

การศึกษาเปรียบเทียบการเพาะแยกเชื้อยูเรียพลาสมาจากช่องคลอดแม่โค ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด

จันทร์เพ็ญ สุวิมลธีระบุตร* ปราจีน วีรกุล

Abstract

Junpen Suwimonteerabutr^{1*} Prachin Virakul¹

A COMPARATIVE STUDY ON THE ISOLATION OF UREAPLASMA DIVERSUM FROM THE VULVAE OF THE CATTLE, USING THREE DIFFERENT CULTURE MEDIA

The objective of the present study was to investigate the optimum culture media for *Ureaplasma diversum*. The study used 3 culture media, TR broth and differential A7 agar (1), Boston broth and differential A7 agar (2) and differential A7 agar (3). The samples were collected from the vulvae of 15 cows that had a reddish, mucosal, vulva lesion and 15 cows without the lesion. A liquid culture media was prepared using the serial, tenfold, dilution method to avoid contamination from other microflora. The type of *U. diversum* was determined using A7 agar mixed with manganese sulfate. Positive results were observed as brown colonies with a variety of shapes, such both round and smooth. The study revealed that *U. diversum* could be cultured in media 1, 2 and 3 from 33.3%, 53.3% and 26.7%, respectively, from cattle with lesions of the disease. *U. diversum* could also be cultured in media 1, 2 and 3 from 13.3% of cattle without lesions of the disease. Using media 2, the proportion of *U. diversum* cultured was higher in cattle with the lesion, compared with cattle without the lesion ($p<0.05$). In conclusion, Boston broth with differential A7 agar (media 2) was recommended as the preferred medium for culturing *U. diversum*.

Keywords : ureaplasma, isolation, reproductive system, cow

Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

*Corresponding author

ภาควิชาสูติศาสตร์ เภสัชเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

จันทร์เพ็ญ สุวิมลธีระบุตร* ปราจีน วีรกุล

การศึกษาเปรียบเทียบการเพาะแยกเชื้อยูเรียพลาสมาจากช่องคลอดแม่โคด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพ อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ในการเพาะแยกเชื้อยูเรียพลาสมา ไคเวอร์ซัม (*Ureaplasma diversum*) จากช่องคลอดแม่โค อาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดที่ 1 ประกอบด้วย TR broth และ differential A7 agar ชนิดที่ 2 Boston broth และ differential A7 agar และชนิดที่ 3 ประกอบด้วย differential A7 agar อย่างเดียว ทำการแยกเชื้อยูเรียพลาสมา (*Ureaplasma diversum*) จากแม่โคนมที่มีรอยโรคเป็นพื้นแดง บริเวณเยื่อปากช่องคลอด จำนวน 15 ตัว และแม่โคที่ไม่มีรอยโรค จำนวน 15 ตัว อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหล่านี้ใช้วิธี serial tenfold dilutions เพื่อเป็นการลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่น และคัดเลือกชนิดของ *U. diversum* ด้วย A7 agar ที่ผสมแมงกานีสซัลเฟต ผลการเกิดโคโลนีสีน้ำตาลดำมีลักษณะหลายรูปร่าง เช่น รูปร่างเป็นไข่ดาวกลม รามเรียบ จากผลการตรวจในแม่โคนมที่มีรอยโรค พบเชื้อยูเรียพลาสมาที่ปากช่องคลอดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 33.3% 53.3% และ 26.7% ตามลำดับ ส่วนแม่โคที่ไม่มีรอยโรค พบเชื้อยูเรียพลาสมาบริเวณปากช่องคลอดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 1, 2 และ 3 เท่าๆ กัน คือ 13.3% ในการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 2 พบว่าโคที่มีรอยโรคสามารถแยกเชื้อได้มากกว่าโคที่ไม่มีรอยโรคอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การศึกษานี้สรุปว่าการตรวจหาเชื้อยูเรียพลาสมาจากช่องคลอดของแม่โคควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ประกอบด้วย Boston broth และ differential A7 agar

คำสำคัญ: ยูเรียพลาสมา การแยกเชื้อ ระบบสืบพันธุ์ แม่โค

บทนำ

เชื้อยูเรียพลาสมา หรือ T-mycoplasma (Thornber, 1982) จัดอยู่ใน Family Mycoplasmataceae โคโลนีมีขนาดเล็กมาก มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2-1.0 ไมครอน ไม่มีผนังเซลล์ (Kuhn and Hopkins, 1982) สามารถไฮโดรไลซ์ยูเรียได้ (Shepard and Lunceford, 1967) เชื้อในแฟมิลีดังกล่าว มีเพียงสปีชีส์เดียวที่พบในโค คือ *Ureaplasma diversum* (Howard and Gourlay, 1982) การติดเชื้อ *Ureaplasma diversum* ทำให้เกิดโรคยูเรียพลาสโมซิส อาการของโรค แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ แบบเฉียบพลัน พบหนองลักษณะเหนียว เปรอะเปื้อนบริเวณปากช่องคลอด อาการอีกชนิดที่พบ คือ แบบเรื้อรัง ซึ่งจะไม่มีหนองไหล เชื้อปากช่องคลอดจะบวม มีน้ำหล่อลื่นไหล เชื้อยูเรียพลาสมาพบได้ทั้งในอวัยวะเพศของทั้งโคเพศผู้และเพศเมีย ในโคเพศผู้มีรายงานว่า พบเชื้อยูเรียพลาสมา ในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง (Ungureanu et al., 1986) โดยพ่อโคไม่แสดงอาการทางคลินิก แต่เป็นพาหะนำโรคไปสู่โคเพศเมียได้ (Molira et al., 1992) ส่วนในโคเพศเมียมีรายงานว่า

พบเชื้อยูเรียพลาสมาในโคที่มีอาการปากช่องคลอดอักเสบ (granular vulvitis) เชื้อบวมดลูกอักเสบ ท่อนำไข่อักเสบ การผสมไม่ติด แท้ง และลูกตายแรกคลอดได้ (Doig et al., 1981; Molira et al., 1992) ลักษณะของปากช่องคลอดอักเสบ คือ มีเลือดมาเลี้ยงมาก บวม มีตุ่มแดงบนเนื้อเยื่อช่องคลอด ขนาด 1-2 มิลลิเมตร (Miller et al., 1994) เชื้อ *Ureaplasma urealyticum* แยกได้ครั้งแรกในคนโดย Shepard (1954) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Shepard's U-9 broth, A-3 solid หรือ A-5 solid แต่อาหารเหล่านี้ไม่เหมาะสมกับการแยกเชื้อในโค เพราะต่างสปีชีส์กัน (Carter, 1984) ต่อมา Taylor-Robinson และคณะ (1968) พบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการแยกเชื้อในโค คือ Taylor-Robinson medium แต่มีการพบอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ คือ Boston broth ใช้ในการเพาะเชื้อ *Ureaplasma urealyticum* ในคน (Leland et al., 1982) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการแยกเชื้อยูเรียพลาสมาจากตัวอย่างที่ได้จากช่องคลอดของแม่โค

วัสดุและวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างจากแม่โคที่มีรอยโรค เช่น พบเม็ดตุ่มใสหรือแดงหรือพบตุ่มหนองบริเวณปากช่องคลอด (vulva lip) จำนวน 15 ตัว และแม่โคที่ไม่มีรอยโรคบริเวณปากช่องคลอด จำนวน 15 ตัว แม่โคดังกล่าวเป็นแม่โคจากฟาร์มโคนมแห่งหนึ่งในจังหวัดชลบุรี เก็บตัวอย่างโดยทำความสะอาดบริเวณปากช่องคลอดด้านนอกด้วยสบู่และน้ำยาฆ่าเชื้อเช็ดให้แห้งด้วยกระดาษฟาง ทำการเก็บตัวอย่าง 3 ตำแหน่ง โดยใช้ไม้พันสำลียาว 15 ซม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ป้ายที่ตำแหน่งปากช่องคลอดแล้วนำตัวอย่างใส่ลงใน Transport media - PPLO broth แช่ในน้ำแข็งนำส่งตรวจห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ ภายใน 24 ชั่วโมง เพื่อทำการเพาะแยกเชื้อยูเรียพลาสมา

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดที่ 1 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว TR broth ตามสูตรของ Taylor-Robinson และคณะ (1968) ประกอบด้วย PPLO broth w/o cv (Difco, Detroit, USA) 2.1 กรัม 0.4% Phenol-red solution 1 มล. น้ำกลั่น 70 มล. ปรับ pH เป็น 5.7-5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121°C นาน 15 นาที จากนั้นอุ่นให้มีอุณหภูมิ 56°C แล้วเติม horse serum (inactivated) 20 มล. 25% fresh yeast extract 10 มล. 10% urea 1 มล. penicillin G (200,000 ยูนิต/มล.) 0.5 มล. 2.5% thallium acetate solution 0.5 มล. ตามด้วยเพาะเชื้อซ้ำด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งโดยใช้ differential A7 agar (ดูรายละเอียดจากชนิดที่ 3)

ชนิดที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Boston broth ตามสูตรของ Kundsinn และคณะ (1978) ซึ่งประกอบด้วย PPLO broth w/o cv (Difco, Detroit, USA) 2.1 กรัม 0.4% Phenol-red solution 1 มล. น้ำกลั่น 70 มล. ปรับ pH เป็น 5.7-5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที จากนั้นอุ่นให้มีอุณหภูมิ 56°C แล้วเติม HTM supplement (Oxoid LTD., Hampshire, England) 2 มล. horse serum (inactivated) 20 มล. 25% fresh yeast extract 10 มล. 10% urea 1 มล. penicillin G (200,000 ยูนิต/มล.) 0.75 มล. ตามด้วยเพาะเชื้อซ้ำด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งโดยใช้ differential agar (A7) (ดูรายละเอียดจากชนิดที่ 3)

ชนิดที่ 3 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง differential A7 agar ตามสูตรของ Shepard และ Lunceford (1976)

ประกอบด้วย trypticase soy broth (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD) 2.4 กรัม Oxoid agar No.2 1.05 กรัม (oxoid, LTD., Hampshire, England) (ความเข้มข้นสุดท้าย 1%), สารละลายแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot H_2O$) 0.0155 กรัม (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.015%) ปรับ pH เป็น 5.7-5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที จากนั้นอุ่นให้มีอุณหภูมิ 56°C แล้วเติม HTM supplement (Oxoid LTD., Hampshire, England) 2 มล. horse serum (inactivated) 0.5 มล. 25% fresh yeast extract 1 มล. 10% urea 1 มล. penicillin G (200,000 ยูนิต/มล.) 0.5 มล.

การเตรียมตัวอย่างก่อนการแยกเชื้อ

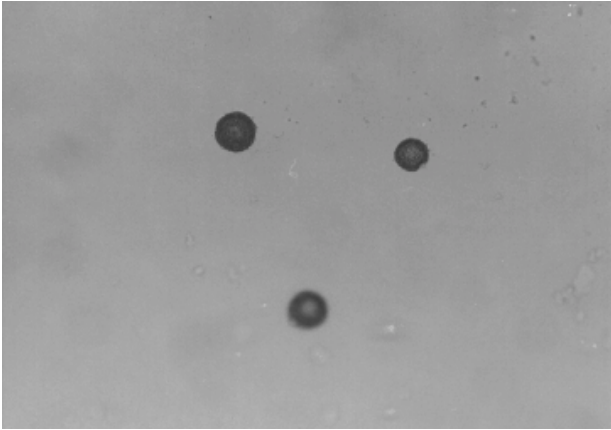
นำตัวอย่าง มาปั่นแยกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งไป เหลือตะกอนที่แขวนลอยด้วย Transport media - PPLO broth ปริมาณ 1 มล.

การเพาะแยกเชื้อ

นำตัวอย่างจากส่วนที่เหลือ ปริมาณ 0.2 มล. มาทำ serial tenfold dilutions จาก 10^{-1} ถึง 10^{-6} จำนวนทั้งหมด 6 หลอด โดยเตรียม TR broth ไว้หลอด 1.8 มล. ในหลอด (รูปที่ 1) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ตรวจดูผลทุกวัน การแปลผลว่ามีเชื้อยูเรียพลาสมา (+ve) ดูการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองหรือส้มเป็นสีแดงและชมพู และอาหารต้องใสไม่ขุ่นเป็นตะกอน จากนั้นนำหลอดความเจือจางสูงสุดที่เปลี่ยนสีของหลอดเจือจางสูงสุดมาเชยเชื้อด้วย loop ลงบน differential agar (A7) ที่ผสมสารแมงกานีสซัลเฟต 0.015% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน Gas Pack Anaerobic Jar (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., Japan) เป็นเวลา 72 ชม. เพื่อดูลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นของเชื้อยูเรียพลาสมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ ที่กำลังขยาย 40 เท่า และตัดบล็อกก้อนที่มีโคโลนีเชื้อยูเรียพลาสมาอยู่ นำโคโลนีที่ได้ไปย้อมด้วย Modify Dienes' stain ตรวจสอบว่าถูกต้องหรือไม่ stain (Velleca et al., 1980 cited by Kolesman et al., 1992) สังเกตผลจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง เพื่อยืนยันผลการทดลองอีกครั้งในกรณีที่เป็นเชื้อมัยโคพลาสมา โคโลนีจะติดสีฟ้า ถ้าเป็นเชื้อยูเรียพลาสมาจะยังคงมีสีน้ำตาลดำ (dark golden-brown) (Ruhnke, 1994) สำหรับชนิดที่ 3 ใช้ loop ตักลงไป ใน Transport media-PPLO broth เชยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง คือ differential A7 agar อย่างเดียว

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี chi-square test โดยใช้โปรแกรม SAS version 6.12 ข้อมูลที่มีค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 1 โคโลนีของเชื้อยูเรียพลาสมาที่ขึ้นบน Differential agar (A7) ที่ผสม 0.015% $MnSO_4$ (100X)

ผลและวิจารณ์

ผลการแยกเชื้อยูเรียพลาสมาในแม่โค จำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่ 1, 2 และ 3 สามารถแยกเชื้อได้ 23.3% (7/30) 33.3% (10/30) และ 20% (6/30) ตามลำดับ โดยแม่โคที่มีรอยโรคบริเวณปากช่องคลอด จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกเชื้อยูเรียพลาสมาได้จากตำแหน่งปากช่องคลอด จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 33.3% (5/15) 53.3% (8/15) และ 26.7% (4/15) ตามลำดับ ส่วนแม่โคที่ไม่มีรอยโรค พบเชื้อยูเรียพลาสมาบริเวณปากช่องคลอด จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 13.3% (2/15) เท่ากันทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 1) เชื้อยูเรียพลาสมาจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ TR broth และ Boston broth จากสีเหลืองหรือส้มเปลี่ยนเป็น

สีแดงหรือชมพู พบว่าเชื้อยูเรียพลาสมาจะขึ้นที่หลอดเชื้อจากต่ำก่อน หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-36 ชม. คูณทุกวันจนครบ 3 วัน ทำการยืนยันผลการตรวจ โดยเฉพาะเชื้อลง Differential A7 agar พบโคโลนีของเชื้อยูเรียพลาสมาจะขึ้นหลังจากบ่มเป็นเวลา 72 ชม. มีขนาดเล็กมาก ลักษณะคล้ายไข่ดาว (fried-egg colony) แต่บนผิวหน้าเป็นสีน้ำตาลทอง เมื่อย้อมด้วย Modify Dienes' stain ก็ยังคงเป็นสีน้ำตาลดำหรือ กลม (circular) ราบเรียบ (smooth) (รูปที่ 1) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 2 สามารถแยกเชื้อได้จากโคที่มีรอยโรคสูงกว่าโคที่ไม่มีรอยโรคอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 1 และ 3 ไม่พบความแตกต่าง ($p > 0.05$) (ตารางที่ 1).

การเพาะแยกเชื้อยูเรียพลาสมาในระบบสืบพันธุ์ของแม่โคนี้ ได้ใช้สูตรอาหารตามแบบของ Taylor-Robinson และคณะ (1968) แตกต่างจากสูตรอาหารของ Shepard (1967) ตรงที่มีการใช้ Thallium acetate เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบและเชื้อรา และใช้สารปฏิชีวนะเพนนิซิลิน เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวก ในสูตรของ Boston broth ไม่มีการใส่สาร Thallium acetate ซึ่งสารนี้มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อยูเรียพลาสมาในการแยกเชื้อจากตัวอย่างแม้ว่าใส่เพียง 0.0125% (Shipley et al., 1968) ซึ่งตรงกับ Shepard และ Lunceford (1967) ว่าไม่ควรใส่ Thallium acetate ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อยูเรียพลาสมา วิธี direct test ในการทดสอบ urease activity ของเชื้อยูเรียพลาสมา มีส่วนประกอบของ urea solution 1% และ สารแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) 0.8% ย้อมโคโลนีของเชื้อยูเรียพลาสมาจะต้องไม่มีอายุมากกว่า 48 ชม. หรือ การทดสอบอาจจะติดสีไม่คงที่หรือไม่เกิดปฏิกิริยาสืบเนื่องจากการขาด urease activity ของโคโลนีนั้น (Shepard and Lunceford, 1976)

ในวิธีตรวจหาเชื้อนี้ควรมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจ โดยนำของเหลวใส่ที่แยกได้ไปปั่นที่ความเร็วสูง

ตารางที่ 1 ผลการแยกเชื้อยูเรียพลาสมาจากตำแหน่งปากช่องคลอดแม่โคที่มีและไม่มีรอยโรค

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ		
		ชนิดที่ 1	ชนิดที่ 2	ชนิดที่ 3
มีรอยโรค	15	5 (33.3%) ^a	8 (53.3%) ^a	4 (26.7%) ^a
ไม่มีรอยโรค	15	2 (13.3%) ^a	2 (13.3%) ^b	2 (13.3%) ^a
รวม	30	7 (23.3%)	10 (33.3%)	6 (20%)

^{a,b}อักษรที่แตกต่างกันภายในแถวแนวตั้งเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เพื่อตกตะกอน ให้เชื้อยูเรียพลาสมาเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของตัวเชื้อในการตรวจวินิจฉัย ในการใส่ TR broth และ Boston broth ทำวิธี serial tenfold dilutions นั้น เพื่อเป็นการลดจำนวนแบคทีเรียที่ปะปนมากับสิ่งส่งตรวจ การแยกเชื้อนี้ใช้วิธีสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองหรือส้มเป็นสีแดงหรือชมพู เนื่องจากเชื้อยูเรียพลาสมาสามารถไฮโดรไลสยูเรียเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่างทำให้ phenol-red ในสูตรอาหารเปลี่ยนสี (Taylor-Robinson et al., 1969) วิธี serial tenfold dilutions เป็นการวัดปริมาณของเชื้อยูเรียพลาสมาในสิ่งส่งตรวจ หลอดที่มีเชื้อนี้จะมีสีแดงหรือชมพูและต้องไม่ขุ่น ถ้าขุ่นแสดงว่ามีแบคทีเรียชนิดอื่นมาปะปนอยู่ด้วยทำให้เกิดการแปรผลผิดพลาดได้ ตามรายงานของ Taylor-Robinson และคณะ (1969) TR broth ไวต่อเชื้อยูเรียพลาสมามาก ในขณะที่เชื้อมัคโคพลาสมาไม่สามารถไฮโดรไลสยูเรียได้ (Taylor-Robinson et al., 1968) อย่างไรก็ตามในการแยกเชื้อด้วย TR broth พบว่ามีเชื้อมัคโคพลาสมายังคงรอดชีวิตปะปนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ได้

ผลการแยกเชื้อยูเรียพลาสมาในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 1 และ 2 จะไม่รายงานว่าเป็นผลบวกถ้าเชื้อไม่ขึ้นบน differential A7 agar เพราะการเกิดสีอาจเกิดจากผลบวกเทียม (false positive) ได้ เนื่องจากในสิ่งส่งตรวจอาจจะมีเซลล์เชื้อบูฟิวที่มีเอนไซม์ยูรีเอสหรือแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถไฮโดรไลสยูเรียปนเปื้อน (Taylor-Robinson et al., 1969)

การเพาะเชื้อข้างอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง differential A7 agar ซึ่งผสมสารแมงกานีสซัลเฟต เพื่อยืนยันผลการทดลองจากการเห็นรูปร่างลักษณะของเชื้อ เป็นโคโลนีสีน้ำตาลดำ (dark golden-brown) ซึ่งเกิดจากการตกตะกอนของแมงกานีสบนผิวหน้าของโคโลนี และมีรูปร่างหลายแบบ ตรงตามรายงานของ Furness (1973) เช่น คล้ายไข่ดาว (fried-egg colony) ขอบหยัก (irregularly circular) แต่บนผิวหน้าเป็นสีน้ำตาลดำ เมื่อย้อมด้วย Modify Dienes' stain ก็ยังคงเป็นสีน้ำตาลทอง หรือกลมราบเรียบ

จากผลการแยกเชื้อยูเรียพลาสมาในอวัยวะสืบพันธุ์ของแม่โคนั้นสามารถแยกเชื้อยูเรียพลาสมาที่ไม่มีรอยโรคบริเวณปากช่องคลอด ซึ่งตรงกับรายงานของ ทิพา และคณะ (1997) พบว่าแยกเชื้อยูเรียพลาสมาได้ 26.7% จากแม่โคที่ไม่พบความผิดปกติ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ 2 สามารถแยกเชื้อได้จากโคที่มีรอยโรคสูงกว่าโคที่ไม่มีรอยโรคอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

โดยสรุปการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Boston broth และ A7 agar สามารถแยกเชื้อยูเรียพลาสมาจากโคที่มีรอยโรคดีที่สุด อาหารเลี้ยงเชื้อยูเรียพลาสมาควรใช้ทั้งชนิดเหลว (Boston broth) และแข็ง (A7 agar) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสามารถเพิ่มจำนวนของเชื้อยูเรียพลาสมาและลดการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.น.สพ.ดร. ชัยณรงค์ โลหิต สำหรับคำแนะนำ และ ผศ.น.สพ.ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์ ที่ได้กรุณาช่วยด้านการคำนวณทางสถิติและแก้ไขบทความนี้ให้สมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- ทิพา ดันติเจริญยศ วงศ์อนันต์ ณรงค์ว่าณิชการ อภัสรา วรราชพัชรา เผือกเทศ วาสนา แสงสุวรรณ พรเพ็ญ พัฒนโสภณ วันทนีย์ เนรมิตรมานสุข และคาซุโนริ ฮาชิโมโตะ. 1997 (2540). การเพาะแยกเชื้อ Mycoplasma และ Ureaplasma จากระบบสืบพันธุ์โคนมในประเทศไทย. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 7(2): 10-22.
- Carter, G.R. 1984. Mycoplasma of animals. In: Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 4th ed. Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine Press. 285-287.
- Doig, P.A. 1981. Bovine genital mycoplasmosis (A Review). Can. Vet. J. 22(11): 339-342.
- Furness, G. 1973. T-Mycoplasma: Some factors affecting their growth; colonial morphology, and assay on agar. J. Infect. Dis. 128(6): 703-709.
- Howard, C.J. and Gourlay, R.N. 1982. Proposal for a second species within the genus Ureaplasma, Ureaplasma diversum sp.nov. In. J. Syst. Bact. 32(4): 446-452.
- Koneman E.W., Allen S.D., Jr. Dowell. V.R., Janda W.M., Sommers, H.M., Jr. Winn W.C. 1992. Mycoplasmas and Ureaplasmas. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic microbiology. 4thed. Philadelphia: Lippincott. 684-702.
- Kuhn, J. M. and Hopkins, M. S. 1982. A clinical review of bovine ureaplasmosis. Iowa State Veterinarian. 45(1): 20-24.

- Kundsins, R.B., Parreno, A. and Poulin S. 1978. Significance of appropriate techniques and media for isolation and identification of *Ureaplasma urealyticum* from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 8: 445-453.
- Leland, D.S., Lapworth, M.A., Jones, R.B., and French M.L.V. 1982. Comparative evaluation of media for isolation of *Ureaplasma urealyticum* and genital mycoplasma species. J. Clin. Microbiol. 16(4): 709-714.
- Miller, R., Chellmonska-Soyta A., Bronwyn S., Foster R. and Rosendal, S. 1994. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. Vet. Clin. North America: Food Anim. Pract. 10(3): 479-490.
- Molira, G.L., Saunders, J.R. and Barth, D.A. 1992. Reproductive performance of beef heifers effect of vulvo-vaginitis. Can. Vet. J. 33:46-49.
- Ruhnke, H.L. 1994. Mycoplasmas associated with bovine genital tract infections. In: Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis. 1st ed. Whitford, H.W., Rosenbusch, R.F. and Lauerman, L.H. (eds.) Iowa: Iowa state university press. 56-62.
- SAS Institute Inc., 1989. SAS User's guide. Statistic version 6.12. Cary, NC.
- Shepard, M.C. 1954. The recovery of pleuropneumonia-like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis. Am. J. Syph. Gonorr. ven. Dis. 38, 113.
- Shepard, M.C. and Lunceford, C.D. 1967. Occurrence of urease in T-strains of Mycoplasma. J. Bact. 93: 1513.
- Shepard, M.C. and Lunceford, C.D. 1976. Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (Human T mycoplasma) in primary culture of clinical material. J. Clin. Microbiol. 3: 613-625.
- Shipley, A., Bowman, S.J., and O' Connor, J.J. 1968. T-strain mycoplasma in non-specific urethritis. Med. J. Aust. 1:794-796.
- Taylor-Robinson, D., Williams, M.H. and Haig, D.A. 1968. The Isolation and Comparative Biological and Physical Characteristics of T-mycoplasma of Cattle. J. Gen. Microbiol. 54:33-46.
- Taylor-Robinson, D., Addey, Jean, P. and Goodwin, C.S. 1969. Comparison of Techniques for the Isolation of T-strain Mycoplasma. Nature. 222:274-275.
- Thornber, P.M. 1982. *Ureaplasma* association with bovine infertility in South-West Scotland. Vet. Rec. 3(1-26):18-25.
- Ungureanu, C., Grigore, C., Ionita-Ionescu, F. and Constantinasu, L. 1986. Frequency of mycoplasma in the semen of reproduction bulls. Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin. 40(1):82-87.