บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย

1. **ฟาร์มที่เก็บตัวอย่าง**

เป็นฟาร์มโคนมของเกษตรกรรายย่อยในจังหวัดเชียงใหม่ โดยคัดเลือกฟาร์มจากสหกรณ์โคนมแม่ออน จำกัด จำนวน 15 ฟาร์ม ให้เป็นตัวแทนของฟาร์มในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ในการเก็บตัวอย่างน้ำนมจากแม่โคเป็นรายตัวและทุกเต้าจากฟาร์มที่เก็บข้อมูล เก็บตัวอย่างฟาร์มละ 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 4 สัปดาห์ ตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึง กันยายน จากแม่โคนมทั้งหมด 100 ตัว จำนวน 1,598 ตัวอย่าง ฟาร์มที่ศึกษาครั้งนี้มีลักษณะสภาพของฟาร์มทั่วไปคล้ายคลึงกันดังนี้ คือ

- คอกอยู่ติดกับที่อยู่อาศัย มีการเลี้ยงสัตว์ปีกแบบปล่อยอิสระ
- วิธีการเลี้ยงใช้แบบผสม คือ ผูกยืนโรงและปล่อยลานดินในเวลากลางวันบางเวลาบริเวณคอกรีดนมเปียกชื้น และบริเวณลานดินเป็นที่ชื้นแฉะมีน้ำขัง ดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3

2. **เครื่องมือ**

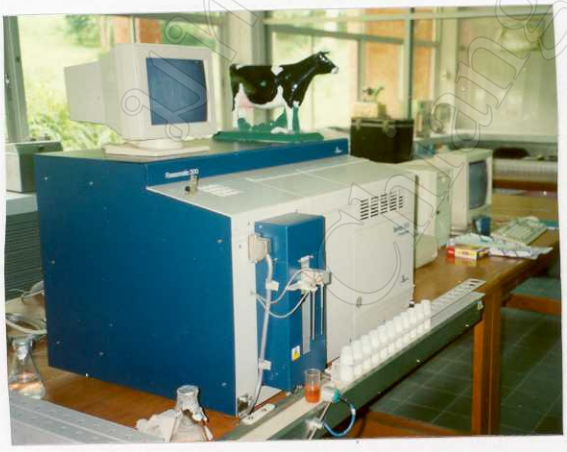
- เครื่อง Fossomatic รุ่น Series 300 สำหรับตรวจนับจำนวนโซมาติคเซลล์ในน้ำนม (ภาพที่ 4)
- เครื่อง Milko scan รุ่น Series 133 สำหรับตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนม (ภาพที่ 5)
- เครื่อง Water bath
- อุปกรณ์ในการเพาะเชื้อจุลินทรีย์และทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ
- ขวดใส่ตัวอย่างน้ำนม
- กระติกน้ำแข็ง
- ตู้แช่แข็ง
- สำลีและแอลกอฮอล์

3.สารเคมี

- สารถนอมคุณภาพน้ำนม (โปรแตสเซียมไดโครเมต : $K_2Cr_2O_7$)
- น้ำแข็ง
- อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้ Blood agar, MacConKey agar, Manital salt agar และ Mueller Hinton agar
- สารเคมีที่ใช้จำแนกชนิดจุลินทรีย์
- ยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบความไวของยาต่อเชื้อสาเหตุ คือ penicillin G, ampicillin, cloxacillin, oxytetracycline, tetracycline, streptomycin, gentamycin, erythromycin, kanamycin, sulfamethoxazole&trimethroprim, neomycin, lincomycin, furazolidone, vancomycin

ภาพที่ 2 สภาพคอกรีดนมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมรายย่อยในจังหวัดเชียงใหม่

ภาพที่ 3 สภาพคอกปล่อยลานของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมรายย่อยจังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 4 เครื่อง Fossomatic รุ่น Series 300

ภาพที่ 5 เครื่อง Milko scan รุ่น Series 133

วิธีการทดลอง

1. **การเก็บตัวอย่างน้ำนม**

เก็บตัวอย่างน้ำนมที่รีดจากแม่โคนมในฟาร์มที่เก็บข้อมูลช่วงตอนเย็น โดยล้างเต้านมให้สะอาดด้วยน้ำยาคลอรีนและเช็ดเต้านมให้แห้ง ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70% เช็ดปลายหัวนมและปล่อยให้แห้ง แล้วจึงรีดน้ำนมทิ้ง 2-3 ครั้ง (Foremilk) ก่อนเก็บจริง แล้วจึงรีดลงขวดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในลักษณะเอียง 45 องศากับพื้น เพื่อป้องกันสิ่งสกปรกตกลงไปในน้ำนม รีดเก็บตัวอย่างน้ำนมเต้าละ 2 ขวด พร้อมทั้งเขียนชื่อฟาร์ม หมายเลขโค และตำแหน่งเต้านมที่เก็บ

ขวดที่ 1 รีดเก็บน้ำนมประมาณ 30 มิลลิลิตร ภายในขวดใส่สารถนอมคุณภาพ (โปรแตสเซียมไดโครเมต)ในอัตราส่วน 1-2 มิลลิกรัมต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร เพื่อรักษาคุณภาพน้ำนมไม่ให้เสีย สำหรับการวิเคราะห์หาจำนวนโซมาติคเซลล์และองค์ประกอบทางเคมี

ขวดที่ 2 รีดเก็บน้ำนมประมาณ 10 มิลลิลิตร สำหรับนำไปเพาะหาเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบและทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ

หลังจากนั้นนำน้ำนมทั้ง 2 ขวด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5±1 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2. **การเก็บข้อมูล**

จดบันทึกข้อมูลพันธุ์ประวัติของแม่โคที่เก็บตัวอย่างน้ำนม โดยจัดแบ่งกลุ่มข้อมูลออกดังนี้

2.1. **เดือนในช่วงฤดูฝนที่เก็บตัวอย่างน้ำนม**

กลุ่มที่ 1 เดือนมิถุนายน

กลุ่มที่ 2 เดือนกรกฎาคม

กลุ่มที่ 3 เดือนสิงหาคม

กลุ่มที่ 4 เดือนกันยายน

2.2.**ระดับสายเลือดของพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน**

กลุ่มที่ 1 แม่โคนมที่มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 75

กลุ่มที่ 2 แม่โคนมที่มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน มากกว่าร้อยละ 75 ขึ้นไป

2.3. **ลำดับของการให้นม**

กลุ่มที่ 1 แม่โคที่มีลำดับของการให้นม ครั้งที่ 1-3

กลุ่มที่ 2 แม่โคที่มีลำดับของการให้นม ครั้งที่ 4-6

กลุ่มที่ 3 แม่โคที่มีลำดับของการให้นม ครั้งที่ 7 เป็นต้นไป

2.4. **ช่วงเวลาของการให้น้ำนม**

กลุ่มที่ 1 แม่โคที่มีช่วงเวลาของการให้น้ำนม เดือนที่ 1 - 3

กลุ่มที่ 2 แม่โคที่มีช่วงเวลาของการให้น้ำนม เดือนที่ 4 - 6

กลุ่มที่ 3 แม่โคที่มีช่วงเวลาของการให้น้ำนม เดือนที่ 7 - 9

กลุ่มที่ 4 แม่โคที่มีช่วงเวลาของการให้น้ำนม เดือนที่ 10 เป็นต้นไป

2.5. **วิธีการรีดนม**

กลุ่มที่ 1 รีดนมด้วยมือ

กลุ่มที่ 2 รีดนมด้วยเครื่องรีดนม

2.6. **ตำแหน่งเต้านม**

กลุ่มที่ 1 เต้าหน้าขวา

กลุ่มที่ 2 เต้าหน้าซ้าย

กลุ่มที่ 3 เต้าหลังขวา

กลุ่มที่ 4 เต้าหลังซ้าย

2.7. **ลักษณะรูปทรงของหัวนม** ดังแสดงในภาพที่ 6

กลุ่มที่ 1 ลักษณะหัวนมทรงกระบอก

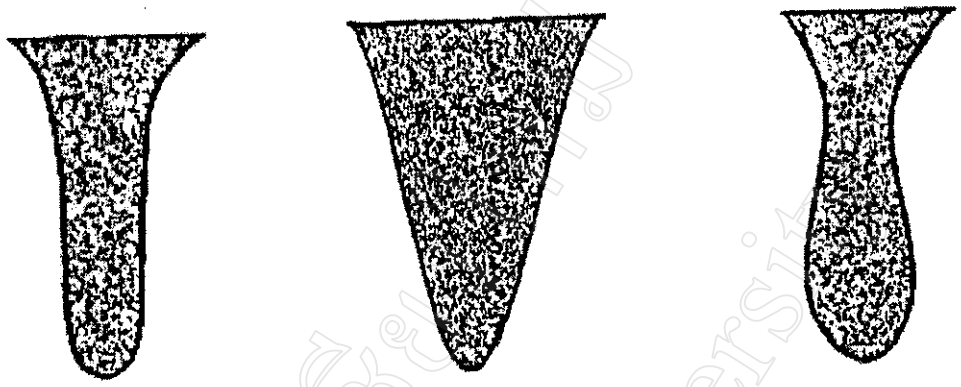
กลุ่มที่ 2 ลักษณะหัวนมทรงกรวย

กลุ่มที่ 3 ลักษณะหัวนมทรงขวด

2.8. **ลักษณะภายนอกของปลายหัวนม** ดังแสดงในภาพที่ 7

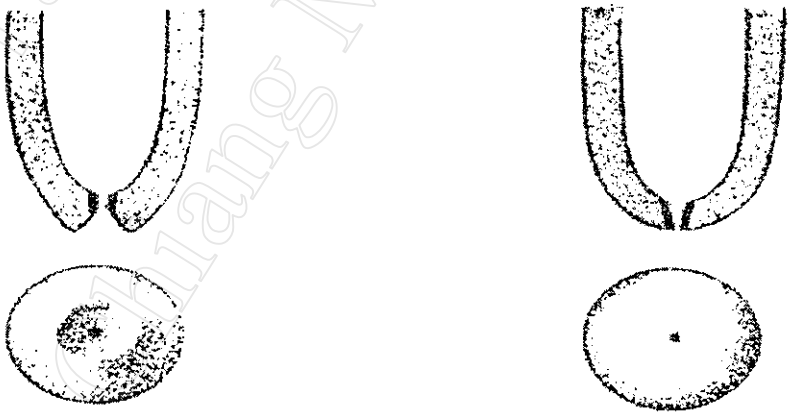
กลุ่มที่ 1 ลักษณะปลายหัวนมบุ๋ม

กลุ่มที่ 2 ลักษณะปลายหัวนมนูน



หัวนมทรงกระบอก หัวนมทรงกรวย หัวนมทรงขวด

ภาพที่ 6. ลักษณะรูปทรงของหัวนม



ปลายหัวนมบุ๋ม ปลายหัวนมนูน

ภาพที่ 7. ลักษณะภายนอกของปลายหัวนม

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและทางจุลินทรีย์

3.1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำนม

นำขวดใส่ตัวอย่างน้ำนมแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าขวดเพื่อผสมตัวอย่างน้ำนมให้เข้ากัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำนมด้วยเครื่อง Milko scan

3.2. การนับจำนวนโซมาติคเซลล์ในน้ำนม (Somatic cell count)

นำน้ำนมมาตรวจนับจำนวนโซมาติคเซลล์ด้วยเครื่อง Fossomatic โดยมีการแบ่งเกณฑ์สุขภาพของเต้านมตามระดับจำนวนโซมาติคเซลล์ในน้ำนมออกเป็นดังนี้ คือ (ธีรพงษ์, 2538)

จำนวนโซมาติคเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	สุขภาพของเต้านม
0–250,000	เต้านมปกติ
มากกว่า 250,000-1,000,000	เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ
มากกว่า 1,000,000	เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ

3.3. การหาเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ

นำน้ำนมที่ตรวจด้วยเครื่อง Fossomatic และมีปริมาณจำนวนโซมาติคเซลล์ในน้ำนมมากกว่า 500,000 เซลล์/มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค ตามคำแนะนำของศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคเหนือ (ติดต่อส่วนตัว) โดยใช้ Blood agar และ MacConKey agar อ่านผลและจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยวิธี Biochemical test ตามหลักการของ National Mastitis Council (1987) รายละเอียดดูได้จากภาคผนวก ก

3.4. การทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบมาทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพ คือ penicillin G, ampicillin, cloxacillin, oxytetracycline, tetracycline, streptomycin, gentamycin, erythromycin, kanamycin, sulfamethoxazole&trimethroprim, neomycin, lincomycin, furazolidone และ vancomycin โดยวิธี Kirby-Bauer Method (นันทนา, 2537) วิธีการอ่านผลทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อสาเหตุดูได้จากภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การศึกษาสถานการณ์ของโรคเต้านมอักเสบในช่วงฤดูฝน

เสนอผลของอุบัติการณ์ของโรคเต้านมอักเสบเป็นร้อยละของจำนวนเต้านมที่ปกติ เต้านมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ

2. อิทธิพลของเดือน ระดับสายเลือดพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน ลำดับของการให้นม ช่วงเวลาของการให้น้ำนม วิธีรีดนม ตำแหน่งเต้านม ลักษณะรูปทรงของหัวนม ลักษณะภายนอกของปลายหัวนม ที่มีผลต่อการเกิดโรคเต้านมอักเสบในช่วงฤดูฝน โดยใช้จำนวนโซมาติคเซลล์ในน้ำนมเป็นเครื่องบ่งชี้

นำข้อมูลของจำนวนโซมาติคเซลล์ในน้ำนมมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) เนื่องจากข้อมูลจำนวนโซมาติคเซลล์ในน้ำนมแจกแจงแบบไม่ปกติ จึงต้องแปลงเป็นค่าลอการิทึม (Logarithmic transformation : log) (จรัญ, 2534) โดยกำหนดอิทธิพลของ ปัจจัยเดือน ปัจจัยระดับสายเลือดพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน ปัจจัยลำดับของการให้นม ปัจจัยช่วงเวลาการให้นม ปัจจัยวิธีรีดนม ปัจจัยตำแหน่งเต้านม ปัจจัยลักษณะรูปทรงของหัวนม ปัจจัยลักษณะภายนอกของปลายหัวนม ที่มีผลต่อการเกิดโรคเต้านมอักเสบในช่วงฤดูฝนโดยใช้จำนวนโซมาติคเซลล์ในน้ำนมเป็นเครื่องบ่งชี้ หากพบว่าปัจจัยใดทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ให้เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระดับปัจจัยด้วยวิธี Duncan's New Mutiple Range Test และนำเสนอผลของอุบัติการณ์ของโรคเต้านมอักเสบเนื่องจากแต่ละปัจจัยด้วยค่าสถิติไค-สแควร์ (Chi-square test)

3. อิทธิพลของจำนวนโซมาติคเซลล์ที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำนมในช่วงฤดูฝน

3.1. นำข้อมูลขององค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำนม ได้แก่ ไขมัน โปรตีน น้ำตาลแลคโตส ของแข็งทั้งหมด ของแข็งไม่รวมไขมัน มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยกำหนดอิทธิพลของปัจจัยจำนวนโซมาติคเซลล์ หากพบว่าปัจจัยใดทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ให้เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระดับปัจจัยด้วยวิธี Duncan's New Mutiple Range Test

3.2. วิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำนม กับจำนวนโซมาติคเซลล์ และวิเคราะห์สัมประสิทธิ์รีเกรซชันแบบเส้นตรง แล้วสร้างสมการรีเกรซชันแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปร (Seedecor and Cochran,1980)

4.เชื้อสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ

หาความถี่ของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ คิดเป็นร้อยละของเชื้อสาเหตุที่เป็นโรค

5.ความไวของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อสาเหตุ

คิดเป็นร้อยละของความไวต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาของเชื้อแต่ละชนิด

6.วิธีการควบคุมและป้องกันโรคเต้านมอักเสบของเกษตรกร

คิดเป็นร้อยละของวิธีการควบคุมและป้องกันโรคเต้านมอักเสบของเกษตรกร

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS) ตามที่แนะนำโดย มนต์ชัย (2537)

สถานที่ทำการทดลอง

- ฟาร์มโคนมของเกษตรกรสหกรณ์โคนมแม่ออน จำกัด จังหวัดเชียงใหม่
- ห้องปฏิบัติการหน่วยผลิตภัณฑ์สัตว์เชียงใหม่ กรมปศุสัตว์ จังหวัดเชียงใหม่
- ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและฝันสูตรโรคสัตว์ภาคเหนือ อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง

ระยะเวลาทำการทดลอง

ตั้งแต่เดือน มิถุนายน ถึง กันยายน 2543

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University