เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2556; 11(2): 157-165

บทความต้นฉบับ

การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสต๊าฟฟิโลค็อกคัยและเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัยที่เพาะแยกได้จากโคที่มีภาวะเต้านมอักเสบในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

ศุกลรัตน์ บุณยยาตรา[1]* และวีนา จูเปีย[2]

[1]ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[2]ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ ไบโอฟิล์มคือโครงสร้างโพลีแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ที่ทับซ้อนกันหลายชั้น การสร้างไบโอฟิล์มมีความสัมพันธ์กับการลดลงของความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลชีพ เป็นผลให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังของเชื้อก่อโรคนั้นๆ ได้ เชื้อแบคทีเรียกลุ่มสต๊าฟฟิโลค็อกคัยและสเตร็ปโตค็อกคัย เป็นเชื้อจุลชีพที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดเต้านมอักเสบในโคนมที่สามารถพบได้บ่อยในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการตรวจหาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสต๊าฟฟิโลค็อกคัยและสเตร็ปโตค็อกคัยที่เพาะแยกได้จากโคที่มีภาวะเต้านมอักเสบในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย โดยทำการศึกษากับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 153 เชื้อ ซึ่งประกอบด้วยเชื้อสต๊าฟฟิโลค็อกคัย จำนวน 60 เชื้อ และเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัย จำนวน 93 เชื้อ ภายในกลุ่มเชื้อสต๊าฟฟิโลค็อกคัยทั้งหมดสามารถแยกได้เป็นเชื้อสต๊าฟฟิโลค็อกคัส ออเรียส จำนวน 27 เชื้อ และเชื้อสต๊าฟฟิโลค็อกคัยที่ให้ผลลบกับการทดสอบโคแอกูเลส จำนวน 33 เชื้อ ภายในกลุ่มเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัยทั้งหมดสามารถแยกได้เป็นเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส แอกาแล็คเตีย จำนวน 45 เชื้อ เชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส ยูเบอริส จำนวน 46 เชื้อ และเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส ดิสกาแล็คเตีย จำนวน 2 เชื้อ ปริมาณร้อยละของเชื้อจุลชีพที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ทั้งหมดคือ 53.33% (77/153) เชื้อสต๊าฟฟิโลค็อกคัส ออเรียส มีสัดส่วนความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้สูงที่สุด (74.07%) รองลงมาคือ เชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส แอกาแล็คเตีย (73.33%) และเชื้อสต๊าฟฟิโลค็อกคัยที่ให้ผลลบกับการทดสอบโคแอกูเลส (36.36%) การศึกษานี้เป็นรายงานความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อสต๊าฟฟิโลค็อกคัยและเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัยที่เพาะแยกได้จากโคที่มีภาวะเต้านมอักเสบครั้งแรกในประเทศไทย พยาธิกำเนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลชีพเหล่านี้ควรได้รับการศึกษาค้นคว้าที่มากยิ่งขึ้น **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2556; 11(2): 157-165**

คำสำคัญ: ไบโอฟิล์ม ภาวะเต้านมอักเสบในโค สต๊าฟฟิโลค็อกคัย สเตร็ปโตค็อกคัย

ติดต่อสำเนาบทความได้ที่ : ศุกลรัตน์ บุณยยาตรา ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100 E-mail address: sukolrat.b@cmu.ac.th ได้รับบทความ วันที่ 30 พฤศจิกายน 2555

บทนำ

เต้านมอักเสบเป็นปัญหาที่สำคัญที่สุดปัญหาหนึ่งในอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนม โดยสามารถส่งผล กระทบต่อสุขภาพของตัวสัตว์และผลผลิตน้ำนมทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ National Mastitis Council ได้ประมาณความสูญเสียจากภาวะเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมสูงถึงประมาณ 185 เหรียญสหรัฐต่อโคต่อปี (http://w3.aces.uiuc.edu/AnSci/USDA/NE-112/Background.shtml) ส่วนหนึ่งของความสูญเสียดังกล่าวมาจากค่าใช้จ่ายในการรักษา ซึ่งพบว่าความสำเร็จในการรักษาเต้านมอักเสบด้วยยาปฏิชีวนะยังไม่สูงเท่าที่ควรโดยมีค่าอยู่ในช่วง 0% - 52% เท่านั้น (Owens et al., 1997) ทั้งนี้ผลการรักษาในแม่โคที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังหรือมีปริมาณโซมาติกเซลล์สูงต่อเนื่องเป็นเวลานาน มักพบว่ามีผลตอบสนองต่อการรักษาต่ำ (Deluyker et al., 1999; Owens et al., 1997; Pyorala and Pyorala, 1998; Shephard et al., 2000) ในขณะที่การรักษาการติดเชื้อแบบเฉียบพลันมักให้ผลการตอบสนองที่ดีกว่า ซึ่งอยู่ในช่วง 33% - 100% (Deluyker et al., 1999; Hillerton and Kliem, 2002; Owens et al., 1997; Pyorala and Pyorala, 1998) ดังนั้นปัญหาการเกิดเต้านมอักเสบหรือการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมแบบเรื้อรัง จึงเป็นปัญหาที่ควรมีการศึกษาหาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการหาวิธีรักษาที่ได้ผลสูงสุดต่อไป

ปัจจัยหนึ่งที่อาจส่งผลต่อความสำเร็จในการรักษาการติดเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ และการติดเชื้อเรื้อรังภายในเต้านม อาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการสร้างโครงสร้างภายนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดเต้านมอักเสบที่เรียกว่าไบโอฟิล์ม (Biofilm) ซึ่งเป็นโครงสร้างโพลีเมอร์แมทริกซ์ ที่ห่อหุ้มกลุ่มเซลล์แบคทีเรียที่มีการเกาะติดกับพื้นผิว (Costerton et al., 1999) เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างไบโอฟิล์ม มักจะต้านทานต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ สารฆ่าเชื้อ และการทำลายโดยกระบวนการป้องกันตนเองของคนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อ

ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อเรื้อรังต่าง ๆ มีการศึกษาจำนวนมากในโรคติดเชื้อเรื้อรังในคน ตัวอย่างเช่น *Staphylococcus aureus* และ *Staph. epidermidis* ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อที่โรงพยาบาล (nosocomial infections) และ *Escherlichia coli* ทำให้เกิดต่อมลูกหมากอักเสบ และการติดเชื้อในท่อน้ำดี และ *Streptococcus* spp. ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ช่องปากและฟัน (periodontitis) กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (endocarditis) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) และปอดอักเสบ (pneumonia) (Donlan and Costerton, 2002) จะเห็นได้ว่า เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ก็มักพบเป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบในโคนมเช่นกัน ดังนั้นความสามารถในการ สร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้จึงอาจเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการติดเชื้อเรื้อรังในเต้านมและส่งผลต่อการตอบสนองต่อการรักษาต่ำในโคติดเชื้อเรื้อรังได้

ในประเทศไทย ยังไม่เคยมีการสำรวจความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบในโคนม การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสัดส่วนของเชื้อสต๊าฟฟิโลค็อคคัย (*Staphylococci*) และสตร็ปโตค็อคคัย (*Streptococci*) ที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบในโคนม ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ

การศึกษานี้ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococci* และ *Streptococci* ที่ถูกเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง -80 °C ในห้องปฏิบัติการกลาง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่เมื่อปี พ.ศ. 2548 ถึง พ.ศ. 2554 โดยเป็นเชื้อแบคทีเรียที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างน้ำนมจากแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบทั้งแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการในเขตจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำพูน จำนวนทั้งสิ้น 153 เชื้อมาทำการทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม

การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม

การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มสามารถทำได้ตามวิธีที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ (Vasudevan et al., 2003) โดยนำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococci* เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) และนำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Streptococci* เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ Todd-Hewitt broth with 1% w/v yeast extract (THY broth) จากนั้นจึงนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง หลังจากบ่มเชื้อจึงนำเชื้อแบคทีเรียมาทำให้เจือจางในอัตราส่วน 1:40 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.25% สำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococci* และในอาหารเลี้ยงเชื้อ THY broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.25% สำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Streptococci* จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่ปริมาณ 200 µl ในแต่ละช่องของ 96-well plates และบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง หลังจากการบ่ม จึงนำมาล้างด้วย phosphate buffer saline solution (PBS), pH 7.0 สามครั้ง และรอให้แห้ง นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 °C จากนั้นทำการย้อมเซลล์ที่ติดที่ plates ด้วย 0.25% crystal violet นาน 1 นาที และล้างด้วย PBS อีกครั้งก่อนที่จะถูกนำมาตรวจวัดความดูดกลืนแสง ที่ OD 570 แต่ละตัวอย่างจะถูกตรวจทั้งหมด 3 ครั้ง โดยใช้ช่องเปล่าเป็น blank และทุกครั้งที่ทำการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม จะมีการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ทราบว่าสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (positive control) ซึ่งได้แก่เชื้อ *Staph. aureus* DMST 4745 (ATCC 29213, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข) และ เชื้อแบคทีเรียที่ทราบว่าไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (negative control) ซึ่งได้แก่เชื้อ *Staph. epidermidis* DMST 15505 (ATCC 12228, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข) ร่วมด้วยทุกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องของการทดสอบ ตัวอย่างที่มีค่า blank corrected mean absorbance มากกว่า 0.1 กำหนดว่าให้ผลบวก หรือสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (Vasudevan et al., 2003)

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลค่าความดูดกลืนแสง (absorbance) ของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษาทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติแบบพรรณนา (descriptive statistic) โดยแยกสำหรับเชื้อกลุ่ม *Staphylococci* และ *Streptococci* และข้อมูลความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียถูกนำเสนอเป็นสัดส่วนเปอร์เซ็นต์จากจำนวนเชื้อทั้งหมดที่ทำการทดสอบ โดยแยกสำหรับเชื้อกลุ่ม *Staphylococci* และ *Streptococci*

ผลการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ได้รวบรวมเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococci* และ *Streptococci* ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างน้ำนมจำนวน 153 เชื้อ แบ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Staphyloccci* จำนวน 60 เชื้อ และเชื้อกลุ่ม *Streptococci* จำนวน 93 เชื้อ โดยเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococci* ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ สามารถแยกได้เป็นเชื้อ *Staph. aureus* จำนวน 27 เชื้อ และเชื้อกลุ่ม coagulase-negative *Staphylococci* (CNS) จำนวน 33 เชื้อ ส่วนเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococci* นั้นสามารถแยกได้เป็นเชื้อ *Strep. agalactiae* จำนวน 45 เชื้อ *Strep. uberis* จำนวน 46 เชื้อ และเชื้อ *Strep. dysgalactiae* จำนวน 2 เชื้อ

จากการตรวจวัดความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาศึกษา พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวกทั้งหมดมีจำนวน 77 เชื้อ คิดเป็น 50.33% (77/153) ของจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาทั้งหมด โดยเชื้อที่ให้ผลบวกทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยของ OD570 เท่ากับ 0.25 ซึ่งต่างจากค่าเฉลี่ยของ OD570 ของเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลลบทั้งหมดซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.03 อย่างชัดเจน

เชื้อกลุ่ม *Staphylococci* ทั้งหมดที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มีจำนวน 32 เชื้อ คิดเป็น 53.33% (32/60) โดยเชื้อ *Staph. aureus* มีสัดส่วนของเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (33.33%) มากกว่าสัดส่วนของเชื้อ

CNS ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (20.00%) ดังแสดงในตารางที่ 1 และพบว่าเชื้อ *Staph. aureus* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ 74.07% (20/27) ของจำนวนเชื้อ *Staph. aureus* ที่ถูกนำมาศึกษา ขณะที่ในกลุ่มของเชื้อ CNS ทั้งหมดพบว่าสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ 36.36% (12/33) ดังแสดงในตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย OD570 ของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococci* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มีค่าเท่ากับ 0.27 ส่วนค่าเฉลี่ย OD570 ของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococci* ที่ไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มีค่าเท่ากับ 0.03

เชื้อกลุ่ม *Streptococci* ทั้งหมดที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มีจำนวน 45 เชื้อ คิดเป็น 48.39% (45/93) โดยเชื้อ *Strep. agalactiae* มีสัดส่วนของเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (35.49%) มากกว่าสัดส่วนของเชื้อ *Strep. uberis* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (12.90%) ในขณะที่เชื้อ *Strep. dysgalactiae* ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้เลย 0% (0/93) ดังแสดงในตารางที่ 1 และพบว่าเชื้อ *Strep. agalactiae* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ 73.33% (33/45) ของจำนวนเชื้อ *Strep. agalactiae* ที่นำมาศึกษา ในขณะที่ในกลุ่มของเชื้อ *Strep. uberis* ทั้งหมด พบว่าสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ 26.09% (12/46) ดังแสดงในตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย OD570 ของเชื้อในกลุ่ม *Streptococci* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มีค่าเท่ากับ 0.23 ส่วนค่าเฉลี่ย OD570 ของเชื้อในกลุ่ม *Streptococci* ที่ไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มีค่าเท่ากับ 0.03

ตารางที่ 1 แสดงสัดส่วนของเชื้อกลุ่ม *Staphylococci* และ *Streptococci* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้

เชื้อแบคทีเรีย	สัดส่วนของเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้	เปอร์เซ็นต์
Staphylococci	32/60	53.33%
Staphylococcus aureus	20/60	33.33%
Coagulase-negative *Staphylococci*	12/60	20.00%
Streptococci	45/93	48.39%
Streptococcus agalactiae	33/93	35.49%
Strep. uberis	12/93	12.90%
Strep. dysgalactiae	0/93	0%

ตารางที่ 2 แสดงสัดส่วนของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative *Staphylococci* (CNS), *Streptococcus agalactiae*, *Strep. uberis* และ *Strep. dysgalactiae* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ภายในกลุ่มสปีชีส์เดียวกัน

เชื้อแบคทีเรีย	จำนวนเชื้อที่นำมาศึกษา	จำนวนเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์มได้	เปอร์เซ็นต์
Staphylococcus aureus	**27**	**20**	**74.07%**
CNS	**33**	**12**	**36.36%**
Streptococcus agalactiae	**45**	**33**	**73.33%**
Strep. uberis	**46**	**12**	**26.09%**
Strep. dysgalactiae	**2**	**0**	**0%**

วิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococci* และ *Streptococci* ที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีสัดส่วนของเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ค่อนข้างสูง คือประมาณครึ่งหนึ่งของความชุกของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสกุลมีความสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ ซึ่งถือได้ว่าเป็นรายงานความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับเต้านมอักเสบในโคนมรายงานแรกในประเทศไทย สำหรับในประเทศอื่นๆ นั้น พบว่ามีรายงานการสำรวจความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมหรือเต้านมอักเสบหลายฉบับ โดยส่วนใหญ่มักทำการศึกษาในเชื้อแบคทีเรียที่จำเพาะสปีชีส์ สำหรับเชื้อ *Staph. aureus* พบว่า ในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้เคยมีรายงานสัดส่วนของเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มในช่วง 40-70% (Fox et al., 2005; Vasudevan et al., 2003) สำหรับประเทศในทวีปยุโรป พบมีรายงานความสามารถของการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staph. aureus* ที่เพาะแยกได้จากน้ำนมไว้หลากหลาย โดยมีค่าอยู่ในช่วง 18-58% (Oliveira et al., 2006; Szweda et al., 2012) สำหรับในทวีปเอเชียเคยมีการศึกษาในประเทศอินเดีย ซึ่งมีรายงานความสามารถของการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staph. aureus* ไว้ที่ 29.41% (Dhanawade et al., 2010) สำหรับการศึกษาในประเทศไทยครั้งนี้ พบว่าเชื้อ *Staph. aureus* ที่นำมาศึกษามีสัดส่วนของเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้สูงมาก (74.07%) ความแตกต่างระหว่างแต่ละการศึกษาอาจเกิดจากความแตกต่างของสายพันธุ์ที่พบในแต่ละพื้นที่ นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างน้ำนมที่นำมาส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักเป็นตัวอย่างน้ำนมจากแม่โคที่มีอาการเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง และไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมาก่อน เชื้อแบคทีเรียที่เพาะแยกได้เหล่านี้ จึงอาจมีแนวโน้มสูงที่จะสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ เนื่องจากเชื้อ *Staph. aureus* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้จะสามารถยึดเกาะกับส่วนผิวของเยื่อบุภายในเต้านมได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (Baselga et al., 1993) และมักก่อให้เกิดการติดเชื้อระยะยาว (persistent infection) ได้ (Götz, 2002)

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม CNS ก็ได้เคยมีรายงานความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มเช่นกัน โดย Simojoki et al. (2012) ได้เคยทำการศึกษากับเชื้อแบคทีเรียหลายๆ สปีชีส์ในกลุ่ม CNS ที่เพาะแยกได้จากน้ำนมในประเทศฟินแลนด์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม 31.3% (Simojoki et al., 2012) เชื้อ *Staph. epidermidis* เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม CNS ที่สามารถพบได้บ่อยในตัวอย่างน้ำนม Oliveira et al. (2006) ได้เคยทำการศึกษาในประเทศโปรตุเกส และรายงานความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวไว้ที่ 37.5% (Oliveira et al., 2006) สำหรับการศึกษาในประเทศไทยครั้งนี้ ได้รายงานความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อกลุ่ม CNS ไว้ใกล้เคียงกัน (36.36%) ซึ่งจะสังเกตได้ว่า เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม CNS มักสัมพันธ์กับการเกิดเต้านมอักเสบแบบที่ไม่มีอาการรุนแรง หรือเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการมากกว่าแบบแสดงอาการ และมีอัตราการหายได้เองค่อนข้างสูง (McDougall, 1998; Wilson et al., 1999) ซึ่งน่าจะสัมพันธ์กับการตรวจพบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้น้อยกว่าเชื้อแบคทีเรียที่มักก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรังเช่นเชื้อ *Staph. aureus* เป็นต้น

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococci* เป็นเชื้อแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่มักพบเป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบในโคนม โดยเฉพาะในเขตภาคเหนือ เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococci* พบเป็นสาเหตุสูงสุดที่ก่อให้เกิดภาวะเต้านมอักเสบทั้งแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการ โดยพบเชื้อ *Strep. agalactiae* และเชื้อ *Strep. uberis* มีความชุกสูงที่สุด (Boonyayatra et al., 2007) เชื้อ *Strep. agalactiae* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มักทำให้เกิดเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และมักติดต่อจากโคสู่โคในระหว่างรีดนม ความสามารถในการสร้าง

ไบโอฟิล์มของเชื้อ *Strep. agalactiae* ที่เพาะแยกได้จากน้ำนมโคยังไม่เคยถูกทำการศึกษามาก่อน แต่ได้เคยมีรายงานความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ในอุปกรณ์ที่ใช้สอดเข้ามดลูกของผู้ป่วยเพศหญิง (Donlan and Costerton, 2002; Maria and Costerton, 1983) และยังเคยมีรายงานความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Strep. agalactiae* ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกของหญิงตั้งครรภ์ที่เป็นพาหะแบบไม่แสดงอาการ (asymptomatic carriers) ไว้สูงถึง76.5% (Kaur et al., 2009) การศึกษาในประเทศไทยครั้งนี้ ได้รายงานความชุกของเชื้อ *Strep. agalactiae* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ไว้สูงเช่นกัน (73.33%) ซึ่งเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เนื่องจากโดยทั่วไปการรักษาภาวะเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อ *Strep. agalactiae* มักให้ผลสำเร็จสูงถึง 85%-100% (Erskine and Eberhart, 1990; Craven, 1987; Thomson et al., 1988) จึงมักมีการสันนิษฐานเบื้องต้นว่าเชื้อ *Strep. agalactiae* น่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มักไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ภายในเต้านม ทำให้การเข้าถึงเชื้อของยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาเป็นไปได้ง่ายและให้ผลสำเร็จสูง อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จของการรักษาภาวะเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อ *Strep. agalactiae* ในเขตภาคเหนือของประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานแน่ชัด ซึ่งอาจมีความแตกต่างกับรายงานอื่นๆ ได้ นอกจากนี้ ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่า ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มโดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งเหนี่ยวนำให้เชื้อแบคทีเรียสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวที่ไม่ใช่ผิวเซลล์หรือเนื้อเยื่อ จะมีความสัมพันธ์มากน้อยเพียงใดกับการสร้างไบโอฟิล์มภายในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่มีการติดเชื้อจริง จึงควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เชื้อแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมชนิด *Strep.uberis* เป็นเชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่พบมีความชุกสูงในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเพาะแยกได้จากน้ำนมโคในเขตภาคเหนือ (Boonyayatra et al., 2007) และพบว่าการควบคุมเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อดังกล่าวยังไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร สาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ โดยมีรายงานว่า 20% ของเชื้อ *Strep. uberis* ที่แยกได้จากน้ำนม สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (Varhimo et al., 2010) โดยมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่รายงานในการศึกษาครั้งนี้ คือ 26.09% และสัดส่วนนี้อาจเพิ่มขึ้นได้ เมื่อเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์ม เช่น ภาวะแบ่งตัวในเต้านม ซึ่งมีโปรตีนน้ำนมชนิดอัลฟ่าเคซีนและเบต้าเคซีนสูง เป็นต้น (Varhimo et al., 2010) ส่วนเชื้อ *Strep. dysgalactiae* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ไม่บ่อยนักในน้ำนมโคในเขตภาคเหนือ จึงมีจำนวนที่นำมาศึกษาในครั้งนี้น้อย และการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถตรวจพบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้

สรุป

การศึกษาครั้งนี้เป็นการสำรวจหาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียหลักที่มักพบทำให้เกิดเต้านมอักเสบในโคนมในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งถือเป็นรายงานครั้งแรกของประเทศ และพบว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococci* และ *Streptococci* ที่นำมาศึกษามีสัดส่วนของเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มในห้องทดลองได้สูง ความสัมพันธ์ของความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้กับการเกิดเต้านมอักเสบของโคนมในพื้นที่ รวมไปถึงพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้จึงควรได้รับการศึกษาค้นคว้าที่มากยิ่งขึ้นในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2554

เอกสารอ้างอิง

Baselga, R., Albizu, I., De La Cruz, M., Del Cacho, E., Barberan, M., & Amorena, B. (1993). Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus:* implications in colonization and virulence. Infection and Immunity 61(11), 4857–4862.

Boonyayatra, S., Thaboonpeng, J., Kreausukon, & K., Suriyasathaporn, W. (2007). Antimicrobial resistance of mastitis-associated bacteria in lactating dairy cows in Chiang Mai province. Chiang Mai Veterinary Journal 5, 135-145.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., & Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284(5418), 1318–1322.

Craven, N. (1987). Efficacy and financial value of antibiotic treatment of bovine clinical mastitis during lactation--a review. British Veterinary Journal 143(5), 410-422.

Deluyker, H.A., Chester, S.T., & Van Oye, S.N. (1999). A multilocation clinical trial in lactating dairy cows affected with clinical mastitis to compare the efficacy of treatment with intramammary infusions of a lincomycin/neomycin combination with an ampicillin/cloxacillin combination. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 22(4), 274-282.

Dhanawade, N.B., Kalorey, D.R., Srinivasan, R., Barbuddhe, S.B., & Kurkure, N.V. (2010). Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Veterinary Research Communications 34(1), 81–89.

Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews 15(2), 167–193.

Erskine, R.J. & Eberhart, R.J. (1990). Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*. Journal of American Veterinary Medical Association 196(8):1230-1235.

Fox, L.K., Zadoks, R.N., & Gaskins, C.T. (2005). Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. Veterinary Microbiology 107, 295-299.

Götz, F. (2002). Staphylococcus and biofilms. Molecular Microbiology 43(6), 1367-1378.Hillerton, J.E. & Kliem, K.E. (2002). Effective treatment of Streptococcus uberis clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. Journal of Dairy Science 85(4), 1009–1014.

Kaur, H., Kumar, P., Ray, P., Kaur, J., & Chakraborti, A. (2009) Biofilm formation in clinical isolates of group B streptococci from north India. Microbial Pathogenesis 46(6), 321–327.

Marrie, T.J. & Costerton, J.W. (1983). A scanning electron microscopic study of urine droppers and urine collecting systems. Archives of Internal Medicine 143(6), 1135–1141.

McDougall, S. (1998). Efficacy of two antibiotic treatments in curing clinical and subclinical mastitis in lactating dairy cows. New Zealand Veterinary Journal 46(6), 226-232.

Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F., & Vilela, C.L. (2006) Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus* epidermidis mastitis isolates. Veterinary Microbiology 118(1-2), 133-140.

Owens, W.E., Ray, C.H., Watts, J.L., & Yancey, R.J. (1997). Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. Journal of Dairy Science 80(2), 313–317.

Pyorala, S.H. & Pyorala, E.O. (1998). Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989–1995). Journal of American Veterinary Medical Association 212(3), 407–412.

Shephard, R.W., Malmo, J., & Pfeiffer, D.U. (2000). A clinical trial to evaluate the effectiveness of antibiotic treatment of lactating cows with high somatic cell counts in their milk. Australian Veterinary Journal 78(11), 763–768.

Simojoki, H., Hyvonen, P., Plumed Ferrer, C., Taponen, S., & Pyorala, S. (2012) Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative *staphylococci* associated with the persistence and severity of intramammary infection? Veterinary Microbiology 158(3-4), 344-352.

Szweda, P., Schielmann, M., Milewski, S., Frankowska, A., & Jakubczak, A. (2012) Biofilm production and presence of ica and bap genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. Polish Journal of Microbiology 61(1), 65-69.

Thomson, J.R., Mollison, N., & Matthews, K.P. (1988). An investigation of mastitis due to *S. agalactiae, S. uberis* and *M. smegmatis* in a dairy herd. Veterinary Record 122(12), 271-274.

Varhimo, E., Varmanen, P., Fallarero, A., Skogman, M., Pyorala, S., Livanainen, A., Sukura, A., Vuorela, P., & Savijoki, K. (2011). Alpha- and beta-casein components of host milk induce biofilm formation in the mastitis bacterium *Streptococcus uberis*. Veterinary Microbiology 149(3-4), 381-389.

Vasudevan, P., Nair, M.K., Annamalai, T., & Venkitanarayanan , K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Veterinary Microbiology 92(1), 179–185.

Wilson, D.J., Gonzalez, R.N., Case, K.L., Garrison, L.L., & Gröhn, Y.T. (1999). Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. Journal of Dairy Science 82(8), 1664-1670.