (15/18)	16.67 (3/18)	83.33 (15/18)	88.89 (16/18)	11.11 (2/18)

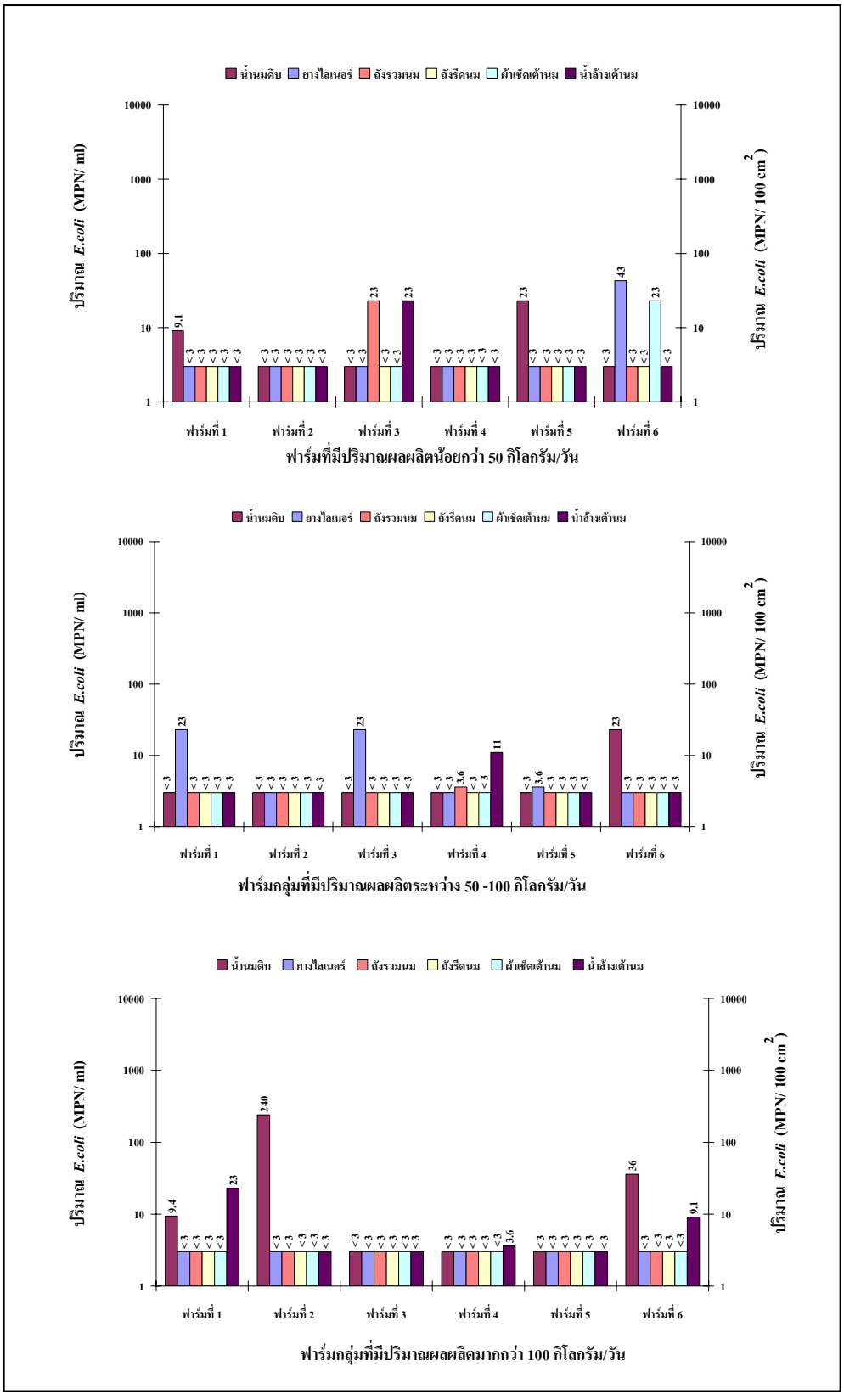
ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดและปริมาณ *E.coli* ในน้ำนมดิบและปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม ในกลุ่มฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตแตกต่างกัน พบว่า ทุกกลุ่มฟาร์มมีโอกาสพบปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดในน้ำนมดิบมากกว่า 1100 MPN/ มิลลิลิตร ซึ่งอาจมีสาเหตุจากยางไลเนอร์ เนื่องจากฟาร์มที่มีปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดในน้ำนมดิบมากกว่า 1100 MPN/ มิลลิลิตร มีการพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในยางไลเนอร์มากกว่า 1100 MPN/ มิลลิลิตรด้วย ขณะที่ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมอื่นๆ มีผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ภาพที่ 10) ส่วนผลการศึกษาปริมาณ *E. coli* ในน้ำนมดิบ พบว่าน้ำนมดิบมีปริมาณ *E. coli* ไม่เกิน 240 MPN/มิลลิลิตร เนื่องจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมมีปริมาณ *E. coli* น้อย คือ ไม่เกิน 23 MPN/มิลลิลิตร (ภาพที่ 11)

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางสถิติของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 และปริมาณ *E. coli* ที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2536 กับปริมาณผลผลิต พบว่าปริมาณผลผลิตไม่มีผลต่อการผ่านเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และปริมาณ *E. coli* ในน้ำนมดิบ ($P>0.05$) โดยพบฟาร์มที่มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณ *E. coli* ไม่ผ่านมาตรฐานเพียงร้อยละ 5.56 ของฟาร์มทั้งหมดที่ทำการเก็บตัวอย่าง

ขณะที่ผลการศึกษาพบปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดในน้ำนมดิบ พบว่าน้ำนมดิบมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ผ่านมาตรฐานร้อยละ 61.1 ของฟาร์มทั้งหมดที่ทำการศึกษา (ตารางที่ 22) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ได้จากการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังรวมนมจำนวน 78 ฟาร์ม ที่พบฟาร์มที่มีปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดในน้ำนมดิบไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานร้อยละ 69.23 สรุปได้ว่าเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง มีการรักษาความสะอาดระหว่างการรีดนมได้ไม่ดี ทำให้พบฟาร์มที่มีการเกิดการปนเปื้อนของปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดเกินเกณฑ์มาตรฐานจำนวนมาก เนื่องจากการเลี้ยงโคนมของเกษตรกร อำเภอป่าพะยอม เป็นการเลี้ยงภายในครอบครัว ทำให้มีแรงงานการรักษาความสะอาดบริเวณฟาร์มและระหว่างการรีดนมไม่เพียงพอ หรือมีสาเหตุจากการที่เกษตรกรไม่ได้เอาใจใส่ต่อความสะอาดของอุปกรณ์รีดนมและระหว่างขั้นตอนการรีดนม จึงควรเข้มงวดต่อคุณภาพของน้ำนมดิบที่รับซื้อจากเกษตรกรให้เป็นไปตามที่มาตรฐานกำหนด เพื่อกระตุ้นเกษตรกรให้เอาใจใส่ต่อความสะอาดของอุปกรณ์รีดนมและระหว่างขั้นตอนการรีดนมเพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 10 ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่พบในน้ำนมดิบและปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมในกลุ่มฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตแตกต่างกัน



ภาพที่ 11 ปริมาณ *E.coli* ที่พบในน้ำนมดิบและปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม ในกลุ่มฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตแตกต่างกัน

ตารางที่ 22 ร้อยละของฟาร์ม (จำนวนฟาร์ม) ที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำนมดิบจากถังรวนนมตามปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบของฟาร์ม

กลุ่มฟาร์ม	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด		ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด		ปริมาณ *E. coli*	
	ไม่ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	ไม่ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	ไม่ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)	ผ่านมาตรฐาน (ร้อยละ)
ผลผลิตน้อยกว่า 50 กก. (n = 6)	5.56 (1)	27.78 (5)	16.67 (3)	16.67 (3)	0.00 (0)	33.33 (6)
ผลผลิตระหว่าง 50-100 กก. (n = 6)	0.00 (0)	33.33 (6)	22.22 (4)	11.11 (2)	0.00 (0)	33.33 (6)
ผลผลิตมากกกว่า 100 กก. (n = 6)	0.00 (0)	33.33 (6)	22.22 (4)	11.11 (2)	5.56 (1)	27.78 (5)
รวม	5.56 (1/18)	94.44 (17/18)	61.11 (11/18)	38.89 (7/18)	5.56 (1/18)	94.44 (17/18)

หมายเหตุ เกณฑ์มาตรฐาน Total bacteria ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 400,000 CFU/ml (กรมปศุสัตว์, 2542)
เกณฑ์มาตรฐานแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 10,000 CFU/มิลลิลิตร (กรมปศุสัตว์, 2542)
เกณฑ์มาตรฐาน *E. coli* ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 50 MPN/มิลลิลิตร (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2536)

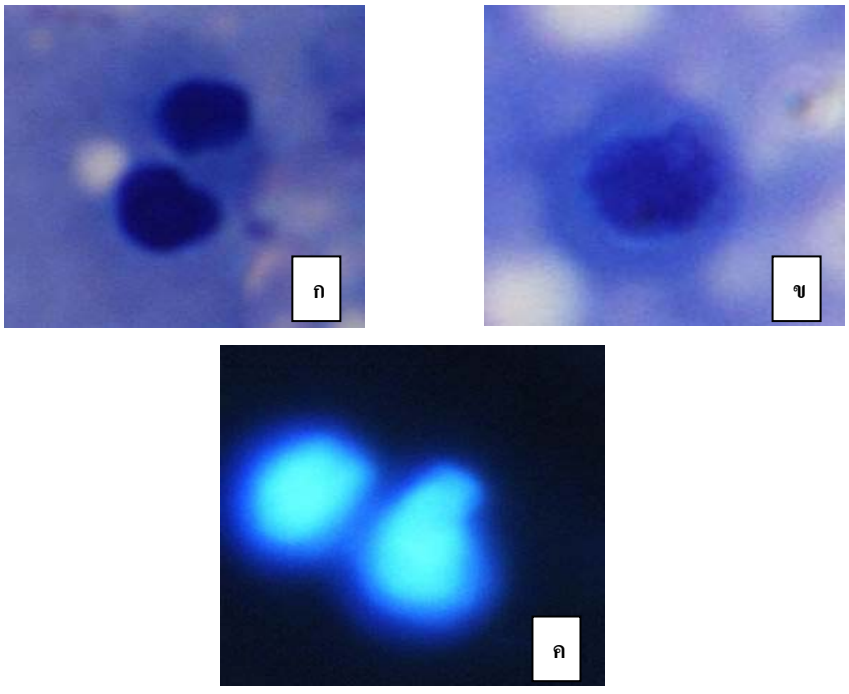
2. การเปรียบเทียบการนับปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่างและกล้องจุลทรรศน์อีพิฟลูออเรสเซนต์

การเปรียบเทียบปริมาณของเซลล์โซมาติกที่ตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 กับการตรวจจากกล้องจุลทรรศน์แบบฉากสว่าง โดยการย้อมเซลล์ด้วย สี Methylene blue พบว่าตัวอย่างที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกน้อยกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาณเซลล์โซมาติกที่ตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 มีความแตกต่างกับปริมาณเซลล์โซมาติกที่ตรวจได้จากการย้อมเซลล์ด้วย สี Methylene blue ($P<0.05$) ขณะที่ตัวอย่างที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกมากกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาณเซลล์โซมาติกที่ตรวจได้ด้วยเครื่อง Somacount 150 ไม่แตกต่างกับปริมาณเซลล์โซมาติกที่ตรวจได้จากการย้อมเซลล์ด้วย สี Methylene blue ($P>0.05$) ดังตารางที่ 23 ทำให้การนับตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสี Methylene blue สามารถใช้แทนการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 ได้ ในตัวอย่างที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกมากกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร และในตัวอย่างที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกน้อยกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตรนั้น การย้อมเซลล์ด้วยสี Methylene blueไม่สามารถใช้แทนการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 ได้ เนื่องมาจากการตรวจนับปริมาณด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสี Methylene blue เป็นการสุ่มนับแล้วที่ใช้สูตรในการคำนวณเป็นปริมาณเซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งใช้ตัวอย่างเพียง 10 ไมโคลิตร/ตัวอย่าง และหากใช้ปริมาตรตัวอย่างมากกว่านี้ในการ Smear ตัวอย่างจะทำให้ตัวอย่างที่ Smear หลุดออกจากสไลด์ ทำให้ผลการตรวจมีความคลาดเคลื่อนมากขึ้น ขณะที่ด้วยเครื่อง Somacount 150 ใช้หลักการ Flow cytometry ที่เป็นการนับโดยตรงจากตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ทำให้ปริมาณเซลล์ที่ได้เป็นปริมาณเซลล์ที่แท้จริง และผลการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์โซมาติกที่ตรวจจากเครื่อง Somacount 150 กับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อีพิฟลูออเรสเซนต์ที่ย้อมเซลล์ด้วยสี DAPI พบว่า ปริมาณเซลล์โซมาติกที่ตรวจได้จากทุกตัวอย่างมีความแตกต่างกัน ($P<0.05$) ดังตารางที่ 23 ทำให้การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อีพิฟลูออเรสเซนต์ไม่สามารถใช้ทดแทนการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 ได้ เนื่องจากการนับด้วยกล้องอีพิฟลูออเรสเซนต์ที่ย้อมเซลล์ด้วยสี DAPI จะเห็นเฉพาะนิวเคลียสของเซลล์โซมาติกหรือเซลล์เม็ดเลือดขาวเท่านั้น ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีนิวเคลียส ได้ตั้งแต่ 1-5 พู ทำให้การตรวจอาจนับ 1 พูนิวเคลียสเป็น 1 เซลล์ได้ แตกต่างกับการนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่สามารถมองเห็นเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 23 ปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบ (Mean ± SD) จากการนับด้วย 3 วิธี

ระดับเซลล์โซมาติก	วิธีการตรวจนับปริมาณเซลล์โซมาติก		
	Somacount 150 (Cell / ml)	**Methylene blue stain** (Cell / ml)	**DAPI stain** (Cell / ml)
น้อยกว่า 200,000 เซลล์/มล.	10,540 ± 2,703 (ก)	23,121, ± 5,277 (ข)	25,963 ± 17,803 (ข)
	104,987 ± 4,816 (ก)	115,607 ± 6,812 (ก)	206,965 ± 11,250 (ข)
	195,713 ± 6,629 (ก)	123,314 ± 12,561 (ข)	321,946 ± 16,039 (ค)
200,000–500,000 เซลล์/มล.	207,907 ± 3,182 (ก)	211, 946,± 9,634 (ก)	479,210 ± 20,551 (ข)
	355,880 ± 4,495 (ก)	360,308,± 17,501 (ก)	511,850 ± 61,842 (ข)
	469,620 ± 6,706 (ก)	493,256 ± 8,060 (ก)	529,653 ± 19,870 (ข)
มากกว่า 500,000 เซลล์/มล.	815,300 ± 12,384 (ก)	816,956 ± 20,886 (ก)	935,918 ± 19,870 (ข)
	1,110,833 ± 5,761 (ก)	1,117,534 ± 15,233 (ก)	1,389,041 ± 164,364 (ข)
	1,682,680 ± 27,195 (ก)	1,687,861 ± 18,531 (ก)	1,939,094 ± 135,098 (ข)

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 12 เซลล์โซมาติกที่ได้จากการย้อมด้วยสี Methylene blue และ DAPI
ก และข. เซลล์โซมาติกจากย้อมเซลล์ด้วย Methylene blue
ค. เซลล์โซมาติกจากการย้อมเซลล์ด้วย DAPI

3. การเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจแบคทีเรียในน้ำนมดิบที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคที่นิยมในปัจจุบัน

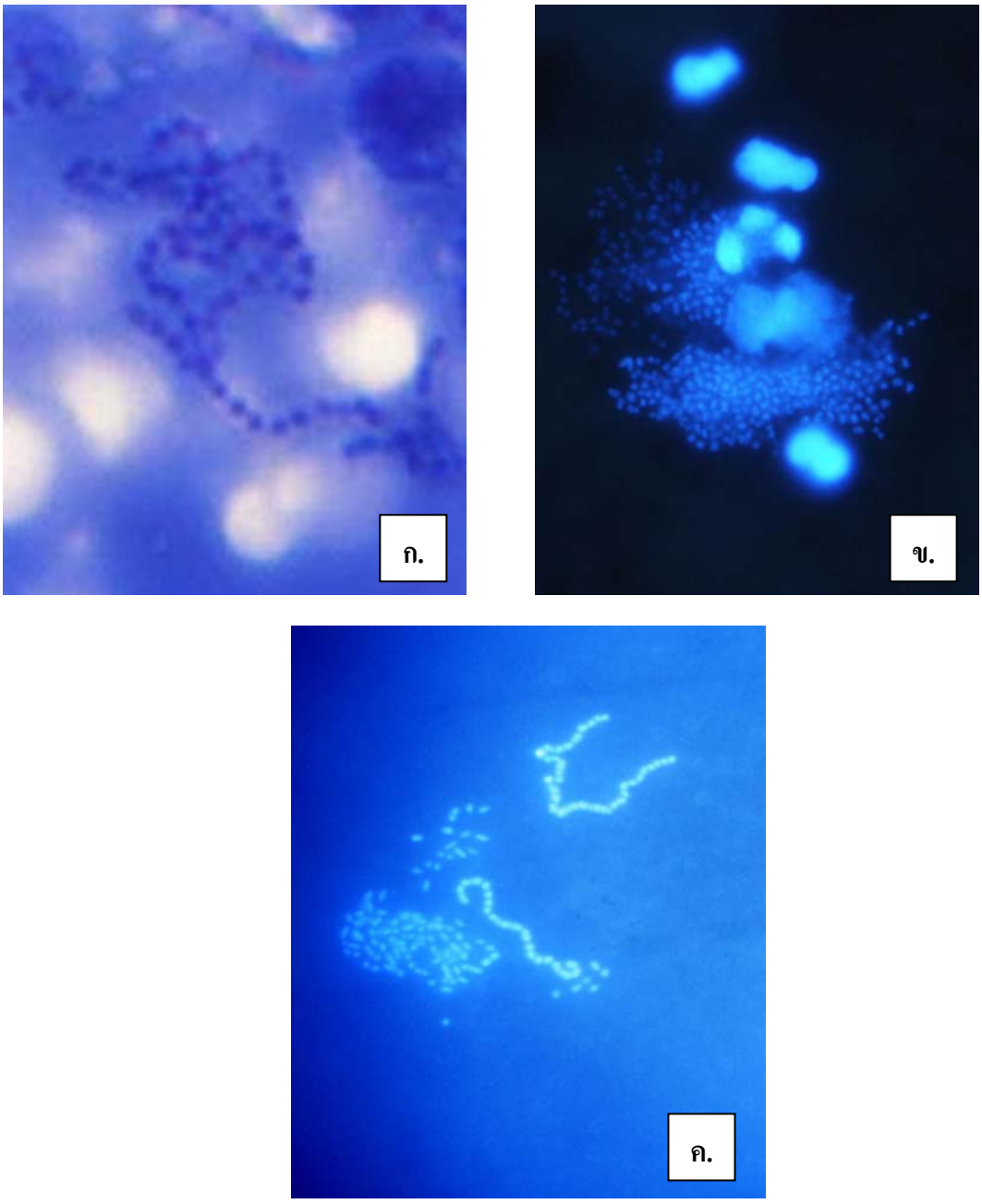
3.1 การเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจปริมาณเซลล์แบคทีเรียในน้ำนมดิบที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคที่นิยมในปัจจุบัน

การศึกษาปริมาณเซลล์แบคทีเรียจากการนับด้วยวิธีการต่างๆ ในแต่ละระดับเซลล์โซมาติกจากการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 พบว่า ปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสี Methylene blue มีปริมาณเซลล์โซมาติกที่ตรวจนับไม่แตกต่างกับการย้อมสีเซลล์ด้วยสี DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Gunasekera *et al*. (2002) ในทุกตัวอย่าง ขณะที่ปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจนับได้จากวิธีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารและการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสี DAPI ตามวิธีการของ Wei Yu *et al.* (1995) มีปริมาณที่แตกต่างแตกต่าง กับ 2 วิธีการที่กล่าวไว้ข้างต้น($P<0.05$) โดยการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสี Methylene blue การย้อมเซลล์แบคทีเรียด้วย DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Gunasekera *et al*. (2002) พบปริมาณเซลล์แบคทีเรียมากกว่าการย้อมเซลล์แบคทีเรียด้วยสี DAPI ตามวิธีการของ Wei Yu *et al.* (1995) และการศึกษาโดยวิธีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร (ตารางที่ 24) และการย้อมเซลล์ด้วย DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Gunasekera *et al*. (2002) มีความคลาดเคลื่อนของปริมาณเซลล์ที่นับได้น้อยกว่าการย้อมเซลล์ด้วยสี Methylene blue เนื่องจาก การย้อมเซลล์ด้วยสี Methylene blue พบเซลล์แบคทีเรียบางส่วนถูกบดบังด้วยเซลล์โซมาติกและตะกอนของโปรตีน ขณะที่การย้อมเซลล์ด้วย DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Gunasekera *et al*. (2002) ได้กำจัดตะกอนของโปรตีนและไขมันออกแล้วทำให้พบแต่เฉพาะเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้น และสาเหตุที่ทำให้การตรวจด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์ด้วย DAPI ตามวิธีการของ Wei Yu *et al.* (1995) พบปริมาณแบคทีเรียแตกต่างกับปริมาณที่ได้จากการตรวจด้วยการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสี Methylene blue และ การย้อมเซลล์ด้วย DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Gunasekera *et al*. (2002) นั้น เนื่องจากการย้อมสีเซลล์ด้วย DAPI ตามวิธีการของ Wei Yu *et al.* (1995) ยังไม่มีการกำจัดเซลล์โซมาติกจึงทำให้เซลล์โซมาติกที่มีอยู่บดบังเซลล์แบคทีเรียและใช้ปริมาณตัวอย่าง น้อยกว่าเพียง 5 ไมโครลิตรเท่านั้น เพื่อป้องกันการหลุดออกจากสไลด์ของตัวอย่างน้ำนมดิบในขั้นตอนการย้อมเซลล์ และการศึกษาโดยวิธีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่พบปริมาณแบคทีเรียน้อยที่สุด เนื่องจากข้อจำกัดของเทคนิคอาจให้ผลผิดพลาดในกรณีที่เซลล์มีการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนในตัวอย่างที่นำมาศึกษา (ภาพที่ 13)

ตารางที่ 24 ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย (Mean ± SD) ในน้ำนมดิบจากการตรวจนับด้วยเทคนิคต่างๆ

ระดับเซลล์โซมาติก	Somacount 150 (Cell / ml)	วิธีการตรวจปริมาณเซลล์แบคทีเรีย			
		Plate count (CFU/ml)	Methylene blue stain (Cell / ml)	DAPI stain (Cell / ml)	DAPI (Modified) stain (Cell / ml)
น้อยกว่า 200,000 เซลล์/มล.	10,540	$3.00x10^{6} \pm 4.97x10^{5}$ (ก)	$9.25x10^{7} \pm 4.25x10^{6}$ (ข)	$5.50x10^{6} \pm 1.67x10^{6}$ (ค)	$9.22x10^{7} \pm 1.79x10^{6}$ (ข)
	104,987	$4.40x10^{5} \pm 4.55x10^{4}$ (ก)	$1.69x10^{9} \pm 3.54x10^{7}$ (ข)	$5.64x10^{7} \pm 4.95x10^{5}$ (ค)	$1.69x10^{9} \pm 2.27x10^{6}$ (ข)
	195,713	$5.70x10^{6} \pm 1.58x10^{5}$ (ก)	$5.55x10^{8} \pm 8.92x10^{6}$ (ข)	$2.39x10^{6} \pm 2.88x10^{5}$ (ก)	$5.44x10^{8} \pm 1.41x10^{7}$ (ข)
200,000 – 500,000 เซลล์/มล.	207,907	$3.95x10^{5} \pm 2.80x10^{4}$ (ก)	$7.47x10^{8} \pm 2.11x10^{7}$ (ข)	$5.94x10^{6} \pm 1.09x10^{6}$ (ค)	$7.39x10^{8} \pm 3.49x10^{5}$ (ข)
	355,880	$4.10x10^{5} \pm 3.10x10^{4}$ (ก)	$1.27x10^{8} \pm 4.66x10^{6}$ (ข)	$4.79x10^{6} \pm 2.11x10^{5}$ (ก)	$1.27x10^{8} \pm 2.93x10^{5}$ (ข)
	469,620	$1.80x10^{5} \pm 2.00x10^{4}$ (ก)	$6.78x10^{7} \pm 3.71x10^{6}$ (ข)	$1.09x10^{8} \pm 4.02x10^{6}$ (ค)	$6.50x10^{7} \pm 4.34x10^{5}$ (ข)
มากกว่า 500,000 เซลล์/มล.	815,300	$1.00x10^{5} \pm 1.61x10^{4}$ (ก)	$3.41x10^{8} \pm 8.45x10^{6}$ (ข)	$1.66x10^{7} \pm 1.10x10^{6}$ (ค)	$3.40x10^{8} \pm 5.15x10^{5}$ (ข)
	1,110,833	$1.05x10^{6} \pm 7.02x10^{4}$ (ก)	$4.33x10^{7} \pm 1.02x10^{6}$ (ข)	$8.78x10^{7} \pm 1.07x10^{6}$ (ค)	$4.35x10^{7} \pm 3.24x10^{5}$ (ข)
	1,682,680	$5.20x10^{5} \pm 3.50x10^{4}$ (ก)	$5.19x10^{8} \pm 4.94x10^{6}$ (ข)	$1.90x10^{7} \pm 3.33x10^{5}$ (ก)	$5.19x10^{8} \pm 3.66x10^{5}$ (ข)

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 13 เซลล์แบคทีเรียที่นับได้จากวิธีการต่างๆ

ก . เซลล์แบคทีเรียจากย้อมเซลล์ด้วย Methylene blue

ข. เซลล์แบคทีเรียจากการย้อมเซลล์ด้วย DAPI

ค. เซลล์แบคทีเรียจากการย้อมเซลล์ด้วย DAPI ที่พัฒนาขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบเครื่องมือที่ใช้ในแต่ละวิธี ค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่าง ระยะเวลา และตัวอย่างที่ตรวจพบ ของแต่ละวิธีการ พบว่า วิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยสี Methylene blue สามารถตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกและปริมาณแบคทีเรียได้ในการย้อมเพียงครั้งเดียว และปริมาณเซลล์โซมาติกที่ได้ไม่แตกต่างกับการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 ($P>0.05$) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความถูกต้องและรวดเร็วมากที่สุด แต่มีต้นทุนการลงทุนและค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่เหมาะสมกับโรงงานขนาดเล็กและตัวอย่างจำนวนน้อยของเกษตรกร กล่าวได้ว่าวิธีการย้อมเซลล์ด้วยสี Methylene blue เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการปฏิบัติงานจริงสำหรับโรงงานขนาดเล็กที่มีต้นทุนในการลงทุนต่ำและมีปริมาณตัวอย่างน้อย อย่างไรก็ตามถ้าต้องการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกเพียงอย่างเดียววิธีการย้อมเซลล์ด้วยสี Methylene blue จะใช้เวลานานกว่าการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 (ตารางที่ 25) ดังนั้นการเลือกที่จะใช้วิธีการใดจำเป็นต้องพิจารณาด้านสิ่งที่ต้องการตรวจ ปริมาณตัวอย่าง งบประมาณและระยะเวลาที่ต้องการทราบผล เมื่อต้องการตรวจเฉพาะปริมาณเซลล์แบคทีเรียเพียงอย่างเดียววิธีการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสี DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Gunasekera *et al.* (2002) นั้น เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถใช้ภาพที่ได้จากการถ่ายด้วยกล้อง Cooled CCD Digital Camera (Olympus DP50) มานับจำนวนเซลล์ด้วยโปรแกรมที่สามารถตรวจปริมาณเซลล์ได้อัตโนมัติ เช่น โปรแกรม ImageProPlus (Media Cybernetics, USA) โปรแกรม Imagepro discovary (Media Cybernetics, USA) เป็นต้น ทำให้การตรวจปริมาณเซลล์แบคทีเรียสามารถทำได้รวดเร็วและถูกต้องมากขึ้น

ตารางที่ 25 เปรียบเทียบความเหมาะสมของเครื่องมือ ค่าใช้จ่าย ระยะเวลา และ ตัวอย่างที่สามารถตรวจของแต่ละเทคนิค

เทคนิคที่ใช้	**Somacount 150**	**Methylene blue stain**	**DAPI (Modified) stain**
เครื่องมือ	Somacount 150	Light Microscope	Epifluorescence microscope
ค่าใช้จ่าย	ประมาณ 100 บาท	ประมาณ 2 บาท	ประมาณ 70 บาท
ระยะเวลา	150 ตัวอย่าง/ชั่วโมง	20 ตัวอย่าง/ชั่วโมง	20 ตัวอย่าง/ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ได้	Somatic cell	Somatic cell และ Bacteria	Bacteria

3.2 การเปรียบเทียบเทคนิคการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในน้ำนมดิบที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคที่นิยมในปัจจุบัน

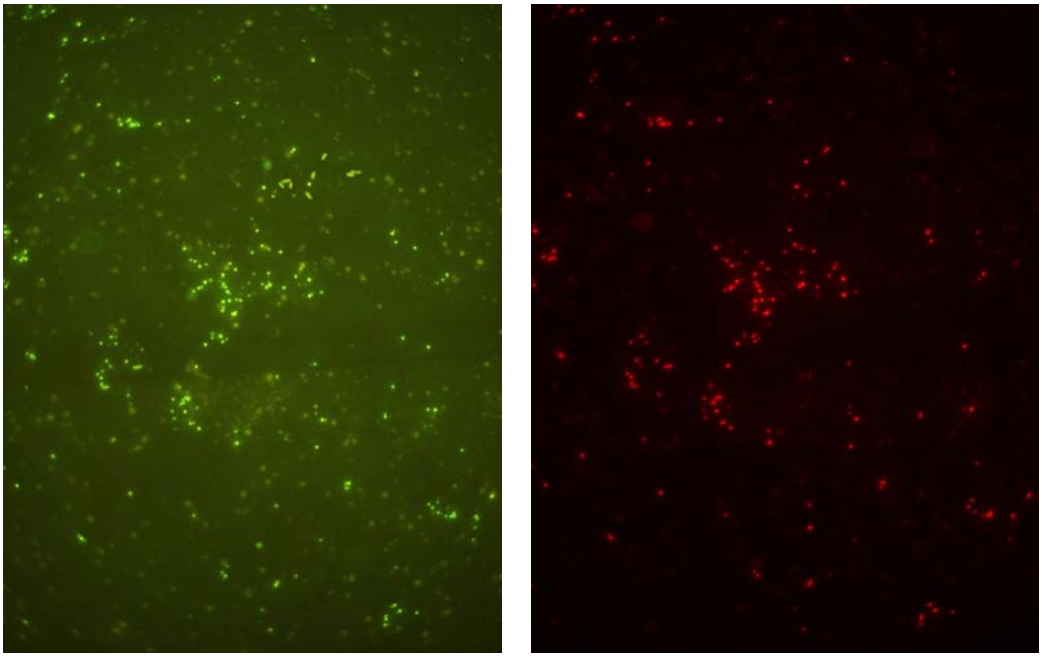
ผลการเปรียบเทียบการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีกับเทคนิค FISH พบว่า ทั้งสองเทคนิคสามารถใช้จำแนกชนิดแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบได้ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 26) โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ แบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. จีนัส *Streptococcus* spp. และ *E. coli* ซึ่งการใช้เทคนิค FISH โดยใช้ Probe EUB mixed ซึ่งมีความจำเพาะกับแบคทีเรียทั้งหมด Probe LGC mixed ที่จำเพาะกับแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. และ Probe GAM42a ที่จำเพาะกับ *E. coli* พบว่า การใช้เทคนิค FISH สามารถตรวจพบแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มได้ (ภาพที่ 14 และ 15) และการใช้เทคนิค FISH โดยใช้ Probe EUB mixed ร่วมกับ LGC mixed พบว่าสามารถตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ได้ เนื่องจากแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Gram-positive bacteria with low G+C content ที่ Probe LGC mixed มีความจำเพาะ (ภาพที่ 14) และการใช้เทคนิค FISH โดยใช้ Probe EUB mixed ร่วมกับ GAM42a สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *E. coli* ได้ เนื่องจากแบคทีเรีย *E. coli* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Gamma *Proteobacteria* ซึ่ง Probe GAM 42a มีความจำเพาะ (ภาพที่ 15) สรุปได้ว่า เทคนิค FISH เป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบในโคนมได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วมากขึ้น ส่งผลให้สามารถรักษาและป้องกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 26 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการจำแนกกลุ่มแบคทีเรียในน้ำนมดิบระหว่างการทดสอบทางชีวเคมีกับการใช้เทคนิค FISH

เชื้อที่เติมในน้ำนมดิบ	เชื้อที่พบจากการทดสอบทางชีวเคมี			เชื้อที่พบจากการทำเทคนิค FISH		
	***Stap.* spp.**	***Strep.* Spp.**	***E. coli***	**EUB (mix)**	**LGC (mix)**	**GAM42a**
***Stap.* spp.**	+			+	+	
***Strep.* Spp.**		+		+	+	
E. coli			+	+		+
Stap.* spp.+ *E. coli	+		+	+	+	+
Strep.* Spp. + *E. coli		+	+	+	+	+

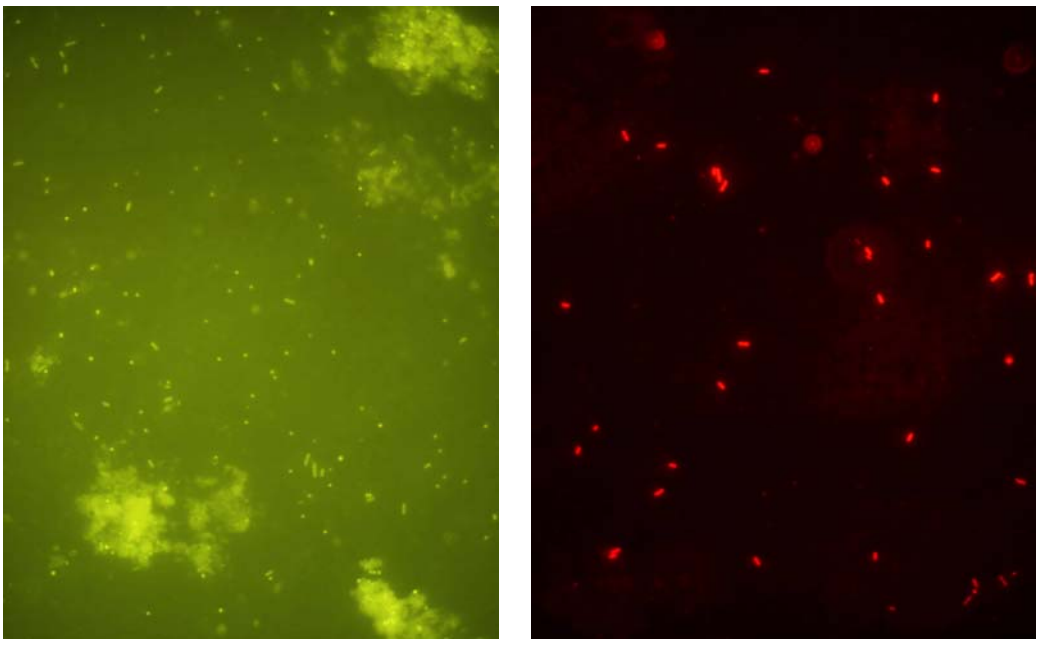
หมายเหตุ + คือ การตรวจพบแบคทีเรีย ***E. coli*** คือ *Escherichia coli*

***Stap.* spp.** คือ *Staphylococcus* spp. ***Strep.* spp.** คือ *Streptococcus* spp.



ก. ข.

ภาพที่ 14 เซลล์แบคทีเรียในน้ำนมดิบที่เติม *Escherichia coli* และ *Staphylococcus* spp.
ก. เซลล์แบคทีเรียที่ติด Probe EUB mixed ข. เซลล์ *Staphylococcus* spp. ที่ติด Probe LGC mixed



ก. ข.

ภาพที่ 15 เซลล์แบคทีเรียในน้ำนมดิบที่เติม *Escherichia coli* และ *Staphylococcus* spp
ก. เซลล์แบคทีเรียที่ติด Probe EUB mixed ข. เซลล์ *E. coli* ที่ติด Probe GAM42a

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาสถานการณ์ของโรคเต้านมอักเสบจากฟาร์มโคนมอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2547 พบว่า ปี พ.ศ. 2546 เกษตรกรสามารถควบคุมสถานการณ์การเกิดของโรคเต้านมอักเสบภายในฟาร์มได้ดีกว่าปี พ.ศ. 2545 เนื่องจาก ปี พ.ศ. 2546 พบฟาร์มที่มีปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบน้อยกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร ที่เป็นปริมาณเซลล์โซมาติกที่ระบุว่าเป็นน้ำนมดิบที่ได้มาจากแม่โคที่เป็นปกติมากกว่าปี พ.ศ. 2545 และปี พ.ศ. 2546 เกษตรกรมีความเข้าใจในการส่งน้ำนมดิบที่มีมาตรฐานให้กับสหกรณ์โคนมพัทลุง มากกว่าปี พ.ศ. 2545 เนื่องจากพบฟาร์มที่ส่งน้ำนมดิบที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 (กรมปศุสัตว์, 2542) มากกว่าปี พ.ศ. 2545

การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการตรวจโรคเต้านมอักเสบที่นิยมในปัจจุบัน พบว่า การตรวจจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจากพบฟาร์มที่เสี่ยงต่อการระบาดของโรคเต้านมอักเสบมากกว่า การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยน้ำยา California mastitis test (CMT) และการทดสอบ Alcohol test ที่มีประสิทธิภาพเป็นอันดับ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

จากการศึกษาความสามารถในระบุปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Trypticase Soya Agar, TSA) ปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ของการทดสอบ Methylene blue reduction test และการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 ในตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังรวมนมและเต้านมของแม่โครีดนม พบว่า การทดสอบ Methylene blue reduction test และปริมาณเซลล์โซมาติกจากการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 ไม่สามารถระบุปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ที่มีปริมาณ 10^6 , 10^5 และ 10^4 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับในน้ำนมดิบจากถังรวมนมและปริมาณ 10^9 , 10^6 และ10^6 CFU/มิลลิลิตรตามลำดับ ในน้ำนมดิบรายเต้าได้ อีกทั้งการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 ไม่สามารถระบุการตรวจพบแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ที่รายงานว่าเป็นเชื้อสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนมดิบได้ทั้งจากถังรวมนมและจากเต้านมของแม่โครีดนม

ทำให้การตรวจโรคเต้านมอักเสบจำเป็นต้องตรวจเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบร่วมด้วย เพื่อใช้เป็นข้อมูล ในการตัดสินสภาวะการระบาดของโรคเต้านมอักเสบในแม่โครีดนม

การศึกษาความสามารถของการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยเครื่อง Somacount 150 ในการระบุการผ่านเกณฑ์มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 (กรมปศุสัตว์, 2542) และเกณฑ์มาตรฐานทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2536 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2536) ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดบนที่เจริญอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดและปริมาณ *E. coli* ในน้ำนมดิบจากถังรวมนมและรายเต้า พบว่า ปริมาณเซลล์โซมาติกไม่สามารถบ่งชี้การผ่านเกณฑ์มาตรฐานของแบคทีเรียดังกล่าวในถังรวมนมได้ ขณะที่ผลการศึกษารายเต้าของแม่โครีดนม พบว่า ปริมาณเซลล์โซมาติกสามารถบ่งชี้การผ่านเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดได้ แต่ไม่สามารถใช้บ่งชี้การผ่านเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณ *E. coli* เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังรวมนม

การศึกษาปริมาณผลผลิตของน้ำนมดิบในฟาร์มของเกษตรกรต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร ปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Streptococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบจากถังรวมนมและปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีดนมทั้ง 5 แห่งที่ทำการศึกษา คือ ยางไลเนอร์ ถังรวมนม ถังรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม และน้ำล้างเต้านม พบว่า ปริมาณผลผลิตไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบ ขณะที่ปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. ที่พบในน้ำนมดิบจากฟาร์มที่มีปริมาณผลผลิตมากกว่า 100 กิโลกรัม/วันมีปริมาณน้อยกว่าฟาร์มที่ผลผลิตน้อยกว่า 50 กิโลกรัม/วัน และปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. ที่พบในถังรวมนมของฟาร์มที่ผลผลิตมากกว่า 50 กิโลกรัม/วัน พบปริมาณน้อยกว่าฟาร์มที่ผลผลิตน้อยกว่า 50 กิโลกรัม/วัน และปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ที่พบในน้ำนมดิบไม่ความสัมพันธ์กับปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการรีด โดยน้ำนมดิบมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมากกว่าปริมาณที่พบในปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบ ยางไลเนอร์ ถังรวมนม ถังรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม และน้ำล้างเต้านม พบว่า การตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. ในถังรวมนมมีความสัมพันธ์กับถังรีดนม ขณะที่การตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Streptococcus* spp. ในน้ำนมดิบมีความสัมพันธ์กับยางไลเนอร์ และการตรวจพบแบคทีเรียจีนัส *Streptococcus* spp. ในผ้าเช็ดเต้านมมีความสัมพันธ์กับในน้ำที่ใช้

ล้างเต้านม ขณะที่ผลการศึกษาปริมาณผลผลิตน้ำนมดิบในฟาร์มของเกษตรกรต่อการผ่านเกณฑ์มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 และเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2536 ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และปริมาณ *E. coli* ในน้ำนมดิบจากถังรวมนม พบว่า ปริมาณผลผลิตไม่มีผลต่อการผ่านเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร แบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E. coli* ในน้ำนมดิบ

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร ปริมาณแบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ของตัวอย่างน้ำนมดิบจากรายเต้าของแม่โครีดนมในแต่ละระดับอาการของโรคเต้านมอักเสบด้วยเทคนิคการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. เพียงร้อยละ 3 ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเท่านั้น กล่าวได้ว่า อาจจะมีเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ ที่ส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเต้านมอักเสบ เนื่องจากมีอีกร้อยละ 97 ที่ยังไม่ได้จัดจำแนกชนิด และเทคนิคการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในการศึกษายังมีข้อจำกัด ทำให้ปริมาณแบคทีเรียที่พบอาจน้อยกว่าความเป็นจริง

ผลการเปรียบเทียบเทคนิคที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เพื่อศึกษาปริมาณเซลล์โซมาติก เซลล์แบคทีเรีย และการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบว่า ปริมาณเซลล์โซมาติกที่ได้จากเทคนิคการนับโดยตรงด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสี Methylene blue มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับการตรวจด้วยเครื่อง Somacount 150 ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ปริมาณเซลล์โซมาติกมากกว่า 200,000 เซลล์/มิลลิลิตร และสามารถนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียได้ในการย้อมเพียงครั้งเดียว โดยมีการลงทุนและค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างน้อยกว่า อีกทั้งการตรวจปริมาณแบคทีเรียด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสี Methylene blue มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการตรวจด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสี DAPI ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Gunasekera *et al*. (2002) และเทคนิค Fluorescence *In Situ* hybridization (FISH) ที่พัฒนาขึ้น สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบได้ไม่แตกต่างกับเทคนิคการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ทำให้เทคนิค Fluorescence *In Situ* hybridization (FISH) ที่พัฒนาขึ้น เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ศึกษาและวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบ เนื่องจากการใช้เทคนิค FISH อีกทั้งเทคนิค FISH ยังลดข้อจำกัดของเทคนิคอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องใช้เวลานานและให้ผลผิดพลาดได้ ในกรณีที่เซลล์มีการจับตัวเป็นกลุ่มก้อน

ข้อเสนอแนะ

1. นำเทคนิคการนับจำนวนเซลล์โซมาติก โดยการย้อมเซลล์ด้วยสี Methylene blue มาตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบของเกษตรที่เป็นสมาชิกของสหกรณ์โคนมพัทลุง จำกัด หรือจากฟาร์มโคนมอื่นๆ แทนการส่งตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Somacount 150 เพื่อความสะดวกรวดเร็วและลดค่าใช้จ่ายของเกษตรกร

2. ควรศึกษาชนิดแบคทีเรียภายในเนื้อเยื่อเต้านมของแม่โคปกติและแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียที่พบดังกล่าว ทำให้สามารถสรุปสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบได้อย่างถูกต้อง

3. ควรมีการนำเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ เช่น เทคนิค 16S rRNA clone library analysis เพื่อให้ทราบถึงชนิดของแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบที่แท้จริง และทำการออกแบบ Probe ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียดังกล่าวมาใช้ร่วมกับเทคนิค FISH ที่ทำการพัฒนาขึ้น ทำให้สามารถวินิจฉัยและรักษาโรคได้ถูกต้องมากขึ้น

บรรณานุกรม

กรมปศุสัตว์. (2542). **คู่มือระเบียบการปฏิบัติงาน "มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 สำหรับผู้ประกอบการฟาร์มโคนมมาตรฐาน".** กรุงเทพฯ. ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2536). **เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร และภาชนะสัมผัสอาหาร.** เอกสารแนบท้ายบันทึกที่ สธ 0524/5756 ลงวันที่ 24 สิงหาคม 2536.

กิตติกร บุญศรี จรัญลักษณ์ ยวงกาศ รักษ์พงษ์ ตาใจ วาสนา ไชยศรี สุวิทย์ โชตินันท์ อ้อมฤทัย ทอกี่ สุวิชัย โรจนเสถียร ประสิทธิ ธราวิจิตรกุล ขวัญชาย เครือสุคนธ์ วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา วีนา มานิตย์ วีระวรรณ ติวนันทกร ปรมินทร์ วินิจฉัยกุล. (2545). การศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย คุณภาพน้ำนมในด้านองค์ประกอบของ น้ำนมและเซลล์โซมาติกในน้ำนม ในแม่โคก่อนหยุดพักการรีดนมภายใน 2 สัปดาห์ ในเขตกิ่งอำเภอแม่ออน จังหวัดเชียงใหม่. ใน **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสาขาสัตวบาล สัตวศาสตร์ สัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 3.** 28-29 มกราคม 2545. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. หน้า 457-464.

เกษตร วิทยานุภาพยืนยง และพิเชษ ศักดิ์พิทักษ์สกุล. (2531). **คู่มือการเลี้ยงโคนม.** สระบุรี: องค์กรการส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย.

ฉลอง วชิราภากร. (2546). การจัดการอาหารโคนมต่อผลผลิตและองค์ประกอบน้ำนม. ใน **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการโคนมเรื่องน้ำนมคุณภาพสู่ผู้บริโภค.** 23-24 มกราคม 2546. โรงแรมเจริญธานี ปริ๊นเซส. ขอนแก่น. หน้า 23-24.

ชวนิศนดากร วรวรรณ. (2540). **การเลี้ยงโคนม.** กรุงเทพฯ. ไทยวัฒนาพานิช.

ณรงศักดิ์ ชัยบุตร. (2541). **การประเมินผลโครงการส่งเสริมการเลี้ยงโคนม.** กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทัศนีย์ ชมพูจันทร์. (2537). **รายงานผลการสำรวจสภาวะโรคโคนมปี 2537.** สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. กรมปศุสัตว์. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ธนู ภิญโญภูมิมินทร์. (2543). **การอบรมเชิงปฏิบัติการสัตวแพทย์ผู้ควบคุมฟาร์มโคนม.** คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

ธีรพงค์ ธีรภัทรสกุล อุษุมา กู้เกียรตินันท์ กฤษ อังคนาพร บัญชา พงศ์พิศาลธรรม สุรเดช ด่างวิวัฒน์ สุดประเสริฐ บุญปาลิต และวิพิชญ์ ไชยศสรีสงคราม. (2529). การศึกษาอุบัติการณ์โรคเต้านมอักเสบด้วยวิธีจำนวนเซลล์ในน้ำนม. **สัตวแพทยสาร**. 37(3): 131-146.

นิมิต ลีสิริกุล เพชรัตน์ เฝ้าทรัพย์ และสมใจ ศรีหาคิม. (2537). สภาวะโรคเต้านอักเสบในโคนมและประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค. ใน **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการสัตวแพทยสมาคม ครั้งที่ 21.** 28-30 พฤศจิกายน 2537. หน้า 38-46.

นิมิต ลีสิริกุล. (2540). โรคเต้านมอักเสบ. **แก่นเกษตร.** 25(4): 232-236.

พนัส ธรรมกีรดิวงศ์. 2537. โรคเต้านมอักเสบและแนวทางการป้องกัน. **วารสารโค-กระบือ.** 17(3): 32-47.

พรพิมล รักษาพล. (2545). **สภาวะการณ์ของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง.** ปัญหาพิเศษทางชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ.

ชวนิศดากร วรวรรณ จำเนียร สัตยาพันธุ์ และอุทัย พิสณฑ์. (2510). การศึกษาโรคเต้านมอักเสบในฝูงวัวนมของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ใน **รายงานการประชุมวิชาการเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 6.** 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2510. หน้า 218 – 227.

วาสนา ไชยศรี อ้อมฤทัย ทอกี่ รักษ์พงษ์ ตาใจ กิตติกร บุญศรี จรัญลักษณ์ ยวงกาศ สุวิทย์ โชตินันท์ วีนา มานิตย์ ขวัญชาย เครือสุคนธ์ วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา วีระวรรณ ติวะนันทกร สุวิชัย โรจนเสถียร ประสิทธิ ธราวิจิตรกุล ปรมินทร์ วินิจฉัยกุล. (2545). ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจน้ำนมด้วยน้ำยาทดสอบโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการที่ผลิตเองกับปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมโค. ใน **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสาขาสัตวบาล สัตวศาสตร์ สัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 3.** 28-29 มกราคม 2545. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. หน้า 457-464.

วาสนา แสงสุวรรณ์ ศุภลักษณ์ จันทร์อุดม อภัสรา วรราช และนิมิต ไตรวนาธรรม. (2538). สภาวะโรคเต้านมอักเสบในโคนมภาคใต้. **สัตวแพทย์ศาสตร์ มข.** 5(2): 1-10.

วิบูลวรรณ วรรณโมลี. (2547). **อุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมมาตรฐานและการตรวจรับรองฟาร์มโคนม.** กรุงเทพฯ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วิพิชญ์ ไชยศรีสงคราม. (2546). **การตรวจคุณภาพน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม.** กรุงเทพฯ. กองสัตวแพทย์สาธารณสุข กรมปศุสัตว์.

ศีลธรรม วราอัศวปติ วรวิชญ์ วราอัศวปติ เจนวิริยะ โสภาคย์ และสมใจ ศรีหาคิม. (2539). การศึกษาทางระบาดวิทยาของโรคเต้านมอักเสบชนิดแสดงอาการในโคนม จังหวัดขอนแก่น. **สัตวแพทยศาสตร์ มข.** 6(1): 1-11.

ศุภลักษณ์ จันทร์อุดม อภัสรา วรราช และวาสนา แสงสุวรรณ์. (2536). เต้านมอักเสบชนิดไม่แสดงอาการในโคนมภาคใต้ของไทยการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา.**วารสารสงขลานครินทร์.** 15(4): 389-397.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. (2544). **นโยบายการพัฒนาอุตสาหกรรมโคนมไทย.** กรุงเทพฯ. ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

สหกรณ์โคนมจังหวัดพัทลุง. (2546). **รายงานการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบสมาชิก ประจำวันที่ 16-30 เมษายน 2546.**

สมพงศ์ โอทอง สุชาติ สุขสถิตย์ มงคล ประทุมมณี และ ไชยวรรณ วัฒนจันทร์. (2547). ชนิดของคลอรีนและคุณภาพของน้ำใช้ต่อประสิทธิภาพของสารละลายคลอรีนในการฆ่าเชื้อโรคและสภาวะโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมในอำเภอป่าพะยอมจังหวัดพัทลุง ใน **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ภาคใต้ ครั้งที่ 3 "ปศุสัตว์ภาคใต้สู่อาหารฮาลาล"** คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 18 -19 สิงหาคม 2547. สงขลา. หน้า 25-32.

สำนักงานสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 9. (2548). **เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาแนวทางการปรับปรุงคุณภาพน้ำนมดิบ ครั้งที่ 1.** 15-16 มีนาคม 2548 ณ ห้องประชุมสหกรณ์โคนมพัทลุง จำกัด จังหวัดพัทลุง. หน้า 1-12.

สุเมธ ประทุมสุวรรณ. (2543). การผลิตนมคุณภาพดีและแนวทางการส่งเสริมเพื่อการพัฒนาคุณภาพนม. ใน **รายงานการประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 1,** 22 มกราคม 2543 ณ ห้องประชุมใหญ่ อาคาร 3 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 57-64

สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย. (2529). **การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียในโคนมโดยเฉพาะแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ.** สระบุรี: งานสัตวแพทย์. องค์การส่งเสริมโคนมแห่งประเทศไทย.

สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย. (2541). คุณภาพน้ำนมดิบโคมาตรฐานราคาน้ำนมดิบไทยควรเป็นไปทิศทางใด. **แก่นเกษตร.** 25(4): 260-270.

สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย. (2542). **การทบทวนเอกสารด้านสุขภาพเต้านมในโคนม.** กรุงเทพฯ. สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย.

สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย. (2544). **โรคเต้านมอักเสบและสุขภาพของเต้านมในโค.** คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 1-20.

สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย. (2546). **เอกสารประกอบการอบรมโครงการเพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยงโคนมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมจังหวัดพัทลุง.** 28 ก.พ.-2 มี.ค. 2546**.**

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ. ไทยวัฒนาพานิช.

อนุชิต ชาวเหนือ. (2545). การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของน้ำนมดิบและนมพาสเจอไรส์. **แก่นเกษตร.** 30(2): 122-128.

อรัญ จันทร์ลุน. (2544). **การตรวจนับโซมาติคเซลล์ในน้ำนมด้วยกล้องจุลทรรศน์.** คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 111 - 114.

อรัญ จันทร์ลุน จารุวรรณ พัฒนาวงศ์ และกิ่งกาญจน์ สาระชู. (2546). ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจคุณภาพน้ำนมถังรวมฟาร์มด้วยวิธีเมธิลลีนบลูรีดักชันเทสต์กับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดชนิดเชื้อแบคทีเรียและจำนวนโซมาติกเซลล์. ใน **ประมวลวิชาการโคนม.** 23-24 มกราคม 2546. โรงแรมเจริญธานีปริ๊นเซส. ขอนแก่น. หน้า 40-41.

Alexandre, H., Khampoune, S., Serge, S., Pascal, D. and Jacqueline, L. (2000). Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cell and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **FEMS. Microbiology. Letters.** 193: 57-62.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R. J., Chirholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 1919-1925.

Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H.. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.** 59: 143-169.

Amann, R.I., Fuchs, B.M. and Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by Flurescenc *In Situ* hybridisation. **Curr. Opin. Biotechnol.** 12: 231-236.

Anonymous. (1972). **Classes of and standards for primary dairy products foodstuffs, cosmetics and disinfectants act (Act 54/1972). Department of Health**. Retrived August 15 2005 from http://www.dairystandard.co.za/dept_health.asp

Aoi, Y., Miyoshi, T., Okamoto, T., Tsuneda, S., Hirata, A., Kitayamy, A. and Nakamune, T. (2000). Microbial ecology of nitrifying bacteria in wastewater treatment process examined by fluorescent *In Situ* hybridization. **J. Biosci. Bioeng.** 90:234-240.

Arestrup F.M., Wegener H.C., Rosdahl and Jensen N.E. (1995). Staphylococcus and other bacterial species associated with intramammary infections in danish dairy herds. **Acta. Veterinaria.** 36(4).475-487.

Auty, M.A.E., Gardiner, G.E., Mcbrearty, S.J., Sullivan, E.O., Mulvihili, D.M., Collins, J. K., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. and Ross, R.P. (2001). Direct *In Situ* viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. **Appl. Environ. Microbiol.** 67(1): 420-425.

Bentley Instruments. (1998). **Somacount® 150 Operator's Manual**. Bentley Instruments Inc. New Jersey.

Bhushan, J. (2000). **Bovine Mastitis.** Department of Veterinary Science. Pennsylvania State University.

Bianchi, A. and Giuliano, L. (1996). Enumeration of viable bacteria in the marine pelagic environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 62(1): 174-177.

Clarke, R. G. and Pinder, A. C. (1998). Improved detection of bacteria by flow cytometry using a combination of antibody and viability markers. **J. Appl. Microbiol.** 84:577–584.

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H. and Wagner, M. (1999). The domain – Specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. **Syst. Appl. Microbiol.** 22: 434-444.

Effie, A., Leea, P., Pirkka, V. K., Erika, I., Seppo, J. S. and Glenn, R. G. (2001). Differences in the gut bacterial flora of healthy and milk-hypersensitive adults, as measured by fluorescence *in situ* hybridization. **FEMS. Immu. and Medi. Microbiol.** 30: 217-221.

Eilers, H., Pernthaler, J., Glöckner, F. and Amann, R.I. (2000). Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 3044-3051.

Fernandez, J. F., Fernandez, E., Heras, A.L., Pascual, C., Collins, M.D. and Dominguez, L. (1998). *Streptococcus parasanguinis*: new pathogen associated with asymptomatic mastitis in sheep. **Emer. Infec. Dis.** 4(4): 125-129

George,. J and Jackson, D. (1998). **Bacteriological Analytical Manual.** Food and Drug Administration. Gaitherberg. USA.

Gunasekera, T.S., Attfield, P.V.and Veal, D.A. (2002). Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. **Inter. J. of Food Microbiol.** 2673. 1-11.

Gunasekera, T. S., Dorsch, M. R., Slade, M. B. and Veal, D. A. (2003). Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence *in situ* hybridization using ribosomal RNA directed probes. **Appl. Environ. Microbiol.** 94: 936-945.

Gunasekera, T.S., Paul, V.A. and Duncan, A.V. (2000). A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. **Appl. Environ. Microbiol.** 66(3): 1228–1232.

Hogan, J.S., Weiss, W.P., Todhunter, D.A., Smith, K.L. and Schoenberger, P.S. (1992). Bovine blood neutrophil responses to parent vitamin E. **J. dairy Sci.** 75: 399

Holt, J. G., Krieg, N. R. Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). **Bergey's manual of determinative microbiology**. 9th ed. Baltimore, Md. Williams & Wilkins.

Kennelly, J.J. (2000). **Nutritionnal factors influencing yield and composition of milk.** Retrived August 15 2005 from http://www.afns nalberta.ca/drte/dp 472-5 n. html.

Manz, W., Amann R.I., Ludwig W., Wagner M. and Schleifer K.-H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. **Syst. Appl. Microbiol.** 15: 593 – 600.

Meier, H., Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1999). Specific oligonucleotide probes for *In Situ* detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. **Syst. Appl. Microbiol.** 22: 186-196.

Michael, T.M., John, M.M., Jack, P. (2003). **Brock biology of microorganism.** 10th ed. New Jersey, Pearson education.

Patel, P. (1994). **Rapid analysis Techniques in Food Microbiology**. California, Blackie Academic & Professionnal.

Philpot, W.N. (2001). **Increasing profits by improving milk quality and reducing mastitis.** A manuscript for seminar at Faculty of Veterinary Medicine Chiangmai University. Chiangmai.

Philpot, W.N. and Nickerson, S.C. (1991). **Mastitis:counter Attack.** Illinois. Babson Bros. Co.

Philpot W.N. and Nickerson. S.C. (2000). **Winning the fight against mastitis**. Illinois: Westfalia.

Roitt, I., Brosfaff, J. and Male, D. (1998). **Immunology**. 4th ed. London. Dept. of Neuropathology. Institute of Psychiary.

SAS.Institute, Inc. 1982. **SAS user'guide: Statistics.** Cary, NC: SAS SAS.Institute Inc.

Shem, M.N., Malole, J.M., Machangu, R., Kurwijila, L.R. and Fujihara, T. (2001). Incidence and causes of sub-clinical mastitis in dairy cows on smallholder and large scale farms in tropical areas of tanzania. **Ani. Sci. J.** 14 (3): 297-446 .

Sorhaug, T. and Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products quality aspects. **Tren. Food Sci. Tech.** 8: 35– 41.

Veal, D.A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J. and Attfield, P.V. (2000). Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. **J. Imm. Met.** 243: 191– 210.

Wagner, M, Rath, G., Amann, R.L., Koops, H. and Schleifer, K. (1995). *In Situ* identification of ammoniaoxidizing bacteria. system**. Appl. Environ. Microbiol.** 18: 251-264 .

Wei Yu, K., Walter, M., Dodds, B., Katherine, N., Jeannie, S. and Eric, A. (1995). Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total fluorescence dyes. **Environ. Microbiol**. 913: 3367 – 3372.

William, L., Robert,C. J., Harmon, O., Leary, J. and Jack, M A. (2002). **Mastitis and Its Control.** Kentucky University.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
การตรวจคุณภาพน้ำนม

1. การตรวจการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (วิพิชญ์, 2546)

วิธีการตรวจ ใช้ Ethyl alcohol หรือ Ethanol 68% หรืออาจใช้ 70% แทนได้ เติมในน้ำนมที่มีปริมาตรเท่ากัน การศึกษาครั้งนี้ ใช้น้ำนมปริมาณ 2 มิลลิลิตรและEthanol 70% ปริมาณ 2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน สังเกตการตะกอน การรายงานผล คือ เกิดตะกอนรายงานผลเป็นบวก ไม่เกิดตะกอนให้ผลเป็นลบ

<u>หมายเหตุ</u> ถ้าสงสัยว่าเกิดผลบวกเทียมให้ตรวจซ้ำด้วยวิธี Clot-on-Boiling test (C.O.B)

2. การตรวจ Methylene blue reduction test (วิพิชญ์, 2546)

วิธีการตรวจ เติมตัวอย่างน้ำนมปริมาณ 10 มิลลิลิตรในหลอดปราศจากเชื้อและเติมสี Methylene blue ที่ระดับความเข้มข้น 1 ต่อ 25,000 จำนวน 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอดควบคุมเติมน้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง เพื่อเป็นหลอดเปรียบเทียบ ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ตรวจดูการเปลี่ยนสีจากสีฟ้าจนเป็นสีน้ำนมตามธรรมชาติ ในทุกๆ 30 นาที จนครบ 6 ชั่วโมง จึงหยุดการสังเกต บันทึกเวลาการเปลี่ยนสี ในกรณีที่เปลี่ยนสีเพียงครึ่งหลอดถึงรายงานว่าเกิดการเปลี่ยนสี

สูตรการเตรียมสี Methylene blue

Methylene blue	0.3	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข.
การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบ

1. การตรวจ ปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบด้วย California mastitis test (นิมิต, 2540)

นำตัวอย่างน้ำนมดิบ ใส่ในจานทดสอบปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำยา California mastitis test (CMT) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร หมุนทดสอบเพื่อให้น้ำยาผสมกับน้ำนม อ่านผลระดับของปฏิกริยาที่พบ ดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 แสดงการแปลผลปริมาณเซลล์โซมาติกจากการทดสอบด้วย California mastitis test

ระดับปฏิกิริยา	จำนวนเซลล์โซมาติก	ลักษณะของปฏิกิริยา
0	< 200,000	ส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เคลื่อนที่เร็ว สีม่วงจาง
T	200,000-500,000	ส่วนผสมเป็นเมือกเล็กน้อย เคลื่อนที่เร็ว สีม่วงจาง
1	500,000-1,000,000	ส่วนผสมมีความหนืดและเป็นเมือก เคลื่อนที่ช้าลง สีม่วง
2	>1,000,000	ส่วนผสมมีความหนืดเป็นเมือกพอสมควร เคลื่อนที่ช้ามาก สีม่วงเข้ม

ที่มา: Philpot and Nackerson (1991)

ส่วนประกอบของน้ำยา CMT

Bromcresol purple	0.03%
Sodium hydroxide	0.7%
Liquid detergent (Teepol)	2.5%
Distilled water	96.77%

ภาคผนวก ค.

เทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)

เทคนิค FISH ใช้วิธีการของ Amann et al. (1995) โดยการนำตัวอย่างจำนวน 3 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมสไลด์ซึ่งเคลือบด้วย 0.1 % Gelatin ที่ผสมด้วย Chromium potassium sulfate 0.01% เกลี่ยให้ทั่วหลุมสไลด์ ปล่อยให้แห้ง นำสไลด์จุ่มใน Ethanol 50%, 80%, 98% อย่างละ 3 นาที ตามลำดับ ทำให้แห้งเตรียม Hybridization buffer เติม Hybridization buffer ในหลุมสไลด์ 8 ไมโครลิตร แล้วเติม probe อีก 2 ไมโครลิตร วางสไลด์ในหลอดฝาเกลียวขนาด 50 ml ที่บรรจุทิชชูซึ่งชุ่ม Hybridization buffer ที่เหลือ บ่มที่ 46 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง ทำการล้างด้วย Wash buffer ที่บ่มไว้ในอุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นำไปจุ่มใน Wash buffer ที่เหลือ นาน 15 นาที ทำให้แห้ง หยด Citifluor (Citifluor Ltd., Canterbury, UK) เล็กน้อยลงบนสไลด์ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Epifluorescence microscope; Olympus BX51) แล้วถ่ายภาพด้วยกล้อง Cooled CCD Digital camera (Olympus DP50) ซึ่งต้องหยด nonfluorescence oil immersion ลงบนสไลด์ก่อนนำไปส่องต้องระวังไม่ให้ Citifluor ผสมกับ nonfluorescence oil immersion และการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงต้องเลือกใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสมกับสาร Fluorochrome แต่ละชนิดที่ติดฉลากบน Probe ซึ่ง Probe ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ EUB mixed, LGC mixed และGAM 42a โดย Probe EUB mixed สาร Fluorochrome ที่นำมาติดฉลากคือ Fluorescien ต้องใช้ความยาวคลื่นในช่วง 492 nm (excited wavelength) เมื่อส่องดูจะเห็นเซลล์เป้าหมาย เปล่งแสงออกมาเป็นความยาวคลื่น 520 nm (emitted wavelength) ที่มองเห็นเป็นสีเขียว ขณะที่ Probe LGC mixed Fluorochrome ที่นำมาติดฉลากคือ CY3 และ Probe GAM 42a Fluorochrome ที่นำมาติดฉลากคือ Rhodamine ซึ่ง Fluorochrome ซึ่งทั้งสองชนิดนี้ต้องใช้ความยาวคลื่นแสงในช่วง 550-570 nm (excited wavelength) เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงจะเห็นเซลล์เป้าหมายเปล่งแสงออกมาเป็นความยาวคลื่น 570-590 nm (emitted wavelength) ซึ่งสามารถมองเห็นเซลล์เป้าหมายเกิดการเรืองแสงเป็นสีแดง

สารเคมีที่ใช้

Hybridization buffer

360 µl of 5M Nacl

40 µl of 1 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride (Tris/HCl)

2 µl of 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

x µl of Formamide

y µl of autoclaved milli – Q water

ตารางที่ 28 การเตรียม Hybridization buffer

Amount of Formamide	% Formamide on the well	Amount of milli – Q water
0	0	1,598
100	5	1,498
200	10	1,398
300	15	1,298
400	20	1,198
500	25	1,098
600	30	998
700	35	898
800	40	798
900	45	698
1,000	50	598
1,100	55	498

Wash buffer

5 M NaCl	Z	µl
1 M Tris/HCl	1	ml
10% SDS	50	µl

ตารางที่ 29 การเตรียม Wash buffer ที่ระดับความเข้มข้นของ Formamide ต่างๆ

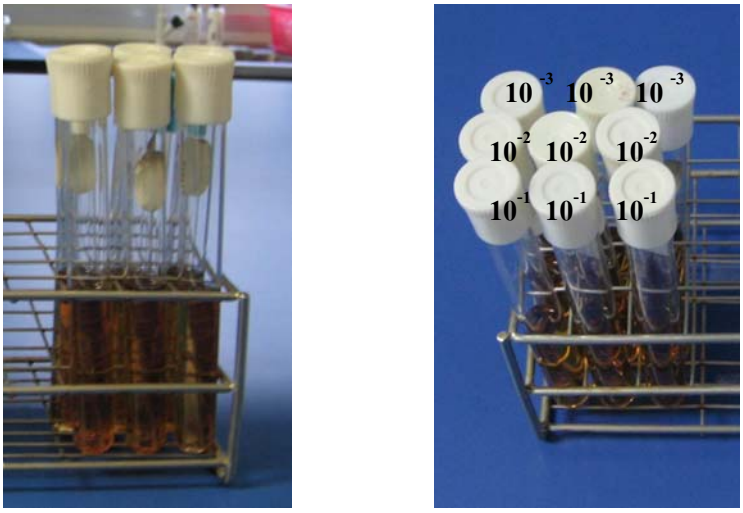
Hybridazation @ 46°C % formamide	NaCl (M)	Z µl 5 M NaCl	µl 0.5 M EDTA For 20 % FA and above
0	0.900	9000	-
5	0.636	6300	-
10	0.450	4500	-
15	0.318	3180	-
20	0.225	2150	500
25	0.159	1490	500
30	0.112	1020	500
35	0.080	700	500
40	0.056	460	500
45	0.040	300	500
50	0.028	180	500
55	0.020	100	500

Mount fluid

p- Phenylenediamine	100	mg
0.5 M Carbonate buffer (pH 9)	10	ml
100% Glycerol	90	ml

ภาคผนวก ง.
การตรวจปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E.coli* ด้วยวิธี
Most propable number (George and Jackson, 1998)

การตรวจปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด และ *E.coli* ด้วยวิธีMost propable number ใช้วิธีการของ George and Jackson (1998) โดยการตรวจใช้อาหาร Fluorocount Lauryl Sulfate Broth ของบริษัท Merck, Germany โดยเตรียมอาหาร Fluorocount Lauryl Sulfate Broth ใส่หลอดหลอดละ 9 มิลลิลิตร พร้อมหลอดดักแก๊ส นำตัวอย่างน้ำนมดิบเจือจางด้วย 0.1% Peptone water ที่ระดับ 10^{-1} ถึง 10^{-3} นำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางละ 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหาร บ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 24 – 48 ชั่วโมง



ก. ข.

ภาพที่ 16 การตรวจปริมาณแบคทีเรียโคลิฟาร์มทั้งหมด และปริมาณ *E.coli* ด้วยวิธีแบบ Most probable number (MPN)

ก. อาหาร Fluorocount Lauryl Sulfate Broth

ข. ลักษณะการเติมตัวอย่างที่แต่ละระดับความเจือจางในอาหาร

การตรวจผล สังเกตเฉพาะการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส ในกรณีต้องการศึกษาเฉพาะปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด ขณะที่การตรวจปริมาณ *E.coli* สังเกตเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส เกิดการเรืองแสงและเมื่อหยด Kovac's indole reagent 1-2 หยดแล้วเกิดวงแหวนสีแดง นำผลที่ได้มาเทียบปริมาณ MPN/ml จากตารางที่ 30 ซึ่งเป็นตาราง MPN แบบ 3 หลอด

ตารางที่ 30 ค่าดัชนีปริมาณแบคทีเรียที่เป็นไปได้มากที่สุด (Most Probable Index) แบบ 3-3-3 ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

หลอดที่ให้ผลเป็นบวก (Positive tubes)			MPN	หลอดที่ให้ผลเป็นบวก (Positive tubes)			MPN	หลอดที่ให้ผลเป็นบวก (Positive tubes)			MPN	หลอดที่ให้ผลเป็นบวก (Positive tubes)			MPN
0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

ภาคผนวก จ.
การวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SAS System 1982

1. ตัวอย่างการวิเคราะห์ด้วยคำสั่ง Proc GLM/LSMEANS/PDIFF

ในการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารในน้ำนมดิบ ยางไลเนอร์ ถังรวมนม ถังรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม น้ำล้างเต้านม ซึ่งมีข้อมูลการศึกษาดังนี้

ตัวอย่าง	ยางไลเนอร์ (CFU/ml)	ถังรวมนม (CFU/ml)	ถังรีดนม (CFU/ml)	ผ้าเช็ดเต้านม (CFU/ml)	น้ำล้างเต้านม (CFU/ml)	น้ำนมดิบ (CFU/ml)
ฟาร์มที่ 1	105,000	8,400	1,300	25	1,485	3,100,000
ฟาร์มที่ 2	350,000	220	200	0	1,050	375,000
ฟาร์มที่ 3	370,500	545,000	3,800	50	131,500	105,000
ฟาร์มที่ 4	425,000	192,500	160	15	44,600	15,100,000
ฟาร์มที่ 5	395,000	318,000	450	15	520	23,250,000
ฟาร์มที่ 6	475,000	377,000	93,000	175,000	35,000	180,000
ฟาร์มที่ 7	48,450	76,900	3,650	200	1,750	2,830,000
ฟาร์มที่ 8	3,750	250	100	50	1,055,100	2,230,000
ฟาร์มที่ 9	685,000	13,800	178,500	715	445	20,450,000
ฟาร์มที่ 10	163,000	329,500	11,300	150	12,100	4,620,000
ฟาร์มที่ 11	507,000	2,700	12,500	7,050	28,000	12,393,500
ฟาร์มที่ 12	542,000	525	86,000	500	1,175	7,200,000
ฟาร์มที่ 13	183,400	3,350	1,500	450	1,300	1,250,000
ฟาร์มที่ 14	66,800	100	6,050	150	4,850	2,425,000
ฟาร์มที่ 15	1,850	900	4,100	200	18,450	875,000
ฟาร์มที่ 16	1,445	109,500	45	5	60	20,500
ฟาร์มที่ 17	28,900	470	1,500	45	1,365	21,550,000
ฟาร์มที่ 18	528,500	484,000	101,300	67,000	78,200	2,425,000

จากข้อมูลสามารถใช้คำสั่ง Proc GLM/LSMEANS/PDIFF ในการวิเคราะห์ได้ดังนี้

```
title ' TB vs Enviro STUDY';
    data aom;
        do batch = 1 to 18;
          do trt = 1 to 6;
       input cell @@;
        output;
        end;
       end;
       cards;
         105000 8400   1300   25     1485    3100000
         350000 220    200    0      1050    375000
         370500 545000 3800   50     131500  105000
         425000 192500 160    15     44600   15100000
         395000 318000 450    15     520     23250000
         475000 377000 93000  175000 35000   180000
         48450  76900  3650   200    1750    2830000
         3750   250    100    50     1055100 2230000
         685000 13800  178500 715    445     20450000
         163000 329500 11300  150    12100   4620000
         507000 2700   12500  7050   28000   12393500
         542000 525    86000  500    1175    7200000
         183400 3350   1500   450    1300    1250000
         66800  100    6050   150    4850    2425000
         1850   900    4100   200    18450   875000
         1445   109500 45     5      60      20500
         28900  470    1500   45     1365    21550000
         528500 484000 101300 67000  78200   2425000
    ;
  proc GLM data = aom;
    Class batch trt;
    model cell =batch trt;
    mean trt;
    LSMEANS trt /PDIFF;
  RUN;
```

โดยผลการศึกษาจะแสดงในรูปตาราง General Linear Models Procedure และ General Linear Models Procedure Least Squares Means ดังนี้

General Linear Models Procedure

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BATCH	17	186291631575829.0000	10958331269166.400	1.01	0.4605
TRT	5	650617983414692.0000	130123596682938.000	1.94	0.0001

General Linear Models Procedure Least Squares Means

TRT	CELL	Pr > |T|	H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j)				
	LSMEAN	i/j	1	2	3	4	5	6
1	271144.17	1	.	0.9031	0.8257	0.8158	0.8616	0.0001
2	136839.72	2	0.9031	.	0.9215	0.9114	0.9580	0.0001
3	28080.83	3	0.8257	0.9215	.	0.9898	0.9634	0.0001
4	13978.89	4	0.8158	0.9114	0.9898	.	0.9532	0.0001
5	78719.44	5	0.8616	0.9580	0.9634	0.9532	.	0.0001
6	6687722.22	6	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	.

การแปลผล อ่านค่า p-value (Pr > F) จากตาราง General Linear Models Procedure ของการทดสอบทรีทเมนต์ทั้ง 6 ทรีทเมนต์ (น้ำนมดิบ ยางไลเนอร์ ถังรวมนม ถังรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม และน้ำล้างเต้านม) ซึ่งพบว่ามีค่าเท่ากัน 0.0001 แสดงว่า ทรีทเมนต์ทั้ง 6 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) จากนั้นทำการเลือกทรีทเมนต์ที่ต้องการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า LS-mean number จากตาราง General Linear Models Procedure Least Squares Means แล้วจึงอ่านค่า p-value ระหว่างค่าที่ต้องการเปรียบเทียบ โดยเลือกอ่านทางส่วนบนหรือส่วนล่างของแนวทแยงก็ได้ ซึ่งผลการศึกษาพบว่า น้ำนมดิบ (หมายเลข 6) เมื่อเปรียบเทียบกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดทั้ง 5 แล้ว พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.0001 แสดงว่า ปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบมีความแตกต่างจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดนม (P<0.01) ขณะที่ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรีดมีปริมาณแบคทีเรียไม่แตกต่างกัน (P >0.05) เนื่องจากค่า p-value ของทุกคู่มากกว่า 0.05

2. ตัวอย่างการวิเคราะห์ด้วยคำสั่ง Proc FREQ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับเซลล์โซมาติกกับการตรวจพบ *Staphylococcus* spp. ซึ่งมีข้อมูลการศึกษาดังนี้

แบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* spp. ในน้ำนมดิบ	ระดับเซลล์โซมาติก (เซลล์/มล.)			
	< 200,000	200,000-500,000	500,000-1,000,000	>1,000,000
พบ	6	2	0	0
ไม่พบ	38	19	10	3
รวม	44	21	10	3

จากข้อมูลสามารถใช้คำสั่ง Proc FREQ ในการวิเคราะห์ได้ดังนี้

```
title 'DETERGENT PREFERENCE STUDY';
    data deterg;
       input Scc $ Stap $ count @@;
       cards;
        0 P 6
        0 F 38
        T P 2
        T F 19
        1 P 0
        1 F 10
        2 P 0
        2 F 3
    ;
    proc freq data=deterg;
        table Stap*Scc/chisq norow nocol;
        weight count;
    run;
```

โดยผลการศึกษาจะแสดงในรูปตาราง STATISTICS FOR TABLE OF STAP BY SCC ดังนี้

```
STATISTICS FOR TABLE OF STAP BY SCC
-----------------------------------------------------
Statistic                      DF     Value        Prob
-----------------------------------------------------
Chi-Square                      3     2.044       0.563
Phi Coefficient                       0.162
Sample Size = 78
-----------------------------------------------------
```

การแปลผล อ่านค่า p-value (Prob) จากตาราง STATISTICS FOR TABLE OF STAP BY SCC ของการศึกษาความเป็นอิสระต่อกันของทรีทเมนต์ทั้ง 2 ทรีทเมนต์ (ระดับเซลล์โซมาติกและการตรวจพบ *Staphylococcus* spp.) ซึ่งพบว่ามีค่าเท่ากัน 0.563 ดังนั้นจึง accept Ho (P>0.05) แสดงว่า การตรวจพบ *Staphylococcus* spp. ระดับเซลล์โซมาติกเป็นอิสระต่อกัน กล่าวคือ ระดับเซลล์โซมาติกไม่สามารถบ่งบอกถึงการพบเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* spp ได้

3. ตัวอย่างการวิเคราะห์ด้วยคำสั่ง Proc CATMOD

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของวิธีการตรวจโรคเต้านมอักเสบทั้ง 4 แบบ ได้แก่ การทดสอบ Alcohol test การตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกด้วยน้ำยา California mastitis test (CMT) และเครื่อง Somacount 150 กับตรวจจุลินทรีย์สาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบซึ่งมีข้อมูลการศึกษาดังนี้

เทคนิคในการตรวจ	**เสี่ยงต่อการระบาด**	**ไม่เสี่ยงต่อการระบาด**
Alcohol test	1 ฟาร์ม (ร้อยละ 0)	77 ฟาร์ม (ร้อยละ 100)
ระดับปฏิกิริยา CMT	18 ฟาร์ม (ร้อยละ 23.08)	60 ฟาร์ม (ร้อยละ 76.92)
ปริมาณเซลล์โซมาติก	34 ฟาร์ม (ร้อยละ 43.59)	44 ฟาร์ม (ร้อยละ 56.41)
เชื้อสาเหตุหลักของโรคเต้านมอักเสบ	58 ฟาร์ม (ร้อยละ 74.36)	20 ฟาร์ม (ร้อยละ 25.64)

จากข้อมูลสามารถใช้คำสั่ง Proc CATMOD ในการวิเคราะห์ได้ดังนี้

```
title 'DETERGENT PREFERENCE STUDY';
    data deterg;
       input method $ level $ count @@;
       cards;
        AT  P 77
        AT  F 1
        CMT P 60
        CMT F 18
        Scc P 44
        Scc F 34
        BAC P 20
        BAC F 58
    ;
    proc catmod;
       response 0 1;
       weight count;
       model level=method / ml corrb;
    run;
```

โดยผลการศึกษาแสดงในรูปตาราง ANALYSIS-OF-VARIANCE TABLE และCORRELATION MATRIX OF THE PARAMETER ESTIMATES ดังนี้

ANALYSIS-OF-VARIANCE TABLE

Source	DF	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	826.46	0.0000
METHOD	3	257.95	0.0000

CORRELATION MATRIX OF THE PARAMETER ESTIMATES

	1	2	3	4
1	1.0000000	-0.8529072	0.1170449	0.0735762
2	-0.8529072	1.0000000	-0.1490471	-0.1097407
3	0.1170449	-0.1490471	1.0000000	-0.4030859
4	0.0735762	-0.1097407	-0.4030859	1.0000000

การแปลผล อ่านค่า p-value (Prob) จากตาราง ANALYSIS-OF-VARIANCE TABLE ถึงอิทธิพลของวิธีการศึกษากับวิธีการทั้ง 4 กับการตรวจ พบว่า มีค่าเท่ากัน 0.000 ดังนั้นจึง reject Ho (P>0.05) แสดงว่า ปัจจัยที่ 4 มีผลต่อการตรวจ จากนั้นทำการเปรียบเทียบว่าวิธีใดมีผลต่อการตรวจมากกว่ากันจากค่า CORRELATION ในตาราง CORRELATION MATRIX OF THE PARAMETER ESTIMATES ซึ่งการเปรียบเทียบทำให้ทราบว่า การตรวจจุลินทรีย์สาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ (หมายเลข 4) มีความสัมพันธ์กับการตรวจปริมาณเซลล์โซมาติกเครื่อง Somacount 150 มากกว่าการตรวจด้วยน้ำยา CMT และการทดสอบ Alcohol test โดยวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจมากที่สุดคือ การตรวจจุลินทรีย์สาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ มงคล **ชื่อสกุล** ประทุมมณี

เกิดวันที่ 26 เดือนมกราคม พ.ศ. 2523

ที่อยู่ปัจจุบัน 8/8 หมู่12 ตำบลโคกกลอย อำเภอตะกั่วทุ่ง จังหวัดพังงา

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2544 วท.บ.(ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยทักษิณ

พ.ศ. 2548 วท.ม.(ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยทักษิณ

ผลงานวิจัย

มงคล ประทุมมณี จิตติมา สถาพร จิราพร เลื่อนจันทร์ สมพงษ์ โอทอง สุชาติ สุขสถิตย์ ไชยวรรณ วัฒนจันทร์ และ นุกูล อินทระสังขา (2547) อัตราส่วนและความสัมพันธ์ของเชื้อ *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., total coliform และ *Escherichia coli* ที่พบในน้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ.ในงานประชุมวิชาทางวิชาการสัตวศาสตร์ภาคใต้ ครั้งที่ 3 “ปศุสัตว์ภาคใต้สู่อาหารฮาลาล” คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 18 -19 สิงหาคม 2547

มงคล ประทุมมณี นุชติยา ยิ้มละมัย สุไรดา สีสะโก นุกูล อินทระสังขา สมพงศ์ โอทอง สุชาติ สุขสถิตย์ และ ไชยวรรณ วัฒนจันทร์ (2547) การนับจำนวนเซลล์โซมาติกและแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมดิบด้วยกล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์อีพิฟลูออเรสเซนต์ ในงานประชุมทางวิชาการสัตวศาสตร์ภาคใต้ ครั้งที่ 3 “ปศุสัตว์ภาคใต้สู่อาหารฮาลาล” คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 18 -19 สิงหาคม 2547

สมพงศ์ โอทอง สุชาติ สุขสถิตย์ **มงคล ประทุมมณี** และ ไชยวรรณ วัฒนจันทร์ (2547) ชนิดของคลอรีนและคุณภาพของน้ำใช้ต่อประสิทธิภาพของสารละลายคลอรีนในการฆ่าเชื้อโรคและสภาวะโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมในอำเภอป่าพะยอมจังหวัดพัทลุง ในงานประชุมทางวิชาการสัตวศาสตร์ภาคใต้ ครั้งที่ 3 “ปศุสัตว์ภาคใต้สู่อาหารฮาลาล” คณะทรัพยากร ธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 18 -19 สิงหาคม 2547

สุชาติ สุขสถิตย์ สมพงษ์ โอทอง **มงคล ประทุมมณี** ใจพร ไชยชาย นุกูล อินทระสังขา และ ไชยวรรณ วัฒนจันทร์. (2547) การวิเคราะห์คุณภาพด้านจุลชีววิทยาและองค์ประกอบของน้ำนมรวมของฟาร์มโคนมในเขตอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ในงานประชุมทางวิชาการสัตวศาสตร์ภาคใต้ ครั้งที่ 3 “ปศุสัตว์ภาคใต้สู่อาหารฮาลาล” คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 18 -19 สิงหาคม 2547