Fatal mastitis ในแพะ จากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ผลิต enterotoxin G และ I

พัชรี ทองคำคูณ* สนทนา มิมะพันธุ์ อภัสรา วรราช

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 025798908 โทรสาร 025798919 email: patchareet@dld.go.th

บทคัดย่อ

แพะพันธุ์ Saanen เพศเมีย จากฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดอ่างทอง หลังจากคลอดลูกได้ 1 วัน แสดงอาการไข้สูง ซึม ไม่กินอาหาร และตายภายใน 3 วัน ตรวจรอยโรคด้วยตาเปล่า พบเต้านมทั้งข้างซ้ายและขวามีการอักเสบอย่างรุนแรง มีสีแดงปนม่วง ลักษณะบวมแข็ง ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบรอยโรคการเสื่อมของกล้ามเนื้อหัวใจร่วมกับหย่อมเลือดออก ปอดพบรอยโรคจุดเลือดออกกระจายอยู่ทั่วไป และพบ interstitial pneumonia แบบเป็นกลุ่มเล็ก ๆ กระจาย หรือขยายเชื่อมต่อกัน มีการแทรกตัวของ alveolar macrophages และปอดแฟบบางส่วน ภายใน alveolar lumen ของเต้านมมีการอักเสบโดยพบการสะสมของเซลล์ตาย macrophages และบางส่วนพบ neutrophils รวมทั้งพบกลุ่มของแบคทีเรียรูปร่างกลมและติดสีน้ำเงิน การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา พบเชื้อ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) จากเต้านม โดยเชื้อมีความไวต่อยา amoxicillin/clavulanic acid, enrofloxacin, erythromycin, gentamycin, kanamycin, ofloxacin, oxacillin, sulfamethoxazole/ trimethoprim, tetracycline และดื้อต่อยา ampicillin, cephalexin และ penicillin G การตรวจหาท็อกซินยีนโดยวิธี multiplex PCR พบยีนของ enterotoxin G และ I ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า แพะเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบกึ่งเฉียบพลันอย่างรุนแรง จากเชื้อ *S. aureus* ที่ผลิต enterotoxin G และ I ซึ่งส่งผลให้แพะตายจากภาวะการหายใจล้มเหลว

คำสำคัญ: โรคเต้านมอักเสบ, แพะ, *Staphylococcus aureus*, enterotoxin G, enterotoxin I

บทนำ

โรคเต้านมอักเสบเป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งในสัตว์เลี้ยง โดยเฉพาะสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการผลิตน้ำนม เช่น โคนมและแพะนม สาเหตุเกิดได้จากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งสร้างความเสียหายแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและความรุนแรงของเชื้อ สัตว์มักได้รับเชื้อผ่านทางหัวนมจากการสัมผัสโดยตรงกับสัตว์ที่มีเชื้อ สิ่งแวดล้อมหรือระหว่างกระบวนการรีดนม (Ribeiro et al., 2007) ในโคนมเชื้อที่มักพบเป็นสาเหตุของอาการเต้านมอักเสบ ได้แก่ *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ส่วนเชื้อที่มีความรุนแรงจนทำให้สัตว์ตาย (fatal mastitis) มีหลายชนิด จากการศึกษาย้อนหลังในโคนมที่ประเทศแคนาดา ระหว่างปี 1969-1984 พบว่าเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นสาเหตุหลักของ fatal mastitis โดยมีสัดส่วนถึง 75% ของโคที่ตายด้วยโรคเต้านมอักเสบ รองลงมาคือ *Klebsiella* spp. และ *S. aureus* (Hazlett et al., 1984) ส่วนในแพะเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ ได้แก่ *Mannheimia hemolytica* (*M. hemolytica*), *E. coli*, *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Nocardia* spp. รวมทั้ง *S. aureus* ที่เป็นสาเหตุหลัก (Radostits et al., 2007)

S. aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก รูปร่างกลม เคลื่อนที่ไม่ได้และไม่สร้างสปอร์ มีทั้งชนิดที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ช่องจมูก ผิวหนังและเยื่อชุ่มของคนและสัตว์ (Todar, 2005) เชื้อชนิดที่ก่อโรคก็มีความหลากหลาย เช่น ทำให้เกิดเป็นฝีหนองทั่วไปที่บริเวณภายนอก การติดเชื้อที่อวัยวะภายในต่าง ๆ โรคอาหารเป็นพิษ ตลอดจนภาวะช็อกที่เรียกว่า toxic shock syndrome (TSS) เนื่องจากมีโปรตีนมากกว่า 30 ชนิดที่เชื้อชนิดนี้สามารถผลิตและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ได้ (Iandolo, 1989) โดยที่ส่วนใหญ่เป็นท็อกซินที่ก่อความรุนแรงต่อทั้งมนุษย์และสัตว์ เช่น exfoliative toxins (ETA และ ETB), toxic shock syndrome toxin (TSST-1) และ Staphylococcus enterotoxin (SE) family ได้แก่ SEA, SEB, SEC (1, 2, 3), SED, SEE, SEG, SEH, SEI และ SEJ เป็นต้น (Yarwood and Schlievert, 2000) โดยทั่วไปเชื้อ *S. aureus* แต่ละสายพันธุ์มักจะผลิตท็อกซินเพียงชนิดเดียว อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อบางสายพันธุ์ผลิตท็อกซินสองชนิดหรือมากกว่าได้ เช่น เชื้อ *S. aureus* ที่เป็นสาเหตุของ TSS จะผลิต TSST-1 คู่กับ SEC หรือ TSST-1 คู่กับ SEA เป็นต้น (Crass and Bergdoll, 1986; Okada et al., 1999)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะรายงาน อาการ ลักษณะทางพยาธิวิทยา รวมทั้งวิธีการตรวจและวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบแบบกึ่งเฉียบพลันอย่างรุนแรงในแพะ ซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อ *S. aureus* ที่ผลิต enterotoxin G และ I ทำให้แพะตายภายในเวลาเพียง 3 วัน เพื่อเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาของการเกิดโรคในแพะ ตลอดจนวิธีป้องกันและรักษาโรคอย่างเหมาะสม

อุปกรณ์และวิธีการ

ประวัติสัตว์

แพะจากฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดอ่างทอง พันธุ์ Saanen เพศเมีย อายุ 2 ปี 2 เดือน คลอดลูกเมื่อวันที่ 1 มิถุนายน 2551 ได้ลูก 2 ตัว ตัวแรกหนัก 3 กิโลกรัม ตัวที่สองหนัก 1.9 กิโลกรัม ลูกตัวที่สองตายในวันรุ่งขึ้น เนื่องจากไม่แข็งแรงและมีน้ำหนักตัวน้อย หลังจากคลอดลูกได้ 1 วัน แพะเริ่มแสดงอาการป่วย โดยมีไข้สูง ซึม และไม่กินอาหาร เจ้าของให้ยาลดไข้ (Novacilan®) และยาปฏิชีวนะ (Shotapen®) แต่การรักษาไม่ได้ผล แพะตายในคืนวันที่ 4 มิถุนายน 2551 เจ้าของจึงแจ้งแก่เจ้าหน้าที่สำนักงานปศุสัตว์อ่างทอง เพื่อส่งซากแพะมาทำการชันสูตรโรคที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ในวันที่ 5 มิถุนายน 2551

การตรวจทางพยาธิวิทยา

ตรวจดูรอยโรคภายนอกด้วยตาเปล่า (external examination) แล้วผ่าซากเพื่อตรวจดูรอยโรคของอวัยวะภายใน (internal examination) ได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต มดลูก และลำไส้ทุกส่วน รวมทั้งสมอง เก็บเนื้อเยื่อสดส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา ส่วนการตรวจทางพยาธิวิทยา ทำโดยเก็บชิ้นเนื้อดังกล่าวแช่ใน 10% neutral buffered formalin เพื่อนำมาผ่านกระบวนการมาตรฐานทางพยาธิวิทยา แล้วฝังชิ้นเนื้อใน paraffin นำไปตัดให้มีความหนาประมาณ 3 ไมครอน เพื่อทำเป็นสไลด์เนื้อเยื่อ แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธีของ Luna (1968) จากนั้นนำไปตรวจหารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

สำหรับสไลด์เนื้อเยื่อส่วนที่ตรวจพบกลุ่มของแบคทีเรีย นำไปย้อมสี Gram ตามวิธีการของ Sheehan และ Hrapchak (1973) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรค

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

เพาะเชื้อจากตัวอย่างอวัยวะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 7% defibrinated sheep blood agar (SBA) และ MacConkey agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วตรวจหาโคโลนีที่สงสัยเป็นเชื้อก่อโรค ทำการพิสูจน์เชื้อโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Carter and Cole, 1990) และทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพที่เหมาะสม โดยวิธี disk diffusion (NCCLS, 1997)

การตรวจหาท็อกซินโดยวิธี multiplex PCR

เป็นการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างท็อกซินต่าง ๆ ของเชื้อ *S. aureus* หลังจากที่แยกเชื้อนี้ได้จากตัวอย่าง เพื่อจะได้ทราบชนิดของท็อกซินที่เชื้อผลิตขึ้น วิธีการคือ สกัด DNA จากเชื้อโดยการต้ม นำส่วนน้ำใสมาใส่ในส่วนผสมที่แบ่งเป็น 2 ชุด สำหรับใช้ในโปรแกรม A และ B แต่ละชุดมีปริมาตรรวม 45 µl ประกอบด้วย multiplex mastermix (Qiagen, Germany) และ primer แต่ละตัวในชุดเดียวกันปริมาณ 2 µM โดยที่ primer ชุด A ประกอบด้วย *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* และ *tst* (Mehrotra et al., 2000) ส่วน primer ชุด B ประกอบด้วย

seg, *seh* และ *sei* (Omoe et al., 2002) primer ทั้งสองชุดมีรายละเอียด ดังตารางที่ 1 เติมตัวอย่าง DNA 5 µl ลงในแต่ละชุด และมี DNA ของเชื้ออ้างอิงเป็นตัวควบคุมบวกและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ นำเข้าเครื่อง thermal cycler (Biorad, Germany) แยกเป็น 2 โปรแกรมตามชุดของ primer ได้แก่ โปรแกรม A ประกอบด้วย denaturing 94ºC นาน 30 วินาที annealing 57ºC นาน 2 นาที และ extension 72ºC นาน 1.30 นาที จำนวน 35 รอบ และโปรแกรม B ประกอบด้วย denaturing 94 ºC นาน 30 วินาที annealing 55ºC นาน 2 นาที และ extension 72 ºC นาน 1.30 นาที จำนวน 35 รอบ โดยทำการ preheat ที่ 95º C นาน 15 นาที และ final extension ที่ 72 º C นาน 10 นาที เหมือนกันทั้งสองโปรแกรม จากนั้นนำมาหา PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

Table 1. Sequence of oligonucleotide primers and size of PCR products

Gene	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	product size (bp)	program
sea	GSEAR-1	GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG	102	A
	GSEAR-2	CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG		
seb	GSEBR-1	GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC	164	A
	GSEBR-2	CCA AAT AGT GAC GAG TTA GG		
sec	GSECR-1	AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG	451	A
	GSECR-2	CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG		
sed	GSEDR-1	CCA ATA ATA GGA GAA AAT AAA AG	278	A
	GSEDR-2	ATT GGT ATT TTT TTT CGT TC		
see	GSEER-1	AGG TTT TTT CAC AGG TCA TCC	209	A
	GSEER-2	CTT TTT TTT CTT CGG TCA ATC		
seg	SEG-1	AAG TAG ACA TTT TTG GCG TTC C	287	B
	SEG-2	AGA ACC ATC AAA CTC GTA TAG C		
seh	SEH-1	GTC TAT ATG GAG GTA CAA CAC T	213	B
	SEH-2	GAC CTT TAC TTA TTT CGC TGT C		
sei	SEI-1	GGT GAT ATT GGT GTA GGT AAC	454	B
	SEI-2	ATC CAT ATT CTT TGC CTT TAC CAG		
tst	GTSSTR-1	ACC CCT GTT CCC TTA TCA TC	326	A
	GTSSTR-2	TTT TCA GTA TTT GTA ACG CC		

ผล

ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา

จากการตรวจดูรอยโรคด้วยตาเปล่า พบเต้านมทั้งข้างซ้ายและขวามีการอักเสบอย่างรุนแรง มีสีแดงปนม่วง ลักษณะบวมแข็ง ขยายใหญ่ประมาณ 4-5 เท่าของเต้านมปกติ (Fig. 2) เมื่อเปิดผ่าซาก พบจุดเลือดออกกระจายทั่วไปที่กล้ามเนื้อหัวใจ ปอดมีการคั่งเลือดทั้ง lobe ซ้ายและขวา ส่วนเต้านมที่บวมอักเสบ เมื่อฝานหน้าตัดพบท่อน้ำนมหนาตัวและขยายใหญ่ น้ำนมสีขาวข้นกว่าปกติแต่ไม่มีกลิ่นเหม็น

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคดังนี้ ปอดพบรอยโรคจุดเลือดออกกระจายอยู่ทั่วไป และมีการอักเสบแบบ subacute insterstitial pneumonia แบบเป็นกลุ่มเล็ก ๆ กระจายหรือขยายเชื่อมต่อกัน (Fig. 3) โดยมีการเพิ่มจำนวนของ type 2 pneumocytes และการแทรกซึมของเซลล์ lymphocytes, neutrophils plasma cells และ alveolar macrophage ที่ interstitial tissues และปอดแฟบบางส่วน หัวใจพบการเสื่อมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจร่วมกับการเกิดหย่อมเลือดออกกระจายทั่วไป (Fig. 4) ส่วนที่เต้านม เนื่องจากแพะเพิ่งคลอดลูก เต้านมอยู่ใน lactating period จึงเห็นต่อมน้ำนม (secretory parenchymal glands) พัฒนาเพิ่มจำนวนมากขึ้น มีลักษณะเป็นกลุ่ม alveoli กระจายอยู่ทั่วไป โดยส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่แบ่งแยกเนื้อเยื่อเต้านมออกเป็นแต่ละ lobule มีจำนวนลดลง ซึ่งเป็นลักษณะปกติ ส่วนรอยโรคพบการอักเสบแบบกึ่งเฉียบพลันอย่างรุนแรง (severe diffuse subacute mastitis) (Fig. 5) โดยมี dilation ของ alveolar lumen หรือ lactiferous ducts และมีการสะสมของเซลล์ตาย macrophages และบางส่วนพบ neutrophils รวมทั้งกลุ่มของแบคทีเรีย ซึ่งพบทั้งใน cytoplasm ของ macrophages และกระจัดกระจายอยู่ใน lumen ในขณะที่ interalveolar stroma มีการบวมน้ำอย่างรุนแรง ร่วมกับการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือดที่คั่งเลือด และพบการแทรกตัวของ lymphocytes, neutrophils และ plasma cells บ้างแต่ค่อนข้างน้อย นอกจากนั้น alveolar epithelium มีการเสื่อมแบบ vacuolar degeneration และบางเซลล์มีการลอกหลุดไปรวมกับกลุ่มเซลล์ใน lumen ของ alveoli ทั้งนี้ตรวจไม่พบรอยโรค necrosis ในเนื้อเยื่อเต้านม

ผลการย้อมสี Gram จากสไลด์เนื้อเยื่อของเต้านมที่พบรอยโรคดังกล่าว พบกลุ่มแบคทีเรียรูปร่างกลมติดสีน้ำเงินม่วง ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียกรัมบวก (Fig. 6)

ผลการตรวจทางแบคทีเรียวิทยาและ multiplex PCR

พบโคโลนีของเชื้อจำนวนมาก ลักษณะกลมใหญ่ขอบเรียบ สีขาวเหลือง ล้อมรอบด้วย beta-hemolysis เป็นวงกว้าง โดยขึ้นเฉพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SBA จากตัวอย่างเต้านมของแพะ จึงทำการพิสูจน์เชื้อโดยการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อ *S. aureus* การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพต่าง ๆ พบว่าเชื้อมีความไวต่อยา amoxicillin/clavulanic acid, enrofloxacin, erythromycin, gentamycin, kanamycin, ofloxacin, oxacillin, sulfamethoxazole/ trimethoprim, tetracycline และดื้อต่อยา ampicillin, cephalexin และ penicillin G

การตรวจหาท็อกซินโดยวิธี multiplex PCR พบแถบ DNA 2 แถบ จาก primer ชุด B มีขนาดประมาณ 287 และ 454 bp แสดงว่า *S. aureus* ที่แยกได้จากแพะตัวนี้เป็นเชื้อที่ผลิต SEG และ SEI (Fig. 1)

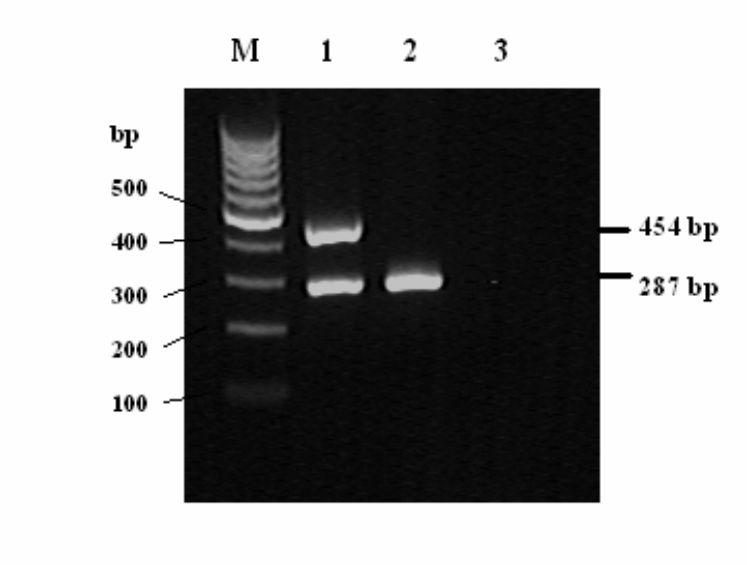

Fig. 1 Detection of enterotoxin genes in *S. aureus* isolated from goat by multiplex PCR showed the amplified fragments of SEG and SEI at 287 and 454 bp, respectively. Lane M, 100 bp ladder marker; Lane 1, *S. aureus* isolated from goat; Lane 2, *S. aureus* ATCC 43300 (positive control for SEG); Lane 3, distilled water (negative control).

Fig. 2 Both sides of goat udder were red, hard and swollen, approximately 4- 5 times larger than normal udder.

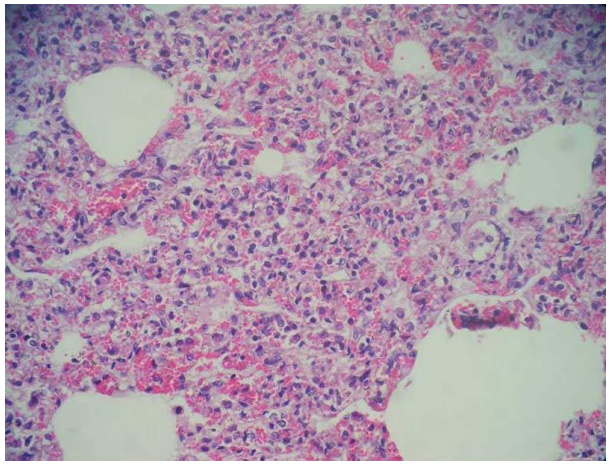

Fig. 3 Lung ; subacute interstitial pneumonia with thickening of interstitium by proliferated type 2 pneumocytes and infiltrated inflammatory cells (H&E, 40x)

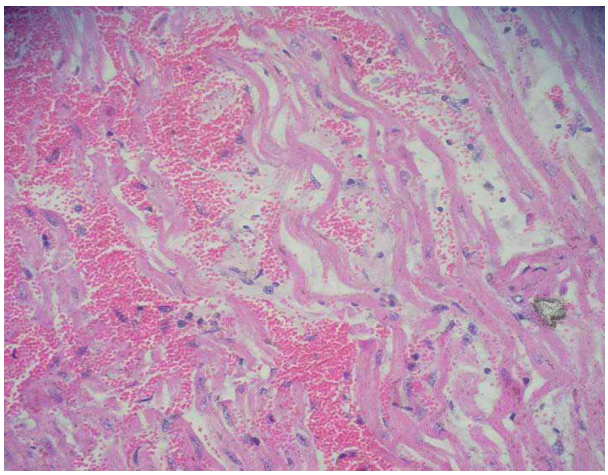

Fig. 4 Heart ; cardiac myocyte degeneration with petechial hemorrhages (H&E, 40x)

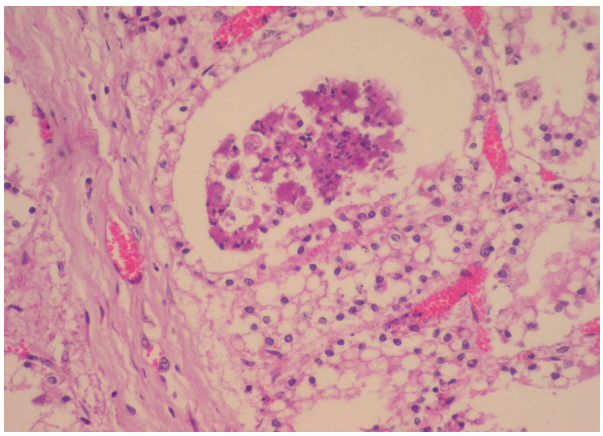

Fig. 5 Mammary gland ; severe subacute mastitis with accumulation of cellular debris and macrophages in a dilated alveolar lumen which was surrounded by interalveolar stroma edema (H&E, 40x)

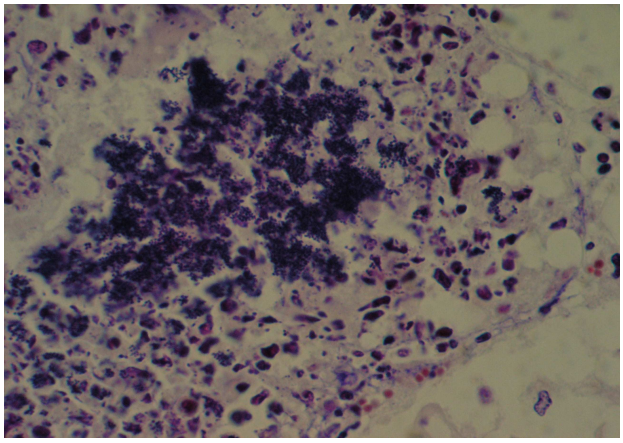

Fig. 6 Clusters of gram positive cocci bacteria in the alveolar lumen of mammary gland (Gram, 100x)

วิจารณ์

จากการตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่เต้านมทั้งสองข้าง พบว่าเต้านมของแพะมีการอักเสบแบบกึ่งเฉียบพลันอย่างรุนแรง (severe subacute mastitis) และพบกลุ่มแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีกรัมบวก ทั้งใน cytoplasm ของ macrophage และที่กระจัดกระจายอยู่ใน lumen อันเป็นลักษณะเด่นของโรคเต้านมอักเสบจากเชื้อ *S. aureus* ที่ทำให้แยกออกจากการติดเชื้อชนิดอื่นได้ค่อนข้างชัดเจน (Hazlett et al., 1984; Bezek and Hull, 1995) ซึ่งก็สอดคล้องกับผลการตรวจทางแบคทีเรียที่พบเชื้อ *S. aureus*

แพะติดเชื้อและแสดงอาการโรคเต้านมอักเสบได้บ่อย โดยเฉพาะในสัปดาห์แรกของการให้นม เต้านมหนึ่งหรือทั้งสองข้างจะบวม ร้อนและเจ็บ แพะมีไข้ ไม่กินอาหาร หายใจขัด เชื้อ *S. aureus* มักเป็นสาเหตุหลักของ clinical mastitis ในแพะและแกะ โดยเชื้อที่พบในสัตว์พวกนี้จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukotoxic) มากกว่าเชื้อที่พบในโค (Bergonier et al., 2003) กรณี fatal mastitis มักเนื่องจากแพะมีอาการปอดบวมร่วมกับมีเชื้อและท็อกซินในกระแสเลือด โดยทั่วไปพบว่าสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *S. aureus* ร่วมกับ *M. haemolytica* (Cable et al., 2004) อย่างไรก็ตามไม่มีข้อมูลกล่าวถึงชนิดของท็อกซินของเชื้อเหล่านั้น Bezek and Hull (1995) รายงานการตายของแพะด้วยโรค peracute gangrenous mastitis จากเชื้อ *S. aureus* ที่ผลิต TSST-1 และ SEC โดยเริ่มแสดงอาการหลังจากคลอดลูกได้เพียง 2 ชั่วโมง ไม่ตอบสนองต่อการรักษาและตายใน 16 ชั่วโมงถัดมา De Buyser et al. (1987) พบว่า 60% ของเชื้อ *S. aureus* (n=50) ที่แยกได้จากแพะและแกะที่แสดงอาการเต้านมอักเสบเป็นเชื้อที่ผลิต TSST-1 และ SEC ส่วน Jones and Wieneke (1986) พบว่าโค 4 ตัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจากเชื้อ *S. aureus* ที่ผลิต TSST-1 และ SEC ไม่ตอบสนองต่อการรักษา ในขณะที่โค 5 ตัวที่เป็นโรคจากเชื้อที่ไม่ผลิตท็อกซินตอบสนองดีต่อการรักษา Ribiero et al. (2007) พบแพะเป็นโรค gangrenous mastitis จากเชื้อ *E. coli*, *C. perfringens* และ *S. aureus* ร่วมกัน แต่ไม่ได้ตรวจหาท็อกซินของเชื้อ สำหรับในประเทศไทยน่าจะมีการเกิดโรคเต้านมอักเสบในหลายลักษณะเช่นกัน แต่การศึกษาถึงชนิดและความรุนแรงของ

เชื้อยังมีน้อย ทำให้ไม่ค่อยมีการรายงานโรคมากนัก ครั้งนี้จึงเป็นรายงานที่แสดงข้อมูลการเกิดโรค severe subacute mastitis ในแพะ จากการติดเชื้อ *S. aureus* ที่ผลิต SEG และ SEI

การศึกษาของ Smith and Johnson (1975) พบว่าท็อกซินบางชนิดของเชื้อ *S. aureus* สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ T lymphocyte (T cell) ในระบบภูมิคุ้มกัน ต่อมาจึงทราบว่าความสามารถนี้ก่อให้เกิดผลกระทบจากการตอบสนองนั้น (Thibodeau and Sekaly, 1995) ท็อกซินเหล่านี้มีคุณสมบัติเรียกว่า superantigen ได้แก่ TSST-1 และ enterotoxins ซึ่งถ้าได้รับทางการกินจะเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ แต่ถ้าได้รับเข้าสู่กระแสเลือดจะแสดงความเป็น superantigen ที่อาจกระตุ้น T cell subpopulation ได้มากกว่าแอนติเจนปกติถึง 2,000 เท่า ทำให้มีการแบ่งตัวและหลั่ง cytokines หลากชนิดออกมาในปริมาณสูง ส่งผลให้เกิดภาวะ toxic shock ขึ้น (Todar, 2005) ซึ่งรอยโรคที่เกิดในกระต่ายที่ได้รับ TSST-1 พบการเสื่อมของเซลล์ของผนังเส้นเลือดในอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะที่ปอดและตับ ทำให้มีเลือดคั่ง บวมน้ำ และมีการแทรกตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ในอวัยวะดังกล่าว และพบหย่อมการเสื่อมและอักเสบของกล้ามเนื้อหัวใจ (Rasheed et al., 1985) การศึกษาการก่อโรคของ SEB ซึ่งเป็น prototype enterotoxin ใน Rhesus macaques พบว่าลิงแสดงอาการอาหารเป็นพิษภายในเวลา 24 ชั่วโมง และหายได้เองภายใน 40 ชั่วโมง แต่ต่อมาที่ 48 ชั่วโมงหลังจากได้รับท็อกซิน สัตว์กลับอ่อนเพลียลง หายใจลำบาก หน้าซีด และตายภายใน 4 ชั่วโมงหลังจากเริ่มแสดงอาการ ตรวจพบรอยโรค multifocal to coalescing interstitial pneumonia, edema of peribronchovascular connective tissue spaces, distended perivascular lymphatics และ edema of alveolar spaces ของปอด รวมทั้งการแทรกซึมของเซลล์ lymphocytes, macrophages และ neutrophils ที่อวัยวะสำคัญหลายแห่ง ซึ่งเป็นภาวะของ multiple organ failure (Ulrich et al., 2007)

สำหรับ SEG และ SEI เพิ่งมีรายงานการพบในปี 1998 ท็อกซินทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติกระตุ้นการสร้าง T cell และตรวจพบการหลั่งสาร interleukin 2 และ interferon gamma (Munson et al., 1998) Jarraud et al. (1999) พบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่ผลิต SEG และ SEI ก่อให้เกิด TSS ในผู้ป่วย 9 ราย และโรค scarlet fever ในผู้ป่วย 3 ราย การศึกษาในประเทศญี่ปุ่นก็พบว่าเชื้อ *S. aureus* จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบเป็นเชื้อที่ผลิต SEG และ SEI 33.3% (7/21) และตรวจพบเชื้อชนิดนี้ในคนปกติได้เช่นกัน (2/18) (Omoe et al., 2002) นอกจากนี้ Dauwalder et al. (2006) เปรียบเทียบคุณสมบัติการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T cell และการอักเสบระหว่าง SEA และ SEG พบว่าท็อกซินทั้งสองชนิดกระตุ้นการสร้าง T cell ได้ไม่แตกต่างกัน แต่ SEA กระตุ้นการหลั่ง tumor necrosis factor alpha ซึ่งเป็น pro-inflammatory cytokine ได้สูงกว่า SEG มาก แสดงว่า SEA ก่อให้เกิดการอักเสบได้รุนแรงกว่า SEG แม้จะไม่มีรายงานการศึกษาผลของท็อกซินนี้ในแพะโดยตรง แต่รายงานข้างต้นชี้ให้เห็นว่า SEG และ SEI มีคุณสมบัติเป็น superantigen และส่งผลต่อการเกิดโรคได้อย่างคล้ายคลึงกันทั้งในคนและสัตว์ต่าง ๆ

การเกิดโรคในแพะครั้งนี้ แม้จะไม่ทราบกลไกการก่อโรคที่แน่ชัด เนื่องจากยังมีการศึกษาถึงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในเต้านมของแพะไม่มากนัก อย่างไรก็ตามรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบมีความสอดคล้อง

กับรายงานการทดสอบผลของ superantigen ข้างต้น (Rasheed et al., 1985; Ulrich et al., 2007) แม้จะพบเชื้อจำกัดอยู่เพียงที่เต้านมและทำให้เกิดการอักเสบของเต้านมอย่างรุนแรง แต่รอยโรคที่ปอดและหัวใจ น่าจะบ่งชี้ได้ถึงผลกระทบจากการแพร่ของ SEG และ SEI ไปสู่อวัยวะสำคัญดังกล่าวอันเป็นเหตุให้แพะตาย แต่น่าจะมีความรุนแรงน้อยกว่าในรายที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* ที่ผลิต TSST-1 และ SEC (Bezek and Hull, 1995) ในครั้งนี้แพะแสดงอาการอยู่ 3 วัน เจ้าของทำการรักษาโดยให้ยาลดไข้และยากลุ่ม penicillin และ streptomycin ได้แก่ Shotapen® แต่การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ พบว่าเชื้อดื้อต่อยา penicillin G แพะจึงไม่ตอบสนองต่อการรักษา หากได้มีการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมและรวดเร็ว อาจทำให้เชื้อถูกทำลายและไม่มีการปล่อยท็อกซินเข้าสู่อวัยวะอื่น ๆ ได้ แม้ว่าเชื้อ *S. aureus* ที่ผลิต SEG และ SEI เป็นเชื้อที่พบได้ทั้งในคนปกติ สิ่งแวดล้อม แต่ก็มีหลายรายงานที่แสดงว่าเชื้อนี้ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ทั้งในสัตว์และคน เกษตรกรจึงควรระมัดระวังไม่ให้สัตว์ได้รับเชื้อโดยเฉพาะในระหว่างการคลอดลูกและการให้นม โดยทำความสะอาดบริเวณคอกคลอด สิ่งรองนอน เครื่องรีดนม การเช็ดเต้านมและจุ่มหัวนมก่อนรีด ตลอดจนหมั่นดูแล และทำความสะอาดมือของผู้รีดนมให้ดี เนื่องจากบริเวณเหล่านี้เป็นแหล่งสะสมตัวของเชื้อ *S. aureus* รวมทั้งรักษาความสะอาดและสุขอนามัยของตัวเกษตรกรเอง เพื่อป้องกันตนเองจากการติดเชื้อไม่ว่าจะเป็นช่องทางใด ๆ เช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

Bergonier, D., Cremoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G. and Berthelot, X. 2003. Mastitis of Dairy small ruminants. Vet. Res. 34: 689 - 716.

Bezek, D.M. and Hull, B.L. 1995. Peracute gangrenous mastitis and cheilitis associated with enterotoxin - secreting *Staphylococcus aureus* in a goat. Can. Vet. J. 36: 106 - 107.

Cable, C.S., Peery, K. and Fubini, S.L. 2004. Radical mastectomy in 20 ruminants. Vet. Surg. 33: 263 - 266.

Carter, G.R. and Cole, R. J. 1990. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5th ed. California, USA. 620 p.

Crass, B.A. and Bergdoll, M.S. 1986. Toxic involvement in toxic shock syndrome. J. Infect. Dis. 153(5): 918 - 926.

Dauwalder, O., Thomas, D., Ferry, T., Debard, A., Badiou, C., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G. and Monneret, G. 2006. Comparatives inflammatory properties of staphylococcal superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock. J. leukoc. Biol. 80: 753 - 758.

De Buyser, M.L., Dilasser, F., Hummel, R. and Bergdoll, M. S. 1987. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin- 1 production by Staphylococci isolated from goat's milk. Int. J. Food Microbiol. 5: 301 - 309.

Hazlett, M. J., Little, P. B., Maxie, M. G. and Barnum, D. A. 1984. Fatal mastitis of dairy cows: A retrospective study. Can. J. Comp. Med. 48: 125 - 129.

Iandolo, J.J. 1989. Genetic analysis of extracellular toxin of *Staphylococcus aureus*. Annu. Rev. Microbiol. 43: 375.

Jarraud, S., Cozon, G., Vandenesch, F., Bes, M., Etienne, J. and Lina, G. 1999. Involvement of enterotoxins G and I in Staphylococcal scarlet fever. J. Clin. Microbiol. 37(8): 2446 - 2449.

Jones, T. O. and Wieneke, A. A. 1986. Staphylococcal toxic shock syndrome. Vet. Rec. 119: 435 - 436.

Luna, L. G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Arm Forces Institute of Pathology. 3rd ed., McGraw-Hill Inc., New York, U.S.A. 217 p.

Mehrotra, M., Wang, G. and Johnson, W. M. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin-1, and methicillin resistance. J. Clin. Micobiol. 38(3): 1032 - 1035.

Munson, S., Tremaine, M. T., Betley, M. J. and Welch, R. A. 1998. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 66(7): 3337 - 3348.

National committee for clinical laboratory standards (NCCLS). 1997. Performance standard for antimicrobial disk susceptibility test. 6thed. NCCLS. Document M2 - A6, Pennsylvania, USA. 26 p.

Okada, T., Furukawa, S., Miwa, K., Sakai, R and Sugiyama, J. 1999. A new exanthematous disease in newborn infants caused by exotoxins producing *Staphylococcus aureus* exotoxins production of the isolates and serum levels of antitoxin antibody in the patients and umbilical cord blood. J. Japan. Assoc. Infect. Dis. 73(9): 893 - 900.

Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D., Ueda, S. and Shinakawa, K. 2002. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates haboring *seg*, *seh* or *sei* genes. J.Clin.Microbiol. 40: 857 - 862.

Radostits, O. M., Gay, C. C. and Hinchcliff, K. W. and Constable, R.D. 2007. Veterinary medicine- A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed., Saunders Ltd., Philadelphia, U.S.A. 2065 p.

Rasheed, J. K., Arko, R. J., Feeley, J. C., Chandler, F. W., Thornsberry, C., Gibson, R. J., Cohen, M. L., Jeffries, C. D. and Broome, C. V. 1985. Acquired ability of *Staphylococcus aureus* to produce toxic shock associated protein and resulting illness in rabbit model. Infect. Immun. 47(3): 598 - 604.

Ribeiro, M. G., Lara, G.H.B., Bicudo, S.D., Souza, A.V.G., Salerno, T., Siqueira, A. K. and Geraldo, J.S. 2007. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59(3): 810 - 812.

Sheehan, D.C. and Hrapchak, B.B. 1973. Theory and practice of histotechnology. 2nd ed. The C.V. Mosby Company. London, U.K. 218 p.

Smith, B. and Johnson, H. 1975. The effect of *Staphylococcus* enterotoxins on the primary in vitro immune response. J. Immunol. 115: 575.

Thibodeau, J. and Sekaly, R.P. 1995. Bacterial superantigens, structure, function and therapeutic potential. Springe-Verlag, Heidelberg, Germany. 245 p.

Todar, K. 2005. *"Staphylococcus*." [Online] available: http://www.textbookofbacteriology.net/staph. html

Ulrich, R.G., Sidell, S., Taylor, T.J., Wilhelmsen, C. L. and Franz, D. R. 2007. Staphylococcal enterotoxin B and related pyrogenic toxins. In: Medical aspects of chemical and biological warfare. Office of the Surgeon General, Rockville, Maryland, U.S.A. p. 621 - 628.

Yarwood, J. M. and Schlievert, P. M. 2000. Toxin production. In: *Staphylococcus aureus* infection and disease. edited by Honeyman, A. L., Friedman, H and Bendinelli, M., Plenum Publishers. New York, U.S.A. p. 93 - 115.

Fatal mastitis in a goat caused by enterotoxins G and I producing *Staphylococcus aureus*

Pacharee Thongkamkoon* Sontana mimaphan Apasara Worarach

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development

Kaset klang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding person: Tel. 025798909 Fax. 025798919 email: patchareet@dld.go.th

Abstract

A Saanen doe from a farm in Angthong province was sick one day post parturition. The clinical signs were high fever, depression, anorexia and the doe died on day three after clinical onset. The entire udder was reddish, hard and swollen. Histopathological examination revealed cardiac myocyte degeneration with petechial hemorrhages, multifocal to coalescing interstitial pneumonia with a proliferation of alveolar macrophages. Diffuse petechial hemorrhages and lung atelectasis were also present. Cellular debris, macrophages, small number of neutrophils as well as large clumps of basophilic cocci bacteria were accumulated in dilated alveolar lumen and lactiferous ducts of mammary gland. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) was recovered in pure culture from the udder. The isolate was sensitive to amoxicillin/clavulanic acid, enrofloxacin, erythromycin, gentamycin, kanamycin, ofloxacin, oxacillin, sulfamethoxazole/ trimethoprim and tetracycline, but resistant to ampicillin, cephalexin and penicillin G. To detect enterotoxin genes of the isolate, 2 sets of multiplex PCR were performed and enterotoxins G and I gene fragments were positively amplified. These results indicated that the doe was infected with enterotoxins G and I producing *S. aureus* that caused severe subacute mastitis and respiratory failure.

Keywords: Fatal mastitis, goat, *Staphylococcus aureus*, enterotoxin G, enterotoxin I