**เชียงใหม่สัตวแพทยสาร** 2553;8(1):25 - 35

**นิพนธ์ต้นฉบับ**

# ผลของอิมมูโนโกลบูลินจีต่อการทำงานของนิวโทรฟิลในการต่อต้านเชื้อสเตรปโตคอกคัส ยูเบอริส ที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบในโคในห้องปฏิบัติการ

**อาภาภรณ์ เทพสิทธิ์ สิริวรรณศิลปี และ กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร**

*ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

**บทคัดย่อ** การศึกษาผลของอิมมูโนโกลบูลินจีต่อการทำงานของนิวโทรฟิลในการต่อต้านเชื้อ *S. uberis* ที่เป็นสาเหตุเต้านมอักเสบในโคในห้องปฏิบัติการ โดยมีแหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจีในตัวอย่างน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติ และตัวอย่างซีรั่มของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* ที่ได้จากการติดเชื้อธรรมชาติจำนวน 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (clinical mastitis; CM isolate) และแบบไม่แสดงอาการ (subclinical mastitis; SCM isolate) โดยมีกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือเป็นกลุ่มควบคุม ตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิลในการเก็บกินเชื้อที่ย้อมสาร FITC ด้วยวิธี flow cytometry และการทำลายเชื้อ *S. uberis* ด้วยวิธี plate count พบว่า ในสภาวะที่อิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมสามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ แต่กลับพบว่าอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมของแม่โคที่มีการติดเชื้อเข้าเต้านมสามารถกระตุ้นนิวโทรฟิลในการทำลายเชื้อ *S.uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ อย่างไรก็ตามอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการได้ แต่ให้ผลไม่ชัดเจนในการส่งเสริมการทำลายเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร** 2553;8(1) : 25 – 35.

**คำสำคัญ** : อิมมูโนโกลบูลินจี การทำงานของนิวโทรฟิล สเตรปโตคอกคัส ยูเบอริส เต้านมอักเสบในโค

## บทนำ

เต้านมอักเสบ (mastitis) เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจของฟาร์มผู้เลี้ยงโคนม โดยพบว่าเป็นปัญหาสุขภาพสูงถึง 21.01 เปอร์เซ็นต์ของปัญหาสุขภาพทั้งหมด[1] ซึ่งส่งผลกระทบต่อการลดลงของปริมาณผลผลิตและคุณภาพของน้ำนม ทำให้ต้นทุนการผลิตน้ำนมสูงขึ้นเนื่องจากการเสียค่าใช้จ่ายในการรักษา การต้องทิ้งน้ำนมที่มีการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะ และการคัดทิ้งแม่โคก่อนเวลาอันสมควรเพิ่มขึ้น[2]

เต้านมอักเสบในโคนมเป็นกระบวนการอักเสบที่ร่างกายโคตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่สามารถติดต่อระหว่างเต้านมสู่เต้านมหรือเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมแล้วติดต่อเข้าสู่เต้านม[3] โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Streptococci

ติดต่อขอสำเนาบทความได้ที่ : อาภาภรณ์ เทพสิทธิ์ สิริวรรณศิลปี, ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 ; E-mail: arbhabhorn@gmail.com
ได้รับบทความวันที่ 17 ธันวาคม 2552

ที่สามารถทำให้เกิดเต้านมอักเสบได้ทั้งแบบเฉียบพลันหรือแบบเรื้อรังพบได้หลายชนิด ได้แก่ *S. uberis S. agalactiae* และ *S. dysgalactiae* แต่ทั้งนี้พบว่าเชื้อ *S. uberis* เป็นเชื้อจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อเข้าเต้านม[4] สำหรับในประเทศไทยเชื้อ *S. uberis* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลมและให้ผลลบต่อการทดสอบ catalase ที่สามารถเพาะแยกได้มากที่สุดจากตัวอย่างน้ำนมโคที่เป็นเต้านมอักเสบ[5] การศึกษาภายนอกร่างกายสัตว์พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการเกาะและเข้าสู่ภายในของเซลล์เยื่อบุของเต้านมได้ นอกจากนี้เชื้อยังสามารถแบ่งตัวและมีชีวิตอยู่ภายในเซลล์เยื่อบุของเต้านมได้เป็นเวลานาน โดยไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อแบบรุนแรงและความเสียหายของเซลล์เยื่อบุเต้านม ดังนั้นจึงทำให้เกิดการติดเชื้อที่ยาวนานและพัฒนาเป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง[6]

โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรังจากการติดเชื้อ *S. uberis* พบว่าในน้ำนมมีจำนวนเซลล์โซมาติกสูงขึ้น ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล[3] แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าการติดเชื้อ *S. aureus* เข้าเต้านม แม้ว่าจะพบจำนวนนิวโทรฟิลสูงขึ้น แต่กลับไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ซึ่งอาจเป็นเพราะนิวโทรฟิลในเต้านมมีความสามารถในการเก็บกินเชื้อได้น้อย[7] เนื่องจากในเต้านมมีปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินจีที่ทำหน้าที่จับกับเชื้อและช่วยให้นิวโทรฟิลเข้าไปเก็บกินในระดับต่ำ[8]

ปัจจุบันแม้ว่าฟาร์มโคนมจะพยายามป้องกันปัญหาเต้านมอักเสบโดยการใช้มาตรการต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นการรีดนมตามหลักสุขศาสตร์ การจุ่มเต้านมด้วยน้ำยาทำลายเชื้อทันทีหลังการรีดนม การใช้ยาปฏิชีวนะรักษาโคที่แสดงอาการเต้านมอักเสบ การใช้ยาปฏิชีวนะในช่วงพักการรีดนม ตลอดจนการคัดทิ้งโคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรังแล้วก็ตาม แต่ก็ยังพบโคที่มีการติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อมเข้าเต้านมมากขึ้น ในขณะที่การแพร่เชื้อจากเต้านมที่ติดเชื้อไปสู่เต้าอื่นๆมีอัตราลดลง นั้นชี้ให้เห็นได้ว่ามาตรการดังกล่าวยังไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันเต้านมอักเสบที่มีสาเหตุมาจากสิ่งแวดล้อมได้[9] ดังนั้นแนวคิดในการใช้ภูมิคุ้มกันในการรักษาเต้านมอักเสบจากเชื้อ *S. uberis* โดยการให้อิมมูโนโกลบูลินจีเข้าเต้านม เพื่อให้เต้านมมีปริมาณอิมมูโนโกลบูลินจีที่สามารถจับกับเชื้อได้อย่างเพียงพอ จึงน่าจะเป็นอีกแนวทางในการเพิ่มความสามารถในการเก็บกินเชื้อแบคทีเรียของนิวโทรฟิลให้ดีมากขึ้น เพื่อเป็นการทำให้เต้านมสามารถกำจัดเชื้อให้หมดไป และยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความสามารถของอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มของโคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* โดยธรรมชาติ โคที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และโคที่มีเต้านมปกติต่อการทำงานของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกาย

## อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

### การเตรียมเชื้อ *S. uberis* ที่ใช้ในการตรวจสอบ

เชื้อ *S. uberis* ที่นำมาใช้ในการตรวจสอบเป็นเชื้อสาเหตุเต้านมอักเสบที่เพาะแยกได้จากแม่โคที่มีการติดเชื้อเข้าเต้านม และได้ตรวจระบุชนิดด้วยชุดตรวจชีวเคมีจำแนกชนิดเชื้อ API 20 STREP® (bioMérieux, France) คัดเลือกเชื้อ *S. uberis* 2 สายพันธุ์ โดยเป็นสายพันธุ์ของเชื้อที่ทำให้เกิดเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (clinical mastitis; CM isolate) และเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (subclinical mastitis; SCM isolate)

**การเตรียมอิมมูโนโกลบูลินจีจากตัวอย่างน้ำนมซีรั่มของแม่โค และ hyperimmune serum ของลูกโค**

เก็บตัวอย่างน้ำนม และเลือดจากแม่โคในฟาร์มโคนมรายย่อยทั้งหมด 7 ฟาร์มที่มีประวัติการติดเชื้อ *S. uberis* ในฟาร์มโดยเป็นแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม (*S. uberis* IMI cows) และแม่โคที่มีเต้านมปกติ (healthy cows) สำหรับแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมนั้นเป็นแม่โคที่ได้รับการตรวจยืนยันแล้วว่ามีการติดเชื้อเข้าเต้านมอย่างน้อย 1 เต้า ด้วยชุดตรวจชีวเคมีจำแนกชนิดเชื้อ API 20 STREP® (bioMérieux, France) ว่าเป็นเชื้อ *S. uberis* ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนกันติดต่อกัน 2 ครั้ง เป็นระยะเวลาห่างกัน 7 วัน และแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมต้องมีเต้านมอย่างน้อย 1 เต้าที่ตรวจไม่พบเชื้อใดๆ เข้าเต้านม และสำหรับแม่โคที่มีเต้านมปกติจะเป็นแม่โคที่มีผลการตรวจไม่พบเชื้อใดๆ เข้าเต้านมทั้ง 4 เต้าติดต่อกัน 2 ครั้ง เป็นระยะเวลาห่างกัน 7 วันเช่นเดียวกัน ในการศึกษานี้พบแม่โคที่มีที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมจำนวน 7 ตัว โดยมีเต้าที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมทั้งหมด 8 เต้า ซึ่งมีแม่โคจำนวน 1 ตัวที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมจำนวน 2 เต้า และมีเต้าที่ไม่มีการติดเชื้อทั้งหมด 7 เต้า และแม่โคที่มีเต้านมปกติ จำนวน 6 ตัว

เก็บตัวอย่างเลือดจากลูกโคพันธุ์ขาว-ดำ เพศผู้ อายุ 1-3 เดือน ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิด้วยเชื้อ *S. uberis* เชื้อตาย[10, 11] ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ จำนวน 3 ตัว และแบบไม่แสดงอาการ จำนวน 3 ตัว และได้รับน้ำเกลือเพื่อเป็นกลุ่มควบคุมจำนวน 3 ตัว ในวันที่ 0 1 14 28 และ 35 ของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้ลูกโคที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านกระบวนการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง เลขที่ 0931002 จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เตรียมตัวอย่างน้ำนมให้เป็นหางนม (whey) และตัวอย่างเลือดให้เป็นซีรั่ม[12, 13] และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างหางนม และตัวอย่างซีรั่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบระดับของอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ในตัวอย่างน้ำนมและซีรั่มด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [10, 11, 14] ตัวอย่างน้ำนม และซีรั่มที่ให้ค่าการเปลี่ยนแปลงของระดับอิมมูโนโกลบูลินจีมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 เท่า ถือว่าตัวอย่างนั้นให้ผลบวกแล้วจึงนำตัวอย่างนั้นไปตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิลต่อไป

**การแยกนิวโทรฟิล**

เก็บตัวอย่างเลือดในโคสาวที่มีสุขภาพดีที่หลอดเลือดดำที่คอ (jugular vein) ปริมาตร 50 มล. ลงในหลอดเก็บเลือดที่มีสาร Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำมาตรวจแยกนิวโทรฟิล[10] และเตรียมสารละลายที่มีจำนวนนิวโทรฟิลใน PBS ในระดับความเข้มข้น 107 เซลล์ต่อมล.

**การตรวจสอบการทำงานของนิวโทรฟิล**

**การเก็บกินเชื้อ *S. uberis* (Phagocytosis activity)**

ศึกษาการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ที่ย้อมด้วยสารเรืองแสง fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma-Aldrich, U.S.A.) ของนิวโทรฟิล โดยเตรียมสารละลายที่มีเชื้อ *S. uberis* ระดับความเข้มข้น $10^6$ cfu ต่อมล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นผสมสารละลายเชื้อ *S. uberis* กับตัวอย่างน้ำนมหรือตัวอย่างซีรั่มใน

อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายที่มีจำนวนนิวโทรฟิลระดับความเข้มข้น $10^7$ เซลล์ต่อมล.ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไป ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีตัวอย่างควบคุมเป็นน้ำนม UHT และ fetal bovine serum จากนั้นตรวจวัดตัวอย่างด้วยเครื่อง FACSCalibur® flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA) ผลการตรวจแสดงเป็นค่ามัธยฐานของความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไปของนิวโทรฟิลที่เก็บกินเชื้อ (median fluorescence intensity; MFI)

**การหาเปอร์เซ็นต์การทำลายของเชื้อ *S. uberis* (Killing ability)**

ศึกษาการทำลายเชื้อ *S. uberis* ของนิวโทรฟิล โดยการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (bacteria count) [10] ดังนี้ ผสมสารละลายที่มีเชื้อ *S. uberis* ระดับความเข้มข้น $10^6$ cfu ต่อมล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นผสมสารละลายเชื้อ *S. uberis* กับตัวอย่างน้ำนมหรือตัวอย่างซีรั่มในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรเข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายที่มีจำนวนนิวโทรฟิลระดับความเข้มข้น $10^7$ เซลล์ต่อมล. ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไป ทิ้งไว้ 90 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีตัวอย่างควบคุมเป็นน้ำนม UHT และ fetal bovine serum จากนั้นตรวจนับเชื้อ *S. uberis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเชื้อ *S. uberis* ที่ถูกนิวโทรฟิลทำลายไป (% killing ability) ดังนี้

$$\% \text{ killing ability} = \frac{[\text{จำนวนเชื้อตั้งต้น} - \text{จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต}] \times 100}{\text{จำนวนเชื้อตั้งต้น}}$$

**การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

วิเคราะห์ความแตกต่างของค่ามัธยฐานของความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไปของนิวโทรฟิลที่เก็บกินเชื้อ และค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเชื้อ *S. uberis* ที่ถูกนิวโทรฟิลทำลายไป (% killing) ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติ และ hyperimmune serum ของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม Statistix® version 8.0 กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $p<0.05$

**ผลการศึกษา**

ความสามารถในการเก็บกินและทำลายเชื้อ *S. uberis* ของนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 พบว่านิวโทรฟิลมีความสามารถในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจากซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมแตกต่างจากซีรั่มของแม่โคที่มีเต้านมปกติ และน้ำนมของแม่โคทั้ง 2 กลุ่ม ($p<0.05$) และความสามารถในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการของนิวโทรฟิลมีความแตกต่างกันภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจากซีรั่มของแม่โคทั้ง 2 กลุ่มกับน้ำนมของแม่โคทั้ง 2 กลุ่ม ($p<0.05$)

อย่างไรก็ดีความสามารถในการทำลายเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการของนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจากน้ำนมของแม่โคทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างจากซีรั่มของแม่โคทั้ง 2 กลุ่ม ($p<0.05$) ในขณะที่ความสามารถในการทำลายเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการของนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจากน้ำนมจากเต้านมที่ติดเชื้อ *S. uberis* และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมมีความแตกต่างจากน้ำนมของแม่โคที่มีเต้านมปกติ ($p<0.05$)

ความสามารถในการเก็บกินเชื้อ และทำลายเชื้อ *S. uberis* ของนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ และแบบไม่แสดงอาการดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4 พบว่านิวโทรฟิลมีความสามารถในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการภายใต้สภาวะที่มี อิมมูโนโกลบูลินจีจาก hyperimmune serum ที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการได้แตกต่างจากการได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและการได้รับน้ำเกลือของวันที่ 28 ของการกระตุ้น ($p<0.05$)

แต่พบความสามารถของนิวโทรฟิลในการทำลายเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากซีรั่มของกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือมีความแตกต่างจากกลุ่ม hyperimmune serum ที่ได้รับการกระตุ้นในวันที่ 28 ด้วยเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ($p<0.05$) ในขณะที่พบความสามารถของนิวโทรฟิลในการทำลายเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการเท่านั้นภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีจากซีรั่มของกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือแตกต่างจาก hyperimmune serum ที่ได้รับการกระตุ้นในวันที่ 28 ด้วยเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ($p<0.05$)

**ตารางที่ 1** ความสามารถของนิวโทรฟิลในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติด้วยวิธี Flow cytometry

| แหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจี | | | ความสามารถในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบ | |
|---|---|---|---|---|
| | | | แบบไม่แสดงอาการ* | แบบแสดงอาการ* |
| น้ำนม | 1. แม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม | เต้าที่มีการติดเชื้อ | 46.52 ± 16.459[c] | 55.45 ± 44.815[b] |
| | | เต้าที่ไม่ติดเชื้อ | 48.32 ± 13.672[c] | 47.41 ± 21.081[b] |
| | 2. แม่โคที่มีเต้านมปกติ | เต้าที่ไม่ติดเชื้อ | 55.61 ± 11.834[c] | 61.69 ± 24.654[b] |
| ซีรั่ม | 1. แม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม | | 172.33 ± 32.944[a] | 217.87 ± 41.516[a] |
| | 2. แม่โคที่มีเต้านมปกติ | | 121.46 ± 24.388[b] | 241.43 ± 24.860[a] |

[a b c] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญระหว่างแหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจี ($p<0.05$)

* ความสามารถในการเก็บกินเชื้อแสดงผลเป็นค่ามัธยฐานของความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไปของนิวโทรฟิลที่เก็บกินเชื้อ (median fluorescence intensity; MFI) (mean±SEM)

**ตารางที่** 2 ความสามารถของนิวโทรฟิลในการทำลายเชื้อ *S. uberis* ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และแม่โคที่มีเต้านมปกติด้วยวิธี plate count

| แหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจี | | | ความสามารถในการทำลายเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบ | |
|---|---|---|---|---|
| | | | แบบไม่แสดงอาการ** | แบบแสดงอาการ** |
| น้ำนม | 1. แม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม | เต้าที่มีการติดเชื้อ | 98.02 ± 1.096[a] | 61.95 ± 32.815[a] |
| | | เต้าที่ไม่ติดเชื้อ | 98.12 ± 0.707[a] | 41.51 ± 33.810[ab] |
| | 2. แม่โคที่มีเต้านมปกติ | เต้าที่ไม่ติดเชื้อ | 98.00 ± 0.840[a] | 5.56 ± 9.580[b] |
| ซีรั่ม | 1. แม่โคที่ติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม | | 34.34 ± 10.172[c] | 28.89 ± 26.396[a] |
| | 2. แม่โคที่มีเต้านมปกติ | | 47.81 ± 10.882[b] | 53.30 ± 24.579[ab] |

[a b c] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญระหว่างแหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจี ($p<0.05$)

** ความสามารถในการทำลายเชื้อแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเชื้อ S. uberis ที่ถูกนิวโทรฟิลทำลายไป (% killing ability)

**ตารางที่** 3 ความสามารถของนิวโทรฟิลในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และแบบแสดงอาการด้วยวิธี Flow cytometry

| แหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจี | | ความสามารถในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบ | |
|---|---|---|---|
| กลุ่มลูกโคที่กระตุ้นด้วย | วันที่ได้รับการกระตุ้น | แบบไม่แสดงอาการ | แบบแสดงอาการ |
| เชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านม | 0 | 10.78 ± 1.492[a 1] | 14.26 ± 1.666 |
| อักเสบแบบไม่แสดงอาการ | 28 | 30.95 ± 4.538[A 2] | 12.90 ± 1.513 |
| เชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านม | 0 | 9.82 ± 0.614[ab] | 22.97 ± 6.903 |
| อักเสบแบบแสดงอาการ | 28 | 17.96 ± 4.309[B] | 39.15 ± 28.898 |
| น้ำเกลือ | 0 | 6.80 ± 1.812[b] | 14.17 ± 0.687 |
| | 28 | 6.29 ± 2.105[B] | 15.25 ± 0.260 |

[a b] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มลูกโคในวันที่ 0 ($p<0.05$)

[A B] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มลูกโคในวันที่ 28 ($p<0.05$)

[1 2] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญระหว่างวันที่ได้รับการกระตุ้น ($p<0.05$)

* ความสามารถในการเก็บกินเชื้อแสดงผลเป็นค่ามัธยฐานของความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไปของนิวโทรฟิลที่เก็บกินเชื้อ (median fluorescence intensity; MFI) (mean±SEM)

**ตารางที่ 4** ความสามารถของนิวโทรฟิลในการทำลายเชื้อ *S. uberis* ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และแบบแสดงอาการด้วยวิธี plate count

| แหล่งของอิมมูโนโกลบูลินจี | | ความสามารถในการทำลายเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบ | |
|---|---|---|---|
| **กลุ่มลูกโคที่กระตุ้นด้วย** | **วันที่ได้รับการกระตุ้น** | **แบบไม่แสดงอาการ** | **แบบแสดงอาการ** |
| เชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านม | 0 | 26.58 ± 28.497 | 83.07 ± 7.365 |
| อักเสบแบบไม่แสดงอาการ | 28 | 29.72 ± 2.459[b] | 84.68 ± 11.761[ab] |
| เชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านม | 0 | 34.58 ± 36.084 | 64.18 ± 24.286 |
| อักเสบแบบแสดงอาการ | 28 | 32.17 ± 13.592[b] | 63.66 ± 9.990[b] |
| น้ำเกลือ | 0 | 67.67 ± 1.450 | 92.87 ± 3.708 |
| | 28 | 61.06 ± 13.090[a] | 92.13 ± 2.524[a] |

[a b] อักษรต่างแสดงความมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มลูกโคในวันที่ 28 ($p<0.05$)

** ความสามารถในการทำลายเชื้อแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเชื้อ *S. uberis* ที่ถูกนิวโทรฟิลทำลายไป (% killing ability)

**บทวิจารณ์**

อิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมสามารถทำให้นิวโทรฟิลทำลายเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ได้อาจเป็นเพราะในน้ำนมมีปริมาณอิมมูโนโกลบูลินจีที่ต่ำอยู่แล้ว[15] จึงทำให้มีอิมมูโนโกลบูลินจีไม่เพียงพอในการจับกับเชื้อ *S. uberis* แล้วให้นิวโทรฟิลเก็บกินได้ และการทำลายเชื้อโดย complement ในน้ำนมไม่สามารถเกิดขึ้นได้ในการศึกษานี้ เนื่องจากในตัวอย่างน้ำนมได้มีการทำลาย complement ด้วยความร้อนแล้ว ดังนั้นจึงน่าจะมีปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่งในองค์ประกอบของน้ำนมที่ส่งเสริมการทำลายเชื้อ *S. uberis* ได้เองโดยไม่ต้องอาศัยกระบวนการเก็บกิน และทำลายเชื้อโดยนิวโทรฟิล ดังการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อ *S. uberis* ที่เจริญในห้องปฏิบัติการถูกยับยั้งโดย lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system[16] ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาที่พบว่า lactoperoxidase ในน้ำนมไม่มีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. uberis* เนื่องจาก lactoperoxidase ต้องอาศัย hydrogen peroxide และ thiocyanate ในการเป็น cofactor เพื่อผลิต oxidizing hypothiocyanate ในการกำจัดเชื้อ ซึ่งในน้ำนมไม่มี thiocyanate และhydrogen peroxideเพียงพอ[17, 18] หรือการยับยั้งการเจริญของเชื้ออาจเกี่ยวกับการขาดสารที่จำเป็นต่อการเปลี่ยน plasminogen ไปเป็น plasmin[19] นอกจากนี้มีการศึกษาที่พบว่าในน้ำนมที่ได้จากเต้านมอักเสบมี immune complex ที่สามารถจับกับส่วน Fc receptor ของเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนมได้ส่งผลทำให้การเก็บกิน *S. aureus* โดยผ่านการจับกับ Fc receptor ของนิวโทรฟิลลดลง[20]

อิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมสามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลมีความสามารถในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลทำลายเชื้อทั้ง

2 สายพันธุ์ได้ โดยปกติแล้วระดับอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มจะมีมากกว่าในน้ำนม[15] ดังนั้นการที่นิวโทรฟิลสามารถเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ได้นั้นอาจเป็นเพราะการมีอิมมูโนโกลบูลินจีในปริมาณสูงอยู่แล้ว จึงสามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อได้ดีมากขึ้น และเมื่อนิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อได้แล้วแต่เชื้อ *S. uberis* นั้นสามารถคงอยู่ภายในเซลล์ของนิวโทรฟิลได้โดยไม่ถูกทำลายไปจึงทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ในเต้านมได้นาน และเป็นเหตุผลของการพัฒนาเป็นเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง[6, 21]

อิมมูโนโกลบูลินจีในซีรั่มของแม่โคที่มีเต้านมปกติสามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลมีความสามารถในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลทำลายเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ได้เป็นไปได้ว่าแม่โคอาจเคยมีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมมาก่อนหน้านี้และมีการสร้างอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะกับเชื้อ *S. uberis*ในการศึกษาครั้งนี้การกระตุ้นลูกโคด้วยเชื้อ *S. uberis* ชนิดเชื้อตายที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและแบบไม่แสดงอาการกลับพบว่าไม่สามารถทำให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการได้ ยกเว้นเชื้อที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และอิมมูโนโกลบูลินจีของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ไม่สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลทำลายเชื้อได้เลยอาจเป็นเพราะการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* ในครั้งนี้จำนวนครั้งของการกระตุ้นน้อยเกินไปจึงไม่สามารถทำให้ร่างกายสามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ได้เพียงพอในการช่วยนิวโทรฟิลให้เก็บกินเชื้อ *S. uberis* ได้ และการได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* ชนิดเชื้อตายในครั้งนี้อาจไม่สามารถให้การป้องกันการติดเชื้อ *S. uberis* ได้แม้แต่การฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อตายแก่แม่โคถึง 10 ครั้ง สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง $IgG_2$ จับกับเชื้อ *S. uberis* ทั้งสายพันธุ์ที่ทนต่อการเก็บกิน และไวต่อการเก็บกินของนิวโทรฟิลได้ แต่ก็ยังไม่สามารถกระตุ้นให้นิวโทรฟิลทำลายเชื้อได้เช่นกัน[10] ซึ่ง $IgG_2$ มีบทบาทสำคัญในการจับกับเชื้อเพื่อให้นิวโทรฟิลเก็บกินได้[22] ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการตรวจแยกชนิดของอิมมูโนโกลบูลินจีจึงเป็นไปได้ว่าชนิดของอิมมูโนโกลบูลินจีมีผลต่อประสิทธิภาพการเก็บกินเชื้อและทำลายเชื้อของนิวโทรฟิล ในการเลือกลูกโคเพื่อผลิต hyperimmune serum ที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* แทนที่จะเป็นแม่โคของการศึกษานี้เนื่องจากลูกโคยังไม่เคยสัมผัสกับเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านมมาก่อน จึงไม่มีการสร้างอิมมูโนโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* ได้ แม้ว่าลูกโคจะมีความสามารถในการสร้างการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะซึ่งก็คือ การสร้างอิมมูโนโกลบูลินจีได้น้อยกว่าแม่โค[23] อิมมูโนโกลบูลินจีสามารถส่งเสริมให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการได้เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่นิวโทรฟิลเองก็ไม่สามารถเก็บกิน และทำลายเชื้อ *S. uberis* ที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการได้ นอกจากนี้ซีรั่มของกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือสามารถทำให้เชื้อ *S. uberis* ถูกทำลายได้ จึงน่าจะมีสภาวะบางอย่างในซีรั่มที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อ *S. uberis* ถูกทำลายไปได้โดยไม่ต้องอาศัยอิมมูโนโกลบูลินจีที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. uberis* และนิวโทรฟิลในการทำลายเชื้อได้[21]

อย่างไรก็ดีสภาวะที่เหมาะสมต่อการศึกษาการเก็บกินของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกายเมื่อเปรียบเทียบกับ

การศึกษาครั้งนี้พบว่ามีสภาวะบางอย่างมีความแตกต่างกัน [24] ดังการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการศึกษาการเก็บกินของนิวโทรฟิลภายนอกร่างกาย คือ จำนวน bead ต่อจำนวนนิวโทรฟิล เท่ากับ 20 ต่อ 1 ระยะเวลาในการบ่มเท่ากับ 30 นาที และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเท่ากับ 38.5 องศาเซลเซียส[24] แต่ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน FITC-labeled *S. uberis* ต่อจำนวนนิวโทรฟิลเท่ากับ 1 ต่อ 20 และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้อาจมีผลต่อความสามารถของนิวโทรฟิลในการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ได้ นอกจากนี้ EDTA ที่ใช้เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดในการเก็บเลือดเพื่อแยกนิวโทรฟิลในการศึกษาครั้งนี้สามารถยับยั้งการเก็บกินเชื้อของนิวโทรฟิลได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์[24] และการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการตรวจยืนยันการเก็บกินเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และในขั้นตอนการศึกษาการทำงานของนิวโทรฟิลทั้งการเก็บกิน และทำลายเชื้อที่ใช้ตัวอย่างเดียวกัน เวลาในการศึกษาเวลาเดียวกัน และอยู่สภาวะแวดล้อมเดียวกัน แต่ก็เป็นวิธีการศึกษาที่มีหลักการในการตรวจวัดที่แตกต่างกัน โดยวิธีการศึกษาการเก็บกินเชื้อใช้วิธีการย้อมสี FITC กับเชื้อ *S. uberis* แล้วตรวจวัดความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงไป แต่วิธีการศึกษาการทำลายเชื้อใช้การตรวจนับจำนวนเชื้อ *S. uberis* ที่รอดชีวิต ดังนั้นผลการศึกษาของการเก็บกินและการทำลายเชื้อของนิวโทรฟิลจึงไม่สามารถเชื่อมโยงผลการศึกษาได้ถูกต้องตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ นอกจากนี้องค์ประกอบใดๆไม่ว่าจะเป็นอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมและซีรั่มหรือปัจจัยใด ๆ ในน้ำนมก็ตามของแม่โคที่มีเต้านมปกติสามารถส่งเสริมให้นิวโทรฟิลเก็บกินเชื้อ และทำลายเชื้อ *S. uberis* ได้

**สรุป**

การศึกษาพบว่านิวโทรฟิลสามารถถูกกระตุ้นให้มีการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* ได้ในสภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และ hyperimmune serum ที่ผลิตจากลูกโค แต่ไม่พบอิมมูโนโกลบูลินจีในน้ำนมช่วยกระตุ้นการเก็บกินเชื้อ *S. uberis* เมื่อพิจารณาถึงความสามารถของนิวโทรฟิลในการเก็บกิน และทำลายเชื้อ *S uberis* ภายใต้สภาวะที่มีอิมมูโนโกลบูลินจีที่ได้จากน้ำนม และซีรั่มของแม่โคที่มีการติดเชื้อ *S. uberis* เข้าเต้านม และ hyperimmune serum ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. uberis* ไม่สามารถส่งเสริมให้นิวโทรฟิลมีการเก็บกินและทำลายเชื้อ *S. uberis* ทั้งที่แยกได้จากเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและแบบไม่แสดงอาการได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการป้องกันปัญหาเต้านมอักเสบเรื้อรังจากการติดเชื้อ *S. uberis* ในฟาร์มด้วยการส่งเสริมการทำงานของนิวโทรฟิลด้วยอิมมูโนโกลบูลินจีเพียงอย่างเดียวจึงยังไม่สามารถสรุปได้

**คำขอบคุณ**

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นผู้ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ประจำปีการศึกษา 2549 และทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีการศึกษา 2551ที่สนับสนุนงบประมาณในงานวิจัยชิ้นนี้

**เอกสารอ้างอิง**


1. ชัยเทพ พูลเขตต์, จตุรงค์ วงษ์สนิท, ธีระ รักความสุข. ปัญหาสุขภาพของโคนมที่เลี้ยงในฟาร์มรายย่อยในเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ระหว่างตุลาคม 2542 ถึงกันยายน 2543. ใน: การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาสัตว์ สาขาสัตวแพทยศาสตร์ สาขาประมง 5-7 กุมภาพันธ์ 2544. กรุงเทพ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544: 376-380.
2. Lightner JK, Miller GY, Hueston WD, Dorn CR. Estimation of the costs of mastitis, using national animal health monitoring system and milk somatic cell count data. J Am Vet Med Assoc 1988; 192: 1410-3.
3. Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcon JJ, Cajero-Juarez M, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE, Bravo-Patino A, Baizabal-Aguirre VM. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. J Infect 2007; 54: 399-409.
4. Leigh JA. Streptococcus uberis: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? Vet J 1999;157: 225-38.
5. กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร ,สุกุมา สามงามนิ่ม. การระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลมและให้ผลลบต่อการทดสอบ catalase ซึ่งแยกได้จากการติดเชื้อเต้านมของโคนม. ใน: การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30 10-12 พฤศจิกายน 2547. กรุงเทพ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547: 52-59.
6. Phuektes P, Mansell PD, Dyson RS, Hooper ND, Dick JS, Browning GF. Molecular epidemiology of Streptococcus uberis isolates from dairy cows with mastitis. J Clin Microbiol 2001; 39: 1460-6.
7. Guidry AJ, Berning LM, Hambleton CN. Opsonization of Staphylococcus aureus by bovine immunoglobulin isotypes. J Dairy Sci 1993; 76: 1285-9.
8. Newbould FHS. Some effects of the source of bovine milk leukocytes and strain of Staphylococcus on their interaction in vitro. Can J Comp Med Vet Sci 1967; 31: 303-8.
9. Jayarao BM, Gillespie BE, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver SP. Epidemiology of Streptococcus uberis intramammary infections in a dairy herd. J. Vet. Med. B 1999; 46: 433-42.
10. Leigh J.A, Field TR. Streptococcus uberis resists the bactericidal action of bovine neutrophils despite the presence of bound immunoglobulin. Infect Immun 1994; 62: 1854-9.
11. Finch JM, Hill AW, Field TR, Leigh JA. Local vaccination with killed Streptococcus uberis protects the bovine mammary gland against experimental intramammary challenge with the homologous strain. Infect. Immun. 1994; 62: 3599-603.
12. Grant RG, Finch JM. Phagocytosis of Streptococcus uberis by bovine mammary gland macrophages. Res Vet Sci 1996; 62: 74-8.
13. Guidry AJ, Paape MJ, Pearson RE. Quarter milk variation in immunoglobulins and ability to support phagocytosis. J Dairy Sci 1980; 63: 611-5.
14. Hill AW, Finch JM, Field TR, Leigh JA. Immune modification of the pathogenesis of Streptococcus uberis mastitis in the dairy cow. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1994. 8: 109-18.
15. Farrell HMJr, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks C L, Hollar C M, Ng-Kwai-Hang KF, Swaisgood HE. Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. J Dairy Sci 2004; 87: 1665. Cited in Butler JE, Kehrli MEJr. Immunocytes and immunoglobulins in milk. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, editors. Mucosal Immunology. New York: Academic Press, 2004.
16. Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2002; 7: 135-46.
17. Fang W, Luther DA, Almeida RA, Oliver SP. Decreased growth of Streptococcus uberis in milk from mammary glands of cows challenged with the same mastitis pathogen. J Vet Med B 1998; 45: 539-49.