รายงานการวิจัย

ความสัมพันธ์ของวงรอบการเป็นสัดกับเชื้อแบคทีเรียที่พบในระบบสืบพันธุ์สุกรเพศเมีย

The relationship between stage of estrous cycle and bacterial isolation from porcine reproductive tract

เมธาสุ จันทร์รอด Metasu Chanrot

คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบวิจัยทุนรายได้ประจำปี พ.ศ. 2563

รายงานการวิจัย

ความสัมพันธ์ของวงรอบการเป็นสัดกับเชื้อแบคทีเรียที่พบในระบบสืบพันธุ์สุกรเพศเมีย

The relationship between stage of estrous cycle and bacterial isolation from porcine reproductive tract

เมธาสุ จันทร์รอด Metasu Chanrot

คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบวิจัยทุนรายได้ประจำปี พ.ศ. 2563

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “ความสัมพันธ์ของวงรอบการเป็นสัดกับเชื้อแบคทีเรียที่พบในระบบสืบพันธุ์สุกรเพศเมีย” ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 ระยะการทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2562 – กันยายน 2563 เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ในการประเมินความเป็นไปได้ในการตรวจวงรอบการเป็นสัดด้วยวิธีทางเซลล์วิทยา (vaginal cytology) และสำรวจความชุกของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบในระบบสืบพันธุ์เพศเมียเพื่อหาแนวทางในการป้องกันและลดการปัญหาในระบบสืบพันธุ์ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย หากสัตว์มีสุขภาพของระบบสืบพันธุ์ที่ดีสามารถเพิ่มผลผลิตภายในฟาร์มได้ ก่อให้เกิดประโยชน์แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงสุกร ตลอดจนลการวิจัยสามารถใช้เป็นแนวทางส่งเสริมให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ทางการสัตวแพทย์ในแง่ของการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในระบบสืบพันธุ์ได้อย่างเหมาะสม

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่ได้ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่สนับสนุนที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณนักศึกษาสัตวแพทย์ภาคินี สุทธิสังข์ นักศึกษาชั้นปีที่ 6 นางสาวสุภาพร หนูชู นางสาวสุภาพร กาญจนศิราธิป และนางสาวสุภาภรณ์ กลิ่นแก้ว เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและบุคลากรคณะที่ให้การช่วยเหลืออำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดมา ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่างได้ด้วยดี ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

เมธาสุ จันทร์รอด

กันยายน 2564

ความสัมพันธ์ของวงรอบการเป็นสัดกับเชื้อแบคทีเรียที่พบในระบบสืบพันธุ์สุกรเพศเมีย

เมธาสุ จันทร์รอด[1]

บทคัดย่อ

สุกรเป็นสัตว์ที่นิยมเลี้ยงเพื่อการบริโภคทั่วประเทศและทั่วโลก ซึ่งแม่พันธุ์สุกรถือว่ามีความสำคัญในการเพิ่มผลผลิตโดยเฉพาะระบบสืบพันธุ์เป็นระบบที่มีส่วนในการเพิ่มผลผลิตเป็นหลัก สุขภาพของระบบสืบพันธุ์เป็นสิ่งที่จำเป็นที่ต้องตรวจสอบดูแลและรักษาอย่างต่อเนื่อง ปัญหาระบบสืบพันธุ์สุกรเพศเมียที่พบได้บ่อยและส่งผลกระทบต่อผลผลิตภายในฟาร์ม ได้แก่ การไม่เป็นสัด การผสมไม่ติด กลับสัดช้า แท้ง มดลูกอักเสบ เป็นต้น สาเหตุที่พบมากของปัญหาในระบบสืบพันธุ์สุกรคือการติดเชื้อแบคทีเรีย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจเชื้อแบคทีเรียในระบบสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมียในช่วงระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัด เพื่อเป็นแนวทางในการเฝ้าระวัง และป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียในระบบสืบพันธุ์ในแต่ละช่วงวงรอบการเป็นสัด โดยสวอปเซลล์เยื่อบุช่องคลอดแม่สุกรเพื่อระบุชนิดของเซลล์ในระยะต่างๆ ของการเป็นสัด และสวอปเชื้อจากช่องคลอดนำมาเพาะแยกชนิดของแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการจำนวน 100 ตัวอย่าง จากการทดลองพบว่าในวงรอบการเป็นสัดของสุกร พบแบคทีเรียในระบบสืบพันธุ์จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis, Shigella flexnerri, Shigella flexnerri, Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis และ Citrobacter freundii* เป็นแกรมลบมากกว่าแกรมบวก ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง คิดเป็น 88.2 % (มากที่สุด) ซึ่งระยะ Diestrus พบเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด แสดงได้ว่าระยะนี้มีความเสี่ยงในการเกิดโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียมากที่สุด ระยะ Diestrus เป็นระยะที่กินเวลานานที่สุดในวงรอบของการเป็นสัด ดังนั้นจึงต้องเฝ้าระวังไม่ให้เกิดการติดเชื้อในช่วง diestrus ในแม่สุกรเพื่อลดการสูญเสียภายในฟาร์ม

คำสำคัญ: แม่สุกร วงรอบการเป็นสัด มดลูกสุกร เซลล์เยื่อบุช่องคลอด แบคทีเรีย

[1] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

The relationship between stages of estrous cycle and bacterial isolation from porcine reproductive tract

Metasu Chanrot[1]

Abstract

Swine are popular for consumption throughout the country and around the world. The sows are considered important in increasing production, especially the reproductive system that plays a major part in increasing production. Reproductive health is a necessity that requires constant monitoring and treatment. The most common problems in the sow reproductive system and affecting the farm's production are: out of estrous, infertility, long of estrous cycle, abortion, endometritis etc. The most common cause of problems in the swine reproductive system is bacterial infection. The objective of this research is to investigate bacteria in the female pig reproductive system at different stages of the estrus cycle as a guideline for surveillance and prevent bacterial infections in the reproductive system during each estrus cycle. The vaginal cytology of sow was swapped to identify cell types at different stages of estrus and vaginal swabs were cultured for bacterial identification from 100 samples. Ten types of reproductive bacteria were identified, including *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis, Shigella flexnerri, Shigella flexnerri, Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis* and *Citrobacter freundii.* Gram-negative bacteria was found more than gram-positive. A gram-negative bacterium with rod-shaped was found 88.2% (the most) that was *Escherichia coli*. The Diestrus stage was most found bacteria showed that this stage is most at risk of developing bacterial infections since diestrus is the longest duration of estrus cycle. In conclusion, it must be monitored to prevent infection during diestrus in sows.

Keywords: Sow, Estrous cycle, Swine uterus, Vaginal cytology, Bacteria

[1] Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thaungyai, Nakhonsrithammarat

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำ	
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
วิธีการดำเนินการวิจัย	3
ผลการวิจัย	10
อภิปรายผล/วิจารณ์ผล	13
สรุปผลการวิจัย	15
ข้อเสนอแนะ	15
บรรณานุกรม	16

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 : แสดงผลการเพาะเชื้อลงบนอาหารเชื้อ Macconkey agar, Blood agar, Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) และ Nutrient agar 11

ตารางที่ 2 : แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียที่พบในแต่ละระยะของวงรอบการเป็นสัด 12

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1 :	A ตัวอย่างมดลูกสุกรที่เก็บจากโรงเชือด และ B อาหารเลี้ยงเชื้อ (transport media) ที่ สวอปจากมูดลูกเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ	4
ภาพที่ 2 :	A แสดงกลุ่มเซลล์เยื่อบุมดลูกกลุ่มที่ A โดยลูกศรสีดำชี้ parabasal cell และลูกศรสีแดงชี้ intermediate cell, B แสดงกลุ่มเซลล์เยื่อบุมดลูกกลุ่มที่ B, C แสดงกลุ่มเซลล์เยื่อบุมดลูกกลุ่มที่ C และ D แสดงกลุ่มเซลล์เยื่อบุมดลูกกลุ่มที่ D ลูกศรสีเขียวชี้ superficial cell	5
ภาพที่ 3 :	A ลักษณะของ follicles ที่อยู่บนรังไข่ลักษณะเป็นถุงน้ำใส, B ลักษณะของ corpus luteum ลักษณะเป็นก้อนกลมเนื้อแน่นสีน้ำตาลแดง และ C ภาพแสดงการตัดตามขวางของรังไข่เพื่อประเมินสีและวัดขนาดของ corpus luteum	5
ภาพที่ 4 :	A กรอบสีแดงแสดงส่วนของปีกมดลูกที่ทำการตัดตามขวางเพื่อนำมาเตรียม tissue slide, B เนื้อเยื่อปีกมดลูกที่ตัดตามขวางและถูกฝังในพาราฟิน, C เนื้อเยื่อปีกมดลูกที่ถูกเตรียมเป็น glass tissue slide ที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้ว, D uterine gland จากเนื้อเยื่อปีกมดลูกที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 40 เท่า	6
ภาพที่ 5 :	A การเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar, B การเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar, C การเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lyssine Deoxycholate agar และ D การเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar	8
ภาพที่ 6 :	A แสดงการติดสีย้อมแกรมของเชื้อแบคทีเรียลักษณะเป็น rod shape, B แสดงการติดสีย้อมแกรมของเชื้อแบคทีเรียลักษณะเป็น cocci shape ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง	9
ภาพที่ 7 :	แสดงการหยดเชื้อลงบนชุดทดสอบ Analytical Profile Index (API®20 E)	9
ภาพที่ 8 :	แสดงค่าความหนาแน่นของ Uterine gland ของมดลูกสุกร	10

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

สุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่เลี้ยงไว้สำหรับการบริโภค การประกอบธุรกิจการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยมีหลายรูปแบบทั้งแบบขนาดเล็กที่มีการเลี้ยงหลังบ้านไปจนถึงการเลี้ยงในเชิง อุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพื่อการขายภายในประเทศและการส่งออก (สากล, 2530) การผลิตสุกรให้ได้ปริมาณตามความต้องการของตลาดจึงมีความสำคัญต่อระบบการผลิตเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะแม่พันธุ์มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเพิ่มผลผลิต แต่ถ้าหากแม่สุกรภายในฟาร์มมีปัญหาทางด้านระบบสืบพันธุ์ส่งผลให้เกิดการสูญเสียผลผลิตได้

ระบบการผลิตสุกรภายในฟาร์มสิ่งที่มีผลต่อผลผลิตของฟาร์มสุกรมากที่สุดคือแม่สุกร แม่สุกร 1 ตัว สามารถผลิตลูกได้ปีละ 2 ครอก ปัจจุบันมีการปรับปรุงสายพันธุ์และการจัดการให้สุกรให้ลูก 5 ครอกในระยะเวลา 2 ปี มีอัตราการรอดที่สูงขึ้น (สัมฤทธิ์และคณะ, 2548) เนื่องมาจากประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของสุกรดีขึ้นโดยเฉพาะแม่พันธุ์มีความสำคัญอย่างยิ่ง พบว่าแม่สุกรที่มีการกลับสัดเร็วและไม่มีโรคทางระบบสืบพันธุ์มีผลในการเพิ่มผลผลิตต่อครอกต่อปีได้มากขึ้น ระบบสืบพันธุ์เพศเมียสุกรมีความสำคัญเนื่องจากเป็นระบบที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตที่สร้างรายได้ให้กับฟาร์ม หากสุกรมีปัญหาทางด้านระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ การไม่เป็นสัด การผสมไม่ติด (Schukken *et al*., 1994) กลับสัดช้า แท้ง ติดเชื้อ มดลูกอักเสบ (Karlberg, 1981) ล้วนส่งผลกระทบต่อการผลิตสุกรภายในฟาร์มเช่น เกษตรกรมีรายได้ลดน้อยลงเนื่องจากการสูญเสียผลผลิต ดังนั้นการดูแลสัตว์ให้มีสุขภาพที่แข็งแรง มีความสมบูรณ์พันธุ์ จึงมีส่วนช่วยในการเพิ่มผลผลิตภายในฟาร์มได้ การตรวจสุขภาพสัตว์อย่างสม่ำเสมอช่วยลดและแก้ปัญหาการสูญเสียภายในฟาร์มได้

ปัญหาทางด้านระบบสืบพันธุ์ที่พบได้สุกรเพศเมียที่เป็นมดลูกอักเสบ (metritis) พบว่าปัญหาส่วนใหญ่มักเกิดจากโรคติดเชื้อโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Staphylococcus aureus, Streptococcus suis, Pseudomonas aeruginosa* (Dee, 1992) *Escherichia coli* (Winter *et al*., 1992) และ *Chlamydia* spp. (Eggemann *et al*., 2000) เป็นต้น ซึ่งเป็นสาเหตุโน้มนำทำให้สุกรไม่กลับสัดหรือไม่แสดงอาการเป็นสัดตามมา ดังนั้นการศึกษาหาความสัมพันธ์ของวงรอบการเป็นสัดของสุกรกับชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่พบเพื่อให้รู้ถึงสาเหตุของการก่อให้เกิดปัญหา โรค หรือความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ได้ และช่วยทำให้เข้าใจในกระบวนการเกิดโรคและความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์ เมื่อรู้สาเหตุและเข้าใจกระบวนการเกิดโรคจะช่วยให้สามารถหาวิธีการป้องกันและแก้ปัญหาต่างๆ ในระบบสืบพันธุ์สุกรซึ่งจะช่วยเพิ่มผลผลิตภายในฟาร์มได้

ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แม่พันธุ์มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเพิ่มผลผลิต แต่ถ้าหากแม่สุกรภายในฟาร์มมีปัญหาทางด้านระบบสืบพันธุ์ส่งผลให้เกิดการสูญเสียผลผลิตได้ ตามที่กล่าวไปแล้วข้างต้น

สมรรถภาพทางด้านการสืบพันธุ์ของสุกรสาวภายในฟาร์มสุกรมีความสำคัญในการเพิ่มผลผลิตภายในฟาร์ม ในปัจจุบันการผสมเทียมได้รับความนิยมมากขึ้นมากเนื่องจากมีความสะดวก จัดการง่าย ต้นทุนในการ

ผลิตต่ำกว่าการเลี้ยงแบบผสมจริง และได้ผลผลิตที่ดีเทียบเท่ากับการผสมจริง หากสัตว์ในฟาร์มมีอัตราการผสมติดที่สูงขึ้นส่งผลให้สัตว์ท้อง มีอัตราการเข้าคลอด และอัตราลูกต่อครอกสูงขึ้นเช่นกัน อัตราการผสมติดในสุกรขึ้นกับคุณภาพน้ำเชื้อ เทคนิคการจับสัด เทคนิคการผสม และความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์เพศเมีย เป็นต้น (ศรีสุวรรณ และคณะ, 2542) สุกรจะเป็นสัดทุก 21 วัน ซึ่งในรอบของการเป็นสัดประกอบด้วย 4 ระยะ คือ 1) ระยะก่อนเป็นสัด (proestrus) 2) ระยะเป็นสัด (estrus) 3) ระยะหลังเป็นสัด (metestrus) และ 4) ระยะหมดการเป็นสัด (diestrus) ในแต่ละระยะนั้นเกิดจากอิทธิพลของฮอร์โมนเพศกลุ่มเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน (Soede, 2011) ปกติอาการเป็นสัดเห็นได้ชัดจากลักษณะภายนอกซึ่งมีอวัยวะเพศบวมแดง มีเมือกใสไหลออกจากช่องคลอด และพฤติกรรมยืนนิ่งรอรับการผสม แต่การประเมินวงรอบการเป็นสัดจากสัตว์ไม่มีชีวิตอาจจะต้องประเมินจากการเปลี่ยนแปลงของมดลูกและรังไข่ ปัญหาการผสมไม่ติดหรือผสมติดต่ำที่เกิดจากปัญหาทางระบบสืบพันธุ์สุกรส่วนใหญ่เกิดได้จากสุกรไม่ยอมแสดงอาการเป็นสัด หรือไม่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เมื่อถึงอายุ เป็นสัดเงียบ มดลูกอักเสบเรื้อรัง (เผด็จ, 2555) การเกิดถุงน้ำในรังไข่ (Gherpelli and Tarocco, 1996) และโรคติดเชื้อไวรัสที่ส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ โรค Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) โรค Porcine parvovirus และ โรค Circovirus type 2 เป็นต้น (เผด็จ, 2555., Mengeling, 1992 และ กฤษฎากรณ์, 2550) และโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Streptococcus suis, Pseudomonas aeruginosa* (Dee, 1992) *Escherichia coli* (Winter *et al*., 1992) และ Chlamydia spp. (Eggemann *et al*., 2000) เป็นต้น

โดยทั่วไปในระบบสืบพันธุ์เพศเมียจะมีแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) อาศัยอยู่ ซึ่งมีช่วงเวลาการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในสภาพแวดล้อมภายในตัวสัตว์ที่แตกต่างกัน อาจก่อโรคหรือไม่ก็ได้ ขึ้นอยู่กับสมดุลหรือระดับของภูมิคุ้มกันของร่างกายสัตว์ (Dee, 1992) โอกาสการเกิดโรคหรือติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์สัตว์ขึ้นอยู่กับสภาพร่างกายสัตว์ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ศักยภาพการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายสัตว์อาจจะแตกต่างกันในแต่ละช่วงระยะของการเป็นสัด ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้แตกต่างกัน สาเหตุสำคัญของการเกิดปัญหาในระบบสืบพันธุ์สุกรมาจากหลายปัจจัย แต่ที่พบมากคือจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (Winter *et al*., 1995; Eggemann *et al*., 2000) โดยการเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุผนังมดลูกจากช่องคลอดสุกร และเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียและเก็บตัวอย่างเซลล์เยื้อบุช่องคลอด เพื่อใช้ยืนยันระยะการเป็นสัด และศึกษาหาความสัมพันธ์ของชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในแต่ละระยะของการเป็นสัดเพื่อได้เข้าใจและหาสาเหตุที่มาของกระบวนการเกิดโรคในระบบสืบพันธุ์ที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตภายในฟาร์ม หากทราบความสัมพันธ์ดังกล่าวแล้วสามารถเฝ้าระวังไม่ให้เกิดการติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์ เพื่อลดการสูญเสียภายในฟาร์มได้ นอกจากนี้องค์ความรู้ที่ได้ดังกล่าวสามารถนำไปต่อยอดในการคิดค้นวิธีการตรวจสกรีนโรคในระบบสืบพันธุ์ หรือคิดค้นปรับสูตรอาหารสัตว์ที่ใช้ในการช่วยป้องกันการเกิดโรคหรือเสริมสร้างภูมิคุ้มกันแก่สุกรในช่วงต่างๆ ในแต่ละวงรอบการเป็นสัด เพื่อช่วยลดความเสี่ยงของปัญหาของระบบสืบพันธุ์ในแม่สุกร ลดการสูญเสียและช่วยเพิ่มผลผลิตภายในฟาร์มได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อสำรวจเชื้อแบคทีเรียในระบบสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมียในช่วงระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัด
2) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียในระบบสืบพันธุ์กับวงรอบการเป็นสัด
3) เพื่อหาแนวทางในการเฝ้าระวัง และป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียในระบบสืบพันธุ์ในช่วงวงรอบการเป็นสัด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษาหาความสัมพันธ์ของชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในแต่ละระยะของการเป็นสัดเพื่อได้เข้าใจและหาสาเหตุที่มาของกระบวนการเกิดโรคในระบบสืบพันธุ์ที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตภายในฟาร์ม หากทราบความสัมพันธ์ดังกล่าวแล้วสามารถเฝ้าระวังไม่ให้เกิดการติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์ ลดการสูญเสียหรือลดการคัดทิ้งแม่สุกรที่มีปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ภายในฟาร์มได้ นอกจากนี้องค์ความรู้ที่ได้ดังกล่าวสามารถนำไปต่อยอดในการคิดค้นวิธีการตรวจสกรีนโรคในระบบสืบพันธุ์เพื่อหาแนวทางการแก้ปัญหาหรือรักษาโรคหรือปัญหาของระบบสืบพันธุ์ในแม่สุกรได้ทันท่วงที ช่วยลดการการคัดทิ้งแม่สุกรที่มีปัญหาระบบสืบพันธุ์ และหากแม่สุกรมีสุขภาพดีโดยเฉพาะระบบสืบพันธุ์เป็นการช่วยเพิ่มผลผลิตในฟาร์มได้ นอกจากนี้องค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปใช้ต่อยอดในการคิดค้นปรับสูตรอาหารสัตว์ที่เสริมสร้างการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันให้มีประสิทธิภาพสามารถป้องกันการเกิดโรคในสัตว์ได้ในทุกระยะของวงรอบการเป็นสัดได้

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย คือ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียสุกร (มดลูก) จำนวน 100 ตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างมี 2 ส่วน ดังนี้

1.1 สวอปเซลล์เยื่อบุช่องคลอดจากตัวตัวอย่างมดลูกสุกรเสียชีวิต จำนวน 100 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1A)

1.2 สวอปเชื้อจากช่องคลอดสุกรจากมดลูกสุกรที่เสียชีวิต จำนวน 100 ตัวอย่าง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ transport medium เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 1B) และทำการเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ห้องปฏิบัติการในเวลาต่อมา

A B

ภาพที่ 1: A ตัวอย่างมดลูกสุกรที่เก็บจากโรงเชือด และ B อาหารเลี้ยงเชื้อ (transport media) ที่สวอปจากมูดลูกเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. การจำแนกระยะการสัด

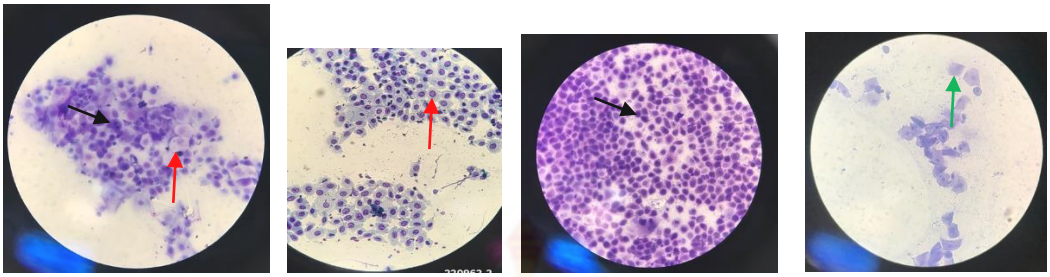
2.1 จำแนกวงรอบการเป็นสัดจากลักษณะของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดที่พบ (vaginal cytology) ทำการสวอปเซลล์เยื่อบุช่องคลอด (Vaginal cytology) ใช้ไม้พันสำลี ยาว 6 นิ้ว ที่ชุ่มด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.9 % ปลอดเชื้อ นำตัวอย่างที่ได้มากลิ้งบนกระจกสไลด์เบาๆเป็น 3-5 แนว แล้วนำแผ่นสไลด์ และ fix สไลด์แก้วที่ป้ายแล้วด้วย 70% ethanol และย้อมสี Modified Wright's stain และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะเซลล์ชนิดต่างๆ ในแต่ละวงรอบการเป็นสัด บันทึกผล โดยแบ่งกลุ่มชนิดของเซลล์ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ (ภาพที่ 2)

กลุ่มที่ A เป็นกลุ่มที่มี Intermediate cell 30%/70% และ parabasal cell 70%/30% (ภาพที่ 2A)

กลุ่มที่ B เป็นกลุ่มที่มี Intermediate cell 90% (ภาพที่ 2B)

กลุ่มที่ C เป็นกลุ่มที่มี parabasal cell 90% (ภาพที่ 2C)

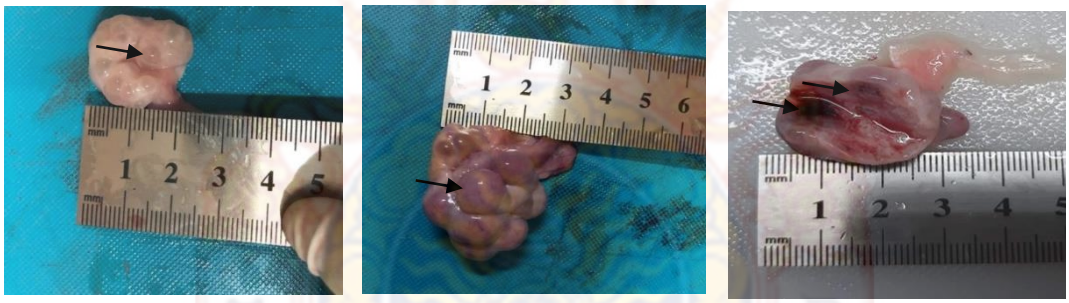
กลุ่มที่ D เป็นกลุ่มที่มี Superficial cell 80% (ภาพที่ 2D)



A B C D

ภาพที่ 2 : A แสดงกลุ่มเซลล์เยื่อบุมดลูกกลุ่มที่ A โดยลูกศรสีดำชี้ parabasal cell และลูกศรสีแดงชี้ intermediate cell, B แสดงกลุ่มเซลล์เยื่อบุมดลูกกลุ่มที่ B, C แสดงกลุ่มเซลล์เยื่อบุมดลูกกลุ่มที่ C และ D แสดงกลุ่มเซลล์เยื่อบุมดลูกกลุ่มที่ D ลูกศรสีเขียวชี้ superficial cell

2.2 จำแนกวงรอบการเป็นสัดจากลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของรังไข่ (gross lesions) ตรวจลักษณะที่ปรากฏบนรังไข่ทั้งสองข้างของสุกร วัดขนาดของรังไข่ทั้งข้างซ้ายและข้างขวา (ภาพที่ 3) ผ่ารังไข่ตามขวางเพื่อประเมินสีของคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum, CL) และวัดขนาดของ corpus luteum จากรังไข่ที่ตัดขวาง บันทึกผล



A B C

ภาพที่ 3 : A ลักษณะของ follicles ที่อยู่บนรังไข่ลักษณะเป็นถุงน้ำใส, B ลักษณะของ corpus luteum ลักษณะเป็นก้อนกลมเนื้อแน่นสีน้ำตาลแดง และ C ภาพแสดงการตัดตามขวางของรังไข่เพื่อประเมินสีและวัดขนาดของ corpus luteum

2.3 จำแนกวงรอบการเป็นสัดจากจำนวน uterine glands จากชิ้นเนื้อปีกมดลูก (glass slide of tissue section) โดยตัดปีกมดลูก (uterine horn) ตามแนวขวางความหนา 2 เซนติเมตร โดยตัดห่างจากปลายของปีกมดลูก 5 เซนติเมตร แล้วนำไป fix ใน 10% formalin หลังจาก fix ปีกมดลูกใน 10% formalin เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้ว นำไปเข้าเครื่อง tissue processing (Reichert Jung Histokinette, Cambridge Instruments company, UK) ตัวอย่างทั้งหมดหมดจะผ่านการตรึงสภาพใน 10 % neutral buffer formalin อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ผ่านกระบวนการล้าง (washing) การดึงน้ำออกจาก

เนื้อเยื่อ (dehydration) การเคลียริ่ง (Clearing) รวมถึงการแทรกซึมของพาราฟิน (Paraffin infiltration) หลังจากนั้นทำการจะฝังชิ้นเนื้อเยื่อลงในพาราฟิน (embedding) และตัดชิ้นเนื้อปีกมดลูก (sectioning) ที่ความหนา 5 ไมโครเมตร นำชิ้นเนื้อมาติดบนสไลด์ (affixing) เมื่อชิ้นเนื้อแห้งสนิท จึงนำชิ้นเนื้อเข้าสู่กระบวนการย้อมสี (staining) ด้วยการย้อมฮีมาท็อกซิลินและอิโอซิน (hematoxylin & eosin; H&E) ศึกษาลักษณะของ uterine horn ของสุกรทางจุลกายวิภาค และนับจำนวน uterine glands ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (light microscope) คำนวณความหนาแน่นเป็น gland/cm^2 จากทั้ง 100 ตัวอย่าง (ภาพที่ 4) โดยเตรียมจาก tissue slide ของเนื้อเยื่อปีกมดลูก (uterine horn) เก็บตัวออย่างปีกมดลูก (uterine horns) ตัดตามขวางห่างจากปลาย 5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4A) ดองไว้ในฟอร์มาลิน 4% และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นเนื้อปีกมดลูกเข้าเครื่อง fixed ชิ้นเนื้อ และนำกลับมาตัดชิ้นเนื้อ (tissue section) และย้อมสีวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยา

A B C D

ภาพที่ 4 : A กรอบสีแดงแสดงส่วนของปีกมดลูกที่ทำการตัดตามขวางเพื่อนำมาเตรียม tissue slide, B เนื้อเยื่อปีกมดลูกที่ตัดตามขวางและถูกฝังในพาราฟิน, C เนื้อเยื่อปีกมดลูกที่ถูกเตรียมเป็น glass tissue slide ที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้ว, D uterine gland จากเนื้อเยื่อปีกมดลูกที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 40 เท่า

การคำนวณหาความหนาแน่นของต่อมมดลูกทางจุลพยาธิวิทยา (density of uterine glands) โดยวัดขนาดชิ้นเนื้อของ uterine horn เพื่อใช้คำนวณหาพื้นที่ และนับจำนวน uterine gland ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 40 เท่า ทั้งจำนวน 100 ตัวอย่าง บันทึกจำนวน uterine gland ที่นับได้ในแต่ละสไลด์เป็นความหนาแน่นของจำนวน uterine gland ต่อพื้นที่ (uterine glands/cm^2; gl/cm^2) ความหนาแน่นของ uterine gland จะมีความแตกต่างกันในแต่ละระยะของการเป็นสัดภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและฮอร์โมนเอสโตรเจน ในระยะที่ความโดดเด่นของฮอร์โมนเอสโตรเจน (follicular phase หรือระยะ proestrus และระยะ estrus)

จะมีความหนาแน่นของ uterine gland น้อยกว่าระยะที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (luteal phase หรือระยะ metestrus และระยะ diestrus) สามารถแบ่งกลุ่มความหนาแน่นของ uterine gland ออกเป็น 4 กลุ่มตามระยะวงรอบการเป็นสัด ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ระยะ Estrus มีความหนาแน่นของ uterine gland ระหว่าง 0-299 gl/cm^2

กลุ่มที่ 2 ระยะ Proestrus มีความหนาแน่นของ uterine gland ระหว่าง 300-599 gl/cm^2

กลุ่มที่ 3 ระยะ Metestrus มีความหนาแน่นของ uterine gland ระหว่าง 600-999 gl/cm^2

กลุ่มที่ 4 ระยะ Diestrus มีความหนาแน่นของ uterine gland ระหว่าง >1,000 gl/cm^2

หรือสามารถแบ่งความหนาแน่นของ uterine gland ออกเป็น 2 กลุ่มตามเฟสได้ดังนี้

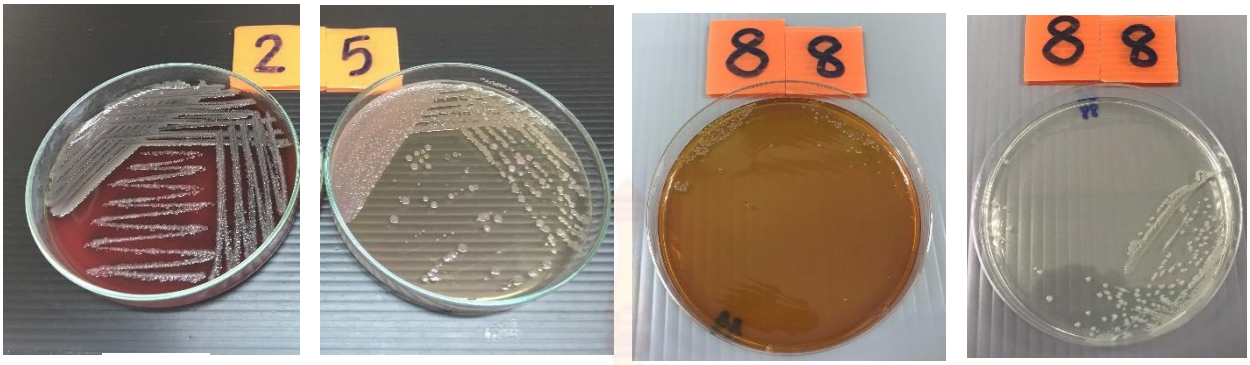
กลุ่มที่ 1 Follicular phase มีความหนาแน่นของ uterine gland ระหว่าง 0-599 gl/cm^2

กลุ่มที่ 2 Luteal phase มีความหนาแน่นของ uterine gland ตั้งแต่ 600 gl/cm^2 ขึ้นไป

3. การเพาะเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial culture)

3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar, Blood agar, Xylose Lyssine Deoxycholate agar และ Nutrient agar จำนวนอย่างละ 1000 ml. โดยใช้เครื่องทำความร้อนไฟฟ้า (hot plate) และแท่งแม่เหล็ก (magenetic stirrer) โดยควบคุมอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 70-80 องศาเซลเซียส อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar ใช้เลือดจากโค รอให้เย็นที่ประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส รีบเทลงบน Petri dish ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาก่อนหน้านี้แล้ว รอให้สารละลายวุ้นเกิดการแข็งตัว

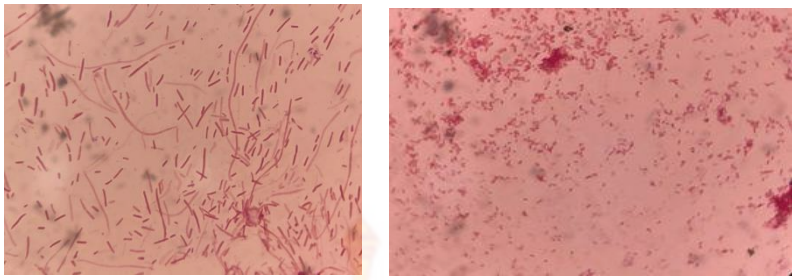
นำตัวอย่างจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (transport medium) streak ลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) MacConkey agar จำนวน 100 ตัวอย่าง Blood agar จำนวน 100 ตัวอย่าง Xylose Lyssine Deoxycholate agar จำนวน 10 ตัวอย่าง และ Nutrient agar จำนวน 24 ตัวอย่างที่เตรียมไว้ ขีดเส้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามแนวประมาณ 3-4 แนว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง การเพาะเชื้อจะเพาะเชื้อจนได้เชื้อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แยกออกมา (ภาพที่ 5) จึงนำเชื้อที่แยกโคโลนีไปย้อมแกรม (Gram's stain)



A B C D

ภาพที่ 5: A การเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar, B การเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar, C การเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lyssine Deoxycholate agar และ D การเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar

3.2 การย้อมแกรมแบคทีเรีย (Bacterial's gram stain) โดยการใช้ loop ไปแตะเชื้อโคโลนีเดี่ยวบน Petri dish หยดน้ำกลั่นบนสไลด์ นำมา smear เชื้อแบคทีเรียลงบน slide โดยทำการ heat fix ผ่านไฟ 3-4 ครั้ง เพื่อตึงเซลล์ให้ติดกับสไลด์ ทิ้งให้แห้ง ย้อมสีด้วยการหยดสารละลาย crystral violet จนท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำ หยดสารละลายไอโอดีน จนท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วล้างออก ล้างออกโดยค่อยๆ หยด 95 % Ethanal เอียงสไลด์ไปมาจนกระทั่งสีน้ำเงินเริ่มจางแล้วจึงรีบล้างออกด้วยน้ำ หยด safranin ให้ท่วมทิ้งไว้ 30 วินาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำ ซับน้ำด้วยกระดาษหรือผ้าและทิ้งไว้ให้แห้ง ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์หัว 100 x หยด oil เซลล์แบคทีเรียทุกเซลล์บน smear จะติดสีน้ำเงินหรือม่วง เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังหนาจึงติดสี crystal violet ได้ดีและเมื่อเติมสารละลายไอโอดีนลงไปจะรวมกับสี crystal violet กลายเป็นผลึกที่มีโครงสร้างซับซ้อน (crystal violetiodine complex) ทำให้สีติดดียิ่งขึ้น ต่อมาเมื่อล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย ethyl alcohol 95% ขั้นตอนนี้ แบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีไขมันอยู่ในส่วนประกอบของผนังเซลล์มาก ไขมันจะถูกละลายออกมากับแอลกอฮอล์ ทำให้รูผนังเซลล์กว้างขึ้น ผลึกของสีจึงหลุดออกมากับผนังเซลล์ แบคทีเรียแกรมลบจึงไม่ติดสี ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกที่มีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เป็นไขมันอยู่น้อยนั้น ผลึกของสียังคงติดแน่นอยู่ (crystal violet สีน้ำเงินหรือม่วง) ซึ่งต่อมาเมื่อย้อมทับด้วยสี Safranin (สีแดง) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียพวกแกรมลบซึ่งเดิมไม่ติดสีจะติดสีแดง แบคทีเรียที่ยังคงติดสี crystal violet (สีน้ำเงินหรือม่วง) หลังจากการล้างด้วยแอลกอฮอล์เรียกว่า "Gram positive" ส่วนพวกที่ไม่ติดสีของ crystal violet แต่ติดสีที่ย้อมทับ (Counter stain) ของ Safranin (สีแดง) เรียกว่า "Gram negative" (ภาพที่ 6) บันทึกผล



A B

ภาพที่ 6 : A แสดงการติดสีย้อมแกรมของเชื้อแบคทีเรียลักษณะเป็น rod shape, B แสดงการติดสีย้อมแกรมของเชื้อแบคทีเรียลักษณะเป็น cocci shape ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

3.3 การจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี Analytical Profile Index (API®20 E)

นำโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้เป็นเดี่ยวๆ มาทดสอบชนิดของเชื้อด้วยชุดทดสอบ Analytical Profile Index (API®20 E) ดังนี้ เตรียมกล่องสำหรับ incubate โดยเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5 ml ลงในหลุมทุกหลุมของกล่อง incubate บันทึกจำนวนของเชื้อบริเวณพลาสติกที่ยื่นออกมา แล้วนำแถบ Strip API วางในกล่อง incubate (ที่เติมน้ำกลั่นไว้แล้ว) ใช้ปิเปต หรือ loop เขี่ยเชื้อ single colony 1 โคโลนีจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อลงใน suspension medium ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ดูด suspension ของเชื้อเติมลงในหลุม cupule ของ Strip สำหรับการทดสอบ CIT, VP และ GEL เติม suspension เต็มหลุม ส่วนการทดสอบที่เหลือให้เติม suspension ของเชื้อในระดับขอบหลุม สำหรับการทดสอบที่ขีดเส้นใต้ ได้แก่ ADH, LDC, ODC , H2S และ URE ให้หยด mineral oil ลงไปให้เต็มหลุมเพื่อให้มีสภาวะ Anaerobe (ภาพที่ 7) ปิดฝากล่อง incubate แล้วนำไป incubate ที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและบันทึกผล

ภาพที่ 7 แสดงการหยดเชื้อลงบนชุดทดสอบ Analytical Profile Index (API®20 E)

ผลการวิจัย

1. **ผลการตรวจประเมินวงรอบการเป็นสัดจากเซลล์เยื่อบุช่องคลอด (evaluation stage of estrous cycle from vaginal cytology)**

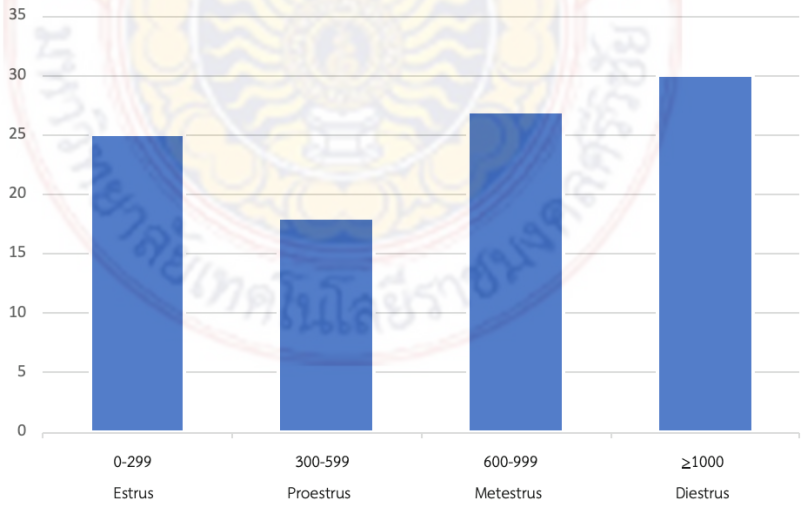
พบกระจายของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดตามกลุ่มต่างๆ ดังนี้ กลุ่มที่ A เป็นกลุ่มที่มี Intermediate cell 30%/70% และ parabasal cell 70%/30% จำนวน 40 ตัวอย่าง กลุ่มที่ B เป็นกลุ่มที่มี Intermediate cell 90% จำนวน 31 ตัวอย่าง กลุ่มที่ C เป็นกลุ่มที่มี parabasal cell 90% จำนวน 24 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ D เป็นกลุ่มที่มี Superficial cell 80% จำนวน 5 ตัวอย่าง

2. **ผลการตรวจประเมินวงรอบการเป็นสัดจากคอร์ปัสลูเทียม (stage of estrous cycle evaluation from corpus luteum)**

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าลักษณะของคอปัสลูเทียมมีสีเดียวคือสีน้ำตาลแดงและขนาดไม่แตกต่างกันจึงไม่สามารถนำมาจำแนกวงรอบการเป็นสัดในสุกรได้

3. **ผลการตรวจหาความหนาแน่นของต่อมมดลูกทางจุลพยาธิวิทยา (density of uterine glands)**

ผลการศึกษาจำจำนวน 100 ตัวอย่างพบว่า ความแน่นของ uterine gland ในกลุ่มที่ 1 (0-299 gl/cm^2) มีทั้งหมด 22 ตัวอย่าง ในกลุ่มที่ 2 (300-599 gl/cm^2) มี 19 ตัวอย่าง ในกลุ่มที่ 3 (600-999 gl/cm^2) มี 28 ตัวอย่าง และในกลุ่มที่ 4 (>1,000 gl/cm^2) มี 31 ตัวอย่าง (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 : แสดงค่าความหนาแน่นของ Uterine gland (gl/cm^2) ของมดลูกสุกร

4. ผลการเพาะเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial culture)

จากการเพาะเชื้อจำนวน 100 ตัวอย่าง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Macconkey agar มีโคโลนีสีครีมขุ่นมี 66 ตัวอย่าง สีใสมี 20 ตัวอย่าง สีชมพูมี 13 ตัวอย่าง และ ไม่พบ 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

จากการเพาะเชื้อจำนวน 100 ตัวอย่าง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar มีโคโลนีสีขาวขุ่น 78 ตัวอย่าง hemolysis 22 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

จากการเพาะเชื้อจำนวน 10 ตัวอย่าง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar พบโคโลนีลักษณะสีใส 3 ตัวอย่าง ไม่พบ 7 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

จากการเพาะเชื้อจำนวน 24 ตัวอย่าง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar พบโคโลนีสีขาวขุ่น 22 ตัวอย่าง โคโลนีสีเหลือง 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงผลการเพาะเชื้อลงบนอาหารเชื้อ Macconkey agar, Blood agar, Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) และ Nutrient agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ/ลักษณะโคโลนี	จำนวนตัวอย่าง							
	สีครีมขุ่น	สีใส	สีชมพู	สีขาวขุ่น	Hemolysis	สีเหลือง	ไม่พบ	รวม
1.MacConkey agar	66	20	13				1	**100**
2.Blood agar				78	22			**100**
3.Xylose Lysine Deoxycholate (XLD)		3					7	**10**
4.Nutrient agar				22		2		**24**

5. ผลการย้อมแกรมแบคทีเรีย (Bacterial's gram stain) และผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี Analytical Profile Index (API®20 E)

ผลการศึกษาจำนวนตัวอย่าง 100 ตัวอย่างพบการย้อมติดสีแกรมของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis, Shigella flexnerri, Shigella flexnerri, Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis* และ *Citrobacter freundii* พบแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแกรมบวก ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง คิดเป็น 88.2 % (มากที่สุด)

6. ความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียที่พบกับวงรอบการเป็นสัด

พบเชื้อแบคทีเรียในทุกระยะของวงรอบการเป็นสัดในสุกร แต่ความชุกของเชื้อแบคทีเรียมากสุดในมดลูกสุกรที่อยู่ระยะ Diestrus ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียที่พบในแต่ละระยะของวงรอบการเป็นสัด

ระยะของสุกร (Stage)	จำนวนตัวอย่าง	แกรมบวก	แกรมลบ
Proestrus	12	6	5
Estrus	4	2	2
Metestrus	6	2	3
Diestrus	40	26	10
ไม่สารถจำแนกวงรอบการเป็นสัด	38	2	38
รวม	**100**	**38**	**58**

อภิปรายผล/วิจารณ์ผล

การศึกษาวงรอบการเป็นสัดในสุกรด้วยการจำแนกเซลล์เยื่อบุช่องคลอด (Vaginal cytology) กลุ่มเซลล์หลักๆ 3 ชนิด คือ Intermediate cells, Parabasal cells และ superficial cells กลุ่มเซลล์เยื่อบุช่องคลอดดังกล่าวคล้ายกับที่พบในสุนัข ซึ่งจะพบ superficial cells ในระยะ estrus เหมือนกับในสุนัขที่พบเซลล์ชนิดดังกล่าวเป็นจำนวนมากในระยะ estrus ในขณะที่ในโคไม่สามารถจำแนกระยะของวงรอบการเป็นสัดด้วยวิธี vaginal cytologyได้ ส่วนการจำแนกวงรอบการเป็นสัดจากรังไข่ซึ่งพิจารณาจากสีและขนาดของคอร์ปัสลูเทียมพบว่าคอร์ปัสลูเทียมของสุกรมีสีที่คล้ายคลึงกันและขนาดที่เท่าๆ กันในทุกระยะของการเป็นสัดซึ่งแตกต่างจากในโคที่มีสีและขนาดที่แตกต่างกันของคอร์ปัสลูเทียม ดังนั้นการพิจารณาวงรอบการเป็นสัดในสุกรจากคอร์ปัสลูเทียมอาจจะเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม และไม่พบการรายงานการจำแนกวงรอบการเป็นสัดจากคอปัสลูเทียมในสุนัขเช่นกัน และการประเมินระยะของวงรอบการเป็นสัดจากความหนาแน่นของ Uterine gland ในสุกรพบว่าในระยะ Luteal phase มีความหนาแน่นของ uterine glands มากกว่าระยะ Follicular phase สอดคล้องกับการศึกษาวงรอบการเป็นสัดจากความหนาแน่นของUterine gland ในโค ดังนั้นสามารถใช้ความหนาแน่นของ uterine glands ประเมินระยะวงรอบการเป็นสัดในสุกรได้

จากการสำรวจแบคทีเรียที่พบบริเวณช่องคลอดในสุกรปกติพบทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่งมากที่สุด เชื้อแบคทีเรียที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ มีทั้งหมด 8 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis, Shigella flexnerri, Shigella flexnerri, Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis และ Citrobacter freundii* ในขณะที่การศึกษาของ Dee et.al. (1992) พบแบคทีเรียในทางเดินปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์สุกรเพศเมียจำนวน 22 ชนิด ได้แก่ *Bacteriodes fragilis, Chromobacterium sp., Citrobacter sp., Corynebacterium pyogenes, Escherichia. coli, Enterobacter aerogenes, Fusobacterium sp., Lactobacillus sp., Mycoplasma sp., Neisseria catarrhalis, Pasteurella multocida, Peptostreptococcus sp., Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus albus, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus equisimillis, Streptococcus faecalis, Streptococcus suis, Streptococcus zooepidemicus, Group A, G,L Strep และ Group D,L,C,E,H Strep* และนอกจากนี้การศึกษาของ Peter (1999) ที่รายงานการตรวจหาชนิดของแบคทีเรียในช่องคลอดสุกรปกติ พบเชื้อ *Staphylococcus spp., Enterobacteria, Corynebacterium spp. และ Actinobacillus spp.*

แบคทีเรียทั้ง 8 ชนิดที่พบจากการศึกษาครั้งนี้เป็นแบคทีเรียที่เป็น normal flora ที่พบในสุกรที่มีสุขภาพปกติ แต่หากมีการติดเชื้อแทรกซ้อนหรือสภาพร่างกายสัตว์อ่อนแอพบว่าแบคทีเรียที่เป็น normal flora เหล่านี้สามารถก่อให้เกิดโรคหรือปัญหาในระบบสืบพันธุ์ได้ กลุ่มแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบสืบพันธุ์สุกรได้ เช่น *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, และ *Staphylococcus aureus* สอดคล้องกับการรายงานเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์สุกร ได้แก่ *Actinobacillus ross,*

Brucella suis, Corynebacterium pyogenes, Escherichia. coli, Klebsiella pneumoniae, Leptospira Bratislava, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella sp., Staphylococcus aureus, Streptococcus equisimillis, Streptococcus suis และ Yersinia enterocolitica (Dee, 1992) ในขณะที่การรายงานของ Jun (2017) ที่มีการสำรวจเชื้อแบคทีเรียจากช่องคลอดแม่สุกร (vaginal microbiota) พบว่ากลุ่มแบคทีเรียที่พบแม่สุกรปกติและแม่สุกรที่มดลูกอักเสบ ได้แก่ *กลุ่ม Bacillus, Paenibacillus, Alkaliphilus, และ Cronobacter* และเชื้อที่พบมากในแม่สุกรที่มีอาการมดลูกอักเสบ ได้แก่ *Escherichia-Shigell, Bacteriodes, Fusobacterium และ Clostridium_sensu_stricto_1* ในขณะที่มีรายงานการศึกษาของ Karlberg (1981) ที่ทำการสำรวจเชื้อแบคทีเรียพบในสุกรนางและสุกรสาวที่มีอาการโรคมดลูกอักเสบ (metritis) และเยื่อบุโพรงมดลูกอักเสบ (endometritis) ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pasteurella sp*. ดังนั้น เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็น normal flora ที่สามารถพบทั่วไปในร่างกายสัตว์ เมื่อภูมิคุ้มกันของร่างกายอ่อนแอเชื้อจะเข้าเกิดการติดเชื้อได้ และ เชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter aerogenes* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในระบบสืบพันธุ์ส่งผลให้เกิดมดลูกอักเสบ (metritis) เยื่อบุโพรงมดลูกอักเสบ (endometritis) และ ช่องคลอดอักเสบ (vaginitis)

ในระบบสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมียจะมีเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่สามารถตรวจพบได้โดยทั่วไป ซึ่งจะพบในปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละวงรอบของการเป็นสัดขึ้นอยู่กับระดับภูมิคุ้มกันของร่างกายและปริมาณของฮอร์โมนที่ส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ในแต่ละระยะทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้แตกต่างกัน ซึ่งจะก่อโรคหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับปริมาณและภูมิคุ้มกันของร่างกายของสัตว์ การศึกษาครั้งนี้พบว่าในระยะ Diestrus พบเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด แสดงได้ว่าระยะนี้มีความเสี่ยงในการเกิดโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย (High prevalent) มากที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาในสุนัขที่พบว่าระยะ Diestrus เป็นระยะที่พบการอักเสบของมดลูก (pyometra) ได้มากที่สุด แต่ทั้งนี้อาจเป็นได้ว่าระยะ Diestrus ซึ่งเป็นช่วงที่กินเวลานานสุดของวงรอบการเป็นสัดจึงมีโอกาสที่จะพบเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่าระยะอื่นๆ และตัวอย่างที่ได้ศึกษาครั้งนี้เป็นตัวอย่างที่เก็บมาในระยะ Diestrus จึงพบเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่าระยะอื่นๆ หากมีตัวอย่างทุกระยะจำนวนเท่ากัน อาจมีผลการพบแบคทีเรียในระยะอื่นๆ ได้ จึงควรมีศึกษาต่อไปเพื่อให้ได้ข้อมูลตัวอย่างมากขึ้นและมีจำนวนเท่ากับระยะอื่นๆ

สรุปผลการวิจัย

การจำแนกวงรอบการเป็นสัดในสุกรสามารถทำได้จากการประเมินความหนาแน่นของ uterine gland ปริมาณของ uterine gland ที่มีความหนาแน่นมากใน Luteal Phase และ Follicular Phase ในปริมาณของ uterine gland ที่มีความหนาแน่นน้อย และการประเมินชนิดของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดสัตว์ที่อยู่ระยะ estrus จะพบ superficial cells จำนวนมาก ไม่สามารถจำแนกระยะวงรอบการเป็นสัดในสุกรได้จากลักษณะของ corpus luteum

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียที่พบในระบบสืบพันธุ์เพศเมียสุกรปกติ มี 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก โดยพบแบคทีเรียแกรมลบมากว่า แบคทีเรียที่พบมากที่สุดจะเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่าง rod shape ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เป็น normal flora และสามารถก่อโรคได้เมื่อภูมิคุ้มกันของร่างกายอ่อนแอหรือเป็นแบคทีเรียที่สามารถเกิดการติดเชื้อแทรกซ้อน และระยะของวงรอบการเป็นสัดที่พบเชื้อแบคทีเรียมากสุดจะเป็นระยะ Diestrus

ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาครั้งนี้มีประโยชน์ที่ทราบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในระบบสืบพันธุ์เพสเมียและวงรอบการเป็นสัดระยะที่มีความเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อและมีเชื้อที่อาจจะก่อโรคในระบบสืบพันธ์ นำไปสู่การแก้ไขและป้องกันความรุนแรงที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียได้ทันท่วงที ช่วยลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับระบบสืบพันธุ์ภายในฟาร์มและเพิ่มผลผลิตให้แก่ฟาร์มได้

บรรณานุกรม

กิจจา อุไรรงค์. 2558. **จัดการเล้าคลอดถูกต้องเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในฟาร์มหมู.** คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นิตยสารโลกสุกร.

กฤษฎากรณ์ พริ้งเพราะ. 2550. **วิทยาภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อเซอร์โคไวรัสชนิดที T2 (PCV) ในสุกร.** คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่สัตวแพทยสาร.

เผด็จ ธรรมรักษ์. 2555. **ผลของการใช้วัคซีนพีอาร์อาร์เชื้อเป็นในฟาร์มสุกรต่อสมรรถภาพทางสืบพันธุ์ของสุกรสาวทดแทนและแม่สุกรอุ้มท้อง**. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

พงษ์ธร สุวรรณธาดา. 2554. **ปัญหาที่พบจาการผสมเทียมสุกร.** คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, โรงพยาบาลสัตว์ขอนแก่น.

ภาวิณี วงศ์สนสุนีย์. 2535. **โรคสุกร.** ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

ศรีสุวรรณ ชมชัย. 2542. **คู่มือปฏิบัติการผสมเทียมในสุกร.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ.

สัมฤทธิ์ แสนบัว, วิศาล ศรีสุริยะ, กมล ฉวีวรรณ. 2548. **การเลี้ยงสุกร**: หนังสืออิเล็กทรอนิกส์ด้านการเกษตร เฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว. กรมปศุสัตว์.

สากล. 2530. สุกรสาส์น: **ระบบการผลิตสุกร**. ศูนย์สถิติการเกษตร. สำนักเศรษฐกิจการเกษตร. 14(53): 70-76.

อุไรวรรณ พิพัฒน์ธนวงศ์. 2558. **การดูแลแม่และลูกสุกรเล้าคลอด.** สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ. สารเบ็ทเทอร์ฟาร์ม่า Animal Health

Bara. 1993. **A study of the microbial flora of the anterior vagina of normal sows during different stages of the reproductive cycle**. Aust Vet J. 70(7): 256-9.

Dee,S.A. 1992**. Porcine urogenital disease**. In: The veterinary clinics of north America : Food Animal practice, Swine reproduction.R.C.Tubbs and A.D.Leman (Eds.) vol.8 No.3 1992 pp. 641-660.

Gherpelli M. and Tarocco C. 1996. **A study on the incidence and clinical evolution of the Ovarian cysts in the sow**. Proc. 14th IPVS Congress, Bolongna, Italy, 1996, p.587.

Jackson, G. 2007. **Handbook of Pig Medicine**. Elsevier's Health Sciences.

John Carr. 2018. **Pig Health.** Rcvs Recognised specialist in pig medicine. James cook University.

Jun, W., Changjiu, L., Lucky, TN., Yongsheng, G., Shumin, Z., and Wenfa, L. 2017. Characterization of vaginal microbiota of endometrtis and healthy sows using high-throughput pyrosequencing of 16S rRNA gene. Microbial Pathogenesis. 111: 325-330.

Karlberg, K.Rein, K.A., and Nordstoga,K. 1981**. Histological and bacteriological examination of uterus From the repeat breeder gilts and sows.** Nord. Vet.-Med. 33: 359-365.

Kunavongkrit, A. 1983a. **Clinical and endocrinological Studies in primiparous zero-weaned sows** 1. Clinical and morphological findongs with special reference to the effects of PGF 2 alpha treatment , Zbl. Vet. Med. 30, 607-615.

Mengeling, W.L. 1992. **Porcine Parvovirus. In: Diseases of Swine.** 7th edition. A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire and D.J. Taylor (Eds). Iowa State University Press. Iowa. pp 299-311.

Metasu, C. , Y. Guo, A.M. Dalin, E. Persson, R. Bage, A. Svensson, H. Gustafsson, P. Humblot 2017**. Dose related effects of LPS on endometrial epithelial cell populations from dioestrus cows**. Doctoctoral thesis no.2017:16 faculty of veterinary medicine and animal science.

Peter J. Heidt, Philip B. Carter, Volker Rusch, and Dirk van der Waaij. 1999. **VAGINAL MICROECOLOGY AND VULVAL DISCHARGE IN SWINE.** Old Herborn University Seminar Monograph 12.

Pointon, A.M., Ruen, P.D., and Dial, G.D. 1990. **Vulval discharge syndrome: How to conduct a clinical investigation.** In: Proceedings of the Minnesota Swine Conference for Veterinarians. St. Paul, MN. pp 280-289

Pope W.F., Xie S., Broermann D.M. and Nephew K.P. 1990. **Causes and consequences of early embryonic diversity in pig.**J. Reprod. Fertil. Suppl. 40: 251-260.

Spencer, T.E. 2019. **Development and Function of Uterine Glands in Domestic Animals.** annurev-animal, 15(7): 125-147.

Wrathall, A.E. 1980. **Ovarian disorders in the sow**. Vet. Bull 50: 253-272.