



วิทยานิพนธ์

การใช้ตำรับพืชสมุนไพรไทย เพื่อลดการเป็น
แหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรา ในโคนม
ระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด

**Administration of Thai Mixed Medicinal Plants to
Decrease Leptospira Reservoir
in Periparturient Dairy Cows.**

นายณรุตติ์ บางภูมิ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ.2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตววิทยาทางสัตว)

ปริญญา

สัตววิทยาทางสัตว

สัตววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การใช้ตำรับพืชสมุนไพรไทย เพื่อลดการเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรา ในโคนม
ระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด

Administration of Thai Mixed Medicinal Plants to Decrease Leptospira Reservoir in
Periparturient Dairy Cows.

นามผู้วิจัย นายนรสุทธิ์ บางภูมิ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์วรศักดิ์ ปังนิมะศิริ, วท.ม.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สมชัย พงศ์รยากุล, Dip in Vet. Pathology, F.R.V.C.S)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อภัสสร ชูเทศะ, Dr.rer.nat.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้ตำรับพืชสมุนไพรไทย เพื่อลดการเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรา
ในโคนมระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด

Administration of Thai Mixed Medicinal Plants to Decrease Leptospira Reservoir
in Periparturient Dairy Cows

โดย

นายนรสุทธิ์ บางภูมิ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยาทางสัตว์)

พ.ศ. 2550

นรสุทธิ์ บางภูมิ 2550: การใช้ตำรับพืชสมุนไพรไทย เพื่อลดการเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรา ในโคนมระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สรีรวิทยาทางสัตว์) สาขา สรีรวิทยาทางสัตว์ ภาควิชาสรีรวิทยา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D. 115 หน้า

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรรวมต่อโคนมที่มีส่วนผสมของ ฟาทะเลาโจร ขมิ้นชัน ไพล ลูกใต้ใบ และ น้ำนมราชสีห์ ในโคนมระยะใกล้คลอด คลอด และหลังคลอด ได้ศึกษาในโคนม 5 สัปดาห์ก่อนคลอดจนถึง 4 สัปดาห์หลังคลอด จำนวน 25 ตัว โดยแบ่งกลุ่มโคโดยการสุ่ม 2 กลุ่ม คือ แม่โคที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (No herb) และ แม่โคที่ได้รับตำรับสมุนไพร (Herb) ศึกษาฤทธิ์ของตำรับสมุนไพรรวมต่อการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยา ทางโลหิตวิทยา ความปลอดภัยต่อไต ปริมาณน้ำนม การเกิดโรคทางเมตาบอลิก (การคลอดยากและ/หรือเกิดภาวะ แท้ง เต้านมอักเสบ และเจ็บกีบ) ผลต่อระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α และการลด/ยับยั้งการปลดปล่อยเชื้อ เลปโตสไปราโดยการแบ่งย่อยกลุ่มแม่โคที่ไม่ได้รับสมุนไพรและได้รับสมุนไพรตามการพบเชื้อเลปโตสไปรา ในปัสสาวะ และนอกจากนี้ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยา ทางโลหิตวิทยา ความปลอดภัยต่อไต ผลต่อระดับ ไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α และการติดเชื้อเลปโตสไปราในลูกโคนมที่เกิดจากแม่โคนมทดลองในช่วง 1 สัปดาห์หลังคลอด ผลการทดลองพบว่าโคนมในกลุ่มได้รับสมุนไพร (Herb) มีจำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) ลิมโฟ ซัยต์ และโมโนซัยต์สูงกว่ากลุ่มไม่ได้รับสมุนไพร (No herb) แต่มีค่ากรดต่างของปัสสาวะ ครีเอทีนิน ยูเรียใน กระแสเลือด ระดับเม็ดเลือดแดง และปริมาณน้ำนมไม่แตกต่างกับกลุ่ม No herb แม่โคนมที่กินสมุนไพรไม่พบการ คลอดยากและ/หรือเกิดภาวะแท้ง และภาวะเต้านมอักเสบ แต่ผลต่อการเจ็บกีบไม่แตกต่างกับกลุ่ม No herb ตำรับพืชสมุนไพรยังมีแนวโน้มลดระดับไซโตไคน์ IFN- γ และไซโตไคน์ TNF- α ของโคนมในวันคลอด ซึ่ง แสดงถึงการลดการอักเสบได้ดี สำหรับผลต่อการลดการปลดปล่อยเชื้อเลปโตสไปราพบว่าสมุนไพรสามารถลดระดับ การแพร่เชื้อสไปโรจิต/เลปโตสไปราออกจากปัสสาวะ ในขณะที่ตำรับสมุนไพรไม่มีผลนี้โดยตรงต่อลูกโค ผล การทดลองบ่งชี้ว่าตำรับสมุนไพรที่ทดลอง มีความปลอดภัยต่อไต สามารถเพิ่มระดับลิมโฟซัยต์และโมโนซัยต์ ซึ่งมีหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย สามารถลดระดับการแพร่เชื้อสไปโรจิต/เลปโตสไปราออกจาก ปัสสาวะ สามารถลดระดับ IFN- γ และ TNF- α ในวันคลอด และสามารถใช้เป็นฤทธิ์ยับยั้ง (bacteriostatic) ต่อ เชื้อเลปโตสไปราได้

Norasuthi Bangphoomi 2007: Administration of Thai Mixed Medicinal Plants to Decrease Leptospira Reservoir in Periparturient Dairy Cows. Master of Science (Animal Physiology), Major Field: Animal Physiology, Department of Physiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Siriwan Prapong, Ph.D. 115 pages.

To evaluate actions of Thai mixed medicinal herbs containing *Andrographis paniculata* (Burm.f) Nee, *Curcuma longa* (Linn), *Phyllanthus amarus*, *Zingiber cassumnar* (Roxb.) and *Euphorbia hirta* (L.), in periparturient dairy cows, twenty five dried off dairy cows were assigned into 2 groups; dairy cows with no herb treatment (No herb) and dairy cows with Thai mixed medicinal herbs (Herb) orally fed during 5 weeks before parturition to 4 weeks after parturition. Hematologic physiological changes, renal safety, milk production, metabolic diseases incidence (dystocia [with/without abortion], mastitis and laminitis) and cytokines level, IFN- γ and TNF- α , were evaluated. Antimicrobial activities to leptospira of these herbs were also investigated in all experimental cows by subdividing all cows 4 subgroups by Leptospira reservoirs status. Calves, born from experimental dairy cows, were evaluated medicinal herbs actions on them too. Experimental results showed that cows from Herbs and No herbs groups had similar hematologic profile except WBC, lymphocyte and monocyte level, which their levels were high in Herb group. Serum creatinine, BUN, urine pH and milk productivity were similar in cows from both groups. The mixed medicinal herbs showed effects on reducing incidence of dystocia [with/without abortion], mastitis on treated cows. However, it did not reduce laminitis incidence. The cytokine IFN- γ and TNF- α levels tend to be reduced in herbs treated cows during parturition days. The mixed medicinal herbs showed to decrease number of spirochete in urine culture from Leptospira reservoir cows, especially during 1 week prepartum to 2 week postpartum. Herbs were not affected to calves. Inconclusion, Thai mixed medicinal herbs were safe for dairy cow health, renal safety, and non disturbing hematological profile and milk production in herbs treated cows. Cows treated with these herbs had higher number of lymphocyte and monocyte which these cells involve in immune response system. Serum IFN- γ and TNF- α levels in cow on parturition day were also reduced. Their antibiotic action in this study is bacteriostatic level to Leptospira.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ /

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.สพ.ญ.ดร.ศิริวรรณ พราพงษ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน คั่นคว้าวิจัย การแก้ไขวิทยานิพนธ์และหลักการดำเนินชีวิต กราบขอพระคุณ รศ.น.สพ.วรศักดิ์ ปัจฉิมะศิริ กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชาเอก และ รศ.น.สพ.สมชัย พงศ์จรรยากุล กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชารอง ที่ให้คำปรึกษาในการเรียนและการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และกราบขอพระคุณ ผศ.ดร.อรินทิพย์ ธรรมชัยภินต ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอพระคุณอาจารย์ภาควิชาสรีรวิทยาทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ขอขอบคุณ คุณสุพจน์ อวสกุลสุทธิ และเจ้าหน้าที่ประจำคอกสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านการเตรียมสัตว์ทดลอง ขอขอบคุณ สัตวแพทย์หญิงวชิรา ลีมตราจิตต์ บริษัทลิลลี่ ฟู้ดแอนด์ชาयน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์คำรับสมุนไพรรในการทดลอง ขอขอบใจน้องนิสิตสัตวแพทยศาสตร์ชั้นปีที่ 6 ประจำปี 2550 ในการช่วยเหลือการเก็บตัวอย่าง

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง และเพื่อนสนิทที่ได้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

นรสุทธิ บางภูมิ

ตุลาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	18
อุปกรณ์	18
วิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	26
ผล	26
วิจารณ์	67
สรุปและข้อเสนอแนะ	76
สรุป	76
ข้อเสนอแนะ	76
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	77
ภาคผนวก	93
ภาคผนวก ก	94
ภาคผนวก ข	95
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	115

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ประวัติการป่วยด้วยภาวะทางเมตาบอลิกในช่วงการทดลองของแม่โคนมทดลอง
2	ปริมาณเชื้อสไปโรจิต/เลปโตสไปราที่เพาะจากปัสสาวะโค โดยตรวจดูจากกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด
3	จำนวนโคที่ตรวจพบ/จำนวนโคทั้งหมดในกลุ่ม (ร้อยละ) ของผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (Direct) ผลการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR) และผลตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MAT
4	ระดับไตเตอร์ต่อภูมิคุ้มกันโรคเลปโตสไปโรซิสในแม่โคนมกลุ่มที่เป็นแหล่งรังโรคต่อเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับคำรับพิษสมุนไพรรทดลอง (NH-SCH+)
5	ประวัติการป่วยด้วยภาวะเมตาบอลิกในช่วงการทดลองของแม่โคนมทดลองที่เป็นแหล่งรังของเชื้อเลปโตสไปรา
6	ข้อมูลสรีรวิทยาพื้นฐานของ อุณหภูมิร่างกาย ค่าโลหิตวิทยา ค่ากรดต่างของปัสสาวะ ระดับซีรัมครีเอตินิน ยูเรียในเลือด ระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ในลูกโคนมทดลองที่เกิดจากแม่โคนมที่ได้รับและไม่ได้รับคำรับสมุนไพรร
7	จำนวนลูกโคที่ตรวจพบ/จำนวนโคทั้งหมดในกลุ่ม (ร้อยละ) ของผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (Direct) ผลการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR) และผลตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MAT

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก1 อุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	95
ก2 จำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ค่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin) จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) ของกลุ่มโคนมทดลองในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	96
ก3 ปริมาณเม็ดเลือดขาวแยกประเภท neutrophil lymphocyte monocyte และ eosinophils ของกลุ่มโคนมทดลองในระยะใกล้ คลอด คลอด และหลังคลอด	97
ก4 จำนวนเกล็ดเลือด (Platelet) โปรตีนในพลาสมา ของกลุ่มโคนมทดลองในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	98
ก5 ความเป็นกรดต่างของปัสสาวะ creatinine และ BUN ของกลุ่มโคนมทดลองในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	99
ก6 ระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	100
ก7 อุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยของกลุ่มโคนม 4 กลุ่ม ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	101
ก8 ค่าโลหิตวิทยาของจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ค่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin) จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) ของกลุ่มโคนม 4 กลุ่มในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	102
ก9 ค่าปริมาณเม็ดเลือดขาวแยกประเภทเป็น neutrophil lymphocyte Monocyte และ eosinophil ของกลุ่มโคนม 4 กลุ่มในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	103
ก10 จำนวนเกล็ดเลือด (Platelet) โปรตีนในพลาสมา ของกลุ่มโคนม 4 กลุ่มในช่วงระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	104
ก11 ระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ของกลุ่มโคนม 4 กลุ่มในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	105

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	เชื้อ <i>Leptospira interrogans</i> serovar icterohaemorrhagiae โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 5
2	ฟ้าทะลายโจร (<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f) Nees) 13
3	ขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i> Linn) 14
4	ไพล (<i>Zingiber cassumnar</i> Roxb) 15
5	นํ้านมราชสีห์ (<i>Euphorbia hirta</i> L.) 16
6	ลูกใต้ใบ (<i>Phyllanthus amarus</i>) 17
7	แผนการเก็บตัวอย่างของแม่โคทดลองและการให้สมุนไพรในแม่โคที่ได้รับตำรับสมุนไพรทดลอง 20
8	อุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะก่อนคลอดคลอด และหลังคลอด 32
9	จำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC, A) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit, B) ค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin, C) จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC, D) ของกลุ่ม โคนมทดลองในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด 33
10	ปริมาณเม็ดเลือดขาวแยกประเภท Neutrophils (A) Lymphocytes (B) Monocytes (C) และ Eosinophils (D) ของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด 35
11	จำนวนเกล็ดเลือด (Platelet, A) โปรตีนในพลาสมา (B) ของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด 37
12	ความเป็นกรดต่างของปัสสาวะ (A) Creatinine (B) และ BUN (C) ของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด 39
13	ปริมาณนํ้านมเฉลี่ยต่อวันตั้งแต่วันแรกถึง 30 วันหลังคลอดของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด 41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ระดับไซโตไคน์ IFN- γ (A) TNF- α (B) ของกลุ่มโคนมทดลอง ใน ระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	42
15	อุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยของกลุ่มโคนม 4 กลุ่ม ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	46
16	ค่าโลหิตวิทยาของจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC, A) ค่าเม็ดเลือดแดง อัดแน่น (Hematocrit, B) ค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin, C) จำนวน เม็ดเลือดขาว (WBC, D) ของกลุ่มโคนม 4 กลุ่ม ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	47
17	ค่าปริมาณเม็ดเลือดขาวแยกประเภทเป็น Neutrophil (A) Lymphocyte (B) Monocyte (C) และ Eosinophil (D) ของกลุ่มโค นม 4 กลุ่ม ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	49
18	จำนวนเกล็ดเลือด (Platelet) (A) โพรตีนในพลาสมา (B) ของกลุ่ม โคนม 4 กลุ่ม ในช่วงระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	51
19	ระดับไซโตไคน์ IFN- γ (A) TNF- α (B) ของกลุ่มโคนม 4 กลุ่ม ใน ระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด	53

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BUN	=	Blood Urea Nitrogen
CD	=	Cluster of Differentiation
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	Deoxynucleotidetriphosphate
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	=	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMJH	=	Ellinghausen and McCullough, modified by Johnson and Harris
°F	=	degree Fahrenheit
gm	=	gram
IFN- γ	=	Interferon-gamma
IL	=	Interleukin
iNOS	=	inducible Nitric Oxide Synthetase
kg	=	kilogram
<i>L.</i>	=	<i>Leptospira</i>
LPS	=	Lipopolysaccharride
MAT	=	Microscopic Agglutination Test
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
NK cell	=	Natural Killer Cell
NO	=	Nitric Oxide
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
pg	=	picogram
RBC	=	Red Blood Cell
rpm	=	rotation per minute
TAE	=	Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer solution
TGB- β	=	Transforming Growth Factor – beta
Th	=	T-helper
TLR	=	Toll like receptor

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

TNF- α	=	Tumor Necrotic Factor – alpha
μ l	=	microliter
WBC	=	White Blood Cell
Wk	=	Week

การใช้ตำรับพืชสมุนไพรไทย เพื่อลดการเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรา ในโคนม ระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด

Administration of Thai Mixed Medicinal Plants to Decrease *Leptospira* Reservoir in Periparturient Dairy Cows

คำนำ

โรคเลปโตสไปโรซิสในโค เป็นโรคติดเชื้ออย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดความสูญเสียในผลผลิตของสัตว์ และส่งผลกระทบต่อทางเศรษฐกิจในการเลี้ยงโคนม โคนมที่แสดงอาการแบบเฉียบพลันแสดงอาการน้ำนมลด และตาย ในขณะที่โคที่แสดงอาการเรื้อรังโรคนี้จะแสดง การแท้ง การผสมติดยาก ลูกอ่อนแอ น้ำนมลด และเต้านมอักเสบ เป็นต้น โรคนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเลปโตสไปราที่ก่อโรค (*Leptospira interrogans*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนและสัตว์ สามารถพบการระบาดในเกือบทุกประเทศทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย โรคนี้เป็นโรคที่สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คน และเป็นอันตรายถึงชีวิตและผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้ส่วนมากมีอาชีพเกษตรกรที่เกี่ยวข้องกับการทำนาและเลี้ยงสัตว์

ระยะ 3 สัปดาห์ก่อนคลอด จนถึง ระยะ 3 สัปดาห์หลังคลอด หรือเรียกว่าระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอดนั้น เป็นระยะที่มีความสำคัญต่อการจัดการการเลี้ยงโคนมเป็นอย่างยิ่ง เนื่องมาจากในระยะนี้แม่โคนมมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาหลายอย่าง เช่น การเปลี่ยนระดับฮอร์โมน การคลอดลูก และการเริ่มสร้างน้ำนม เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงต้องเตรียมแม่โคนมระยะก่อนคลอด เพื่อการปรับตัวสู่ระยะคลอด และระยะให้นม เมื่อใดที่เกษตรกรไม่สามารถปรับสภาพแม่โคนมได้ แม่โคจะมีแนวโน้มที่จะเป็นโรคทางเมตาบอลิกที่สำคัญ เช่น โรคใช้น้ำนม ภาวะคีโตซิส เป็นต้น และโรคติดเชื้อ เช่น เต้านมอักเสบ โรคเลปโตสไปโรซิส เป็นต้น ซึ่งโรคต่างๆที่กล่าวมานี้ จะทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในธุรกิจการเลี้ยงโคนมอย่างมาก โดยเฉพาะโรคเลปโตสไปโรซิสในโคนมมักเป็นภาวะแบบเรื้อรัง โคที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรานี้อาจจะแสดงอาการและมีการแพร่เชื้อสู่โคตัวอื่นในฝูงและลูกโคได้

ปัจจุบันการรักษาโรคเลปโตสไปโรซิสในโคนมจะใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรค เช่นเดียวกับโรคติดเชื้อแบคทีเรียอื่น แต่การใช้ยาปฏิชีวนะจะทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมมีรายได้

ที่ลดลงจากการซื้อยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังสูญเสียรายได้จากการงดส่งนมที่มียาปฏิชีวนะเป็นระยะเวลาหนึ่งด้วย ปัจจุบันจึงมีการหาทางเลือกใหม่ในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะเหล่านี้ พืชสมุนไพรก็เป็นทางเลือกทางหนึ่งเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ จากการศึกษาสารที่ออกฤทธิ์ของสมุนไพรบางตัวที่ผ่านมา มีคุณสมบัติที่คล้ายกับยาปฏิชีวนะคือมีฤทธิ์ในการทำลายและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ และยังไม่มียารายงานความเป็นพิษหรือสารตกค้างที่ผ่านไปยังผู้บริโภคและไม่มีรายงานเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อสมุนไพรด้วย

ไม่นานนี้การศึกษาการทำงานของไซโตไคน์ต่างๆ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพการเกิดโรคให้ชัดเจนมากขึ้น รวมถึงการประยุกต์การใช้ไซโตไคน์เพื่อการป้องกันและรักษาโรค การเปลี่ยนแปลงระดับไซโตไคน์ต่อโรคเลปโตสไปโรซิสก็เป็นโรคหนึ่งที่มีการศึกษาอย่างมาก โดยการศึกษาชนิดและการเปลี่ยนแปลงระดับไซโตไคน์ต่อโรคเลปโตสไปโรซิสพบว่าไซโตไคน์หลายชนิดที่เกี่ยวข้อง เช่น IFN- γ TNF- α IL-2 IL-4 IL-10 และ IL-12 โดยเฉพาะ TNF- α IL-2R และ IL-6 ที่พบการเพิ่มขึ้นในกรณีโรคเลปโตสไปโรซิสแบบเฉียบพลันในคน (Petro and Engelmann, 2000) และ IFN- γ TNF- α และ IL-12 ในคน (Fost *et al*, 2003) และหนู (Vernel-Pauillac and Merien, 2006) การที่ทราบสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับโรคเลปโตสไปโรซิสจะสามารถรู้ถึงสาเหตุการเกิดพยาธิสภาพ การพัฒนาของโรค รวมไปถึงการรักษาและป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิสด้วยสารไซโตไคน์

การใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคมียาวนานกว่า 3,000 ปีแล้ว ในการแพทย์แผนไทยได้มีการนำพืชสมุนไพรหลายชนิดมาใช้เช่นกัน ทั้งในรูปของสมุนไพรชนิดเดี่ยว หรือในการผสมชนิดของสมุนไพรในรูปตำรับยา ซึ่งการใช้ตำรับสมุนไพรมีข้อดีกว่าสมุนไพรชนิดเดี่ยว ในด้านการเสริมฤทธิ์ของสมุนไพร ลดความเป็นพิษของแต่ละสมุนไพร โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาดำรับสมุนไพรที่มีส่วนผสมของสมุนไพร 5 ชนิดคือ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ใพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) และน้ำมันมะพร้าว (*Euphorbia hirta* L.) ซึ่งแนวคิดการออกฤทธิ์ของสมุนไพรชนิดนี้ ฟ้าทะลายโจรมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ andrographolide มีคุณสมบัติที่คล้ายกับยาปฏิชีวนะคือทำลายหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B.subsitis* *E.coli* *P.aeruginosa* เชื้อรา *C.albicans* (Singha *et al.*, 2003) และ *Leptospira interrogans* (SCARG, 1976) ขมิ้นชัน สารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ curcuminoid ซึ่งลดกระบวนการอักเสบ ปรับระดับภูมิคุ้มกันได้ทั้งแบบ innate immunity และแบบ adaptive immunity (Wessler *et al.*, 2005) ใพลสารออกฤทธิ์คือ curcuminoid และ β -sitosterol ซึ่งช่วยลดการอักเสบ (Ozaki *et al.*, 1991) น้ำมันมะพร้าวสารออกฤทธิ์คือ β -sitosterol มีฤทธิ์ลดการอักเสบและต้าน

เชื้อแบคทีเรีย *Shigella* spp. (Vijaya *et al.*, 1995) และแก้อาการไม่มีน้ำนมในโค (Chifundera, 1998) และลูกไต้ใบ สารออกฤทธิ์คือ phyllanthin และ hypophyllanthin มีฤทธิ์ลดการอักเสบ เป็นต้น

จากเหตุผล การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะโรคเลปโตสไปโรซิส ด้วยยาปฏิชีวนะทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้จากการใช้ยาปฏิชีวนะ การหาวิธีเพิ่มภูมิคุ้มกันร่างกายของแม่โคในช่วงก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด รวมถึงการนำสมุนไพรหรือตำรับสมุนไพรมาใช้ในสัตว์นั้นยังไม่มีการศึกษามากนัก ทำให้งานวิจัยนี้ได้รับิเริ่มนำตำรับพืชสมุนไพรไทยที่มีส่วนผสมของฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ใพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) ลูกไต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) และน้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) มาใช้ในการเลี้ยงโคนม โดยศึกษาฤทธิ์ของตำรับสมุนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยา ทางโลหิตวิทยา ความเป็นพิษต่อไต และผลต่อระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α และปริมาณน้ำนม ในโคนมระยะใกล้คลอด คลอดและหลังคลอดที่ได้รับพืชสมุนไพรไทยโดยการกิน เพื่อพัฒนาตำรับสมุนไพรเพื่อใช้ในโคนม และเพิ่มภูมิคุ้มกันร่างกาย ศึกษาประสิทธิภาพการลดหรือยับยั้งการเป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปโรซิสในโคนม จากระดับของเชื้อเลปโตสไปราที่ปล่อยออกทางปัสสาวะซึ่งเป็นตัวชี้วัดเบื้องต้นเพื่อค้นหาแนวทางใหม่ในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะในโคนม

วัตถุประสงค์

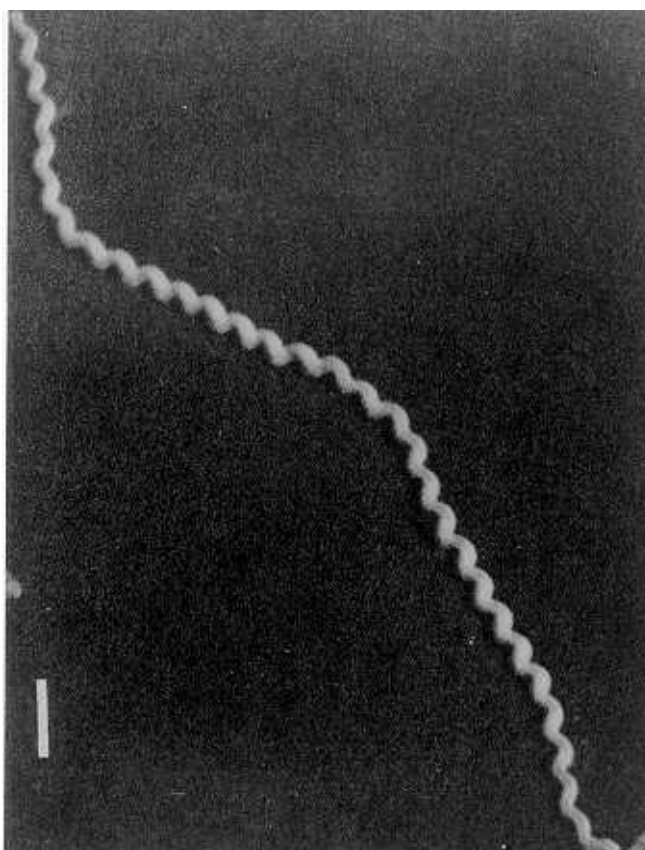
1. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของตำรับสมุนไพรที่มีองค์ประกอบของ ฟ้ายะลวยโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) และน้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) ต่อค่าทางสรีรวิทยา ความเป็นพิษต่อไต สุขภาพและระบบภูมิคุ้มกัน ในแม่โคนม ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด
2. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของตำรับสมุนไพรต่อสรีรวิทยา ความเป็นพิษไต และระบบภูมิคุ้มกัน ในลูกโคนมจากแม่โคนมที่รับตำรับสมุนไพร
3. เพื่อตรวจสอบผลของตำรับพืชสมุนไพรในการยับยั้งหรือลดการเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อ เลปโตสไปราในโคนม ในระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด

\

การตรวจเอกสาร

1. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับโรคเลปโตสไปโรซิส

โรคเลปโตสไปโรซิสในโค เป็นโรคติดเชื้ออย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดความสูญเสียในผลผลิตของสัตว์และส่งผลกระทบต่อทางเศรษฐกิจในการเลี้ยงโคนม โรคนี้เป็นสาเหตุหนึ่งของการแท้ง การผสมติดยาก ลูกอ่อนแอ น้ำนมลด และเต้านมอักเสบ เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเลปโตสไปราที่ก่อโรค (*Leptospira interrogans*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนและสัตว์ สามารถจำแนกเชื้อทางซีรัมวิทยาออกเป็น 23 serogroups ซึ่งมีมากกว่า 212 serovar (Radostits *et al.*, 1997) ลักษณะของเชื้อ เป็นเกลียว (coiled) มีความยาว 6-20 ไมครอน หนา 0.1 ไมครอน มีระยะ wavelength ประมาณ 0.5 ไมครอน ส่วนปลายคล้ายตะขอ มี flagella 2 เส้น (Faine *et al.*, 1999; ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 เชื้อ *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
ที่มา: Baron *et al.* (1996)

เชื้อเจริญเติบโตในที่ชื้น ตามพื้นดิน พื้นโคลน ค่าความเป็นกรดค่าประมาณ 7.2-8.0 และอุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส (คู่มือวิชาการเลปโตสไปโรซิส, 2544) ซึ่งเหมาะสมกับภูมิภาคในประเทศไทย และอีกหลายประเทศ เชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 3 วิธี คือ ตามบาดแผลรอยขีดข่วน ตามเยื่อเมือก และตามระบบสืบพันธุ์ เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกาย โปรตีนส่วนนอกของเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคจะกระตุ้นให้ร่างกายตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Branett *et al.*, 1999; Vinetz, 2001) เมื่อเชื้อเลปโตสไปรารอดพ้นจากการทำลายของภูมิคุ้มกัน ไม่จำเพาะและจำเพาะแล้ว เชื้อจะเจริญและแบ่งตัวในกระแสเลือด ประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นเชื้อจะแพร่กระจายเข้าสู่อวัยวะต่างๆในร่างกาย และทำให้ร่างกายเกิดการอักเสบตามอวัยวะต่างๆที่เชื้อไปอยู่ อวัยวะที่สำคัญคือไต (Younes-Ibrahim *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นอวัยวะหลักที่เชื้อจะอาศัยแบ่งตัว เพิ่มจำนวน เชื้อบางส่วนสามารถหลุดออกมาพร้อมกับของเสียที่ขับถ่ายมากับปัสสาวะและแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม (Mim *et al.*, 2004) อาการของโรคมี 3 แบบ คือ แบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน และแบบเรื้อรัง (Radostits *et al.*, 1997; คู่มือวิชาการเลปโตสไปโรซิส, 2544)

อาการของโคในระยะเฉียบพลัน สามารถพบได้ในโคทุกวัย โดยเฉพาะลูกโค (Radostits *et al.*, 1997) โคจะแสดงอาการมีไข้สูง ประมาณ 104 – 106 องศาฟาเรนไฮต์ ซึมและไม่อยากอาหาร ผลผลิตน้ำนมลด พบจุดเลือดออกตามเยื่อเมือกต่างๆ บางตัวแสดงอาการ ไขข้ออักเสบ (synovitis) เนื้อเยื่อผิวหนังตาย (necrotic dermatitis) หรือเยื่อสมองอักเสบ (meningitis). อาการของโคในระยะกึ่งเฉียบพลัน โคที่อยู่ในระยะนี้จะมีไข้ต่ำถึงปานกลาง ประมาณ 102 – 104 องศาฟาเรนไฮต์ โคจะแสดงอาการน้ำนมลด ปัสสาวะเป็นเลือดเนื่องจากไตอักเสบ และอาการแบบเรื้อรัง โคจะแสดงอาการไม่ชัดเจน โดยมีอาการที่พบบ่อย เช่น การแท้งลูก (abortion) ปัญหาการผสมไม่ติด (infertile) และจะพบเชื้ออยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน (Radostits *et al.*, 1997)

การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน มีอยู่ 3 วิธี คือ การดูเชื้อโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic demonstration) เช่น การดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด การดูจากแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา (antigen detection) เช่น การตรวจพันธุกรรมของเลปโตสไปรา ด้วยวิธีลูกโซ่พอลิโมเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) และวิธีวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยา (serological diagnosis) เช่น การตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) เป็นต้น (Levett, 2001)

การรักษาและการป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิส ได้มีรายงานการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะในโค โดย Radostits *et al.* (1997) ซึ่งใช้ Dihydroxystreptomycin 25 มก./น้ำหนักตัว 1 กก. ฉีดเข้า

กล้าม วันละครั้ง นาน 3-5 วัน หรือ การให้ Tetracycline 3 มก./น้ำหนักตัว 1 กก./วัน 7 วันก่อน สัมผัสเชื้อหรือให้ 14 วัน หลังสัมผัสเชื้อ โดยผสมอาหาร เพื่อป้องกันสัตว์ป่วยแสดงอาการป่วย (คู่มือวิชาการเลปโตสไปโรซิส, 2544) เป็นต้น ซึ่ง Watt *et al.* (1988) และ Edwards *et al.*, (1988) รายงานว่าแม้ใช้ยาปฏิชีวนะรักษาโรคเลปโตสไปโรซิสแล้วก็ตาม แต่ก็ไม่สามารถลดอาการของโรค ได้แน่ชัด ขณะที่การป้องกันและการควบคุมโรคเลปโตสไปโรซิสในโค เช่น การแยกสัตว์ติดเชื้อ ออกจากฝูง มีการจัดการที่ดี ไม่ให้มีน้ำขัง ใช้ยามาเชื้อ กำจัดพาหะนำโรค หรือการทำวัคซีน เป็นต้น (Radostits *et al.*, 1997)

2. ปัญหาของโรคเลปโตสไปโรซิส ในด้านการสูญเสียทางเศรษฐกิจการเลี้ยงโค

โรคเลปโตสไปโรซิสในโค เป็นโรคที่ส่งผลกระทบทางเศรษฐกิจการเลี้ยงโคนมมากที่สุดโรค หนึ่ง เนื่องจากแม่โคที่ติดโรคนี้แล้ว จะแสดงอาการที่สำคัญ เช่น การผสมไม่ติด การแท้งลูก น้ำนม ลดและเต้านมอักเสบ (Barringer, 2003) โดยเฉพาะภาวะเลปโตสไปโรซิสเรื้อรังหรือการเป็นแหล่ง รั้งโรคของเชื้อเลปโตสไปรา ถือว่าเป็นภาวะที่ส่งผลกระทบทางเศรษฐกิจการเลี้ยงโคนมมากที่สุด เช่นในประเทศ สหรัฐอเมริกา (Floyd, 1994) เนื่องจากความไวในการตรวจโรคต่ำมาก (<80%) แม่โคจะแสดงอาการ หรือไม่แสดงอาการ ซึ่งตามรายงานของ Corbeil and BonDurant (2001) อาการที่พบคือ แท้งมี ประมาณ 30% จากการติดเชื้อ *Leptospira pomona* และอีกประมาณ 70% พบว่ามีการตายหรือการ อ่อนแอของลูก ส่วนลูกที่รอดสามารถติดเชื้อจากแม่โค อาจแสดงอาการแบบเฉียบพลัน หรือเป็น แหล่งรั้งโรคของฝูงได้ยาวนานต่อไป และมีรายงานภาวะเรื้อรังจะไม่แสดงความผิดปกติของค่า โลหิตวิทยาและค่าเคมีของร่างกายในคน (Shpilberg *et al.*, 1990) ในสุนัข (Scanziani *et al.*, 1995) รวมทั้งในโคนมด้วย (ณัฐพงศ์ และคณะ, 2549) ในประเทศไทยพบโคที่เป็นแหล่งรั้งโรคของเชื้อมี อยู่ในระดับ 17.8% (ศิริวรรณ และคณะ, 2546)

3. บทบาทการใช้ยาปฏิชีวนะในโคนม

ปัจจุบัน มีการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงโคนมอย่างแพร่หลาย โดยมีจุดประสงค์เพื่อรักษา และการป้องกันโรค ข้อสำคัญที่ สัตวแพทย์ หรือผู้เลี้ยง จำเป็นต้องคำนึงถึงคือการตกค้างของยา ปฏิชีวนะไปสู่นม การตกค้างของยาปฏิชีวนะเหล่านี้จะทำให้ผู้ที่บริโภคนมและผลิตภัณฑ์จากนม เกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ หรือบางรายแพ้ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในโคนม ด้วยเหตุนี้ทำให้ องค์การอาหาร และยาของ สหภาพยุโรป (EU) ประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศไทย กำหนดการตกค้างของยา

ปฏิกิริยาไว การลดการตกค้างคือการงดส่งนม เพื่อให้ยามีการสลายตัว โดยระยะเวลาขึ้นอยู่กับชนิดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ เช่น Seymour *et al.* (1988) ได้รายงานระยะงดส่งนมจากยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน เป็นเวลา 5 วันเป็นต้น ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสูญเสียรายได้จากการงดส่งนม การพยายามที่จะหาสารทดแทนยาปฏิชีวนะ พืชสมุนไพรจึงมีความน่าสนใจเนื่องจากสมุนไพรบางตัวออกฤทธิ์คล้ายยาปฏิชีวนะ ราคาถูก และยังไม่มียารายงานการตกค้างของสมุนไพรจากสัตว์ผู้บริโภค

4. สถานการณ์โรคเลปโตสไปโรซิสในประเทศไทย

ปัญหาของโรคเลปโตสไปโรซิสในคนในสังคมไทยนั้น มีรายงานว่ามีการติดเชื้อเกือบทุกจังหวัดของประเทศ จากการสำรวจของทางกองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อพบว่า ข้อมูลปี 2543 พบผู้ติดโรคเลปโตสไปโรซิสยังมีสูงที่สุด โดยมีผู้ป่วยที่ติดโรคเลปโตสไปโรซิสทั้งสิ้น 14,287 ราย โดยเสียชีวิตทั้งหมด 362 ราย และมีแนวโน้มที่ลดลงเนื่องจาก มีการศึกษา การตรวจวินิจฉัยดีขึ้น ให้ความรู้แก่ประชาชนมากขึ้น ทำให้มีผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสลดน้อยลง ในปี 2549 จึงมีผู้ป่วยติดโรคเลปโตสไปโรซิสทั้งหมด 3,941 ราย เสียชีวิต 68 ราย และในปี 2550 (ข้อมูลเดือนมกราคม ถึง เดือนสิงหาคม) มีผู้ป่วยที่ติดโรคเลปโตสไปโรซิสทั้งหมด 1,354 ราย เสียชีวิต 19 ราย ซึ่งอาชีพของผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเกษตรกรถึงร้อยละ 84 ส่วนสาเหตุของเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคนั้น ส่วนใหญ่ติดมาจากหนู แต่เนื่องจากพบว่าเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคในคน เช่น bratislava, sejroe ในโคและกระบือด้วย ดังนั้นการป้องกันการแพร่เชื้อเลปโตสไปราจากโคมาสู่คน จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการลดความเสี่ยงการติดเชื้อเลปโตสไปรา มาสู่เกษตรกรผู้เลี้ยงโค (คู่มือวิชาการเลปโตสไปโรซิส, 2544)

5. ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายของโคในในช่วงก่อนและหลังคลอด

ในระบบภูมิคุ้มกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมนั้น จะแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ innate immunity ซึ่งเป็นช่วงแรกของการป้องกันสิ่งแปลกปลอมของร่างกาย โดยจะทำหน้าที่แบบไม่เฉพาะเจาะจงต่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรค แต่ก็จะมีความสำคัญในการจดจำสิ่งแปลกปลอมเพื่อใช้ในการต่อต้านเชื้อในระดับ adaptive immunity ต่อไป โดยทั่วไปจะแบ่งย่อยได้ 4 ประเภท คือ anatomic barriers, physiologic barrier, phagocytic หรือ endocytic barriers และ inflammatory barriers ซึ่งในแต่ละกลุ่มนั้นจะทำหน้าที่แตกต่างกัน

และเมื่อผ่านไปประมาณ 5 ถึง 6 วันหลังจากเริ่มมีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย ภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม ก็จะถูกสร้างออกมาเพื่อมีผลในครั้งแรกที่ innate immunity ไม่สามารถขับไล่หรือทำลายสิ่งแปลกปลอมได้ และมีระบบความจำเพื่อใช้ในการขับไล่หรือทำลายเชื้อโรคเดิมในครั้งต่อไป ทำให้ เมื่อเชื้อโรคเดิมกลับเข้ามาได้ถูกทำลายเร็วกว่า มีประสิทธิภาพมากกว่า ในครั้งแรกที่ได้รับเชื้อ เราเรียกช่วงนี้ว่า adaptive immunity ตัวที่สำคัญในขบวนการนี้ได้แก่ T-lymphocyte (cell-mediated response), antibody (humoral response) และสารที่ 2 ตัวนี้ผลิตขึ้น (Goldsby *et al.*, 2003)

ในช่วงก่อน คลอดและหลังคลอด ภูมิคุ้มกันในร่างกายของโคนมจะลดลง (Goff and Horst, 1992) ทั้งในภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity และภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ได้ (Kimura *et al.*, 1999a, 1999b) เนื่องจากสาเหตุหลายประการที่รวมกันระหว่างอิทธิพลของฮอร์โมน ภาวะความเครียด รวมทั้งภาวะโภชนาการ การที่ภูมิคุ้มกันร่างกายลดลงโดยเฉพาะเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลที่มีหน้าที่จับกิน (phagocytosis and killing), (Kehrli Jr. *et al.*, 1989) เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ที่ลดลงชนิด T-lymphocyte (Kimura *et al.*, 1999a, Kimura *et al.*, 2002a, Nonnecke *et al.*, 2003) จะมีแนวโน้มให้เกิดโรคที่สำคัญ ทั้งด้านโรคติดเชื้อและโรคทางเมตาบอลิกเช่น ใช้น้ำนม เต้านมอักเสบ รกค้าง Johne's disease เป็นต้น (Goff and Horst, 1997, Kimura *et al.*, 2002b, Stabel *et al.*, 2003) ซึ่งทำให้เกิดความสูญเสียรายได้ของเกษตรกร ดังนั้นจึงเชื่อว่าเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันร่างกายในช่วงก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด จะช่วยในการป้องกันการเกิดโรคทางเมตาบอลิก และ โรคติดเชื้อที่สำคัญได้ (Meglia *et al.*, 2005) โดยตรวจค่าโลหิตวิทยาเป็นตัวแทนบอกความสามารถของร่างกายที่จะต่อสู้กับเชื้อโรคได้ (Klinkon and Zadnik, 1999; Meglia *et al.*, 2005)

6. ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปโรซิสและสารไซโตคายน์ที่เกี่ยวข้อง

6.1 ระบบ innate immunity

Werts *et al.* (2001) ได้ศึกษาส่วน Lipopolysaccharide ของเชื้อเลปโตสไปรา (leptospiral LPS) พบว่า LPS นั้นจะกระตุ้นผ่าน Toll-like receptor 2 (TLR2) และ CD14 และสามารถกระตุ้นการหลั่งสารไซโตคายน์ TNF-alpha และ IL-8 จากเซลล์ THP-1.hCD14

Hung *et al.*, 2006a ศึกษาว่าส่วน *Leptospira* outer membrane protein (OMPs) ของเชื้อ *Leptospira santarosai* serovar *shermani* ที่ระบาดในประเทศไต้หวัน จะชักนำให้เซลล์ท่อไตส่วน proximal tubule ผ่านทาง TLR2 ได้ด้วย เมื่อกระตุ้นผ่าน TLR2 ที่ผิวเซลล์แล้ว เกิด signal transduction จนสุดท้ายมีการหลั่งสาร chemokine ซึ่ง chemokine เป็นกลุ่มของโปรตีนขนาดเล็กประมาณที่มีกรดอะมิโนเรียงตัว 90-130 อะมิโน มีหน้าที่สำคัญในการดึงดูดเซลล์ (chemotaxis), กระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวหลายชนิด (Goldbys *et al.*, 2003) โดยปัจจุบัน Hung *et al.* (2006a, 2006b, 2006c) และ Yang *et al.* (2006a) ค้นพบ chemokine ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อโรคลेปโตสไปโรซิส โดยใช้ outer membrane protein (OMPs) ของเชื้อ *Leptospira santarosai* serovar *shermani* พบว่ามี chemokine 4 ตัว และมีหน้าที่ชักนำเซลล์ดังนี้ CCL2-MCP1 จะชักนำ monocyte, CXCL1/KC จะชักนำ neutrophil, CXCL/MIP2 จะชักนำ macrophage และ RANTES (CCL5) จะชักนำ เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิด T-cell ให้เข้ามาทำหน้าที่ในขบวนการอักเสบบริเวณที่มีการหลั่ง นอกจากนี้พบว่าในกลุ่ม CC (MCP1 และ RANTES) จะช่วยให้ iNOS และ TNF-alpha มีการหลั่งมากขึ้นด้วย (Goldsby *et al.*, 2003) ซึ่งเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มขึ้นจะทำงานในการทำลายเชื้อเลปโตสไปรา

6.2 Adaptive immunity

Adler and Faine (1977) รายงานการป้องกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา มาจากระบบ antibody (humoral response) เป็นหลัก โดย Jost *et al* (1986) ได้ใช้ส่วน lipopolysaccharide (*Leptospiral* LPS) สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราได้ จึงทำให้เชื่อว่าการใช้วัคซีน โดยการกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง แอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา สามารถป้องกันโรคได้ แต่ Bolin *et al.* (1989) รายงานการใช้วัคซีนป้องกันโรคลेปโตสไปโรซิสรวม 5 สายพันธุ์ ที่ใช้ในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งประกอบด้วย *L. Interrogans* serovars Hardjo (type Hardjoprajitno), canicola, Pomona, icterohaemorrhagiae และ *L. kirschneri* มาสร้างภูมิในโคทดลอง แล้วฉีดเชื้อ *L. borgpetersenii* serovar hardjo เพื่อทำให้เกิดโรค พบว่าวัคซีนไม่สามารถป้องกันอาการแท้ง และลูกตายได้ จึงสรุปว่า ภูมิคุ้มกันแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราแต่ละสายพันธุ์ ไม่สามารถข้ามสายพันธุ์กันได้ และคิดว่าแอนติบอดีอาจไม่ใช่ตัวหลักในการป้องกันเชื้อเลปโตสไปรา

Naiman *et al.* (2001) ได้แสดงว่า โคที่ฉีดวัคซีนเชื้อตาย *L. borgpetersenii* serovar hardjo มีการแบ่งตัว (proliferate) ของ peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ต่อเชื้อที่ฉีด และเมื่อมาแยก PBMC พบว่าเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ ชนิด gamma-delta T-lymphocyte

และ CD+4 T-lymphocyte ซึ่งเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิดนี้ ได้ผลิต IFN- γ และ IFN- γ เป็นไซโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับระบบ Th1-type cellular immunity จึงแนะนำว่าการเพิ่มการต้านทานโรคเลปโตสไปโรซิส ควรกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ cellular immunity ด้วย

6.3 สารไซโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับโรคเลปโตสไปโรซิส

ไซโตคายน์เป็น low-molecular weight regulatory protein หรือ โกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่ถูกหลั่งมาจาก เม็ดเลือดขาว หรือ เซลล์อื่นที่สร้างได้ โดยสารไซโตคายน์เหล่านี้ มีหน้าที่ในการควบคุมเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันให้เจริญเติบโต หรือทำงานได้ แบ่งตามหน้าที่ได้ 2 กลุ่ม คือ ไซโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับ innate immunity เช่น interleukin 1 (IL-1) tumor necrosis factor alpha- (TNF- α) interleukin 12 (IL-12) เป็นต้น และไซโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับ adaptive immunity เช่น interleukin 2 (IL-2) interferon (IFN- γ) เป็นต้น การที่ทราบสารไซโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับโรคต่าง ๆ นั้น จะสามารถรู้ถึงสาเหตุการเกิดพยาธิสภาพ การพัฒนาของโรค รวมไปถึงการรักษาโรคด้วยสารไซโตคายน์ได้ (Goldsby *et al.*, 2003) โรคเลปโตสไปโรซิสก็เป็นโรคหนึ่งที่มีการศึกษาสารไซโตคายน์ การศึกษาพบว่ามีการทำงานของไซโตคายน์หลายชนิดต่อโรคเลปโตสไปโรซิส

Estavoyer *et. al.* (1991) พบว่ามีไซโตคายน์ TNF- α ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส

Tajiki and salomao (1996) รายงานว่าระดับไซคายน์ TNF- α ที่เพิ่มขึ้นจะเกี่ยวข้องกับระดับความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรซิสที่ดำเนินไป

Petro and Engelmann (2000) รายงานว่าพบไซโตคายน์ TNF- α IL-2R และ IL-6 ที่เพิ่มขึ้นในกรณีโรคเลปโตสไปโรซิสแบบเฉียบพลันในคน

Fost *et al.* (2003) รายงานการใช้ *Leptospira interrogans* serovar rachmati ในรูปเชื้อตายมา incubate ในเลือดคน พบว่าเลือดมีการตอบสนองโดยหลังไซโตคายน์ IFN- γ TNF- α IL-12 p40 และเมื่อให้ตัวยับยั้ง IL-12 ปริมาณ IFN- γ ก็ลดลงด้วย แสดงให้เห็นว่า IFN- γ ที่ผลิตขึ้น มี

การควบคุมจาก IL-12 เป็นหลัก และการตอบสนองต่อเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรค เกี่ยวข้องกับไซโตไคน์ ในกลุ่ม adaptive immunity แบบ Th-1 cellular immunity

Vernel-Pauillac and Merien (2006) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไซโตไคน์ IL-2 IL-4 IL-10 และ IL-12p40 IFN- γ TNF- α และ Transforming growth factor beta (TGF- β) ในหนูที่ได้รับเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain Verdun ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าใน 1 ชั่วโมง หลังจาก incubate เชื้อในหนู จะมีไซโตไคน์ IL-12p40 IFN- γ TNF- α แสดงออก ซึ่งบ่งบอกถึงการทำงานของไซโตไคน์ในกลุ่ม adaptive immunity แบบ Th-1 cellular immunity ในหนูเป็นครั้งแรก และใน 1 วัน หลัง incubate เชื้อจะพบไซโตไคน์ IL-4 IL-10 ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การทำงานของไซโตไคน์ในกลุ่ม adaptive immunity แบบ Th-2 cellular immunity ซึ่งจะช่วยในการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา

ดังนั้นการศึกษาไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับโรคเลปโตสไปโรซิสโดยเฉพาะไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α บ่งบอกถึงการทำงานของร่างกายต่อเชื้อเลปโตสไปรา และหาสารปรับไซโตไคน์เหล่านี้ (modulate) เพื่อช่วยลดการอักเสบหรือเพื่อให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราได้

7. สมุนไพรในการรักษาโรค

การใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคมียาวนานกว่า 3,000 ปีแล้ว (Plaeger, 2003) ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาอย่างกว้างขวางและมีการแยกประเภทของสมุนไพรออกเป็นหมวดหมู่มากมาย ส่วนมากงานวิจัยจะเกี่ยวข้องในคน ส่วนในโคก็มีงานวิจัยบ้างเกี่ยวกับพืชสมุนไพร (Tabuti *et al.*, 2003) โดยสมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัยนี้จะใช้พืชสมุนไพรหลัก 5 ชนิดผสมกันอยู่ในรูปตำรับยาสมุนไพร โดยนำมาจากผลิตภัณฑ์ที่ได้ขึ้นทะเบียนจากองค์การอาหารและยา (อย.) 2 ผลิตภัณฑ์คือ มูพลัส® ซึ่งปกติในโคจะใช้ลดปัญหาด้านมออักเสบ ลดปริมาณโซมาติกเซลล์และรักษาโรคท้องร่วงในลูกโค ส่วนผสมพืชสมุนไพรของมูพลัส® ประกอบด้วย ไพล ฟ้าทะลายโจร และ ขมิ้นชัน ส่วนอีกผลิตภัณฑ์คือยาวิวแก้วมังกร® ปกติสามารถเพิ่มน้ำนมและทำให้แม่โคสุขภาพดี ส่วนผสมพืชสมุนไพรของยาวิวแก้วมังกร® คือ ฟ้าทะลายโจร ลูกใต้ใบ และน้ำมันราชสีห์

7.1 ฟ้ายะลวยโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees)



ภาพที่ 2 ฟ้ายะลวยโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees)

ที่มา: โครงการหอมรดกไทย (2542)

ฟ้ายะลวยโจร (ภาพที่ 2) เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้แพร่หลาย ในหลายประเทศ เช่น จีน อินเดีย และไทย เป็นต้น ในประเทศไทยสามารถพบได้ทั่วประเทศ แต่ปริมาณสารออกฤทธิ์อาจแตกต่างกันได้ ฟ้ายะลวยโจรอยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อพ้องหลายชื่อ เช่น น้ำลายพังพอน หญ้ากันงู ฟ้ายะลวย ขี้ต่ายขลุ่ย เป็นต้น เป็นพืชล้มลุก สูง 30 - 60 ซม. ลำต้นมักเป็นเหลี่ยมเห็นได้ชัดเจน ใบเดี่ยวติดกับลำต้นเป็นคู่ตรงข้ามในแต่ละข้อ ตัวใบรูปไข่รีหรือรียาว ปลายใบและโคนใบแหลม ก้านใบยาว ประมาณ 0.5 ซม. ขนาดของใบกว้าง 1 - 3 ซม. ยาว 3 - 15 ซม. ดอกสีขาวมีขนาดเล็กยาวประมาณ 1 ซม. ติดเป็นช่อยาวออกทั้งที่ปลายยอดและซอกโคนก้านใบ ผลเป็นฝักแบน กว้าง 3 - 4 มม. ยาว 1 - 1.5 ซม. เมื่อแก่ฝักจะแตกเป็น 2 ซีก ภายในมีเมล็ดแบน ซีกละ 3 - 7 เมล็ด (กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร "สมุนไพรพื้นบ้าน (ฉบับรวม), 2537) มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ว่ามีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ ฆ่าและยับยั้งแบคทีเรีย มีฤทธิ์ลดการอักเสบ เพิ่มการหลั่งน้ำลายทำให้ชุ่มคอและมีฤทธิ์สร้างภูมิคุ้มกัน โดยสารที่ออกฤทธิ์อยู่ในกลุ่มแลคโตน ที่มีชื่อว่าแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) ซึ่งพบได้ในส่วนที่เหนือดินของต้น (Nanduri *et al.*, 2004)

Singha *et al.* (2003) ศึกษาฟ้าทะลายโจร ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อโรค พบว่า สาร andrographolide ในฟ้าทะลายโจร มีคุณสมบัติที่คล้ายกับยาปฏิชีวนะคือทำลายหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B.subsitis* *E.coli* *P.aeruginosa* เชื้อรา *C.albicans* เป็นต้น

SCARG (1976) รายงานการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส ด้วยยาเม็ดที่มีส่วนผสมของ deoxyandrographolide andrographolide และ neoandrographolide ให้ผลดีต่อการรักษาประมาณ 80%

7.2 ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn)



ภาพที่ 3 ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn)

ที่มา: โครงการหอมรดกไทย (2542)

ขมิ้นชัน (ภาพที่ 3) อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้ล้มลุกที่มีลำต้นใต้ดินเป็นเหง้า เนื้อเหง้าสีเหลือง เหง้าเล็ก ขนาด 1 -2 ซม. ใบรูปรียาวาวที่ขอบใบค่อนข้างขนาน ปลายใบแหลม เนื้อใบเรียบ ขนาดกว้าง 8 - 15 ซม. ยาว 25 - 40 ซม. ก้านใบคล้ายกาบยาว 15 - 30 ซม. ดอกออกเป็นช่อทรงกระบอก ขนาดกว้าง 4 - 8 ซม. ยาว 5 - 14 ซม. ก้านดอกออกมาจากเหง้าโดยตรงยาว 7 - 15 ซม. มีกลีบประดับขนาดใหญ่จำนวนมาก เขียวอมชมพู สีตอนบนเข้มขึ้นกว่าตอนล่าง ดอกสีขาวอมเหลือง (กองวิชัยและพัฒนาสมุนไพร "สมุนไพรพื้นบ้าน (ฉบับรวม), 2537) ส่วนเหง้าซึ่งเป็นส่วนที่มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ curcuminoid และ tumeric oil (อัมพวันและมนัสสนันท์, 2544) สาร

curcuminoid มีสรรพคุณหลายอย่าง เช่น มีฤทธิ์ยับยั้งด้านการเกิดแผลในกระเพาะเพราะมีการกระตุ้นการหลั่ง mucin ออกมาเคลือบกระเพาะ ฤทธิ์ด้านฮีสตามีน ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ขับน้ำดี เพิ่มภูมิคุ้มกันร่างกายทั้งขบวนการฟาโกไซต อินเตอร์เฟอรอน มีฤทธิ์ลดการอักเสบ (Chainani-Wu, 2003; Wessler, 2005)

7.3 ใพล (Zingiber cassumnar Roxb)

ใพล (ภาพที่ 4) อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้ล้มลุก มีเหง้าใหญ่ เนื้อสีเหลือง กลิ่นหอม ใบเรียวยาว ปลายแหลม ออกดอกเป็นช่อ อยู่บนก้านช่อ ที่แทงจากเหง้า (สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน สำหรับบุคลากรสาธารณสุข, 2533) สารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ Curcuminoid และ β -sitosterol ซึ่งช่วยลดการอักเสบ (Ozaki *et al.*, 1991) บรรเทาอาการปวด โดยสารที่ออกฤทธิ์คือ (E)-4(3,4-dimethylphenyl) butadiene (Jeenapongsa *et al.*, 2003) ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น *b. subtilis* *P. aeruginosa* β -streptococcus group A (Habsah *et al.*, 2000) เป็นต้น



ภาพที่ 4 ใพล (Zingiber cassumnar Roxb)

ที่มา: โครงการหอมรดกไทย (2542)

7.4 น้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.)

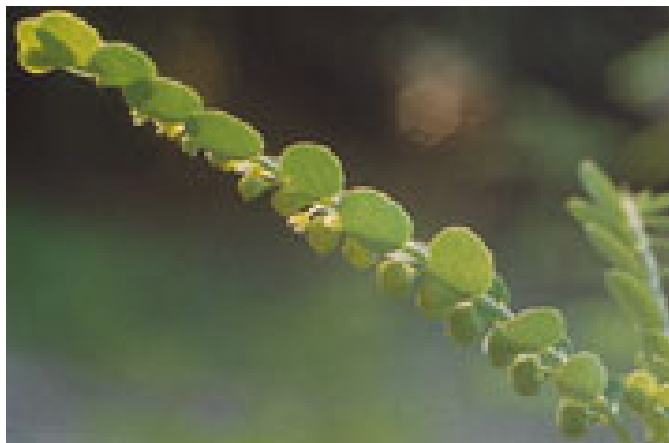


ภาพที่ 5 น้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.)

ที่มา: กองเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ (2550)

น้ำนมราชสีห์อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เป็นไม้ล้มลุก สูงประมาณ 30 - 40 ซม. ลำต้นมีขนละเอียดสีน้ำตาลอ่อน มีน้ำยางขาวไหลซึมหากเกิดบาดแผล ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามรูปขอบขนาน ผิวใบมีขนทั้งสองด้าน กว้าง 1.0 - 1.5 ซม. ยาว 2 - 4 ซม. ดอกแยกเพศ ออกเป็นช่อที่ซอกใบ ดอกไม่มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอก ใบประดับรูปถ้วยสีเขียวเข้ม ผลทรงกลมมี 3 พู เมื่อแก่สีเหลือง ผลแห้งแล้วแตก เมล็ดขนาดเล็กสีน้ำตาลแก่หรือแดง (สยามไภษัชยพิทักษ์ ภูมิปัญญาของชาติ, 2538) (ภาพที่ 5) มีสารออกฤทธิ์คือ β -sitosterol มีฤทธิ์ลดการอักเสบและต้านเชื้อแบคทีเรีย *Shigella* spp. (Vijaya *et al.*, 1995) และแก้อาการไม่มีน้ำนมในโค (Chifundera, 1998) สารที่สกัดได้มีฤทธิ์ลดการอักเสบ (Lanhers *et al.*, 1991)

7.5 ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*)



ภาพที่ 6 ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*)

ที่มา: กลุ่มโรคเอดส์ สำนักโรคเอดส์ วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค
กระทรวงสาธารณสุข (2551)

ลูกใต้ใบ (ภาพที่ 6) อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อพ้อง เช่น มะขามป้อมดิน หญ้าใต้ใบ และ หญ้าใต้ใบขาว สารออกฤทธิ์คือ Phyllanthin และ Hypophyllanthin มีฤทธิ์ลดการอักเสบ และ บำรุงตับ ลดความเป็นพิษจาก aflatoxin (Nazz *et al.*, 2007)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง

1.1 แม่โคนมระยะแห้งนม

แม่โคพันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเซียนตั้งท้องจำนวน 25 ตัว จากคอกสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยผ่านการท้องไม่เกิน 3 ท้อง และไม่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิส ที่จะคลอดในช่วงเดือนกันยายน พ.ศ. 2548 จนถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2549

1.2 ลูกโค

ลูกโคที่เกิดจากแม่โคนมทดลองทั้ง 25 ตัว

2. ดำรับพืชสมุนไพรไทยทดลอง

2.1 ดำรับพืชสมุนไพรไทยทดลอง ดำรับที่ 1

ดำรับสมุนไพรไทยดำรับที่ 1 มีส่วนผสมของ ฟ้าทะลายโจร ลูกใต้ใบ น้ำนมราชสีห์ เป็นหลัก เป็นยาผงสมุนไพรที่ผ่านกระบวนการอบแห้งและบดละเอียด โดยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทลิลี่ฟู้ดแอนด์ชาयน์ ขนาดที่ใช้ 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักโค 1 กิโลกรัมทุก 12 ชั่วโมง

2.2 ดำรับพืชสมุนไพรไทยทดลอง ดำรับที่ 2

ดำรับสมุนไพรไทยดำรับที่ 2 มีส่วนผสมของ ไพล ฟ้าทะลายโจร และขมิ้นชัน เป็นหลัก เป็นยาผงสมุนไพรที่ผ่านกระบวนการอบแห้งและบดละเอียด โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัทลิลี่ฟู้ดแอนด์ชาयน์ ขนาดที่ใช้ 50 มิลลิกรัมค่อน้ำหนักโค 1 กิโลกรัม ทุก 12 ชั่วโมง

วิธีการ

1. การตรวจหาแม่โคที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราก่อนการทดลอง

เก็บตัวอย่างปัสสาวะแม่โคตั้งท้องจำนวน 25 ตัว ที่จะคลอดในช่วงเดือนกันยายน พ.ศ. 2548 จนถึง เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2549 เพื่อตรวจวินิจฉัยหาเชื้อสไปโรจิต/เลปโตสไปราโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด เพื่อนำมาแบ่งกลุ่มทดลองต่อไป

2. การจัดแบ่งกลุ่มแม่โคนมทดลอง

แม่โคที่ได้รับการตรวจหาเชื้อสไปโรจิต/เลปโตสไปราแล้ว จะนำมาแบ่งกลุ่มโดยการสุ่มได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 แม่โคนมที่ไม่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและไม่ได้รับดำรับพืชสมุนไพรทดลอง
ชื่อกลุ่มย่อ NH-SCH-

กลุ่มที่ 2 แม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและไม่ได้รับดำรับพืชสมุนไพรทดลอง
ชื่อกลุ่มย่อ NH-SCH+

กลุ่มที่ 3 แม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและได้รับดำรับพืชสมุนไพรทดลอง
ชื่อกลุ่มย่อ H-SCH+

กลุ่มที่ 4 แม่โคนมที่ไม่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและได้รับดำรับพืชสมุนไพรทดลอง
ชื่อกลุ่มย่อ H-SCH-

4. ข้อมูลและตัวอย่างที่เก็บจากแม่โคนมและลูกโค

4.1 ข้อมูลและตัวอย่างที่เก็บจากแม่โคนม

4.1.1 ข้อมูลปริมาณน้ำนม

ปริมาณน้ำนมต่อวันนับตั้งแต่วันคลอดถึง 30 วันหลังคลอดของโคแต่ละตัวถูกเก็บไว้โดยเจ้าหน้าที่รีดนมประจำคอกสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

4.1.2 ข้อมูลสุขภาพโดยรวมและการเจ็บป่วย

ข้อมูลการตั้งท้อง ข้อมูลการเจ็บป่วยการการรักษาขณะทำการทดลองและการทำวัคซีน ถูกเก็บไว้โดยเจ้าหน้าที่ดูแลสัตว์ทดลองประจำคอกสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

4.1.3 การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากแม่โคทดลองจากเส้นเลือดดำ Jugular vein โดยก่อนการเก็บจะใช้แอลกอฮอล์ 70 % เช็ดบริเวณที่จะเก็บตัวอย่าง เก็บเลือดจำนวน 3 ซีซี ใส่หลอดเก็บเลือดสุญญากาศที่บรรจุสารการกันการแข็งตัวของเลือด ชนิด EDTA (Vacutainer EDTA[®]) ผสมเลือดและสารกันการแข็งตัวของเลือดเข้ากัน โดยการพลิกไปมาอย่างช้าๆ แช่ตัวอย่างเลือดในถังเก็บความเย็น

4.1.4 ตัวอย่างซีรัม

แม่โคถูกเก็บเลือดจากบริเวณ Jugular vein โดยก่อนการเก็บจะใช้แอลกอฮอล์ 70 % เช็ดบริเวณที่จะเก็บเลือดจำนวน 9 ซีซี ใส่ในหลอดเก็บเลือดสุญญากาศชนิดไม่มีสารกันการแข็งตัวของเลือด (SST gel&clot activator vacutainer[®]) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-6 ชั่วโมง จึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 3500 rpm (รอบต่อนาที) 10 นาที จะแยกเป็น 3 ส่วนคือ ซีรัม เจล และ เม็ดเลือดจาก

บนถึงล่าง ตามลำดับ ใช้ปิเปตดูดซีรัมใส่ในหลอด microfuge ขนาด 1.5 ซีซี เก็บที่อุณหภูมิ -40 ถึง -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์

4.1.5 ตัวอย่างปัสสาวะ

แม่โคจะถูกกระตุ้นโดยใช้มือที่ใส่ถุงมือยางขึ้น ลงบริเวณผิวหนังส่วนล่าง อวัยวะเพศ เมื่อโคปัสสาวะจะเก็บบริเวณส่วนกลางของปัสสาวะ ใส่ในถุง Stomacher bag ที่ปลอดเชื้อ

4.2 ข้อมูลและตัวอย่างที่เก็บจากลูกโคนม

เก็บตัวอย่างเลือด ซีรัมและปัสสาวะ จากลูกโคนมในสัปดาห์ตลอดถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด โดยวิธีเก็บตัวอย่างเหมือนข้อ 4.1.3 4.1.4 และ 4.1.5 ตามลำดับ

5. การตรวจสอบความเป็นพิษของตำรับพืชสมุนไพรทดลองต่อสุขภาพแม่โคนม

5.1 การตรวจสอบค่าทางโลหิตวิทยา

เลือดในหลอดเก็บเลือดสุญญากาศที่มีสารกันการแข็งตัวของเลือด ชนิด EDTA ถูกส่งตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยา ที่ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา โรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เพื่อตรวจจำนวนเม็ดเลือดแดง (red blood count; RBC) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ค่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin) จำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood count; WBC) จำนวนเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล (neutrophil) จำนวนเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (lymphocyte) จำนวนเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (monocyte) จำนวนเม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิล (eosinophil) จำนวนเกล็ดเลือด (platelet) และค่าพลาสมาโปรตีน (plasma protein)

5.2 การตรวจวัดระดับเอนไซม์และความผิดปกติของเนื้อเยื่อไต

5.2.1 การตรวจวัดความเป็นกรด-ด่าง ของปัสสาวะ

นำกระดาษวัดกรด-ด่างจุ่มกระดาษลงในปัสสาวะที่อยู่ใน Stomacher bag อ่านผลโดยการเปลี่ยนแปลงสีของกระดาษวัดกรด-ด่าง

5.2.2 การตรวจวัดระดับยูเรียในกระแสเลือด (Blood urea nitrogen; BUN) ในซีรัม

การตรวจการตรวจวัดระดับยูเรียในกระแสเลือด (Blood urea nitrogen, BUN) จะใช้วิธี Urease-Berthlot Method (Chaney and Marbach, 1962; Kaplan and Teng, 1982) หลักการมีดังนี้ ยูเรียในซีรัมจะสลายเป็นแอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเอนไซม์ ยูรีเอส (urease) แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะเกิดสีโดยทำปฏิกิริยากับ hypochlorite และ salicylate โดยมี nitroprusside เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำการตรวจโดยนำซีรัมที่จะตรวจและน้ำยูเรียมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นมา 0.02 ซีซี ผสมกับเอนไซม์ urease ใน salicylate-nitroprusside buffer จำนวน 2.5 ซีซี เขย่าและอุ่นในอ่างน้ำปรับ อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติม alkaline hypochlorite 2.5 ซีซี ผสมและอุ่นในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที การเตรียมค่า blank จะทำเหมือนที่กล่าวมาแต่จะไม่ใส่ซีรัม อ่านค่า OD ที่ได้ ที่ความยาวคลื่นแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยปรับให้ค่า blank เป็นศูนย์ การอ่านผลจะนำค่า OD ที่วัดได้จากยูเรียมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น มาสร้างกราฟเส้นตรงมาตรฐานระหว่างค่า OD กับความเข้มข้น (มิลลิกรัม/เดซิลิตร) นำค่า OD ซีรัมที่ตรวจได้มา มาเทียบกับกราฟ เพื่อแปลงเป็นความเข้มข้น (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)

5.2.3 การตรวจวัดระดับครีเอตินีน (creatinine) ในซีรัม

การตรวจวัดระดับครีเอตินีน (creatinine) ในซีรัม จะใช้วิธี New Convinient Method (Owen *et al.*, 1954 ; Tausky, 1954) หลักการมีดังนี้ ครีเอตินีนในซีรัมจะรวมตัวกับ picric acid ซึ่งได้สีน้ำตาลเมื่อเป็นด่าง ทำการตรวจโดย นำซีรัมที่จะตรวจและน้ำครีเอตินีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นมา 0.5 ซีซี ผสมกับ picric acid จำนวน 3 ซีซี เขย่า 10 วินาทีและปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5 นาที ดูดส่วนใส 2.5 ซีซีที่ปั่นได้ มาผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.4 โมลาร์ 0.5 ซีซี เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส 15 นาที การเตรียมค่า blank จะทำ

เหมือนที่กล่าวมาแต่จะไม่ใส่ซีรัม อ่านผลค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยปรับให้ค่า blank เป็นศูนย์ อ่านผลจะนำค่า OD ที่วัดได้จากครีเอทีนีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น มาสร้างกราฟเส้นตรงมาตรฐานระหว่างค่า OD กับความเข้มข้น (มิลลิกรัม/เดซิลิตร) นำค่า OD ซีรัมที่ตรวจได้มา มาเทียบกับกราฟ เพื่อแปลงเป็นความเข้มข้น (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)

6. การตรวจวัดระดับไซโตคายน์บ่งบอกความเครียดและการอักเสบ

วัดสารไซโตคายน์ 2 ชนิดคือ IFN- γ โดยใช้ชุดตรวจ IFN- γ (Bovine IFN- γ Screening Set) บริษัท ENDOGEN (U.S.A) และสาร TNF- α โดยใช้ชุดตรวจ TNF- α (Bovine TNF- α Screening Set) บริษัท ENDOGEN (U.S.A) ตรวจโดยวิธี ELISA แบบ antibody sandwich

7. การตรวจสอบอิทธิพลของตำรับพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งและ/หรือลดการปลดปล่อยเชื้อสไปโรจิต/เลปโตสไปราจากแม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรค

7.1 อิทธิพลต่อการปลดปล่อยเชื้อ

7.1.1 การดูเชื้อ สไปโรจิต/เลปโตสไปรา ด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด

นำปัสสาวะที่เก็บได้จำนวน 1 ซีซี มาใส่ในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH 9 ซีซี เพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส ทุกวันที่ 2 4 และ 6 นับจากวันเก็บปัสสาวะ จะนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ปัสสาวะมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด โดยดูตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ปัสสาวะ มา 20 ไมโครลิตร ลงในสไลด์ และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดที่กำลังขยาย 100 เท่า บันทึกผลการดู โดยแบ่งออกเป็น 5 เกรดดังนี้

เกรด 0 หมายถึง ไม่พบเชื้อสไปโรจิต ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เกรด 1 หมายถึง พบเชื้อสไปโรจิตประมาณ 1 ใน 4 ของพื้นที่ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เกรด 2 หมายถึง พบเชื้อสไปโรจิตประมาณ 1 ใน 2 ของพื้นที่ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เกรด 3 หมายถึง พบเชื้อสไปโรจิตประมาณ 3 ใน 4 ของพื้นที่ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เกรด 4 หมายถึง พบเชื้อสไปโรจิตประมาณมากกว่า 3 ใน 4 ของพื้นที่ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

7.1.2 การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

การออกแบบ primer จะอิงตามการรายงานของ Gravekamp *et al.* (1993) และใช้วิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ อิงตามการรายงานของ ศิริวรรณและคณะ (2546) ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จะถูกย้อมด้วย SYBR gold และนำไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอจากการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอใน agarose gel

7.2 อิทธิพลต่อระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราเมื่อตรวจด้วยวิธี Microscopic Agglutination Test (MAT)

ตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคเลปโตสไปโรซิส ด้วยวิธี MAT โดยส่งซีรัมไปตรวจที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยใช้ระดับไทเตอร์ 1:50 ขึ้นไปเป็นระดับตัดสินใจว่าเป็นมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา

8. สถิติวิเคราะห์

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง 2 ประชากร ด้วยวิธี T-test วิเคราะห์ความแตกต่างมากกว่า 2 ประชากร ด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบเชิงซ้อน (Multiple Comparison) ด้วยวิธี Tukey's Honesty Significant Difference (HSD) โดยใช้โปรแกรม MINITAB 14 ค่า *P value* น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1 ถือว่ามีความแตกต่าง โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มในแต่ละช่วงเวลา และ *P value* น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 ถือว่ามีความแตกต่าง โดยเปรียบเทียบช่วงเวลาของแต่ละกลุ่ม

ผลและวิจารณ์

ผล

1. สรีรวิทยาเปรียบเทียบระหว่างแม่โคนมที่ได้รับตำรับสมุนไพร และแม่โคนมที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรในระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด

1.1 ผลของตำรับสมุนไพรต่ออุณหภูมิร่างกายและค่าโลหิตวิทยาของแม่โคนม

อุณหภูมิ

แม่โคนมจำนวน 14 ตัวได้รับตำรับสมุนไพรทดลอง (Herb) และ แม่โคนมจำนวน 11 ตัวไม่ได้รับตำรับสมุนไพรทดลอง (No herb) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิร่างกายในระยะใกล้คลอด คลอดและหลังคลอด ได้แสดงในภาพที่ 8 พบว่าอุณหภูมิร่างกายของแม่โคนมทั้งสองกลุ่มอยู่ในค่าอ้างอิงมาตรฐาน ยกเว้นแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร มีอุณหภูมิร่างกายสูงกว่ามาตรฐานในระยะ 1 สัปดาห์หลังคลอด เมื่อเปรียบเทียบช่วงเวลาของแต่ละกลุ่มพบว่า แม่โคนมทั้งสองกลุ่มมีค่าอุณหภูมิร่างกายสูงขึ้นในระยะใกล้คลอด (-1 wk) วันคลอด (0) และหลังคลอด 1 สัปดาห์ (+1 wk) โดยเฉพาะแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรในช่วง 1 สัปดาห์หลังคลอดจะมีอุณหภูมิร่างกายสูงกว่าในช่วงก่อนการทดลอง (Before) และช่วง 4 สัปดาห์หลังคลอด (+4 wk) ($p \leq 0.05$) สมุนไพรมีผลต่ออุณหภูมิร่างกายของโคนม ดังจะพบว่าเมื่อเริ่มให้ตำรับสมุนไพร (ระยะ -5 ถึง -3) และในระยะ 2 สัปดาห์หลังคลอด แม่โคนมจะมีอุณหภูมิสูงกว่ากลุ่มไม่ได้รับสมุนไพร ($p \leq 0.05$, ภาพที่ 8)

ค่าโลหิตวิทยา

ในระยะก่อนคลอดจนถึงวันคลอด แม่โคนมทั้งสองกลุ่มมีจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ใกล้เคียงกันในระดับมาตรฐานปกติและมีค่าคงที่ ดังแสดงในภาพ 9A นับตั้งแต่วันคลอด จำนวนเม็ดเลือดแดงในแม่โคนมกลุ่มไม่ได้รับตำรับสมุนไพรและกลุ่มได้รับสมุนไพรมีค่าเม็ดเลือดแดงลดลงช่วงหลังคลอด โดยเฉพาะแม่โคนมกลุ่มไม่ได้รับตำรับสมุนไพรมีค่าลดลงรวดเร็วและมีค่าลดลงตลอดระยะเวลานับตั้งแต่วันคลอด เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงก่อนการทดลองถึง 1 สัปดาห์ก่อน

คลอด (ภาพ 9A ระยะ 0 1 2 และ 4) และมีความแตกต่างทางสถิติในระยะ 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด ($p \leq 0.05$, ภาพที่ 9A) โดยพบว่าในระยะ 2 สัปดาห์หลังคลอด จำนวนเม็ดเลือดแดงของแม่โคนมในกลุ่มไม่ได้รับตำรับสมุนไพรมีค่าต่ำกว่าค่าของแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร ($p \leq 0.10$) ดังแสดงในภาพ 9A

ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit, ภาพที่ 9B) และค่าฮีโมโกลบิน (hemagobin, ภาพที่ 9C) มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงไปในแนวทางเดียวกันในแม่โคนมทดลองทั้งสองกลุ่ม คือ พบค่าฮีโมโกลบินและค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีระดับคงที่ ตั้งแต่วันเริ่มการทดลองจนถึงวันคลอดและมีการลดลงตั้งแต่วันคลอดจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อยู่ในระดับอ้างอิงมาตรฐาน โดย 4 สัปดาห์หลังคลอดมีค่าต่ำสุด ($p \leq 0.05$) และเมื่อคำนวณทางสถิติของปริมาณฮีโมโกลบินและค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นแต่ละช่วงเวลาของกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรและไม่ได้รับตำรับสมุนไพร ไม่พบความแตกต่างในสองกลุ่มทดลอง

ตลอดระยะเวลาการทดลองปริมาณเม็ดเลือดขาว (WBC) ในแม่โคนมทั้งสองกลุ่มมีการเปลี่ยนแปลงไปในแนวทางเดียวกัน (ภาพที่ 9D) คือปริมาณเม็ดเลือดขาวจะมีค่าสูงขึ้นในระยะ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด และวันคลอด สำหรับใน 1 สัปดาห์หลังคลอดจนถึง 4 สัปดาห์หลังคลอด ปริมาณเม็ดเลือดขาวจะลดลงอยู่ในระดับใกล้เคียงกับในช่วง 1 สัปดาห์ก่อนคลอด เมื่อคำนวณทางสถิติช่วงเวลาของแต่ละกลุ่ม ไม่พบความแตกต่างในช่วงเวลา อย่างไรก็ตาม ปริมาณเม็ดเลือดขาวในแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรจะมีปริมาณเม็ดเลือดขาวที่สูงกว่าค่าของแม่โคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรในทุกระยะ และพบความแตกต่างทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่ม ในสัปดาห์ที่ 2 ก่อนคลอด ($p \leq 0.10$) และ สัปดาห์ที่ 4 หลังคลอด ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในภาพ 9D

จำนวนเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล (neutrophil) ในโคนมทั้งสองกลุ่มมีค่าอยู่ในระดับมาตรฐาน และมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงระดับเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาการทดลอง และไม่พบความแตกต่างระหว่างสองกลุ่ม (ภาพ 10A) โดยจะพบการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล 1 สัปดาห์ก่อนคลอดจนถึงวันคลอด และใน 1 สัปดาห์หลังคลอดปริมาณเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลจะเริ่มปรับลดลงจนเข้าสู่ระดับเดิมในสัปดาห์ที่ 2 – 4 สัปดาห์หลังคลอด โดยวันคลอดจะพบค่าเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลสูงที่สุด ดังแสดงในภาพ 10A

จำนวนเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์ (lymphocyte) ในโคนมทั้งสองกลุ่มมีค่าอยู่ในระดับมาตรฐาน (ภาพที่ 10B) ในแม่โคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรมีระดับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์ที่ลดลงตั้งแต่เริ่มการทดลองจนถึงสิ้นสุดการทดลอง แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ในขณะที่แม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรจะมีจำนวนเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์ที่สูงตั้งแต่ระยะเริ่มให้สมุนไพรจนถึงสัปดาห์ที่ 2 ก่อนคลอด และในระยะ 1 สัปดาห์ก่อนคลอดถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด มีระดับลิมโฟซัยต์ลดลงอยู่ในระดับเดียวกัน จากนั้นเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์ก็จะเพิ่มขึ้นจนจบการทดลอง ดังแสดงในภาพ 10B อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณทางสถิติช่วงเวลาของแต่ละกลุ่ม ไม่พบความแตกต่างในแต่ละระยะ แต่จะพบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์ในแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรจะมีจำนวนสูงกว่าในแม่โคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรในเกือบทุกระยะของการทดลอง โดยพบความแตกต่างทางสถิติในระยะ สัปดาห์ที่ 5 ถึง สัปดาห์ที่ 3 ก่อนคลอด ($p \leq 0.05$) สัปดาห์ที่ 2 ก่อนคลอด ($p \leq 0.10$) วันคลอด ($p \leq 0.10$) สัปดาห์ที่ 2 หลังคลอด ($p \leq 0.05$) และสัปดาห์ที่ 4 หลังคลอด ($p \leq 0.10$)

จำนวนเม็ดเลือดขาวโมโนซัยต์ (monocyte) ในโคนมทั้งสองกลุ่มมีค่าอยู่ในระดับมาตรฐาน เมื่อคำนวณทางสถิติช่วงเวลาของแต่ละกลุ่ม ไม่พบความแตกต่างในแต่ละระยะเวลา (ภาพที่ 10C) อย่างไรก็ตามพบว่าเม็ดเลือดขาวโมโนซัยต์ในแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรจะมีปริมาณเม็ดเลือดขาวโมโนซัยต์ที่มากกว่าแม่โคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรในสัปดาห์ที่ 1 ก่อนคลอด ($p \leq 0.10$) สัปดาห์ที่ 1 หลังคลอด ($p \leq 0.10$) และสัปดาห์ที่ 4 หลังคลอด ($p \leq 0.10$)

ตลอดระยะเวลาการทดลอง จำนวนเม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิล (eosinophil) ในแม่โคนมทั้งสองกลุ่มมีการเปลี่ยนแปลงในแนวทางเดียวกัน (ภาพที่ 10D) คือจำนวนเม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิลมีจำนวนลดลงตั้งแต่เริ่มการให้ตำรับสมุนไพร โดยเฉพาะในช่วงวันคลอดถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด (กลุ่มได้รับตำรับสมุนไพร) และระยะ 2 -4 สัปดาห์หลังคลอด (กลุ่มไม่ได้รับตำรับสมุนไพร) มีค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิลต่ำสุด เม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิลของแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรสูงกว่าค่าของแม่โคนมไม่ได้รับตำรับสมุนไพร ในสัปดาห์ที่ 4 หลังคลอด ($p \leq 0.05$)

จำนวนเกล็ดเลือด (platelet) ในโคนมทั้งสองกลุ่มอยู่ในค่ามาตรฐาน (ภาพที่ 11A) ในแม่โคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรจะมีจำนวนเกล็ดเลือดลดลงระยะเริ่มการทดลองถึง 1 สัปดาห์ก่อนคลอดและจากนั้นจำนวนเกล็ดเลือดจะเพิ่มขึ้น โดยมีค่าสูงสุดในระยะ 1 สัปดาห์หลังคลอด ในขณะที่แม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรพบว่าสมุนไพรมีผลให้จำนวนเกล็ดเลือดเพิ่มขึ้น

ต่อเนื่อง ตั้งแต่เริ่มการให้สมุนไพรจนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งระยะ 4 สัปดาห์หลังคลอด จะมีเกล็ดเลือดที่สูงที่สุด ดังแสดงในภาพ 11A สำหรับการเปรียบเทียบจำนวนเกล็ดเลือดระหว่างแม่โคนม 2 กลุ่ม พบว่าจำนวนเกล็ดเลือดในแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรจะมีปริมาณเกล็ดเลือดที่มากกว่าแม่โคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรในระยะ 2 ถึง 1 สัปดาห์ก่อนคลอด เมื่อทดลองทางสถิติพบว่าแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรมีปริมาณเกล็ดเลือดที่มากกว่าแม่โคนมกลุ่มไม่ได้รับตำรับสมุนไพรอย่างมีนัยสำคัญที่สัปดาห์ที่ 2 ก่อนคลอด ($p \leq 0.05$) และสัปดาห์ที่ 1 ก่อนคลอด ($p \leq 0.10$)

ตลอดช่วงการทดลองค่าพลาสมาโปรตีน (plasma protein, ภาพที่ 11B) ในแม่โคนมทั้งสองกลุ่มมีการเปลี่ยนแปลงในแนวทางเดียวกัน และไม่พบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มในทุกช่วงเวลา (ภาพที่ 11B) คือ ค่าพลาสมาโปรตีนค่อยๆ ลดลงตั้งแต่ 5 สัปดาห์ก่อนคลอดจนถึงวันคลอด มีค่าพลาสมาโปรตีนต่ำสุด จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการทดลอง

1.2 ผลตำรับสมุนไพรด้านความปลอดภัยต่อไตและผลต่อปริมาณน้ำนม

ตลอดช่วงการทดลองค่ากรดต่างในปัสสาวะ (urine pH) ในแม่โคนมทั้งสองกลุ่มอยู่ในค่ามาตรฐานและมีการเปลี่ยนแปลงในแนวทางเดียวกัน (ภาพที่ 12A) คือ พบความเป็นด่างในปัสสาวะลดลงอย่างช้าๆ ตั้งแต่เริ่มการทดลองโดยมีค่ากรดต่างต่ำสุดในวันคลอด ในกลุ่มไม่ได้รับตำรับสมุนไพร และที่ 1 สัปดาห์หลังคลอดในกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร ($p \leq 0.05$) สำหรับแต่ละช่วงเวลาของกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรและไม่ได้รับตำรับสมุนไพร ทั้งสองกลุ่มไม่พบแตกต่างทางสถิติของกรดต่างในปัสสาวะ

สำหรับค่าครีเอทีนีน (creatinine) ในโคนมทั้งสองกลุ่มมีค่าอยู่ในระดับมาตรฐาน (ภาพที่ 12B) และมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันคือ ค่าครีเอทีนีนมีค่าคงที่ตั้งแต่เริ่มการทดลองจนถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด และค่านี้จะลดต่ำสุดในระยะ 2 -4 สัปดาห์หลังคลอด สำหรับค่าครีเอทีนีนในแม่โคนมทั้งสองกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันเกือบตลอดระยะการทดสอบ ยกเว้นในวันคลอดที่แม่โคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรมีระดับครีเอทีนีนต่ำกว่าค่าของแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร ($p \leq 0.10$)

ค่ายูเรียในเลือด (BUN) (ภาพที่ 12C) ในโคนมทั้งสองกลุ่มมีค่าอยู่ในระดับมาตรฐาน ในแม่โคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรมีการเปลี่ยนแปลงค่ายูเรียในเลือดจะลดลงในสัปดาห์ที่ 5

ถึงสัปดาห์ที่ 3 ก่อนคลอด และจะเพิ่มขึ้นจนถึงวันคลอดและจะลดลงหลังคลอดจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยพบว่าในวันคลอดจะมีค่ายูเรียในเลือดที่มากที่สุด แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทุกระยะการทดลอง ในแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรมีการเปลี่ยนแปลงค่ายูเรียในเลือดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตั้งแต่ 5 สัปดาห์ก่อนคลอดจนถึง 1 สัปดาห์ก่อนคลอด และจะลดลงจนถึง 2 สัปดาห์หลังคลอด จากนั้นจะพบปริมาณยูเรียเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 หลังคลอด แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทุกระยะการทดลอง เมื่อทดสอบค่าทางสถิติเปรียบเทียบแต่ค่ายูเรียในเลือดในแม่โคนมกลุ่มไม่ได้รับตำรับสมุนไพรกับแม่โคนมกลุ่มได้รับตำรับสมุนไพรพบว่าในกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรจะมีค่ายูเรียในเลือดที่สูงกว่ากลุ่มไม่ได้รับสมุนไพรที่สัปดาห์ที่ 5-3 ก่อนคลอด ($p \leq 0.10$) แต่ในวันคลอดกลุ่มที่ไม่ได้รับสมุนไพรจะมีค่ายูเรียในเลือดที่สูงกว่า ($p \leq 0.05$)

ปริมาณน้ำนมตลอด 1 เดือนแรกของการให้นม (ภาพที่ 13) ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำนมจากแม่โคนมทั้งสองกลุ่ม

1.3 ผลตำรับสมุนไพรต่อระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในแม่โคทดลอง

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงระดับ IFN- γ แสดงในภาพ 14A ในแม่โคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรมีการเปลี่ยนแปลงค่า IFN- γ ในช่วง 1 สัปดาห์ก่อนคลอดค่า IFN- γ มีแนวโน้มลดลงต่ำกว่าระยะก่อนเริ่มการทดลอง และจะเพิ่มระดับ IFN- γ สูงขึ้นจนถึงสิ้นสุดการทดลอง แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบตลอดระยะการทดลอง ในขณะที่แม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร สมุนไพรจะมีผลลดระดับ IFN- γ ตั้งแต่ให้เริ่มให้ตำรับสมุนไพรและคงระดับค่าตลอดจนถึงสิ้นสุดการทดลอง แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบตลอดระยะการทดลองเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบระดับ IFN- γ ระหว่าง 2 กลุ่มพบว่าในแม่โคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรจะมีแนวโน้มของระดับ IFN- γ สูงกว่าค่าของแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรทุกระยะ อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าระดับ IFN- γ ในโคนมทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน

ระดับไซโตไคน์ TNF- α (ภาพที่ 14B) มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงคือ ในกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรระดับ TNF- α จะสูงขึ้นตั้งแต่เริ่มให้ตำรับสมุนไพรจนถึง 1 สัปดาห์ก่อนคลอด และระดับ TNF- α จะลดลงอย่างมากในวันคลอด หลังจากวันคลอดระดับ TNF- α จะมีระดับสูงขึ้นจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในแม่โคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร ระดับ TNF- α จะลดลงในสัปดาห์ที่ 5 ถึง

สัปดาห์ที่ 3 ก่อนคลอด และจะเพิ่มระดับ TNF- α สูงขึ้นเล็กน้อยจนถึงวันคลอด จากนั้นจะลดระดับ TNF- α จนสิ้นสุดการทดลอง แต่ในทางสถิติจะไม่พบความแตกต่างของระดับ TNF- α ในแต่ละช่วงเวลา สำหรับระดับ TNF- α ในกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรจะมีค่ามากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรเกือบทุกระยะ ยกเว้นในวันคลอด อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่า ระดับ TNF- α ของกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรไม่พบความแตกต่างกับระดับของกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร

1.4 ผลของตำรับสมุนไพรต่อสุขภาพของแม่โคนมในช่วงทดลอง

ผลบันทึกข้อมูลของกลุ่มอาการทางเมตาบอลิก เช่นภาวะการคัดลอกยากร่วมกับการมีหรือไม่มีการแท้งลูก การเกิดเต้านมอักเสบ และการเจ็บกีบ ในระยะ 5 สัปดาห์ก่อนคลอด ถึง 4 สัปดาห์หลังคลอด แสดงในตารางที่ 1 ภาวะการคัดลอกยากร่วมกับการมีหรือไม่มีการแท้งลูก ในแม่โคกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร จะพบ 3 ตัว (12%) ในขณะที่ไม่พบแม่โคตัวใดในกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรแสดงการคัดลอกยากร่วม (0%) เช่นเดียวกัน การเกิดเต้านมอักเสบในแม่โคกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร จะพบ 2 ตัว (8%) แต่ไม่พบแม่โคตัวใดในกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรแสดงอาการเต้านมอักเสบ ส่วนผลการเจ็บกีบแม่โคในกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรและแม่โคที่ได้รับตำรับสมุนไพร จะมีจำนวนแม่โคที่แสดงอาการใกล้เคียงกัน คือ 2 ตัว (8%) และ 3 ตัว (12%) ตามลำดับ

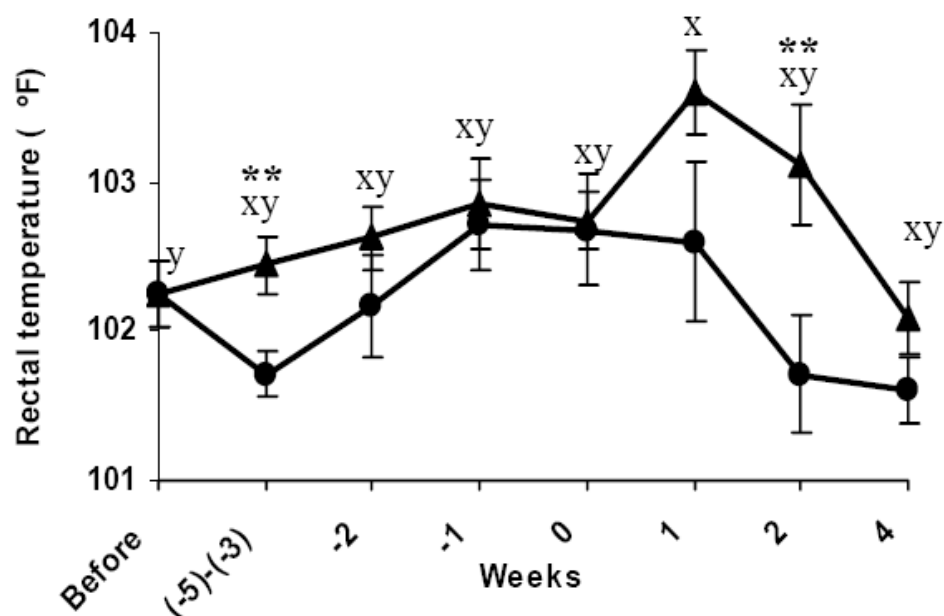
ตารางที่ 1 ประวัติการป่วยด้วยภาวะทางเมตาบอลิกในช่วงการทดลองของแม่โคนมทดลอง

กลุ่มแม่โคทดลอง	จำนวน (ตัว)	ประวัติอาการป่วย (ตัว(ร้อยละ))		
		การคัดลอกยากร่วม*	เต้านมอักเสบ	เจ็บกีบ
No herb	11	3 (12%)	2 (8%)	2 (8%)
Herb	14	0 (0%)	0 (0%)	3 (12%)

หมายเหตุ No herb แม่โคกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร

Herb แม่โคกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร

* อาจมีและ/หรือไม่มีภาวะแท้งลูกรวมอยู่ด้วย



ภาพที่ 8 อุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

ระยะ Before คือ ระยะก่อนการทดลอง

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

แสดง mean $\pm$ SEM

● กลุ่มโคนที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรทดลอง (No Herb)

▲ กลุ่มโคนที่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (Herb)

** ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน

xyz ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ช่วงเวลา ของกลุ่มที่ได้รับ ตำรับสมุนไพร (Herb)

ภาพที่ 9 จำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC, A) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit, B) ค่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin, C) จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC, D) ของกลุ่ม

โคนมทดลองในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

ระยะ Before คือ ระยะก่อนการทดลอง

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

แสดง mean $\pm$ SEM

 กลุ่มโคที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรทดลอง (No Herb)

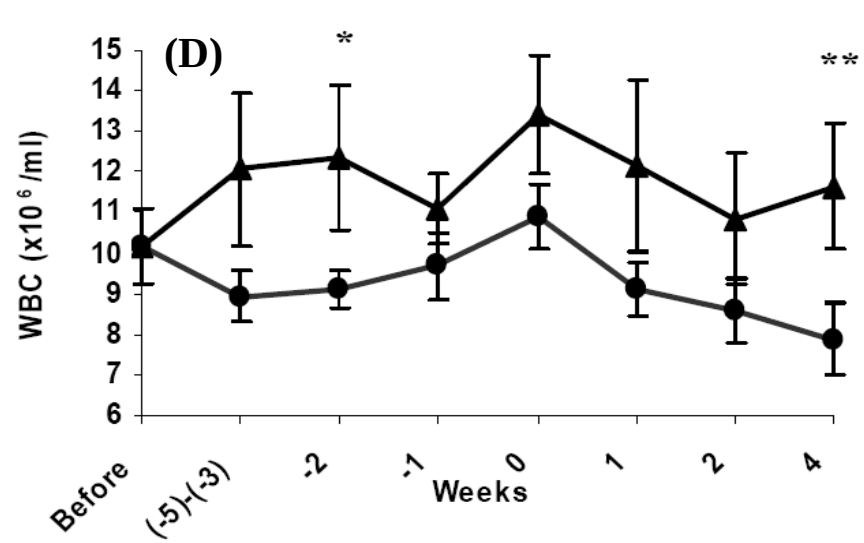
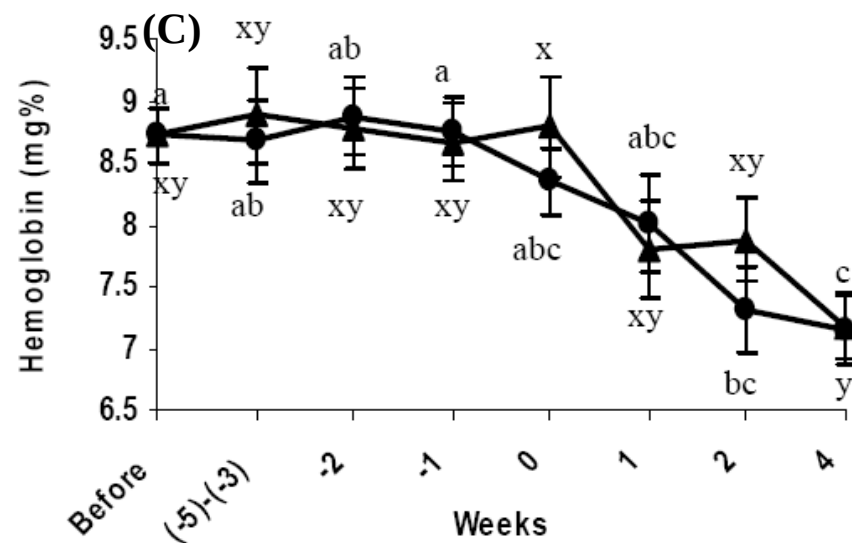
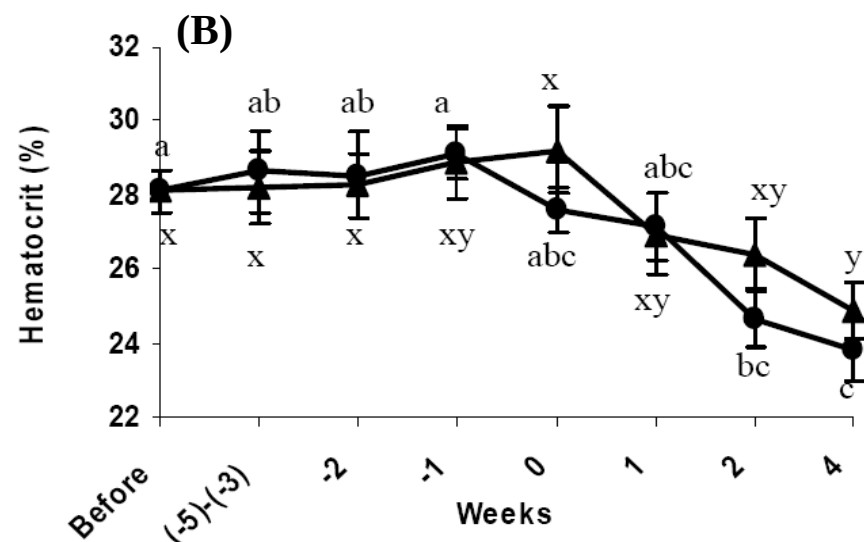
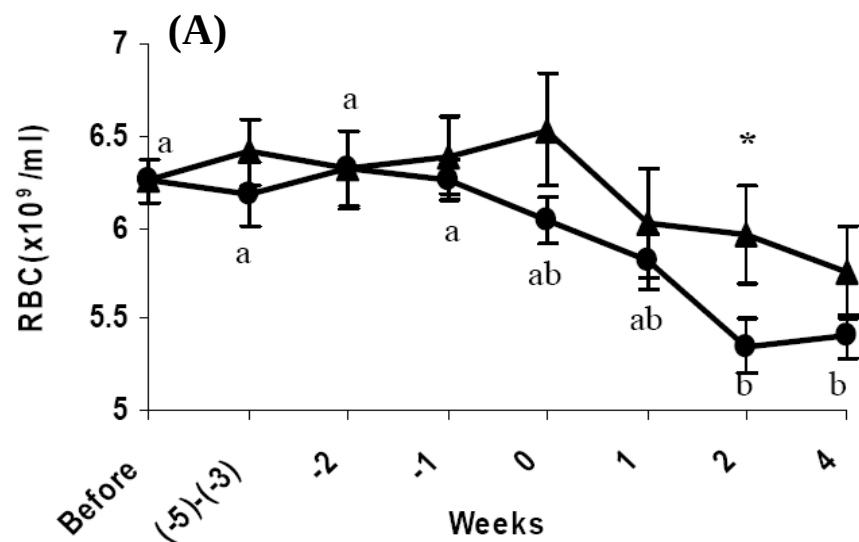
 กลุ่มโคที่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (Herb)

* ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.10$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน

** ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน

abc ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ช่วงเวลา ของกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (No Herb)

xyz ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ช่วงเวลา ของกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร (Herb)



ภาพที่ 10 ปริมาณเม็ดเลือดขาวแยกประเภท neutrophil (A) lymphocyte (B) monocyte (C) และ eosinophil (D) ของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะ
ก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

ระยะ Before คือ ระยะก่อนการทดลอง

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

แสดง mean $\pm$ SEM

 กลุ่มโคที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรทดลอง (No Herb)

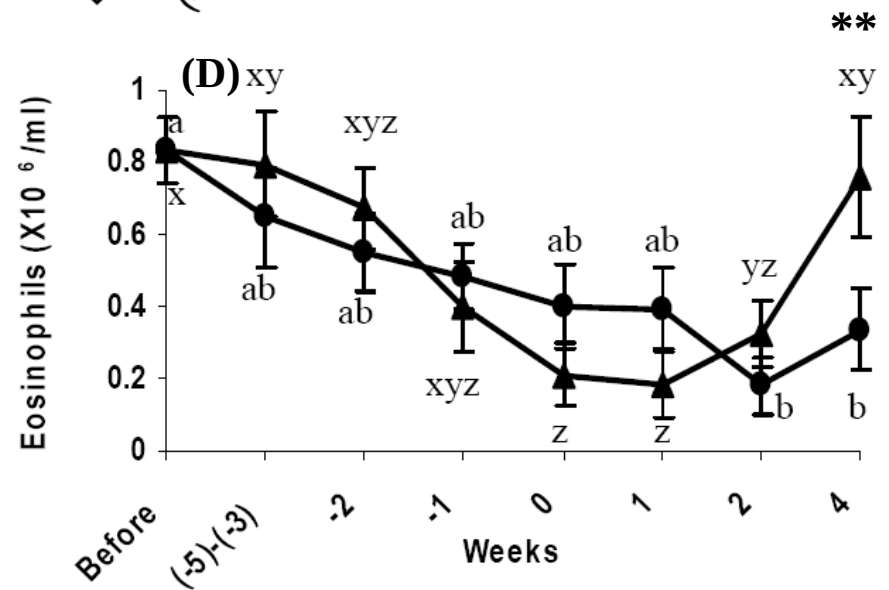
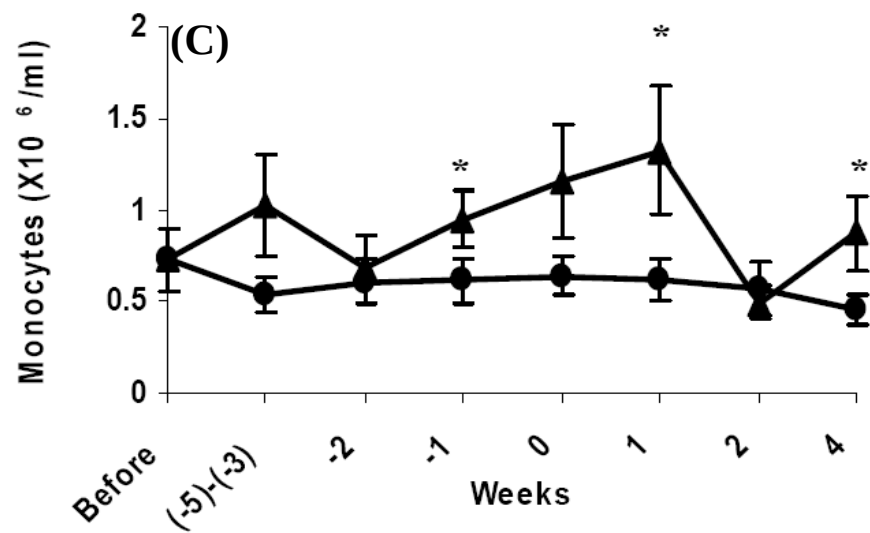
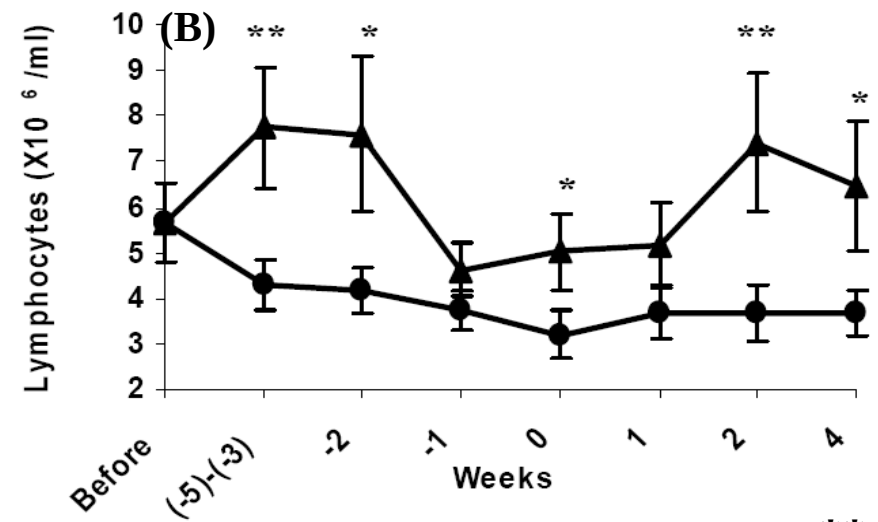
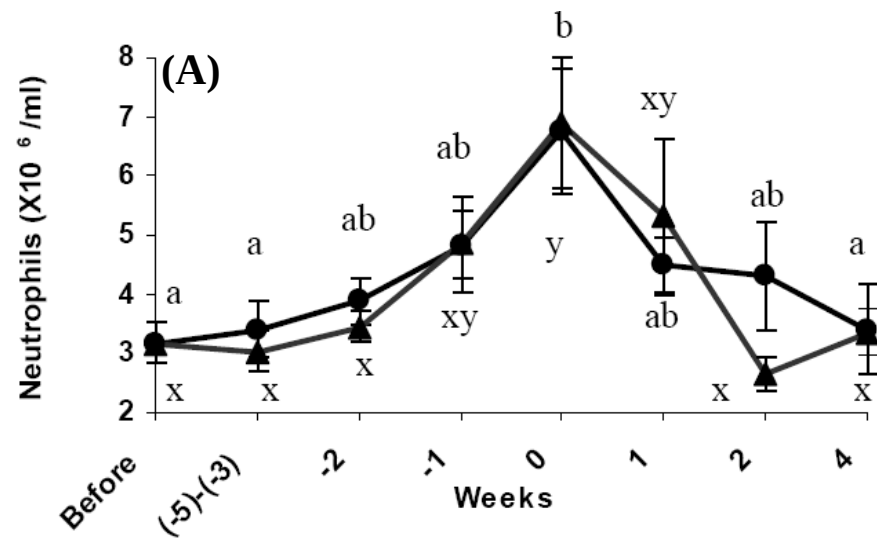
 กลุ่มโคที่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (Herb)

* ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.10$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน

** ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน

abc ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ช่วงเวลา ของกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (No Herb)

xyz ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ช่วงเวลา ของกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร (Herb)



ภาพที่ 11 จำนวนเกล็ดเลือด (platelet, A) โปรตีนในพลาสมา (B) ของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

ระยะ Before คือ ระยะก่อนการทดลอง

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

แสดง mean $\pm$ SEM

● กลุ่มโคที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรทดลอง (No Herb)

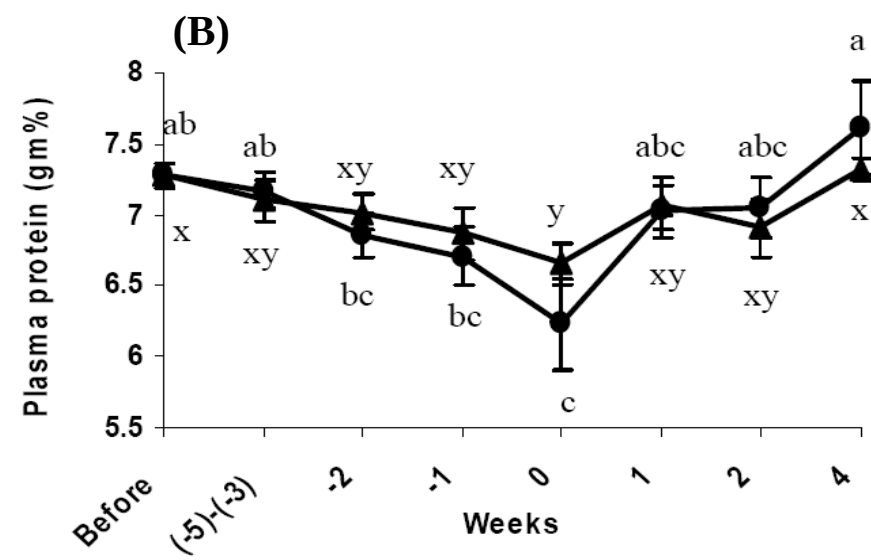
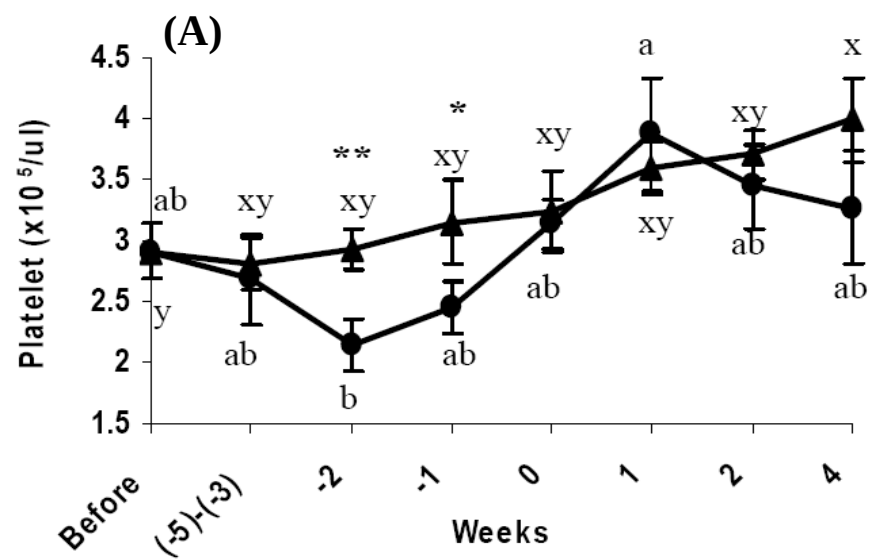
▲ กลุ่มโคที่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (Herb)

* ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.10$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน

** ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน

abc ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ช่วงเวลา ของกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (No Herb)

xyz ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ช่วงเวลา ของกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร (Herb)



ภาพที่ 12 ความเป็นกรดต่างของปัสสาวะ (A) creatinine (B) และ BUN (C) ของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

ระยะ Before คือ ระยะก่อนการทดลอง

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

แสดง mean $\pm$ SEM

 กลุ่มโคที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรทดลอง (No Herb)

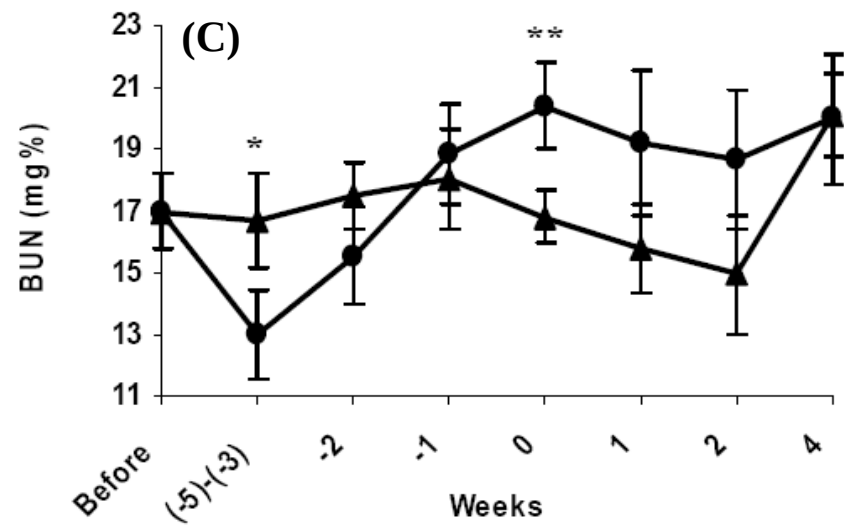
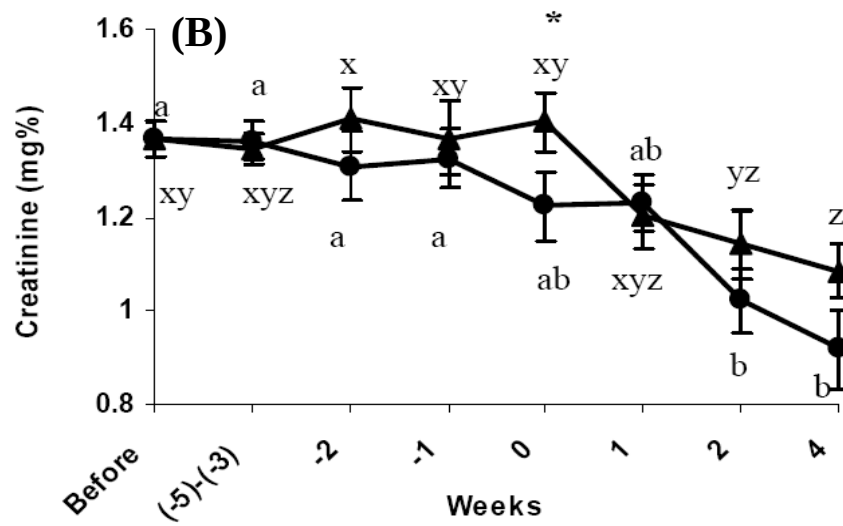
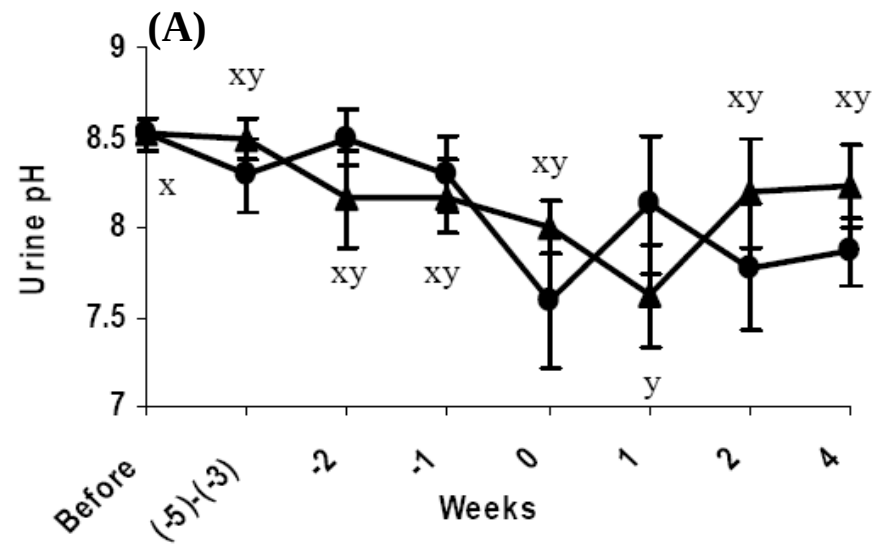
 กลุ่มโคที่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (Herb)

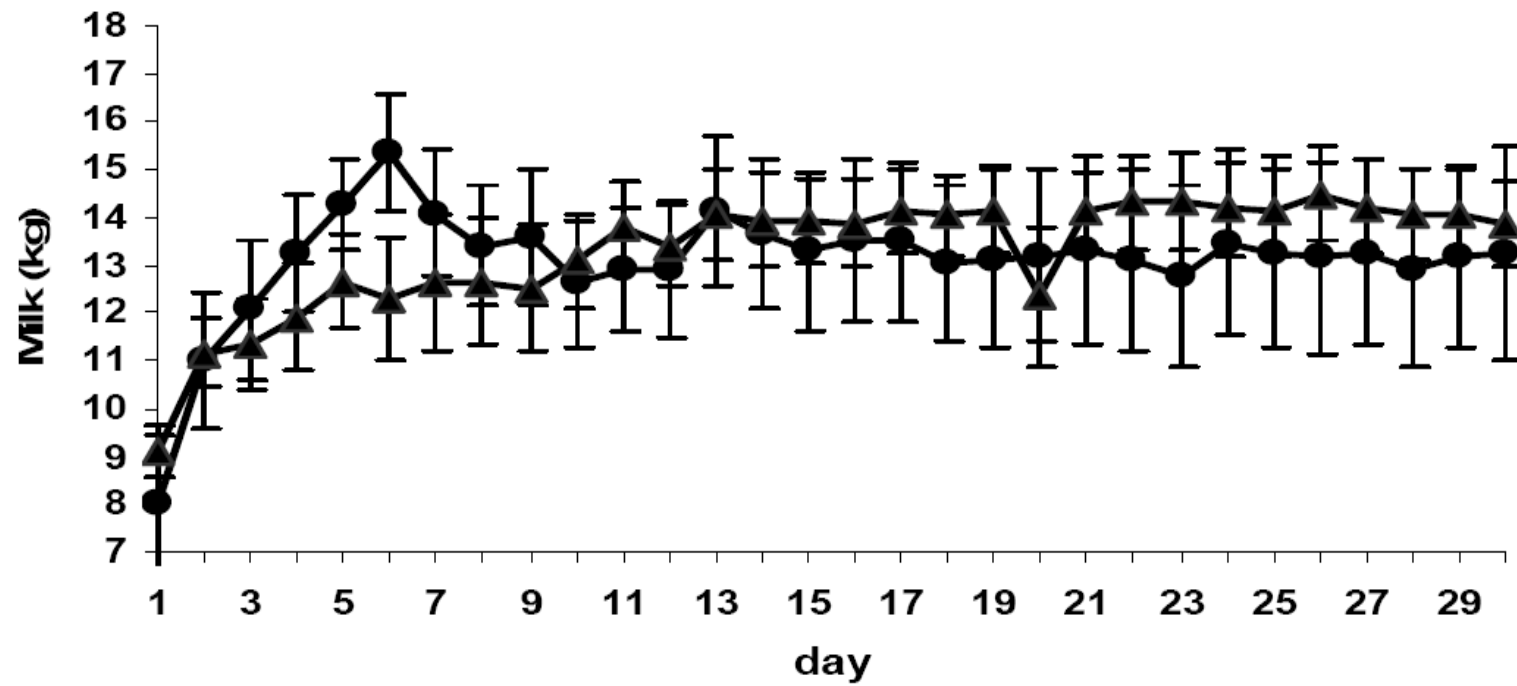
* ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.10$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน

** ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน

abc ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ช่วงเวลา ของกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (No Herb)

xyz ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ช่วงเวลา ของกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร (Herb)

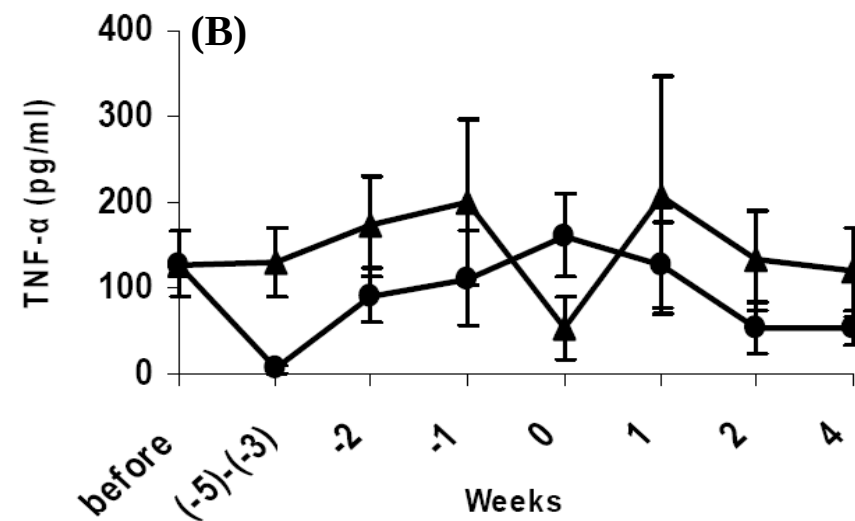
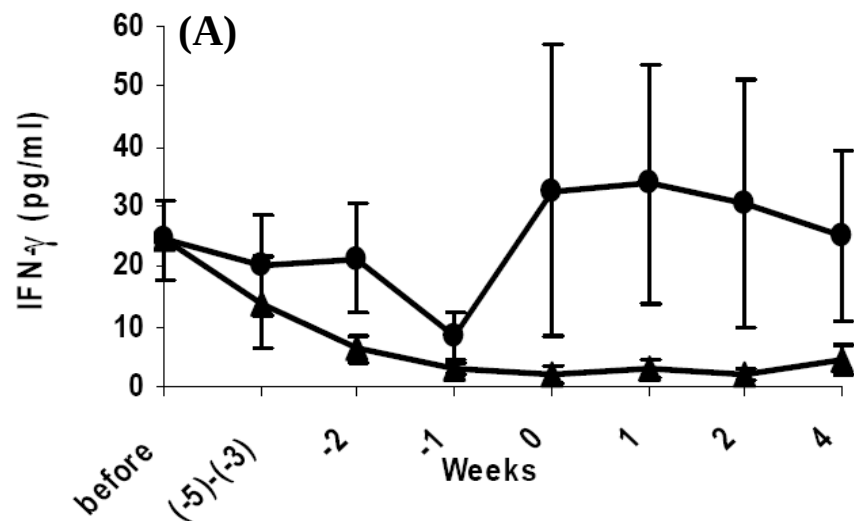




ภาพที่ 13 ปริมาณน้ำนมเฉลี่ยต่อวันตั้งแต่วันแรกถึง 30 วันหลังคลอดของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด

แสดง mean $\pm$ SEM

- กลุ่มโคที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรทดลอง (No Herb)
- ▲ กลุ่มโคที่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (Herb)



ภาพที่ 14 ระดับไซโตไคน์ IFN- γ (A) TNF- α (B) ของกลุ่มโคนมทดลอง ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

ระยะ Before คือ ระยะก่อนการทดลอง

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

แสดง mean $\pm$ SEM

- กลุ่มโคนที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรทดลอง (No Herb)
- ▲ กลุ่มโคนที่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (Herb)

2. สรีรวิทยาเปรียบเทียบผลของตำรับสมุนไพรในแม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรา ตรวจสอบในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

แม่โคนมทดลองทั้งหมด 25 ตัวที่ได้รับและไม่ได้รับตำรับสมุนไพร เมื่อตรวจสอบเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะแล้ว ทำให้สามารถจัดกลุ่มโคนมทดลองทั้งสองกลุ่มแยกย่อยเป็น แม่โคนมที่เป็นและไม่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราดังนี้คือ

- NH-SCH- กลุ่มแม่โคนมที่ไม่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับสมุนไพร
จำนวน 3 ตัว
- NH-SCH+ กลุ่มแม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับสมุนไพร
จำนวน 8 ตัว
- H-SCH+ กลุ่มแม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและได้รับตำรับสมุนไพร
จำนวน 7 ตัว
- H-SCH- กลุ่มแม่โคนมที่ไม่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและได้รับตำรับสมุนไพร
จำนวน 7 ตัว

ผลการศึกษาทางสรีรวิทยาในขณะแม่โคนมอยู่ในระยะใกล้คลอด คลอด และหลังคลอด ปรากฏผลดังนี้

2.1 อุณหภูมิร่างกาย

อุณหภูมิร่างกายแม่โคนมทั้ง 4 กลุ่มได้แสดงในภาพที่ 15 พบว่าแม่โคนมทั้ง 4 กลุ่มมีอุณหภูมิร่างกายใกล้เคียงกันและอยู่ในค่าอ้างอิงมาตรฐานตลอดระยะตั้งแต่เริ่มการทดลองจนถึงวันคลอด อุณหภูมิร่างกายแม่โคนมทั้ง 4 กลุ่มจะมีการเปลี่ยนแปลงและแตกต่างกันใน 1 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์ของระยะให้นม ทั้งนี้พบว่ากลุ่มแม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (NH-SCH+) มีระดับอุณหภูมิร่างกายที่ต่ำกว่าแม่โคกลุ่มอื่นๆ ($p \leq 0.05$) ที่ระยะ 1 สัปดาห์หลังคลอดและเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มแม่โคนมที่เป็นและไม่เป็นแหล่งรังโรคเช่นกัน แต่ได้รับตำรับสมุนไพร (H-SCH+ และ H-SCH-) แม่โค 2 กลุ่มนี้จะมีระดับอุณหภูมิร่างกายที่สูงกว่าตลอดระยะ 2 สัปดาห์หลังคลอดนี้ ($p \leq 0.05$) และยังพบว่าแม่โคนมกลุ่มไม่เป็นแหล่งรังโรคแต่ได้รับสมุนไพร (H-SCH-) มีระดับอุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ในช่วง 2 สัปดาห์หลังคลอดนี้เช่นกัน

2.2 ค่าโลหิตวิทยา

ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) และค่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ได้แสดงในภาพ 16A 16B และ 16C ตามลำดับ พบว่าค่าดังกล่าวของโคนมทั้ง 4 กลุ่มอยู่ในค่าอ้างอิงมาตรฐาน และไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

ค่าจำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) แสดงในภาพที่ 16D แสดงให้เห็นว่าค่า WBC ของโคนมทั้ง 4 กลุ่มอยู่ในค่าอ้างอิงมาตรฐาน พบว่ากลุ่ม H-SCH- จะมีปริมาณเม็ดเลือดขาวที่มีแนวโน้มสูงกว่าทุกกลุ่มทดลองในทุกระยะ ยกเว้น 1 สัปดาห์ก่อนคลอดและเมื่อทดสอบค่าทางสถิติพบว่ากลุ่ม H-SCH- มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวมากกว่ากลุ่ม NH-SCH+ ที่ช่วงเวลา 4 สัปดาห์หลังคลอด ($p \leq 0.05$)

เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล (neutrophil) (ภาพที่ 17A) พบว่าจำนวนนิวโทรฟิลจากแม่โคนมทั้ง 4 กลุ่มอยู่ในค่าอ้างอิงมาตรฐาน และมีค่าใกล้เคียงในโคนมทั้ง 4 กลุ่มตั้งแต่เริ่มการทดลองจนถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด ยกเว้นในระยะ 2 ถึง 4 สัปดาห์หลังคลอด พบว่า กลุ่ม NH-SCH- มีปริมาณเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลมากกว่ากลุ่ม H-SCH- และ H-SCH+ อย่างมีนัยสำคัญที่ช่วงเวลา สัปดาห์ที่ 2 หลังคลอด ($p \leq 0.10$) และมากกว่ากลุ่ม NH-SCH+ ที่ช่วงเวลาสัปดาห์ที่ 4 หลังคลอด ($p \leq 0.10$)

ค่าเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (lymphocyte) (ภาพที่ 17B) พบว่าค่าเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ของแม่โคนมทั้ง 4 กลุ่มอยู่ในค่าอ้างอิงมาตรฐาน กลุ่มโคนม H-SCH- มีแนวโน้มค่าระดับลิมโฟไซต์สูงกว่ากลุ่มโคนมอื่นๆ ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 1 ก่อนคลอดและเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่า กลุ่ม H-SCH- มีปริมาณเซลล์ลิมโฟไซต์มากกว่ากลุ่ม NH-SCH+ ที่สัปดาห์ที่ 2 และ 4 หลังคลอด ($p \leq 0.10$)

ค่าเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (monocyte) (ภาพที่ 17C) ของแม่โคนมทั้ง 4 กลุ่มอยู่ในค่าอ้างอิงมาตรฐาน เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของกลุ่ม H-SCH- มีค่าสูงกว่าค่าของกลุ่ม H-SCH+ และกลุ่ม NH-SCH+ ที่ช่วงวันคลอด ($p \leq 0.05$)

ค่าเม็ดเลือดขาวอีโอซิโนฟิล (eosinophil, ภาพที่ 17D) ของแม่โคทั้ง 4 กลุ่มอยู่ในค่าอ้างอิงมาตรฐาน และมีค่าใกล้เคียงกันยกเว้นในระยะ 2 สัปดาห์หลังคลอด พบว่า กลุ่ม H-SCH- มีปริมาณเม็ดเลือดขาวอีโอซิโนฟิลมากกว่ากลุ่ม NH-SCH- และ H-SCH+ ที่ ($p \leq 0.05$)

ค่าเกล็ดเลือด (platelet, ภาพที่ 18A) ของแม่โคนมทั้ง 4 กลุ่มอยู่ในค่าอ้างอิงมาตรฐาน และใกล้เคียงกันยกเว้นระยะที่ 2 สัปดาห์ก่อนคลอดและระยะ 4 สัปดาห์หลังคลอด พบว่ากลุ่ม H-SCH- มีเกล็ดเลือดสูงกว่ากลุ่ม NH-SCH+ ที่ช่วงเวลา 2 สัปดาห์ก่อนคลอด ($p \leq 0.10$) และที่ 4 สัปดาห์หลังคลอด กลุ่ม NH-SCH+ ก็ยังมีค่าเกล็ดเลือดต่ำสุด เมื่อทดสอบค่าทางสถิติพบว่ากลุ่ม NH-SCH+ มีเกล็ดเลือดต่ำกว่ากลุ่ม H-SCH+ ที่ช่วงเวลา 4 สัปดาห์หลังคลอด ($p \leq 0.05$)

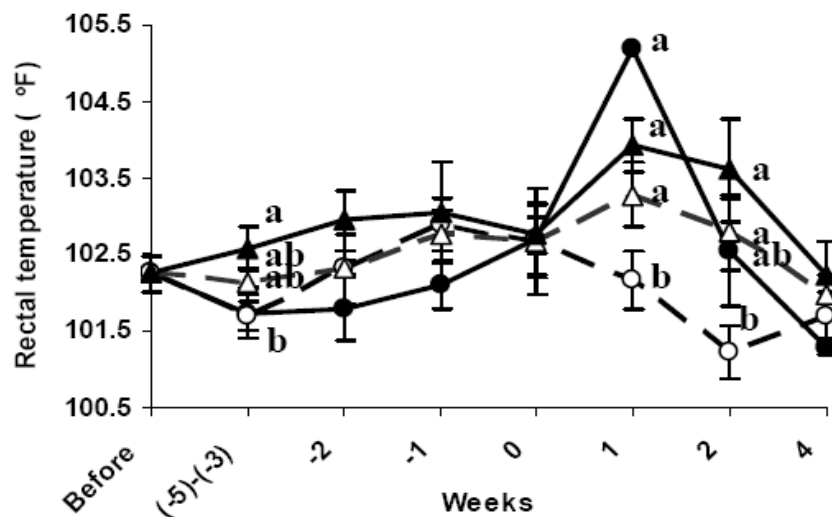
พลาสมาโปรตีน (plasma protein, ภาพที่ 18B) ของแม่โคนมทั้ง 4 กลุ่มอยู่ในค่าอ้างอิงมาตรฐานและไม่มีความแตกต่างกันตลอดระยะเวลาที่ตรวจสอบ

2.3 ผลได้รับของสมุนไพรต่อระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในแม่โคทดลอง

ในการวิเคราะห์จะคัดแม่โคนมจากการวิเคราะห์ 3 ตัว เนื่องจากมีค่าไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ที่สูงกว่าโคตัวอื่นในกลุ่ม 100 – 10,000 เท่าโดยในกลุ่ม NH-SCH+ จะคัดแม่โคออก 2 ตัว และในกลุ่ม H-SCH+ 1 ตัว

ระดับไซโตไคน์ IFN- γ (ภาพที่ 19A) ในซีรัมของแม่โคนมในกลุ่ม H-SCH+ และ H-SCH- จะมีระดับไซโตไคน์ IFN- γ ที่ต่ำกว่ากลุ่ม NH-SCH+ และ NH-SCH- ทุกระยะ แต่เมื่อทดสอบค่าทางสถิติไม่พบความแตกต่างระหว่าง 4 กลุ่ม

ในระดับไซโตไคน์ TNF- α (ภาพที่ 19B) ของแม่โคนมทั้ง 4 กลุ่ม มีระดับ TNF- α ที่ใกล้เคียงกัน ทุกระยะ ยกเว้นในวันคลอดที่ระดับไซโตไคน์มีแม่โคนมกลุ่ม H-SCH- และ H-SCH+ จะมีระดับไซโตไคน์ TNF- α ที่ต่ำกว่าแม่โคนมกลุ่ม NH-SCH+ และ NH-SCH- แต่เมื่อทดสอบค่าทางสถิติไม่พบความแตกต่างทางนัยสำคัญระหว่าง 4 กลุ่ม



ภาพที่ 15 อุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยของกลุ่มโคนม 4 กลุ่ม ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

ระยะ Before คือ ระยะก่อนการทดลอง

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

แสดง mean $\pm$ SEM

- กลุ่มโคที่ไม่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (NH-SCH-)
- กลุ่มโคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (NH-SCH+)
- △- กลุ่มโคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (H-SCH+)
- ▲— กลุ่มโคที่ไม่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (H-SCH-)

abc ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 4 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน

ภาพที่ 16 ค่าโลหิตวิทยาของจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC, A) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit, B) ค่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin, C) จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC, D) ของกลุ่มโคนม 4 กลุ่ม ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

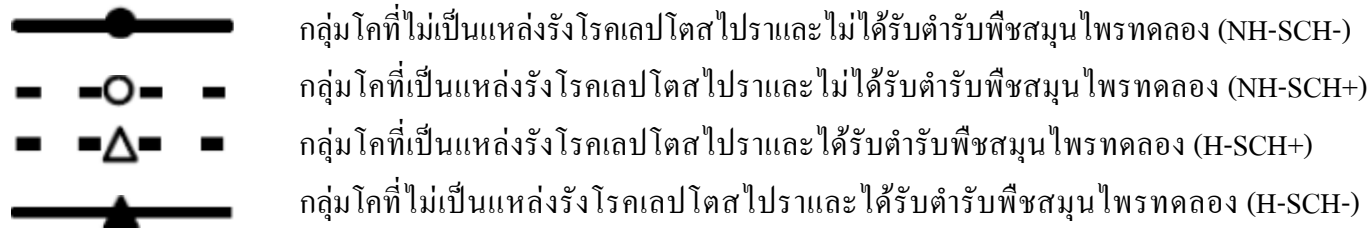
ระยะ Before คือ ระยะก่อนการทดลอง

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

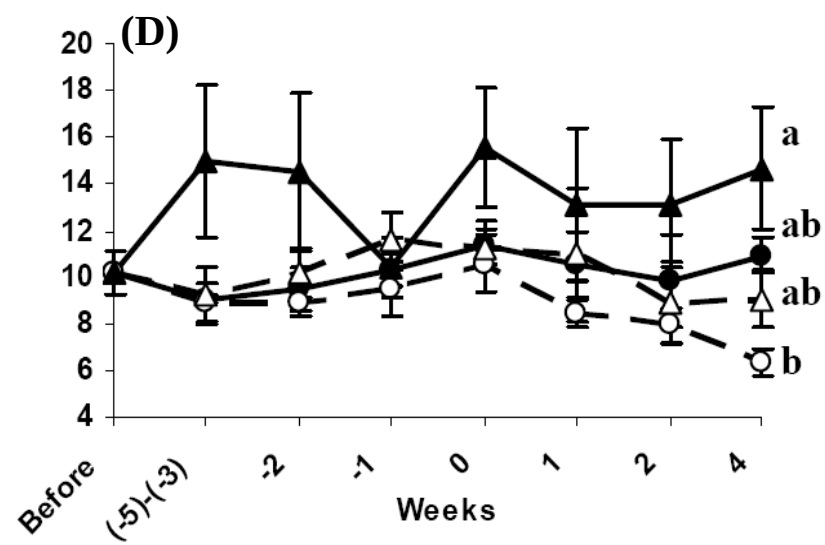
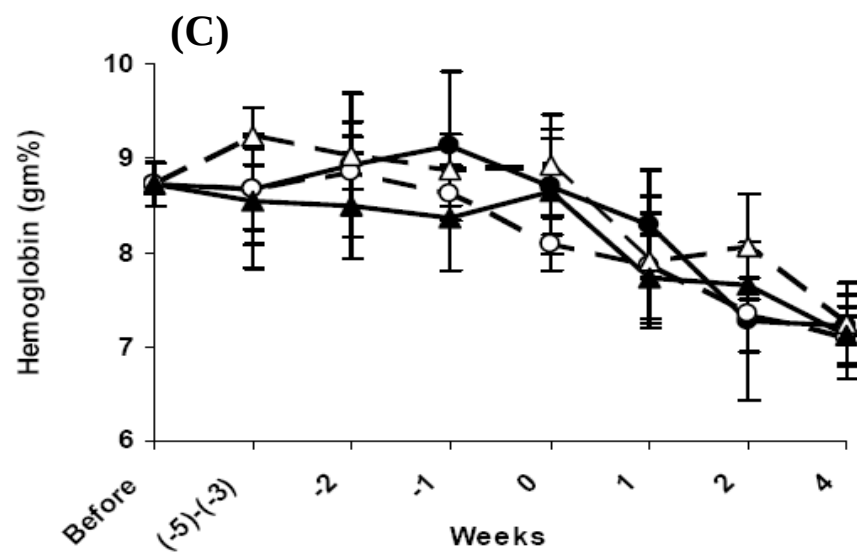
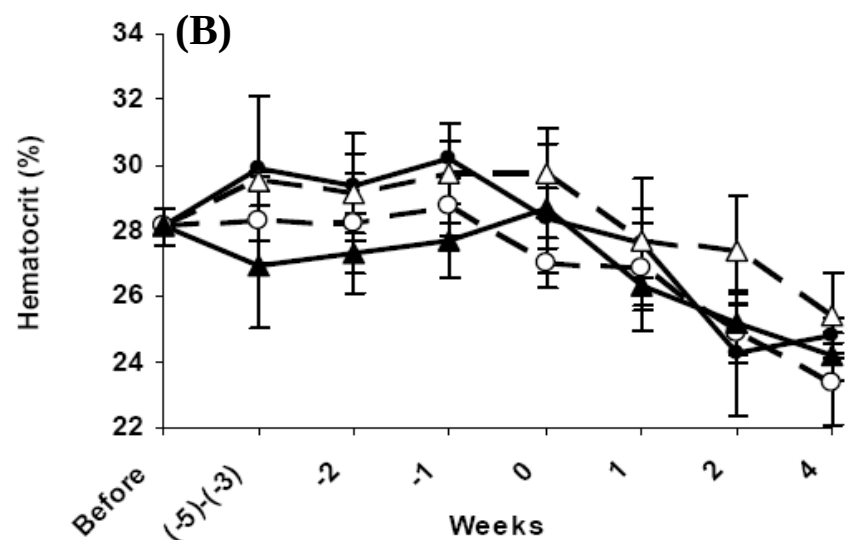
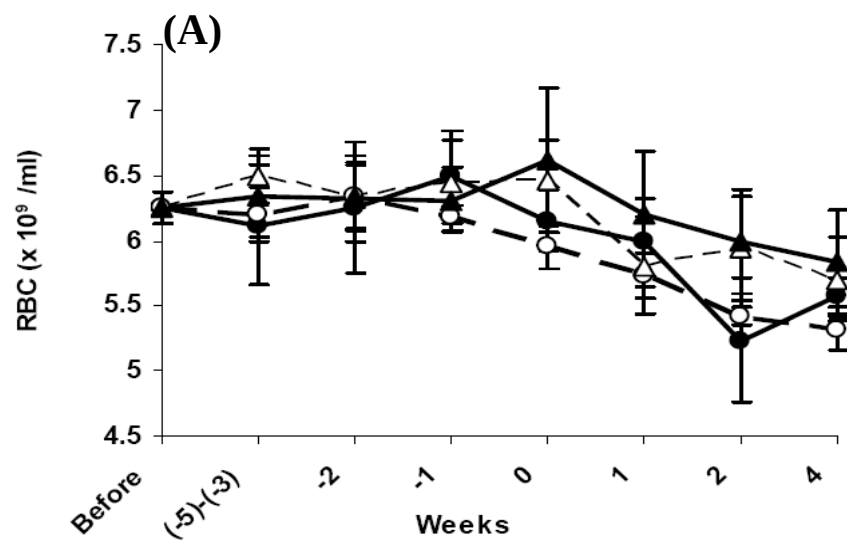
ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

แสดง mean $\pm$ SEM



abc ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 4 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน



ภาพที่ 17 ค่าปริมาณเม็ดเลือดขาวแยกประเภทเป็น neutrophil (A) lymphocyte (B) monocyte (C) และ eosinophil (D) ของกลุ่มโคนม 4 กลุ่ม ในระยะ

ก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

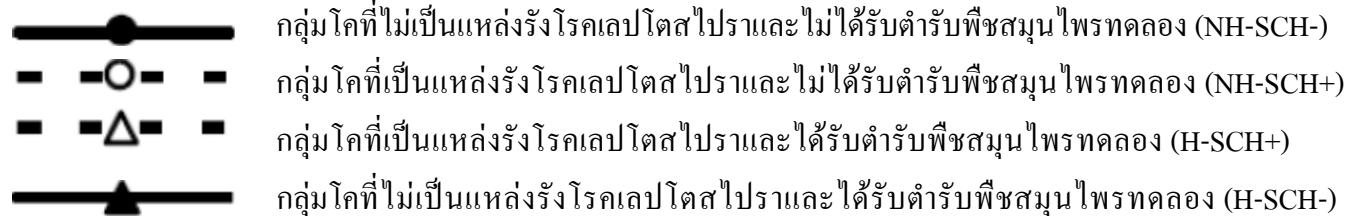
ระยะ Before คือ ระยะก่อนการทดลอง

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

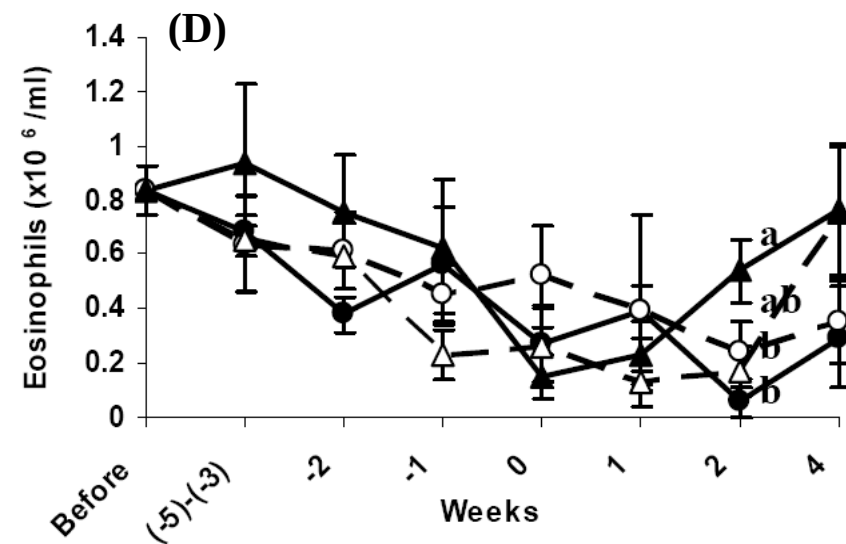
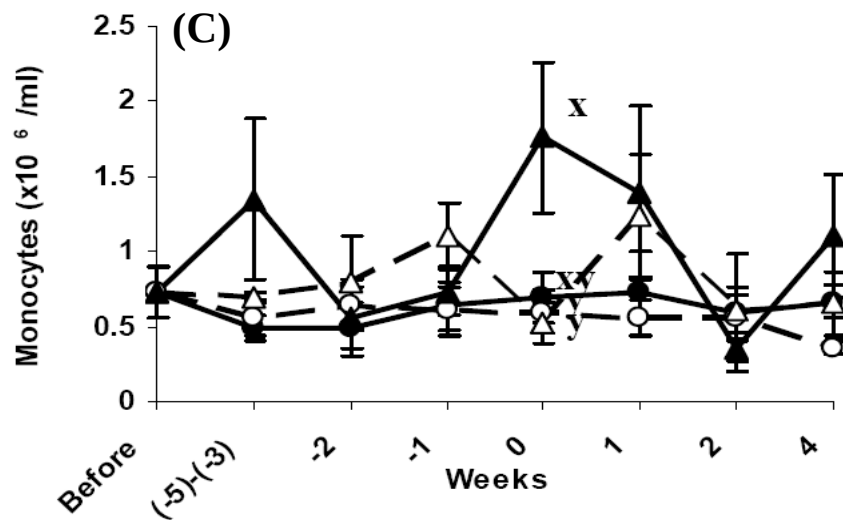
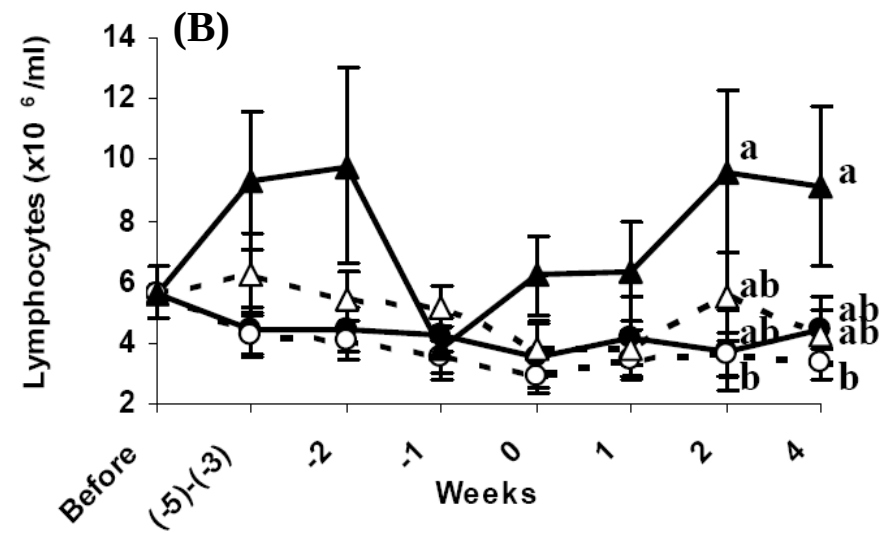
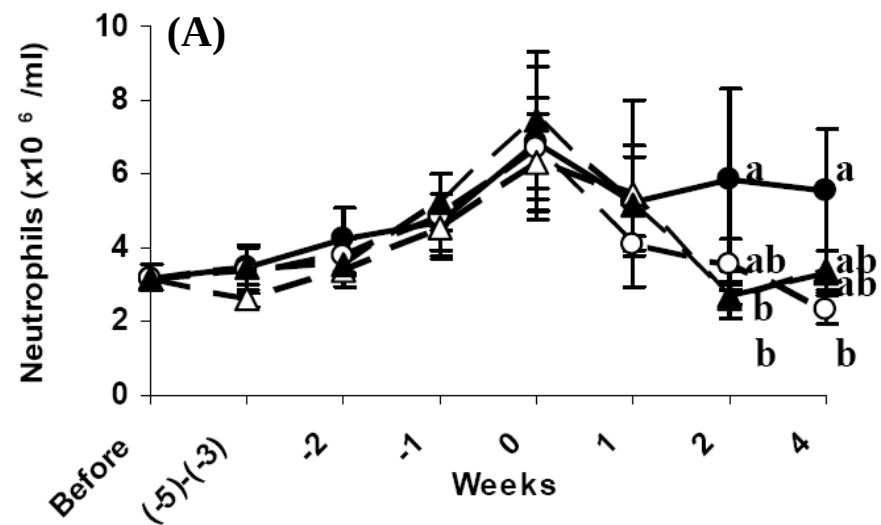
ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

แสดง mean $\pm$ SEM



abc ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.10$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 4 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน

xyz ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 4 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน



ภาพที่ 18 จำนวนเกล็ดเลือด (Platelet) (A) โปรตีนในพลาสมา (B) ของกลุ่มโคนม 4 กลุ่ม ในช่วงระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

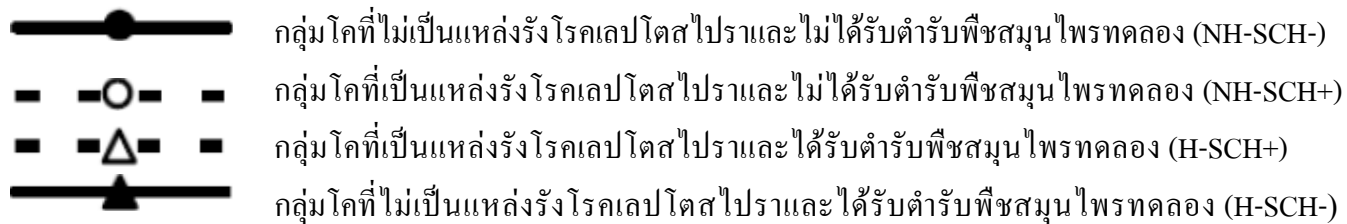
ระยะ Before คือ ระยะก่อนการคลอด

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

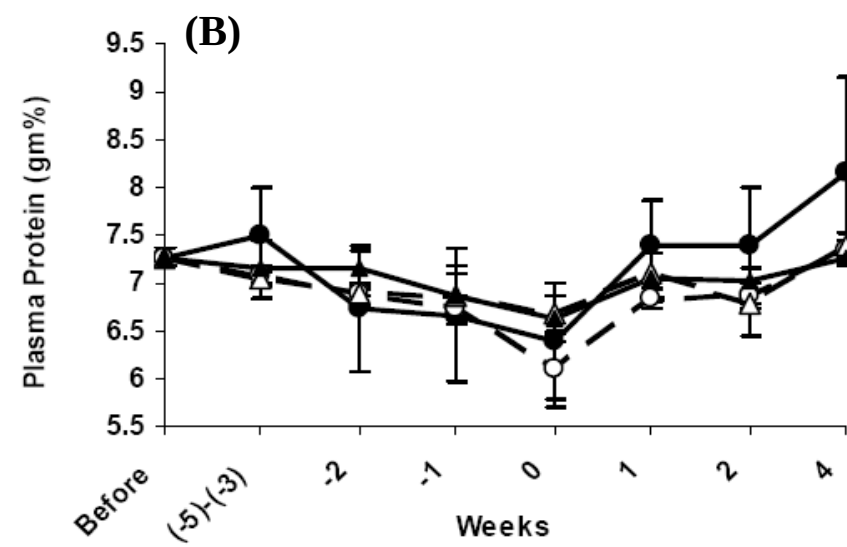
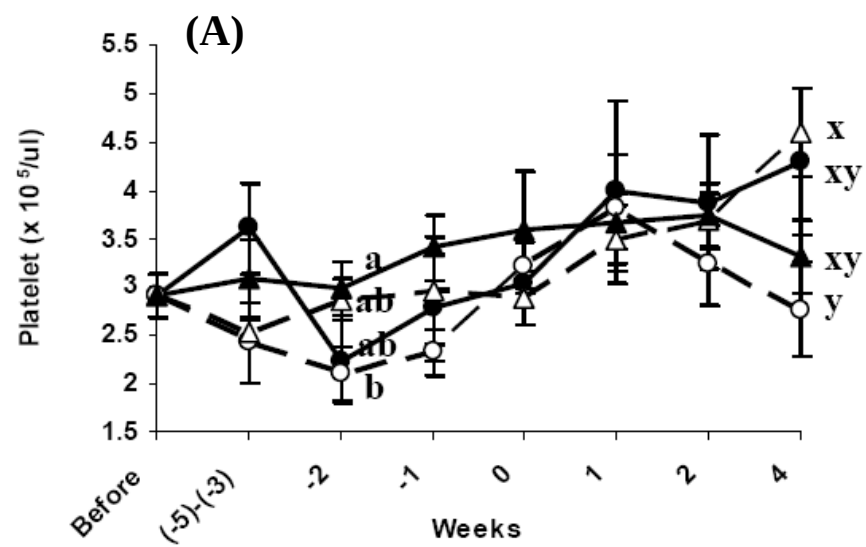
ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

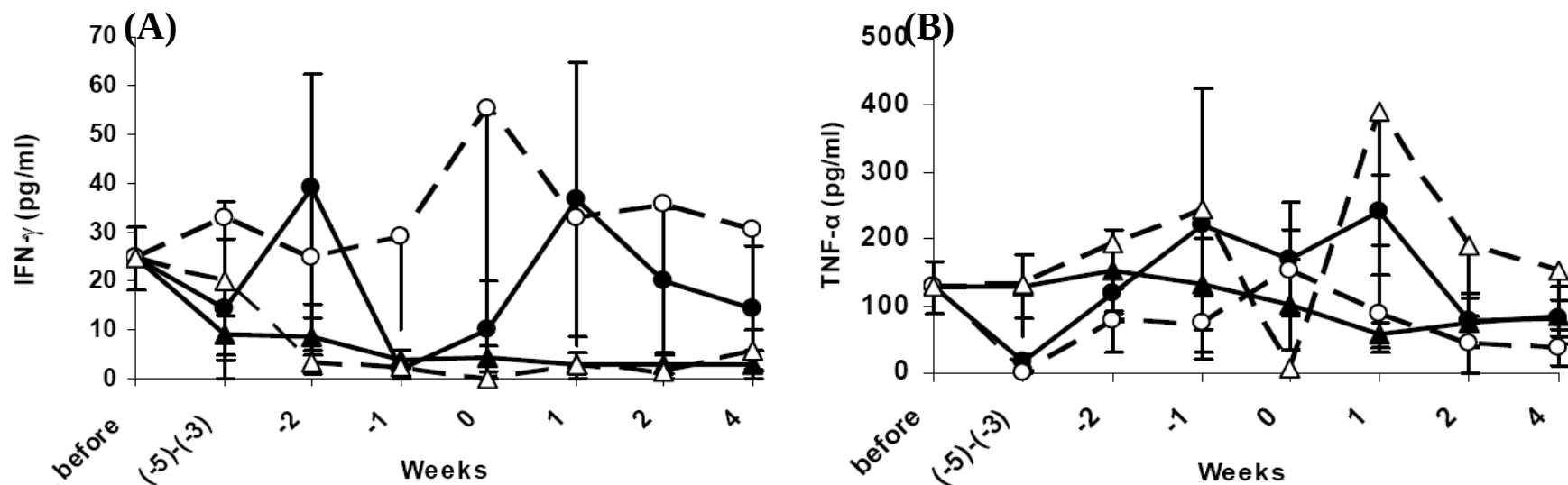
แสดง mean $\pm$ SEM



abc ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.10$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 4 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน

xyz ความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 4 กลุ่มในช่วงเวลาเดียวกัน





ภาพที่ 19 ระดับไซโตไคน์ IFN- γ (A) TNF- α (B) ของกลุ่มโคนม 4 กลุ่ม ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

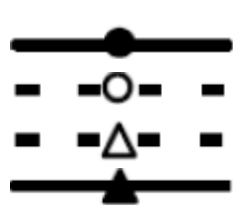
ระยะ Before คือ ระยะก่อนการทดลอง

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

แสดง mean $\pm$ SEM



กลุ่มโคที่ไม่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (NH-SCH-)

กลุ่มโคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (NH-SCH+)

กลุ่มโคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (H-SCH+)

กลุ่มโคที่ไม่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง (H-SCH-)

2.4 การตรวจสอบอิทธิพลของคาร์บไพชสมุนไพรรต่อการยับยั้งและ/หรือลดการปลดปล่อยเชื้อสไปโรจิต/เลปโตสไปราจากแม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรค

ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมีด ผลการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ และผลตรวจด้วยวิธี MAT ผลการทดลองพบว่า ปริมาณเชื้อสไปโรจิตเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมีดของโคแต่ละตัว ในกลุ่ม H-SCH+ จะมีปริมาณเชื้อที่ลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับกลุ่ม NH-SCH+ โดยเฉพาะในสัปดาห์ที่ 1 ก่อนคลอดจนถึงสัปดาห์ที่ 2 หลังคลอด (ตารางที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบร้อยละ โคนมในกลุ่ม NH-SCH+ และ H-SCH+ พบว่าในกลุ่ม H-SCH+ มีร้อยละของโคนมที่ตรวจพบสไปโรจิตลดลงต่อเนื่อง ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ก่อนคลอดจนถึงสัปดาห์ที่ 2 หลังคลอด (42.86% 14.29% 16.67% 33.33% และ 0% ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 2 บ่งชี้ว่าร้อยละของโคนมที่ตรวจพบสไปโรจิตในกลุ่มทดลอง NH-SCH+ มีร้อยละที่สูงเกินร้อยละ 50 ต่อเนื่องกันตลอดระยะเวลาการตรวจสอบ (ตารางที่ 3)

ผลการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ในกลุ่ม H-SCH+ จะไม่พบดีเอ็นเอในช่วงก่อนการทดลอง แต่จะพบดีเอ็นเอคิดเป็นร้อยละตัวที่พบเชื้อกับโคทั้งหมดในกลุ่มในช่วงเวลาสัปดาห์ที่ 2 และ 1 ก่อนคลอด และสัปดาห์ที่ 1 หลังคลอด คือ 14.29% 14.29 และ 16.67% ตามลำดับ ส่วนในช่วงสัปดาห์อื่นจะตรวจไม่พบ ในกลุ่ม NH-SCH+ จะพบดีเอ็นเอ คิดเป็นร้อยละตัวที่พบเชื้อกับโคทั้งหมดในกลุ่มในช่วงเวลาก่อนการทดลองและสัปดาห์ที่ 2 หลังคลอด คือ 25% และ 16.67% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ผลการตรวจด้วยวิธี MAT ไม่พบโคในกลุ่ม H-SCH+ ที่ระดับไตเตอร์ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา มากกว่า 1:50 ในทุกช่วงเวลา ดังแสดงในตารางที่ 5 ส่วนแม่โคในกลุ่ม NH-SCH+ จะพบไตเตอร์ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา มากกว่า 1:50 ในทุกช่วงเวลาของการทดลอง คิดเป็นร้อยละ 50 42.9 50 37.5 33.3 16.7 16.67% และ 16.67% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และ ชิโรวาร์ที่พบคือ Ranarum Tarassovi Sejroe และ Hebdomadis ดังแสดงระดับไตเตอร์ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา ในตารางที่ 4

ตารางที่ 2 ปริมาณเชื้อสไปโรจิต/เลปโตสไปราที่เพาะจากปัสสาวะโค โดยตรวจดูจากกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด

ระยะ Before คือ ระยะก่อนการทดลอง

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

NH-SCH+ หมายถึง กลุ่มโคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง

H-SCH+ หมายถึง กลุ่มโคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง

เกรด 0 หมายถึง ไม่พบเชื้อสไปโรจิต ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เกรด 1 หมายถึง พบเชื้อสไปโรจิตปริมาณ 1 ใน 4 ของพื้นที่ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เกรด 2 หมายถึง พบเชื้อสไปโรจิตปริมาณ 1 ใน 2 ของพื้นที่ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เกรด 3 หมายถึง พบเชื้อสไปโรจิตปริมาณ 3 ใน 4 ของพื้นที่ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เกรด 4 หมายถึง พบเชื้อสไปโรจิตปริมาณมากกว่า 3 ใน 4 ของพื้นที่ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

N หมายถึง ไม่มีตัวอย่างปัสสาวะ

D หมายถึง ตาย

ตารางที่ 2 (ต่อ)

กลุ่มทดลอง (โคตัวที่)	สัปดาห์							
	before	(-5)-(-3)	-2	-1	0	1	2	4
NH-SCH+ (1)	1	0	1	0	1	0	1	0
NH-SCH+ (2)	1	N	0	1	D	D	D	D
NH-SCH+ (3)	2	1	1	0	N	0	0	1
NH-SCH+ (4)	3	0	0	1	1	0	2	0
NH-SCH+ (5)	2	1	1	1	1	1	1	0
NH-SCH+ (6)	2	0	0	0	N	0	0	1
NH-SCH+ (7)	1	0	0	1	0	2	2	0
NH-SCH+ (8)	1	1	1	1	D	D	D	D
H-SCH+(1)	2	2	2	1	1	0	0	1
H-SCH+(2)	1	1	1	0	0	N	0	1
H-SCH+(3)	3	1	1	0	0	1	0	1
H-SCH+(4)	1	1	0	0	0	0	0	0
H-SCH+(5)	1	1	0	0	N	0	0	0
H-SCH+(6)	1	0	0	0	0	0	0	1
H-SCH+(7)	1	0	0	0	0	0	0	1

ตารางที่ 3 จำนวนโคที่ตรวจพบ/จำนวนโคทั้งหมดในกลุ่ม (ร้อยละ) ของผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมีด (Direct) ผลการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR) และผลตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MAT

ระยะ Before คือ ระยะก่อนการทดลอง

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

NH-SCH+ หมายถึง กลุ่มโคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและไม่ได้รับคำรับพิษสมุนไพรทดลอง

H-SCH+ หมายถึง กลุ่มโคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและได้รับคำรับพิษสมุนไพรทดลอง

ตารางที่ 3 (ต่อ)

วิธีการตรวจ	กลุ่ม NH-SCH+							
	สัปดาห์ที่เก็บตัวอย่าง							
	จำนวนโคที่ตรวจพบ/จำนวนโคทั้งหมดในกลุ่ม (ร้อยละ)							
	before	(-5)-(-3)	-2	-1	0	1	2	4
Direct	8/8 (100%)	5/7 (71.4%)	5/8 (62.5%)	7/8 (87.5%)	4/5 (80%)	3/6 (50%)	4/6 (66.7%)	3/6 (50%)
PCR	2/8 (25%)	0/7 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/5 (0%)	0/6 (0%)	1/6 (16.7%)	0/6 (0%)
MAT	4/8 (50%)	3/7 (42.9%)	4/8 (50%)	3/8 (37.5%)	2/6 (33.3%)	1/6 (16.7%)	1/6 (16.7%)	1/6 (16.7%)

วิธีการตรวจ	กลุ่ม H-SCH+							
	สัปดาห์ที่เก็บตัวอย่าง							
	จำนวนโคที่ตรวจพบ/จำนวนโคทั้งหมดในกลุ่ม (ร้อยละ)							
	before	(-5)-(-3)	-2	-1	0	1	2	4
Direct	7/7 (100%)	5/7 (71.4%)	3/7 (42.9%)	1/7 (14.3%)	1/6 (16.7%)	2/6 (33.3%)	0/7 (0%)	5/7 (71.4%)
PCR	0/7 (0%)	0/7 (0%)	1/7 (14.3%)	1/7 (14.3%)	0/6 (0%)	1/6 (16.7%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)
MAT	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)

ตารางที่ 4 ระดับไตเตอร์ต่อภูมิคุ้มกันโรคเลปโตสไปโรซิสในแม่โคนมกลุ่มที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง

(NH-SCH+)

ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด

ระยะ 0 คือ วันที่คลอด

ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

0 หมายถึง ไตเตอร์ต่ำกว่า 1 : 50

50 หมายถึง ไตเตอร์ระดับ 1:50

100 หมายถึง ไตเตอร์ระดับ 1:100

D หมายถึง ตาย

Ran หมายถึง ซีโรวาร์ Ranarum

Tar หมายถึง ซีโรวาร์ Tarassovi

Sej หมายถึง ซีโรวาร์ Sejroe

Heb หมายถึง ซีโรวาร์ Hebdomadis

ตารางที่ 4 (ต่อ)

กลุ่มทดลอง (โคตัวที่)	สัปดาห์ที่เก็บตัวอย่าง							
	Before	(-5)-(-3)	-2	-1	0	1	2	4
NH-SCH+ (1)	50 (Ran)	50 (Ran)	50 (Ran)	50 (Ran)	50 (Ran)	0	0	0
	50 (Tar)	50 (Tar)	50 (Tar)	50 (Tar)	50 (Tar)	0	0	0
NH-SCH+ (2)	50 (Ran)	N	50 (Ran)	0	D	D	D	D
	50 (Tar)	0	50 (Tar)	0	0	0	0	0
	50 (Sej)	0	50 (Sej)	0	0	0	0	0
NH-SCH+ (3)	100 (Heb)	100 (Heb)	100 (Heb)	50 (Heb)	50 (Heb)	50 (Heb)	50 (Heb)	50 (Heb)
	100 (Sej)	100 (Sej)	100 (Sej)	100 (Sej)	100 (Sej)	100 (Sej)	50 (Sej)	50 (Sej)
NH-SCH+ (4)	0	0	0	0	0	0	0	0
NH-SCH+ (5)	0	0	0	0	0	0	0	0
NH-SCH+ (6)	0	0	0	0	0	0	0	0
NH-SCH+ (7)	0	0	0	0	0	0	0	0
NH-SCH+ (8)	50 (Heb)	50 (Heb)	50 (Heb)	50 (Heb)	D	D	D	D
	50 (Sej)	50 (Sej)	50 (Sej)	50 (Sej)	0	0	0	0

2.5. ผลของคำรับสมุนไพรมุ่งสุขภาพทางเมตาบอลิกของแม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราในระหว่างการทดลอง

ผลบันทึกข้อมูลของกลุ่มอาการทางเมตาบอลิก เช่น ภาวะการคลอดยาก (รวมการมีหรือไม่มีการแท้งลูก) การเกิดเต้านมอักเสบ และการเจ็บกีบ ในระยะ 5 สัปดาห์ก่อนคลอด ถึง 4 สัปดาห์หลังคลอด แสดงในตารางที่ 5 ภาวะของการคลอดยากแบบมี/ไม่มีการแท้งลูกในแม่โคกลุ่ม NH-SCH- NH-SCH+ H-SCH+ และ H-SCH- พบแม่โคนมที่มีการคลอดยาก 1 ตัว (4%) 2 ตัว (8%) 0 ตัว (0%) และ 0 ตัว (0%) ตามลำดับ พบแม่โคนมที่เกิดเต้านมอักเสบ 1 ตัว (4%) 1 ตัว (4%) 0 ตัว (0%) และ 0 ตัว (0%) ตามลำดับ และพบแม่โคนมที่เจ็บกีบ 2 ตัว (8%) 0 ตัว (0%) 1 ตัว (4%) และ 2 ตัว (8%) ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ประวัติการป่วยด้วยภาวะเมตาบอลิกในช่วงการทดลองของแม่โคนมทดลองที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรา

กลุ่มแม่โคทดลอง	จำนวน (ตัว)	ประวัติอาการป่วย (ตัวร้อยละ)		
		การคลอดยาก*	เต้านมอักเสบ	เจ็บกีบ
NH-SCH-	3	1 (4%)	1 (4%)	2 (8%)
NH-SCH+	8	2 (8%)	1 (4%)	0 (0%)
H-SCH+	7	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)
H-SCH-	7	0 (0%)	0 (0%)	2 (8%)

หมายเหตุ NH-SCH- แม่โคที่ไม่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและไม่ได้รับคำรับพืชสมุนไพร
 NH-SCH+ แม่โคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและไม่ได้รับคำรับพืชสมุนไพร
 H-SCH+ แม่โคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและได้รับคำรับพืชสมุนไพร
 H-SCH- แม่โคที่ไม่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและได้รับคำรับพืชสมุนไพร
 * อาจมีและ/หรือไม่มีภาวะแท้งลูกรวมอยู่ด้วย

3. สรีรวิทยาเปรียบเทียบระหว่างลูกโคนมในระยะคลอดถึง 1 สัปดาห์หลังคลอดที่เกิดจากแม่โคนมที่ได้รับตำรับสมุนไพร และจากแม่ที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร

ลูกโคจำนวน 22 ตัวจากแม่โคทดลองจำนวน 25 ตัว โดยแบ่งเป็นลูกโคจากแม่โคที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (No herb) จำนวน 9 ตัว และลูกโคจากแม่โคที่ได้รับตำรับสมุนไพร (Herb) จำนวน 13 ตัวได้ศึกษาทางสรีรวิทยาในระยะคลอดถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด ปรากฏผลดังนี้

3.1 ผลของตำรับสมุนไพรต่ออุณหภูมิร่างกายและค่าโลหิตวิทยาของลูกโคนม

อุณหภูมิ

อุณหภูมิร่างกายของลูกโคทดลองทั้งสองกลุ่ม ในระยะคลอดถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด อยู่ในค่ามาตรฐาน ตารางที่ 6 โดยลูกโคกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร (102.5 ± 0.6 °F) จะมีอุณหภูมิร่างกายที่สูงกว่าลูกโคกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (101.6 ± 0.4 °F) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.10$

ค่าโลหิตวิทยา

จำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และค่าฮีโมโกลบินของลูกโคทดลองทั้งสองกลุ่ม ในระยะถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด อยู่ในค่ามาตรฐาน โดยจำนวนเม็ดเลือดแดง ($9.0 \pm 0.4 \times 10^9$ /ml) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (32.5 ± 1.4 %) และค่าฮีโมโกลบิน (9.9 ± 0.5 mg/dl) ในลูกโคกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรจะสูงกว่าจำนวนเม็ดเลือดแดง ($8.4 \pm 0.2 \times 10^9$ cell/ml) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (30.9 ± 0.9 %) และค่าฮีโมโกลบิน (9.4 ± 0.2 mg/dl) ในลูกโคกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร ดังแสดงในตารางที่ 6 ตามลำดับ แต่เมื่อคำนวณทางสถิติไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างสองกลุ่ม ($p > 0.10$)

ค่าเม็ดเลือดขาว (WBC) เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล (neutrophil) เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (lymphocyte) เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (monocyte) และเม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิล (eosinophil) ในลูกโคกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพรคือ $9.8 \pm 0.9 \times 10^6$ /ml $6.5 \pm 0.9 \times 10^6$ cell/ml $2.7 \pm 0.2 \times 10^6$ cell/ml $0.5 \pm 0.1 \times 10^6$ cell/ml และ $0.06 \pm 0.05 \times 10^6$ cell/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับลูกโค

กลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรที่มีค่าเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์ เม็ดเลือดขาวโมโนซัยต์ และเม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิล คือ $8.7 \pm 0.7 \times 10^6$ cell/ml $6.0 \pm 0.6 \times 10^6$ cell/ml $2.2 \pm 2.4 \times 10^6$ cell/ml $0.4 \pm 0.2 \times 10^6$ cell/ml และ $0.03 \pm 0.02 \times 10^6$ cell/ml ตามลำดับ แต่เมื่อคำนวณทางสถิติไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างสองกลุ่ม

ค่าเกล็ดเลือดในลูกโคกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร ($3.6 \pm 0.4 \times 10^5$ / μ l) มีค่าเกล็ดเลือดสูงกว่าลูกโคกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร ($2.3 \pm 0.4 \times 10^5$ / μ l) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ค่าพลาสมาโปรตีนของลูกโคในกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร (5.8 ± 0.2 mg%) มีค่าพลาสมาโปรตีนต่ำกว่าลูกโคกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (6.3 ± 0.3 mg%) แต่เมื่อคำนวณทางสถิติไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างสองกลุ่ม ($p > 0.10$) ดังแสดงในตารางที่ 6

3.2 การตรวจสอบความเป็นพิษจากผลตำรับสมุนไพรต่อลูกโคนม

ค่ากรดค้างในปัสสาวะของลูกโคในกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร (6.8 ± 0.2) มีค่า pH ใกล้เคียงกับลูกโคกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (6.9 ± 0.3) (ตารางที่ 6)

ค่าครีเอตินินและยูเรียในเลือดของลูกโคทั้งสองกลุ่มอยู่ในค่ามาตรฐาน และทั้งสองกลุ่ม มีค่าครีเอตินินใกล้เคียงกัน (1.7 ± 0.3 mg% และ 1.9 ± 0.2 mg%) ในขณะที่ค่ายูเรียในเลือดของลูกโคในกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร (14.4 ± 1.2 mg%) มีค่ายูเรียในเลือดต่ำกว่าลูกโคกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (22.0 ± 0.3 mg%) แต่เมื่อคำนวณทางสถิติไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างสองกลุ่ม ดังแสดงตารางที่ 6

3.3 ผลตำรับของสมุนไพรต่อระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ในลูกโคทดลอง

ระดับไซโตไคน์ของลูกโคทดลองแสดงในตารางที่ 6 ลูกโคในกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร จะมีระดับ IFN- γ (5.2 ± 3.2 pg/ml) ที่ต่ำกว่าลูกโคกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (11.2 ± 7.1 pg/ml) แต่เมื่อคำนวณทางสถิติไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างสองกลุ่ม ($p > 0.10$) ในขณะที่ระดับ TNF- α ของลูกโคในกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร (22.5 ± 15.4 pg/ml) มีค่าสูงกว่าลูกโคกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร (12.3 ± 8.4 pg/ml) แต่เมื่อคำนวณทางสถิติไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างสองกลุ่ม

ตารางที่ 6 ข้อมูลสรีรวิทยาพื้นฐานของ อุนหนูมีร่างกาย ค่าโลหิตวิทยา ค่ากรดต่างของปัสสาวะ ระดับซีรัมครีเอทีนีน ยูเรียในเลือด ระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ในลูกโคนม ทดลองที่เกิดจากแม่โคนมที่ได้รับและไม่ได้รับตำรับสมุนไพร

Parameters (unit)	Physiological value		
	Mean $\pm$ SEM (n)		
	No herb	Herb	<i>p</i> -value
Rectal Temperature ($^{\circ}$ F)	101.6 $\pm$ 0.4 (9)	102.5 $\pm$ 0.6 (6)	-
RBC (10^9 cell/ml)	8.4 $\pm$ 0.2 (9)	9.0 $\pm$ 0.4 (13)	-
Hematocrit (%)	30.9 $\pm$ 1.0 (9)	32.6 $\pm$ 1.4 (13)	-
Hemoglobin (mg/dl)	9.4 $\pm$ 0.3 (9)	9.9 $\pm$ 0.5 (13)	-
WBC (10^6 cell/ml)	8.7 $\pm$ 0.7 (8)	9.8 $\pm$ 0.9 (13)	-
Neutrophil (10^6 cell/ml)	6.0 $\pm$ 0.7 (8)	6.6 $\pm$ 0.9 (13)	-
Lymphocyte (10^6 cell/ml)	2.2 $\pm$ 0.2 (8)	2.7 $\pm$ 0.2 (13)	-
Monocyte (10^6 cell/ml)	0.4 $\pm$ 0.2 (8)	0.5 $\pm$ 0.1 (13)	-
Eosinophil (10^6 cell/ml)	0.03 $\pm$ 0.02 (6)	0.07 $\pm$ 0.04 (13)	-
Platelet (10^5 cell/ul)	2.3 $\pm$ 0.4 (9)	3.6 $\pm$ 0.4 (12)	$p \leq 0.05$
Plasma Protein (gm%)	6.3 $\pm$ 0.3 (9)	5.8 $\pm$ 0.3 (13)	-
Urine pH	6.8 $\pm$ 0.2 (9)	6.9 $\pm$ 0.4 (9)	-
Creatinine (mg/dl)	1.7 $\pm$ 0.3 (9)	1.9 $\pm$ 0.2 (12)	-
BUN (mg/dl)	22.0 $\pm$ 3.3 (8)	14.4 $\pm$ 1.2 (12)	-
IFN- γ (pg/ml)	11.2 $\pm$ 7.1 (8)	5.2 $\pm$ 3.2 (12)	-
TNF- α (pg/ml)	12.0 $\pm$ 8.4 (8)	22.5 $\pm$ 15.4 (12)	-

หมายเหตุ No herb ลูกโคนมจากแม่โคนมกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร

Herb ลูกโคนมจากแม่โคนมกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร

4. สรีรวิทยาเปรียบเทียบผลของตำรับสมุนไพรในลูกโคนมจากแม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรา ตรวจสอบในระยะคลอด ถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด

ลูกโคนมทดลองได้แบ่งกลุ่มเป็น 4 กลุ่ม ตามแม่โคนมทดลอง จากผลทดลองที่ 2 ผลการศึกษาทางสรีรวิทยาในขณะลูกโคนมอยู่ในระยะ คลอด ถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด ปรากฏผลดังนี้

4.1 ข้อมูลสรีรวิทยาทั่วไป

ลูกโคนมจากแม่โคนมที่เป็นและไม่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรา เมื่อจัดแบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับตำรับสมุนไพร แล้วศึกษาค่าสรีรวิทยาของ อุณหภูมิร่างกาย ค่าโลหิตวิทยาของ RBC ฮีโมโกลบิน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ค่าเม็ดเลือดขาว (WBC) ค่าเม็ดเลือดขาวแยกประเภท (นิวโทรฟิล ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และอีโอสิโนฟิล) ระดับโปรตีนในพลาสมา ค่าความเป็นกรดด่างของปัสสาวะ ระดับซีรัมครีเอตินิน และค่ายูเรียในกระแสเลือด ของกลุ่มลูกโคนมทั้ง 4 กลุ่ม (NH-SCH-, NH-SCH+, H-SCH+, H-SCH-) มีค่าในระดับไม่แตกต่างกันในทุกพารามิเตอร์ที่ตรวจสอบ ยกเว้นแต่ค่าจำนวนเกล็ดเลือด ซึ่งพบว่าลูกโคนมจากแม่โคกลุ่ม H-SCH- จะมีค่าจำนวนเกล็ดเลือดสูงที่สุด และสูงกว่าจำนวนเกล็ดเลือดของลูกโคนมจากแม่โคกลุ่ม NH-SCH+ ($p \leq 0.05$)

4.2 ผลตำรับของสมุนไพรต่อระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในลูกโคทดลอง

ระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α จากลูกโคนมทั้ง 4 กลุ่ม พบว่าค่าดังกล่าวของลูกโคนมทั้ง 4 กลุ่มอยู่ในค่าอ้างอิงมาตรฐาน และไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

4.3 การตรวจสอบอิทธิพลของตำรับพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งและ/หรือลดการปลดปล่อยเชื้อสไปโรจิต/เลปโตสไปราในลูกโคจากแม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรคตรวจสอบในระยะคลอด ถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด

ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมีด ผลการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ และผลตรวจด้วยวิธี MAT ผลการทดลองพบว่า ปริมาณเชื้อสไปโรจิตเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมีดของลูกโคแต่ละตัว ลูกโคจากแม่โคกลุ่ม NH-SCH+ เจอเชื้อเลปโตสไปรา 3 ตัว (42.9%) และลูกโคจากแม่โคกลุ่ม H-SCH+ เจอเชื้อเลปโตสไปรา 3 ตัว (60%) ผลการตรวจด้วยวิธี พีซีอาร์ ทั้งลูกโคในกลุ่ม NH-SCH+ และ H-SCH+ ไม่พบดีเอ็นเอของเลปโตสไปรา ในขณะที่การดูด้วยวิธี MAT ลูกโคในกลุ่ม NH-SCH+ พบลูกโค 1 ตัว (14.3%) มีภูมิคุ้มกันที่ระดับไตเตอร์ 1:50 ต่อเชื้อสายพันธุ์ Hebdomadis และ Sejroe และไม่พบลูกโคในกลุ่ม H-SCH+ ที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 จำนวนลูกโคที่ตรวจพบ/จำนวนโคทั้งหมดในกลุ่ม (ร้อยละ) ของผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมีด (Direct) ผลการตรวจด้วย วิธีพีซีอาร์ (PCR) และผลตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MAT

วิธีการตรวจ	จำนวนลูกโคที่ตรวจพบ/จำนวนลูกโคทั้งหมดในกลุ่ม (ร้อยละ)	
	กลุ่ม NH-SCH+	กลุ่ม H-SCH+
Direct	3/7 (42.9%)	3/5 (60%)
PCR	0/7 (0%)	0/5 (0%)
MAT	1/7 (14.3%)	0/5 (0%)

หมายเหตุ NH-SCH+ หมายถึง กลุ่มลูกโคจากแม่ที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง
H-SCH+ หมายถึง กลุ่มลูกโคจากแม่โคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง

วิจารณ์

1. สรีรวิทยาเปรียบเทียบระหว่างแม่โคนมที่ได้รับตำรับสมุนไพร และแม่โคนมที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพรในระยะก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด

1.1 ผลของตำรับสมุนไพรต่ออุณหภูมิร่างกายและค่าโลหิตวิทยาของแม่โคนม

อุณหภูมิ

อุณหภูมิร่างกายของแม่โคกลุ่มที่ได้รับตำรับสมุนไพร จะมีค่าที่สูงกว่าค่ามาตรฐานเล็กน้อย ในสัปดาห์ที่ 1 หลังคลอด (103.6 ± 0.3 °F) โดยค่ามาตรฐาน Rosenberger (1979) รายงานว่าโคนมจะมีอุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยที่ $101 - 103$ °F ซึ่งผู้วิจัยคาดว่า การที่อุณหภูมิร่างกายสูงขึ้น อาจเกิดการติดเชื้อในสิ่งแวดล้อม หรือการเพิ่มขึ้นของขบวนการเมตาบอลิซึมที่สมบูรณ์กว่าแม่โคกลุ่มอื่น เมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ แม่โคในกลุ่มนี้ก็มีอุณหภูมิกลับเข้าสู่สภาวะปกติ

ค่าโลหิตวิทยา

ผลด้านโลหิตวิทยาในช่วงก่อนคลอด คลอดและหลังคลอด ในโคกลุ่มที่ได้รับสมุนไพร (Herb) และ ไม่ได้รับสมุนไพร (No Herb) ค่าโลหิตวิทยาทุกค่าจะอยู่ในระดับอ้างอิงมาตรฐานของโค ตามการรายงานของ Jain (1993) Jain *et al.* (2000) และ Meyer *et al.* (2004) รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของค่าโลหิตวิทยาในช่วงก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด ของการทดลองที่พบ การลดลงของจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ และเม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิล ในวันคลอด และพบการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาว (WBC) เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล และเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ ในวันคลอด ซึ่งให้ผลการทดลองตรงกับ Klinkon and Zadnik (1999) และ ปิยกานต์และคณะ (2548) ได้รายงานการเปลี่ยนแปลงค่าโลหิตวิทยาของโคนมในวันคลอด จากโคนม พันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเซียน จำนวน 60 ตัว ของฟาร์มประเทศสโลวีเนีย และ ไทย ตามลำดับ พบการ ลดลงของ จำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ซึ่งน่าจะมาจากการสูญเสียเลือด และ fetal fluid ส่วนค่าเม็ดเลือดขาว พบว่ามีการลดลงของเม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิล เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ และพบการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาว (WBC) เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล และเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ การเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล และ

เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ จะเกี่ยวข้องกับความเครียด และการเปลี่ยนแปลงของระบบ neuroendocrine ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด (Kehrli *et al.*, 1989) ในขณะที่ค่าเม็ดเลือดขาว (WBC) จะแตกต่างจากการรายงานของ Meglia *et al.* (2005) ที่ศึกษาจากโคพันธุ์ Swedish red and white จำนวน 23 ตัว ที่พบ ค่าเม็ดเลือดขาว (WBC) ต่ำลงในช่วง 1 สัปดาห์ก่อนคลอด จนถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด ค่าพลาสมาโปรตีนและค่าเกล็ดเลือดของการวิจัยนี้ ได้ผลการเปลี่ยนแปลงคล้าย ปียกานต์และคณะ (2548) คือพลาสมาโปรตีนที่ลดลง และค่าเกล็ดเลือดที่เพิ่มขึ้นในช่วง คลอด

ในกลุ่มที่ได้รับสมุนไพรค่าโลหิตวิทยาจะมีค่าไปในแนวทางเดียวกันกับกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร และจะมีระดับจำนวนเม็ดเลือดขาวรวม (WBC) เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (monocyte) ที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสมุนไพร ซึ่งบ่งบอกได้ว่าสมุนไพรที่ให้นั้น เพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งหน้าที่ของเม็ดเลือด 2 กลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเป็นหลัก โดยเม็ดเลือดขาวกลุ่มลิมโฟไซต์ ซึ่งทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันร่างกายทั้ง แบบ innate immunity จาก NK cell และ adaptive immunity จาก T และ B lymphocyte และ โมโนไซต์ ซึ่งทำหน้าที่หลักในกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมแบบฟาโกไซโตซิส (Goldsby *et al.*, 2003) จึงคาดว่า การกินตำรับสมุนไพรนี้ทำให้โคมีระบบภูมิคุ้มกันแบบเฝ้าระวังได้ดีกว่าแม่โคกลุ่มที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร การใช้สมุนไพรเพื่อการเพิ่มภูมิคุ้มกันนั้น ได้มีการรายงานไว้ เช่น Kuroiwa *et al.* (2004) ได้ให้ตำรับสมุนไพรญี่ปุ่น ชื่อ Hochu-ekki-to (HOT) แก่ผู้สูงอายุ โดยการกินเป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่า สมุนไพรนี้ ช่วยลดการเมื่อยล้า (fatigue) เพิ่มความอยากอาหาร (appetite) และช่วยย่อย เมื่อตรวจเม็ดเลือดขาวพบมีการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ ในกลุ่ม NK cell และพบไซโตไคน์ IFN- γ ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม Yang *et al.* (2006b) พบการเพิ่มขึ้นของเซลล์แมโครฟาจ เซลล์ของตับอ่อน และเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ในกลุ่ม T cell ในหลอดทดลอง จากการให้ *Angelica sinensis* polysaccharide (AP) เป็นต้น แต่ในการทดลองนี้ได้ศึกษาเพียงแค่การเปลี่ยนแปลงจำนวนของเม็ดเลือดเท่านั้น ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านหน้าที่การทำงานของเซลล์เหล่านี้ด้วย โดยการทำงานของลิมโฟไซต์ สามารถตรวจจากการแยกชนิดของลิมโฟไซต์และตรวจหาสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้อง เช่น IFN- γ IL-2 หรือ IL-4 เป็นต้น หรือการทำงานของโมโนไซต์ สามารถตรวจจากหาสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้อง เช่น TNF- α หรือ IL-8 เป็นต้น (Goldsby *et al.*, 2003)

1.2 ผลการรับสมุนไพรรักษาความผิดปกติต่อไตและผลต่อปริมาณน้ำนม

ค่าพีเอชของปัสสาวะ ค่าครีเอตินีน และค่ายูเรียในเลือด (BUN) อยู่ในค่าอ้างอิงมาตรฐาน (Rosenberger, 1979) และในแม่โคกลุ่มที่ไม่ได้รับสมุนไพรมีการเปลี่ยนแปลงของค่าครีเอตินีนที่ลดลง และค่า BUN ที่เพิ่มขึ้นในช่วงคลอดคล้ายกับ ปียกานต์และคณะ (2548) ซึ่งการตรวจค่าครีเอตินีนและค่า BUN เป็นดัชนีที่บ่งบอกของการทำงานของไตในโคได้ (Thrall, 2004) ดังนั้นการใช้การรับสมุนไพรรักษาที่ 1 ขนาด 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักโค 1 กิโลกรัมทุก 12 ชั่วโมง และ การรับสมุนไพรรักษาที่ 2 ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักโค 1 กิโลกรัม ทุก 12 ชั่วโมง ไม่มีผลที่เป็นอันตรายต่อการการทำงานของไตในโคนม ซึ่งการทดลองนี้เป็นงานทดลองแรกที่มีการรายงานการใช้สมุนไพรรักษาในโคนมทดลอง

ในด้านความเป็นพิษนั้นมีการศึกษาเกี่ยวกับสมุนไพรมากในสัตว์ทดลอง โดยขนาดของสมุนไพรรักษาหลายโรคที่ใช้ตั้งแต่ 3,000, 2,000 (Sithisomwongse *et al.*, 1989) 500 (Feng *et al.* 1962) 400 200 150 100 50 มก./กก. (Dhammanpahorn and Chaichantipyuth, 1989) ขนาด ของขมิ้นชันที่รายงานตั้งแต่ 2,200 (Sharma *et al.*, 2001) 300 มก./กก. (Shankar *et al.*, 1979) ขนาดของไพลรายงานตั้งแต่ 18,040 2,250 350 มก./กก. (Panyathanya *et al.*, 1986) ขนาดของลูกใต้ใบรายงานตั้งแต่ 600 300 และ 150 มก./กก. (Adeneye, 2006) ขนาดของน้ำมันมะขามที่รายงานตั้งแต่ 1000 300 และ 100 มก./กก. (Hore, 2006) ซึ่งขนาดที่กล่าวมาข้างต้น ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ทดลอง ดังนั้นยังสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ว่าขนาดที่ให้ไม่เป็นพิษต่อโดยรวมถึงร่างกายโคนมด้วย

ผลการตรวจปริมาณน้ำนมแสดงว่า การรับสมุนไพรรักษา ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับการให้น้ำนม แม้ว่าสมุนไพรรักษาที่ผสมอยู่ในการรับสมุนไพรรักษา มีผลในการสร้างเนื้อเยื่อเต้านมและขับน้ำนมในโค (Chifundera, 1998) อาจมาจากปริมาณของน้ำมันมะขามที่ใช้ไม่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ ผู้วิจัยคาดว่า การเพิ่มปริมาณน้ำมันมะขามสามารถเพิ่มปริมาณน้ำนมได้ ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

1.3 ผลการรับสมุนไพรรักษาโรคระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในแม่โคทดลอง

การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การรับสมุนไพรรักษาโรคที่ใช้อย่างทดลอง ส่งผลให้แม่โคนมมีระดับไซโตไคน์ IFN- γ ที่ลดลง และระดับ TNF- α ที่ไม่เปลี่ยนแปลงจากโคที่ได้รับสมุนไพรรักษาโรค โดยปกติ IFN- γ ถูกหลั่งมาจาก T cell กลุ่ม CD4⁺ CD8⁺ และ NK cell มีหน้าที่กระตุ้น ให้ T และ B cell macrophages และ NK cell แบ่งตัว ทำงานและเจริญ เพิ่มการแสดงออกของ MHC และเป็นไซโตไคน์บ่งบอกถึง Type 1 cellular immunity (Goldsby, 2003) การลดลงของ IFN- γ คาดว่า ส่วนประกอบของสมุนไพรรักษาโรค มีรายงานตรงกับการออกฤทธิ์ของ ฟอสฟอรัส (Chiou *et al.*, 2000; Sheeja and Kutton, 2006) โดย Chiou *et al.* (2000) อธิบายกลไกการออกฤทธิ์ว่า ฟอสฟอรัส จะลดการสร้าง IFN- γ ที่หลั่งจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS ของเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งฟอสฟอรัสลดการแสดงออกของ iNOS จากเซลล์แมโครฟาจ ทำให้ไม่มีการสร้าง Nitric oxide (NO) ซึ่ง NO เป็นสารที่อนุมูลอิสระที่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้น การรับสมุนไพรรักษาโรคนี้น่าจะแสดงฤทธิ์ของการลดการอักเสบ (anti-inflammation effect) นอกจากนี้ก็สามารถพบได้ฤทธิ์ลดการอักเสบจากไฟโต (Panthong *et al.*, 1990) ถูกได้ไป (Kassuya *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ของฟอสฟอรัส ก็สามารถพบการเพิ่มขึ้นของ IFN- γ ได้ (Burgos *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006; Sheeja and Kutton, 2007) ไซโตไคน์ TNF- α ถูกหลั่งมาจาก โมโนไซต์ แมโครฟาจ fibroblast และ T-cell มีหน้าที่เป็นสื่อในกระบวนการอักเสบและระบบภูมิคุ้มกัน เป็นสารให้เกิดการแบ่งตัวและเจริญต่อเซลล์หลายชนิด (Goldsby, 2003) ในงานวิจัยนี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ TNF- α แต่พบว่าในช่วงคลอดที่พบปริมาณ TNF- α ที่ลดลง ผู้วิจัยคาดว่าสมุนไพรรักษาโรคจะสามารถช่วยลดการอักเสบในช่วงคลอดได้ งานวิจัยนี้ได้ศึกษามุ่งเน้นผลของสมุนไพรรักษาโรคระดับไซโตไคน์ 2 ตัว คือ IFN- γ และ TNF- α ด้วยเหตุผลเกี่ยวข้องกับเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าสมุนไพรรักษาโรคนี้น่าจะมีผลต่อระดับไซโตไคน์ตัวอื่นๆด้วย เช่น IL-4 ที่แสดงผลตรงข้ามกับระดับ IFN- γ เป็นต้น ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

1.4 ผลของสมุนไพรรักษาโรคต่อสุขภาพของแม่โคนมในช่วงทดลอง

ผลการทดลองแสดงว่า แม่โคที่ได้รับสมุนไพรรักษาโรคจะสามารถลดอุบัติการณ์การเกิดโรคคลอดยากแบบมี/ไม่มีการแท้งลูกและเต้านมอักเสบแต่ไม่มีผลต่อการเกิดการเจ็บกีบของโคนม แม่โคที่เกิดโรคทางเมตาบอลิกและโรคติดเชื้อมักเกิดจากการจัดการและการจัดการด้านอาหารในช่วง

ระยะแห้งนมไม่เหมาะสม เป็นสาเหตุให้เกิดภาวะ negative energy balance (Ostergaard and Sorensen, 1998; Rukkwamsuk *et al.*, 1999) ผลจากภาวะ negative energy balance ทำให้ร่างกายแม่โคมีภาวะการสะสมไขมันที่ตับ และคีโตซิส (hepatic lipidosis and ketosis) และการกีดการทำงานของเม็ดเลือดขาว (Targowski and Klucinski, 1983; Popstad *et al.*, 1989; Hoeben *et al.*, 1997; Wentink *et al.*, 1997; Suriyasathaporn *et al.*, 1999) ส่งผลให้เกิดโรคลิ้นในช่วงหลังคลอดหรือช่วงต้นของการให้นม ซึ่งฤทธิ์ของสมุนไพรได้แสดงให้เห็นว่ามีผลทำให้เพิ่มระดับภูมิคุ้มกันที่สมบูรณ์กว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสมุนไพร และเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการต่อต้านการติดเชื้อ (Meglia *et al.*, 2005) ส่วนในกรณีที่แม่โคที่กินตำรับสมุนไพรมีผลการเกิดภาวะเจ็บก๊ีบไม่แตกต่างกับแม่โคที่ไม่กินสมุนไพร เนื่องจากสาเหตุของการเกิดเจ็บก๊ีบจะเกิดกับแม่โคหลังคลอด (Nilsson, 1963) ซึ่งมีผลจากการให้อาหารข้นมากเกินไปเพื่อการผลิตน้ำนม (Moser and Diver, 1987; Manson and Leaver, 1988a, 1988b) การกินอาหารข้นทำให้จุลินทรีย์ที่กระเพาะรูเมนบางชนิดตาย แล้วหลังสารพวก endotoxin และ histamine และการมีเกิดกรดแลคติกที่มากขึ้น สารเหล่านี้จะดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด และมีผลต่อเส้นเลือดโดยเฉพาะบริเวณก๊ีบ (Radostits *et al.*, 1997)

2. สรีรวิทยาเปรียบเทียบผลของตำรับสมุนไพรในแม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรา ตรวจสอบในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

2.1 อุณหภูมิร่างกาย

ผลการทดลองไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการใช้ต่อการเป็นแหล่งรังโรค ดังแสดงในกลุ่ม NH-SCH+ ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าทุกกลุ่ม ซึ่งคาดว่าแม่โคที่ตรวจพบนั้นเป็นโคนมในภาวะเป็นแหล่งรังโรค (Radostits *et al.*, 1997) ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสมุนไพร (H-SCH- และ H-SCH+) มีค่าอุณหภูมิที่สูง โดยเฉพาะในกลุ่ม H-SCH- ที่สูงนั้น แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ของสมุนไพรเพิ่มขึ้นของขบวนการเมตาบอลิซึมที่สมบูรณ์กว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสมุนไพร

2.2 ค่าโลหิตวิทยา

ผลของค่าโลหิตวิทยา แสดงให้เห็นว่า แม่โคที่กินตำรับสมุนไพร (H-SCH+ และ H-SCH-) มีปริมาณลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ที่สูงขึ้น ซึ่งเมื่อแยกกลุ่มย่อย พบว่าในกลุ่ม H-SCH- จะมีปริมาณเม็ดเลือดขาว 2 ชนิดสูงที่สุด ซึ่งบ่งชี้ว่าสมุนไพรมีผลโดยตรงในการเพิ่มลิมโฟไซต์และโม

โนซัยต์ ส่วนในกลุ่ม H-SCH+ มีปริมาณเม็ดเลือดขาวสองชนิดที่ต่ำกว่ากลุ่ม H-SCH- นั้น ยังไม่มีรายงาน แต่ผู้วิจัยคาดว่าเชื้อเลปโตสไปราอาจมีกลไกที่สามารถลดระดับภูมิคุ้มกันได้ ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

จากผลการทดลองนี้พบว่าค่าโลหิตวิทยาของโคที่วินิจฉัยที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรานั้นไม่มีความแตกต่างกับโคปกติ ซึ่งตรงตามรายงานในคน (Shpilberg *et al.*, 1990) ในสุนัข (Scanziani *et al.*, 1995) รวมทั้งในโคนมด้วย (ณัฐพงศ์ และคณะ, 2549) จึงแสดงให้เห็นชัดเจนว่าพิษสมุนไพรเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์และ โมโนซัยต์จริง และไม่ผลรบกวนจากการที่โคเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรา

จำนวนของเกล็ดเลือดในกลุ่มที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปรานั้น (NH-SCH+ และ H-SCH+) จะมีแนวโน้มที่เกล็ดเลือดต่ำ ซึ่งตรงกับการรายงานของ ณัฐพงศ์ และคณะ (2549) ที่พบการลดของเกล็ดเลือดอย่างมีนัยสำคัญจากแม่โคนมที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา จำนวน 100 ตัว กลไกการเกิดเกล็ดเลือดต่ำเกิดเนื่องจาก leptospiral lipopolysaccharide ทำให้ neutrophil ไปจับกับ endothelial cell และเกล็ดเลือด เป็นสาเหตุให้เกิดการรวมตัวกันของเกล็ดเลือดและเกิดภาวะ thrombocytopenia ตามมา (Levett, 2001) แต่ในกลุ่ม H-SCH+ นั้นจะมีค่าเกล็ดเลือดมากกว่ากลุ่ม NH-SCH+ ผู้วิจัยคาดว่าสมุนไพรอาจมีผลในการลดปริมาณเชื้อเลปโตสไปราหรือเพิ่มปริมาณเกล็ดเลือดได้

2.3 ผลดํารับของสมุนไพรต่อระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในแม่โคทดลอง

จากการทดลองมีแม่โคที่ได้รับดํารับสมุนไพรมีระดับ IFN- γ ที่ต่ำกว่ากลุ่ม NH-SCH+ และ NH-SCH- ทุกระยะ รวมทั้งในวันคลอดที่ระดับไซโตไคน์มีแม่โคนมกลุ่ม H-SCH- และ H-SCH+ จะมีระดับไซโตไคน์ TNF- α ที่ต่ำกว่าแม่โคนมกลุ่ม NH-SCH+ และ NH-SCH- แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของสมุนไพรนั้นเป็นการลดอักเสบได้ทั้งแม่โคที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราได้ แต่กลไกยังไม่สามารถสรุปได้แน่นอน

2.4 การตรวจสอบอิทธิพลของคาร์บับซิมุนไพร์ต่อการยับยั้งและ/หรือลดการปลดปล่อยเชื้อสไปโรจิต/เลปโตสไปราจากแม่โคที่เป็นแหล่งรังโรค

ในงานวิจัยนี้แสดงฤทธิ์ลดการแพร่เชื้อเลปโตสไปราจากแม่โคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปรา จากแม่โคที่ได้รับคาร์บับซิมุนไพร์ จากการลดปริมาณเชื้อเลปโตสไปราโดยตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมีด ซึ่งกลไกยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เมื่อเทียบกับการเปลี่ยนแปลงระดับ IFN- γ ที่ลดลงและ TNF- α ที่ไม่แตกต่างจะพบเหมือนการรายงานการเปลี่ยนแปลงไซโตไคน์จากยาปฏิชีวนะ Tetracycline ในหนู (Lin *et al.*, 2006) แต่ลักษณะโครงสร้างของสมุนไพร์ที่นำมาใช้นั้นไม่เหมือนกับ tetracycline เมื่อศึกษางานวิจัยของแต่ละสมุนไพร์ที่ใช้ในการทดลองในด้านการทดแทนยาปฏิชีวนะเช่น ฟาโทะลายโจร มีฤทธิ์ไม่แตกต่างกับ streptomycin และ gentamycin (Singha *et al.*, 2003) ขมิ้นชัน มีฤทธิ์ไม่แตกต่างกับ Imipenem (Somia *et al.*, 2005) และออกฤทธิ์คล้ายยา Cefepime (Mishra *et al.*, 2005) ไพล มีฤทธิ์ไม่แตกต่างกับ amoxicillin (Wannissorn, 2004) น้ำนมราชสีห์ มีฤทธิ์ไม่แตกต่างกับ ampicillin (Sudhakor *et al.*, 2006) และลูกใต้ใบซึ่งสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดได้ (Kloucek *et al.*, 2005; Mazumder *et al.*, 2006) ซึ่งการวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อเลปโตสไปราในโคเป็นครั้งแรก ยังต้องมีการศึกษาต่อทั้งในเรื่องปริมาณที่เหมาะสมสำหรับยับยั้งเชื้อรวมทั้งการออกฤทธิ์ของสมุนไพร์ที่ใช้ในการลดเชื้อเลปโตสไปราต่อไป

การตรวจวินิจฉัยต่อโรคเลปโตสไปโรซิสที่ใช้ในการวิจัยแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน โดยวิธีทางชีววิทยา จากการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) จะเป็นวิธีที่เป็นมาตรฐานสำหรับตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส (Radostits *et al.*, 1997; WHO, 2003) ข้อดีคือ มีความจำเพาะต่อเชื้ออ้างอิงสูง (high specificity) ข้อเสียที่สำคัญคือ จำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราอ้างอิงหลายซีโรวาร์ การใช้ระยะเวลาตรวจเป็นเวลานาน รวมทั้งความหลากหลายสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราทำให้ไม่มีเชื้อที่ใช้อ้างอิงได้ (WHO, 2003) การตรวจระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธี MAT ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยคิดว่าเป็นการบ่งบอกการเพิ่มภูมิต่อเชื้อเลปโตสไปราเท่านั้น ซึ่งในกรณีโคเป็นแหล่งรังโรคนั้นเชื้อจะหลบซ่อนตามอวัยวะต่างๆ เช่น ไต เป็นต้น ทำให้ไม่พบภูมิคุ้มกันได้ดังกรณีในกลุ่ม H-SCH+ หรือการวินิจฉัยด้วย MAT อาจบ่งบอกสถานะสัมผัสเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมในกรณีกลุ่ม NH-SCH+ ที่มีระดับ MAT >1:50 แต่ไม่มีโรคตัวใดมีระดับ MAT ที่จะบ่งบอกว่ามีอาการทางคลินิก การดูเชื้อโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมีด ข้อดีคือ สามารถเห็นเชื้อได้โดยตรง และใช้เวลาไม่นาน ข้อเสียคือ ต้องใช้ความชำนาญในการจำแนกเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งสามารถพบเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธีนี้ได้ แม้ว่า MAT เป็นลบ (White

et al., 1982; Thiermann, 1983) ซึ่งผู้วิจัยได้ใช้วิธีนี้เป็นหลักในการแยกกลุ่มเลปโตสไปรา วิธีสุดท้ายที่ใช้คือวิธีจากแอนติเจนหรือสารพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธีลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) ข้อดี คือมีความเฉพาะเจาะจงและใช้เวลาตรวจไม่นาน ข้อเสียคือ ใช้งบประมาณสูง ซึ่งในประเทศไทยได้มีการพัฒนาการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธีฟิชอาร์จากตัวอย่างปัสสาวะโดยตรงได้ (ศิริวรรณ และคณะ, 2546) แต่ในการวิจัยนี้ไม่สามารถวินิจฉัยได้ชัดเจนนัก อาจเนื่องจากตัวอย่างมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียอื่นมากเกินไป นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิธีอื่นๆเพื่อวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส เช่น Indirect immunofluorescent test (IFAT) Enzyme link immunosorbant assay (ELISA) Lepto-Dipstick test หรือ Latex agglutination test เป็นต้น (McBride *et al.*, 2005) ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีรายงานแน่ชัดว่า วิธีการใดมีความแม่นยำสูงสุด การตรวจด้วยหลายวิธีจะช่วยยืนยัน การวินิจฉัยได้ดีถูกต้องมากขึ้น (WHO, 2003; Ooteman *et al.*, 2005)

2.5. ผลของตำรับสมุนไพรต่อข้อมูลสุขภาพทางเมตาบอลิกของแม่โคนมที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราในระหว่างการทดลอง

โคที่เป็นแหล่งรังโรคเลปโตสไปราจะมีการคลอดยาก แท้ง ผสมไม่ติด เต้านมอักเสบซึ่งแสดงให้เห็นในกลุ่ม NH-SCH⁺ ซึ่งจะแตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับสมุนไพร (H-SCH⁺) โดยจะไม่พบแม่โคที่มีการคลอดยาก แท้ง ผสมไม่ติด เต้านมอักเสบเลย แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของสมุนไพรที่ลดปริมาณเชื้อเลปโตสไปราได้และสามารถเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันได้ ซึ่งจะแตกต่างกับการทดลองของ ปียกานต์ และคณะ (2548) รายงานว่าไม่พบความแตกต่างของสุขภาพแม่โคจากแม่โคที่พบเชื้อเลปโตสไปราและไม่พบเชื้อเลปโตสไปรา

3. สรีรวิทยาเปรียบเทียบระหว่างลูกโคนมในระยะคลอดถึง 1 สัปดาห์หลังคลอดที่เกิดจากแม่โคนมที่ได้รับตำรับสมุนไพร และจากแม่ที่ไม่ได้รับตำรับสมุนไพร

ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงการส่งผ่านผลของตำรับสมุนไพรจากแม่โคที่ได้รับตำรับสมุนไพรไปสู่ลูกโคโดยศึกษาสรีรวิทยาของลูกโคในช่วงวันคลอดถึง 1 สัปดาห์หลังคลอด พบว่า สมุนไพรไม่มีผลต่ออุณหภูมิร่างกาย ค่าโลหิตวิทยาของลูกโคยกเว้นจำนวนเกล็ดเลือด ความเป็นพิษต่อไต และระดับโซเดียม เมื่อแยกย่อยลูกโคออกมาตามแม่โคที่พบเชื้อเลปโตสไปรา พบว่าเชื้อเลปโตสไปราและตำรับสมุนไพรนั้นไม่มีผลต่ออุณหภูมิร่างกาย ค่าโลหิตวิทยายกเว้นจำนวนเกล็ดเลือดและ

ระดับไซโตคายน์ ดังเช่นในแม่โค โดยการศึกษาที่สรุปว่าเชื้อเลปโตสไปราและตำรับสมุนไพร ไม่มีผลต่อลูกโค ในขณะที่ค่าเกล็ดเลือดที่เพิ่มขึ้น เป็นไปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของเกล็ดเลือดนั้นเกิดจากผลทางสรีระของลูกโค เช่น ผลของเอพินเฟรินจากการตื่นเต้น ผลระหว่างการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสัตว์ (เจเลียว, 2540) หรือการได้รับตำรับสมุนไพรในแม่โคมีผลกระตุ้นการสร้างเกล็ดเลือดในลูกโคระหว่างที่อยู่ในท้องแม่โค

การวิจัยนี้สามารถพบเชื้อเลปโตสไปราใน กลุ่มลูกโคที่แม่โคไม่ได้รับตำรับสมุนไพรและตรวจพบเชื้อเลปโตสไปรา (NH-SCH+) และกลุ่มลูกโคที่แม่โคได้รับตำรับสมุนไพรและตรวจพบเชื้อเลปโตสไปรา (H-SCH+) แม้ในแม่โคกลุ่ม H-SCH+ จะตรวจไม่พบเชื้อเลปโตสไปราก็ตาม เนื่องจาก รกในโคนั้นเป็นแบบ syndesmochorial structure ทำให้การส่งผ่านอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin, Ig) เซลล์ภูมิคุ้มกัน และสารไซโตคายน์ จากแม่โคไม่สามารถส่งผ่านมาสู่ลูกได้ (Barrington and Parish, 2001) ทำให้เชื้อเลปโตสไปราสามารถหลุดรอดและคงอยู่ในร่างกายลูกโคได้หรือเชื้อเลปโตสไปราได้ไปอยู่ในลูกโคตั้งแต่ก่อนการทดลอง แต่ก็ไม่ได้พบเชื้อเลปโตสไปราในลูกโคทุกตัว เนื่องจากในช่วงปลายของการตั้งท้องนั้น ระบบภูมิคุ้มกันของลูกโคมีการพัฒนาไปมาก ทั้งระบบ innate และ adaptive immunity (Tizzard, 2000) ทำให้มีลูกโคบางตัวสามารถกำจัดเชื้อเลปโตสไปราได้ รวมทั้งสามารถตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อโรคเลปโตสไปราได้ เช่นที่พบระดับ MAT ของลูกโค 1 ตัวในกลุ่ม NH-SCH+ ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่า ตำรับสมุนไพรที่ให้ในแม่โคนั้น ไม่สามารถผ่านรกไปสู่ลูกได้ และการป้องกันลูกโคจากแม่โคที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสยังเป็นปัญหาอยู่ ซึ่งการแก้ปัญหานี้ผู้วิจัยมีความคิดว่าการตรวจฤทธิ์ของตำรับสมุนไพรต่อระบบภูมิคุ้มกันในนม น้ำเหลืองและน้ำนม เนื่องจาก ลูกโคจะได้ภูมิต้านทานจากแม่จากนม น้ำเหลือง และน้ำนมเป็นหลัก (Wells and Osbourne, 1921) โดยเฉพาะในช่วง 3-5 สัปดาห์หลังคลอด ก่อนที่ลูกโคจะมีระบบภูมิคุ้มกันสมบูรณ์ (Senogles *et al.*, 1978; Devery *et al.*, 1979; Husband, 1980; Banks and McGuire, 1989) ส่วนประกอบภูมิคุ้มกันในนม น้ำเหลืองจะมี อิมมูโนโกลบูลิน เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ทั้งกลุ่ม T และ B cell นิวโทรฟิล แมคโครฟาจ (Barrington and parish, 2001) และ ไซโตคายน์ เช่น IL-2-like activity (Sordillo *et al.* 1991) TNF- α (Rewinski and Yang. 1994) เป็นต้น และได้มีหลักฐานป้องกันโรคได้ดีของนม น้ำเหลืองหรือนมที่ใส่ภูมิคุ้มกัน ในการป้องกัน *E.coli* (Tizzard, 2000) หรือ *Trichinella spiralis* (Le Jan, 1996) เป็นต้น ในขณะที่แอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในนม น้ำเหลืองของแม่หมู มีความสามารถในการฆ่าเชื้อ (Neutrazizing antibody titer) เลปโตสไปราต่ำ (Soto *et al.*, 2007) ซึ่งยังต้องรอการศึกษาต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การใช้ตำรับพืชสมุนไพรไทยที่มีส่วนผสมของ ฟ้าทะลายโจร ลูกใต้ใบ น้ำนมราชสีห์ ไพล และขมิ้นชัน ในโคนมนั้นมีความปลอดภัยโดยไม่เป็นพิษใด ไม่มีผลต่อระดับเม็ดเลือดแดง แต่สามารถเพิ่มระดับลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ซึ่งมีหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย สามารถลดระดับการแพร่เชื้อสไปโรจิต/เลปโตสไปราออกจากปัสสาวะ สามารถลดระดับ IFN- γ และลดระดับไซโตไคน์ TNF- α ในวันคลอด และสามารถใช้เป็น bacteriostatic ได้ ในขณะที่ตำรับสมุนไพรไม่มีผลโดยตรงต่อลูกโค ซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ในการประยุกต์ใช้ในทางสัตวแพทย์

ข้อเสนอแนะ

ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านหน้าที่การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว หรือการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อทราบระบบการทำงานให้ชัดเจน เช่น โดยการทำงานของลิมโฟไซต์สามารถตรวจจากการแยกชนิดของลิมโฟไซต์และตรวจหาสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้อง เช่น IFN- γ IL-2 หรือ IL-4 เป็นต้น หรือการทำงานของโมโนไซต์สามารถตรวจจากหาสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้อง เช่น TNF- α หรือ IL-8 เป็นต้น

งานวิจัยนี้ได้ศึกษามุ่งเน้นผลของสมุนไพรต่อระดับไซโตไคน์ 2 ตัว คือ IFN- γ และ TNF- α ด้วยเหตุผลเกี่ยวข้องกับเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าตำรับสมุนไพรนี้น่าจะมีผลต่อระดับไซโตไคน์ตัวอื่นๆด้วย เช่น IL-4 ที่แสดงผลตรงข้ามกับระดับ IFN- γ เป็นต้น

ซึ่งการวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อเลปโตสไปราในโคเป็นครั้งแรก ยังต้องมีการศึกษาต่อทั้งในเรื่อง ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของตำรับสมุนไพร การหาปริมาณที่เหมาะสมสำหรับยับยั้งจนถึงขั้นทำลายเชื้อต่อไป

ควรจะมีการตรวจคุณภาพของน้ำนมเหลือง หรือน้ำนมจากแม่โคที่ได้รับตำรับสมุนไพร เพื่อตรวจสอบระดับภูมิคุ้มกัน เพื่อใช้ในการป้องกันโรคในลูกโค

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2533. คู่มือสมุนไพรเพื่อการสาธารณสุขพื้นฐาน. กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร. 2537. สมุนไพรพื้นบ้าน (ฉบับรวม). ครั้งที่ 2. บริษัท พี.เอ. ลิฟวิง จำกัด, กรุงเทพฯ.

เจลิยว ศาลากิจ. 2540. โลหิตวิทยาทางสัตวแพทย์. ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์อักษรสมัย.

ณัฐพงศ์ แซ่ลิ้ม, ณัฐฉา ลิ้มปิฎาภรณ์, สลิลลา สายหยุด, ชาญวิทย์ สุริยะ, นุช โชติช่วง, นรสุทธิ์ บางภูมิ, วรณดา สุจริต, ชีระศักดิ์ พราพพงษ์ และ ศิริวรรณ พราพพงษ์. 2549. การตรวจสอบทางซีรัมวิทยาของซีโรวาร์และระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราของโคนมในฟาร์มโคนมขนาดเล็ก จังหวัดกาญจนบุรี. ประมวลเรื่องประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 32 ประจำปี 2549. สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. ISBN 974-9995-99-6. 155-159.

ปิยกานต์ เมธาลักษณ์, สุพรรณษา เลิศภูมิปัญญา, ไพศาล เพชรเมือง, วีรพงษ์ พงษ์นารายณ์, เจลิยว ศาลากิจ, นุช พึ่งโพธิ์สถ, นรสุทธิ์ บางภูมิ, ดวงใจ สุวรรณเจริญ และศิริวรรณ พราพพงษ์. 2548. สรีรเปรียบเทียบทางด้านสุขภาพของโคนมที่เป็นแหล่งรังโรคและโคนมที่ไม่ได้เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราช่วงระยะใกล้คลอด คลอด และหลังคลอด ในฟาร์มสัตว์ทดลอง. เรื่องเติมการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 31 ประจำปี 2548 สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. ISBN 947-93674-2-1.

ศิริวรรณ พรพงษ์ ดวงใจ สุวรรณเจริญ และ นพพร โต๊ะมี. 2546. การตรวจหาไวรัสที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปโรซิสในประเทศไทยโดยการประสานเทคนิค PCR และ MAT. **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 41มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. ISBN 947-537-241-2. 668-677.

ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2538. **สยามไภษัชยพฤษก์ ภูมิปัญญาของชาติ**. พิมพ์ที่ บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ.

สำนักงานโครงการควบคุมโรคเลปโตสไปโรซิส. 2544. **คู่มือวิชาการเลปโตสไปโรซิส**. ครั้งที่ 1. กองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข,

อัมพวัน อภิสิริยะกุล และ มนัสนันท์ บุญชู. 2544. การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียจากผู้ป่วยของสารน้ำมันขมิ้นและสารเคอร์คิวมิน ซึ่งสกัดได้จากขมิ้นชัน. ในรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

Adeneye, A. A., O. O. Amole and A. K. Adeneye. 2006. Hypoglycemic and hypocholesterolemic activities of the aqueous leaf and seed extract of *Phyllanthus amarus* in mice. **Fitoterapia**. 77: 511-514.

Adler, B. and S. Faine. 1977. Host Immunological Mechanisms in the Resistance of Mice to Leptospiral Infections. **Infect. Immun.** 17: 67-72.

Banks, K. L. and T. C. McGuire. . 1989. Neonatal immunology, pp. 193-204. *In* R. E. W. Halliwell, N. T. Gorman, ed. **Clinical Immunology**. W. B. Saunders, Philadelphia, USA.

Baron, S., D. A. James, M. Susman, C. A. Kennedy, M. J. D. Singleton, S. Schuenke. 1996.

Medical Microbiology. 4 ed. University of Texas medicinal branch at Gelvelson, U.S.A.

Barrington, G. M. and S. M. Parish. 2001. Bovine Neonatal Immunology, pp. 463-476. *In* J. A.

Roth, ed. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. Immunology.** W. B. Saunder, Philadelphia, USA.

Barringer, L. S. 2003. Bovine leptospirosis: Cost factor and new information on prevalence in

U.S. beef and dairy operations. **Phizer Animal Health Technical Bulletin.**

Bolin, C. A., A. B. Thiermann, A. L. Handsaker and J. W. Foley. 1989. Effect of vaccination

with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection of pregnant cattle. **Am. J. Vet. Res.** 50: 161-165.

Branett, J. K., D. Barnett, C. A. Bolin, T. A. Summers, E. A. Wager, N. F. Cheville, R. A.

Hartskeerl, D. A. Haake. 1999. Expression and Distribution of Leptospiral Outer Membrane Components during Renal Infection of Hamsters. **Infect. Immun.** 67: 853-861.

Burgos, R. A., K. Sequel, M. Perez, A. Meneses, M. Ortega, M. I. Guarda, A. Loaiza and J. L.

Hancke. 2005. Andrographolide inhibits IFN-gamma and IL-2 cytokine production and protects against cell apoptosis. **Planta Med.** 71: 429-434.

Chainani-Wu, N. 2003. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: 1 component of tumeric

(*Curcuma longa*). **J. Altern. Complement Med.** 9:161-8.

Chifundera, K. 1998. Livestock diseases and the traditional medicine in the Bushi area, Kivu

province, Democratic Republic of Congo. **African Study Monographs.** 19: 13-33.

- Chiou, W. F., C. F. Chen and J. J. Linn. 2000. Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. **Br. J. Pharmacol.** 129: 1553-1560.
- Chaney, A.L., E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clin. Chem.** 8: 130-132.
- Corbeil, L. B., R. H. BonDurant. 2001. Immunity to Bovine Reproductive infections. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 17: 567-583.
- de Fost, .M., R. A. Hartskeerl, R. Martijin and Poll. 2003. Interleukin 12 in Part Regulates Gamma Interferon Release in Human Whole blood Stimulated with *Leptospira* interrogans. **Clin. and Diag. Lab. Immunol.** 10: 332-335.
- Devery, J. E., C. L. Davis and B. L. Larson. 1979. Endogenous production of immunoglobulin IgG1 in newborn calves. **J. Dairy Sci.** 62: 1814-1818.
- Dhammapahorn, P. and C. Chaichantipyuth. 1989. Acute and subchronic toxicity studies of *Andrographis paniculata* in rats and mice. **Abstr. The 8th symposium**, Faculty of pharmacy, Chulalongkorn University Bangkok, Thailand, December.
- Edwards, C. N., G. D. Nicholson, T. A. Hassell, C. O. R. Everard and J. Callender. 1988. Penicillin therapy in icteric leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 39: 388.
- Estavoyer, J. M., E. Racadot, G. Couetdic, J. Leroy, and L. Groperrin. 1991. Tumor necrosis factor in patients with Leptospirosis. **Rev. Infect. Dis.** 13: 1245-1246.
- Faine, S, B. Adler, C. Bolin and, P. Perolat. 1999. **Leptospira and leptospirosis.** 2 ed. MedSci, Melbourne, Australia.

- Floyd, Jr. J. G., 1994. Leptospirosis in Cattle. **ACES ANR-858**. 8: 94.
- Feng, P. C., L. J. Haynes, K. E. Magnus, J. R. Plimmer and H. S. A. Sherrat. 1962. Pharmacological screening of some west Indian medicinal plants. **J. Pharm. Pharmacol.** 14: 556-561.
- Goff, J. P., R. L. Horst . 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorder. **J. Dairy Sci.** 80: 1260-1268.
- Goff, J. P., R. L. Horst, T. A. Reinhardt, D. R. Buxton. 1997. Strategies for Preventing Milk fever in Dairy cattle. **J. Dairy Sci.**; 80: 1269-1280.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt, B. A. Osborne and J. Kuby. 2003. **Immunology**. 5 ed. W.H. Freeman & company, Newyork.
- Gravekamp, C., H. Van de kamp, M. Franzen, D. Carrington, G. J. Schoone, G. J. Van Eys, C. O. Everard, R. A. Harskeerl and W. J. Terpstra. 1993. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets primers. **J. Gen. Microbiol.** 139: 1691-1700.
- Habsah, M., M. Amran, M. M. Mackeen. 2000. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. **J. Ethnopharmacol.** 72: 403-410.
- Hoeben, D., R. Heyneman and C. Burvenich. 1997. Elevated level of beta-hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 58: 165-170.
- Hore, S. K., V. Ahuja, G. Mehta, pardeep Kumar, S. K. Pandey and A. H. Ahmad. 2006. Effect of aqueous *Euphobia hirta* leaf extract on gastrointestinal motility. **Fitoterapia** 77: 35-38.

Hung, C. C., C. T. Chang, Y. C. Tian, M. S. Wu, C. C. Yu, M. J. Pan, A. Vandewalle and C. W. Yang. 2006a. Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. **Nephrol. Dial. Transplant.** 21: 898-910.

Hung, C. C., C. T. Chang, K. H. Chen, Y. C. Tian, M. S. Wu, M. J. Pan, A. Vandewalle and Yang C. W. 2006b. Upregulation of chemokine CXCL1/KC by leptospiral membrane lipoprotein preparation in renal tubule epithelial cells. **Kidney Int.** 69: 1814-22.

Hung, C. C., C. T. Chang, Y. C. Tian, M. S. Wu, C. C. Yu, M. J. Pan, A. Vandewalle and C. W. Yang. 2006c. Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. **Nephrol. Dial. Transplant.** 21: 898-910.

Husband, A. J. 1980. Ontogeny of the gut-associated immune system, pp. 633-647. *In* J. E. Butler, ed. **The Ruminant Immune system.** Plenum Press, New York, USA.

Jeenapongsa, R., K. Yoovathaworn, K. M. Sriwatanakul, U. Pongprayoon and K. Sriwatanakul. 2003. Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb. **J. Ethnopharmacol.** 87: 143-8.

Jain, N. C. 1993. **Comparative Hematology of Common Domestic Animal In Essentials of Veterinary Hematology.** Lea and Febiger, Philadelphia, USA.

Jain, N. C., B. F. Bernard and J. G. Zinkl. 2000. **Schalm's Veterinary Hematology.** Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.

- Jost, B. H., B. Adler, T. Vihn and S. Faine. 1987. A Monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **J. Med. Microbiol.** 22: 269-275.
- Kaplan, A. and L. L. Teng. 1982. **Selected Methods of Clinical Chemistry**, Vol. 9, AACC, Washington, pp 357-363.
- Kassuya, C. A. L., A. Silvestre, O. Menezes-de-Lima Jr., D. M. Marotta, V. L. G. Rehder and J. B. Calixto. 2006. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus* Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **Eur. J. Pharmacol.** 54: 182-188.
- Kehrli Jr., M. E., B. J. Nonnecke and J. A. Roth. 1989. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. **Am. J. Vet. Res.** 50: 215-220.
- Khattak, S., Saeed-ur-Rehman, H. Ullah Shan, W. Ahmad and M. Ahmad. 2005. Biological effects of indigenous medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galanga*. **Fitoterapia.** 76: 254-257.
- Kimura, K., J. P. Goff, M. E. Kehrli Jr. and J. A. Harp. 1999a. Phenotype Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Periparturient Dairy Cows. **J. Dairy Sci.** 82: 315-319.
- Kimura, K., J. P. Goff and M. E. Kehrli Jr. 1999b. Effects of the Presence of the Mammary Gland on Expression of Neutrophil Adhesion Molecules and Myeloperoxidase Activity in Periparturient Dairy Cows. **J. Dairy Sci.** 82: 2385-2392.
- Kimura, K., J. P. Goff, M. E. Kehrli Jr., J. A. Harp and B. J. Nonnecke. 2002a. Effect of Mastectomy in Composition of Peripheral Blood Mononuclear Cell Populations in Periparturient Dairy Cows. **J. Dairy Sci.** 85: 1437-1444.

- Kimura, K., J. P. Goff, M. E. Kehrli and T. A. Reinhardt. 2002b. Decreased Neutrophil Function as a Cause of Retained Placenta in Dairy Cattle. **J. Dairy Sci.** 85: 544-550.
- Klinkon, M. and T. Zadnik. 1999. Dynamics of red and white blood picture in dairy cows during the periparturient period. **Comp. Hematol. Int.** 9: 156-161.
- Kloucek, P., Z. Polesny, B. Svobodova, E. Vikova and L. Kokoska. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. **J. Ethanopharmacol.** 99: 309-312.
- Kuroiwa, A., S. Liou. H. Yan, A. Eshita., S. Naitoh and A. Nagayama. 2004. Effect of a traditional Japanese herbal medicine, Hochu-ekki-to (Bu-Zhong-Yi-Qi Tang), on immunity in elderly persons. **Int. Immunopharmacol.** 4: 317-324.
- Lanthers, M. C., J. Flerentin, P. Dorfman, F. Moetier and M. Pelt. 1991. Anagesic, antipyretic and anti-inflammatory properties of *Euphorbia hirta*. **Planta med.** 57: 225-231.
- Le Jan, C. 1996. Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: A review. **Vet. Res.** 27: 403-407.
- Levett, P. N., 2001. Leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.** 14: 296-326.
- Lin, S. J., C. S. Chen, S. S. Lin, M. Y. Chou, H. C. Shih, I. P. Lee, C. T. Kao, C. C. Ho, F. L. Chen, Y. C. Ho, K. H. Hsieh, C. R. Huang and C. C. Yang. 2006. In vitro anti-microbial and in vivo cytokine modulating effects of different prepared Chinese herbal medicines. **Food Chem. Toxicol.** 44: 2078-2085.
- Manson, F. J. and J. D. Leaver. 1988a. The influence of concentrate amount on locomotion and clinical lameness in dairy cattle. **Anim. Prod.** 47: 185-190.

- Manson, F. J. and J. D. Leaver. 1988b. The influence of dietary protein intake and of hoof trimming on lameness in dairy cattle. **Anim. Prod.** 47: 191-199.
- Mazumder, A., A. Mahalo and R. Mazumder. 2006. Antimicrobial potentiality of *Phyllanthus amarus* against drug resistant pathogens. **Nat. Prod. Res.** 20: 323-326.
- McBride, A. J.A., D. A. Athanazio, M. G. Reis and A. I. Ko. 2005. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 18: 376-386.
- Meglia, G. E., A. Johannisson, S. Agenas, K. Holtenius and K. Persson Waller. 2005. Effects of feeding intensity during the dry period on leukocyte and lymphocyte sub-populations, neutrophil function and health in peripartureint dairy cows. **Vet. J.** 169: 376-384.
- Meyer, D. J. and J. W. Harvey. 2004. **Veterinary Labolatory Medicine**. 3 ed. Saunder, Philadelphia, USA.
- Mims, C., H. M. Dockrell, R. V. Goering, I. Rott, D. Wakelin and M. Zuckerman. 2004. **Medical Microbiology**. 3 ed. Mosby, Edinburgh.
- Mishra, S., U. Narain, R. Mishra and K. Misra. 2005. Design, development and synthesis of mixed bioconjugates of piperic acid-glycine, curcumin-glycine/alanine and curcumin-glycine-piperic acid and their antibacterial and antifungal properties. **Bioorg. Med. Chem.** 13: 1477-1486.
- Naiman, M. B., D. Alt, C. A. Bolin, R. Zuerner and C. Baldwin. 2001. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* Vaccine Induces Potent Th1 Immunity Comprising Responses by CD4 and gamma delta T Lymphocytes. **Infect. Immun.** 69: 7550-7558.

- Naaz, F., S. Javed and M. Z. Abdin. 2007. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. on aflatoxin B(1)-induced liver damage in mice. **J. Ethnopharmacol.**
- Nonnecke, B. J., K. Kimura, J. P. Goff and M. E. Kehrli. 2003. Effects of the Mammary Gland on Functional Capacities of Blood Mononuclear Leukocyte Populations from Periparturient Cows. **J. Dairy Sci.** 86: 2359-2368.
- Ooteman, M. C., A. R. Vago, M. C. Koury. 2005. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human Leptospirosis. **J. Microbiol. Methods.** 65: 247-257.
- Ostergaard, S. and J. T. Sorensen. 1998. A review of the feeding-health production complex in a dairy herd. **Prev. Vet. Med.** 36: 109-129.
- Owen, J. A., B. Iggo, F. J. Scandrett and C. P. Stewart. 1954. The determination of creatinine in plasma or serum, and in urine; a critical examination. **Biochem. J.** 58: 426-437.
- Ozaki, Y., N. Kawahara and M. Harada. 1991. Anti-inflammatory effect of *Zingiber cassumunar* Roxb. And its active principles. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).** 39: 2353-6.
- Panthong, A., D. Kanjanapothi, V. Niwatananum, P. Tuntiwachwuttikul and V. Reutrakul V. 1990. Antiinflammatory activity of compounds isolated from *Zingiber cassumunar*. **Planta Med.** 56: 60.
- Panyathanya, R., W. Ngamwathana, P. Chawalidthumrong, U. Permpipat, O. Leekakulthanit and C. Chantachaya. 1986. Study of acute and chronic toxicity of Plai (*Zingiber cassumunar* Roxb.) in rats. **Siriraj Hosp. Gaz.** 38: 413-416.

- Petro, S. L. U. and L.Engelmann. 2000. Serum procalcitonin and proinflammatory cytokines in patient with acute severe leptospirosis. **Scand. J. Infect. Dis.** 32: 104.
- Plaeger. 2003. Clinical Immunology and Traditional Herbal Medicines. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 10: 337-338.
- Popstad, E., H. J. Larsen and A. O. Refsdal. 1989. Immune function in dairy cows related to energy balance and metabolic status in early lactation. **Acta. Vet. Scand.** 30: 209-219.
- Radostits, O.M., D.C. Blood, and C.C. Gay. 1997. **Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats and Horses.** 8 ed. W.B. Saunders Comp. Ltd., Philadelphia, USA.
- Rakkwamsuk, T., T. A. M. Kruip and T. Wensing. 1999. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. **Vet. Q.** 21: 71-77.
- Rewinski, M. J. and T. J. Yang. 1994. Lactation stage-dependent changes in levels of tumor necrosis factor/cachectin in milk. **Am. J. Reprod. Immunol.** 31: 170-176.
- Rosenberger, G. 1979. **Clinical Examination of Cattle.** Pual Parey, Berlin, Germany.
- Scanziani, E., L. Crippa, A. M. Giusti, M. Luini, M. L. Paociarini, S. Taqliabue and E. Cavalletti. 1995. *Leptospira interrogans* serovar sejroe infection in a group of laboratory dogs. **Lab. Anim.** 29: 300-306.
- SCARG. Shanghai City Andrographis Research Group, 1976. A study on water-soluble andrographolide. **Newsletters of Chinese Herbal Med.** 3: 10-18.

- Senogles, D. R., C. C. Muscoplat and P. S. Paul. 1978. Ontogeny of circulating B lymphocytes in neonatal calves. **Res. Vet. Sci.** 25: 34- 36.
- Seymour, E. H., G. M. Jones and M. L. McGilliard. 1988. Presistance of Residues in Milk Following Antibiotic Treatment of Dairy Cattle. **J. Dairy Sci.** 71: 2292-2296.
- Shankar, T. N., N. V. Shantha, H. P. Ramesh, I. A. Murthy and V. S. Murthy. 1980. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*). Acute toxicity studies in rats, guinea pigs & monkeys. **Indian J. Exp. Biol.** 18: 73-75.
- Sharma, R. A., H. R. Mc Lelland and K. A. Hill. 2001. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral *Curcuma* extract in patients with colorectal cancer. **Clin. Cancer Res.** 7: 1894-1900.
- Sheeja, K. and G. Kuttan. 2006. Ameliorating effects of *Andrographis paniculata* extract against cyclophosphamide induced toxicity in mice. **Asian Pac. J. Cancer Prev.** 7: 609-614.
- Sheeja, K. and G. Kuttan. 2007. Modulation of natural killer cell activity, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity by andrographolide in normal and Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. **Integr. Cancer Ther.** 6: 66-73.
- Shpilberg, O., Y. Shaked, M. K. Maier, D. Samra and Y. Samra. 1990. Long term follow-up after leptospirosis. **South Med. J.** 83: 405-407.
- Singha, P.K., S. Roy and, S. Dey. 2003. Antimicrobial activity of *Andrographis paniculata*. **Fitoterapia.** 74: 692-4.
- Sittisomwong, N., J. Phengchata and S. Cheewapatana. 1989. Acute and chronic toxicity of *Andrographis paniculata* Nee. **Thai J. Pharm. Sci.** 14: 109-117.

- Sordillo, L. M., M. J. Redmond and M. Campos. 1991. Cytokine activity in bovine mammary gland secretions during the periparturient period. **Can. J. Vet. Res.** 55: 298-299.
- Soto, F. R. M., S. R. Pinheiro, F. H. Ito, Z. M. Morase, A. P. Goncales, S. S. de Azevedo, F. Bernardi, S. R. Camargo and S. A. Vasconcellos. 2007. Evaluation of colostral immunity in swine with commercial anti-leptospira polyvalent whole-bacteria vaccine. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 21.
- Stabel, J. R., J. P. Goff and K. Kimura. 2003. Effects of Supplemental Energy on Metabolic and Immune Measurements in Periparturient Dairy Cows with Johne's disease. **J. Dairy Sci.** 86: 3527-3535.
- Sudhakar, M., Ch.V. Rao, P. M. Rao, D. B. Raju and Y. Venkateswarlu. 2006. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. **Fitoterapia.** 77: 378-380.
- Suriyasathaporn, W., A. J. Daemen, E. N. Noordhuizen-Stassen, S. J. Dieleman, M. Nielen and Y. H. Schukken. 1999. Beta-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 68: 177-186.
- Tabuti, J. R. S., S. S. Dhillon and K. A. Lye. 2003. Ethnoveterinary medicines for cattle (*Bos indicus*) in Bulamogi county, Uganda: plant species and mode of use. **J. Ethnopharmacol.** 88: 279-286.
- Tajiki, H., and R. Salomao. 1996. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.** 23: 1177-1178.

- Targowski, S. P. and W. Klucinski. 1983. Reduction in mitogenic response of bovine lymphocytes by ketone bodies. **Am. J. Vet. Res.** 44: 828-830.
- Thiermann, A. B. 1983. Bovine Leptospirosis: Bacteriological versus serologic diagnosis of cows at slaughter. **Am. J. Vet. Res.** 44 : 2244-2245.
- Taussky, H. H. 1954. A microcolorimetric determination of cretine in urine by the Jaffe reaction. **J. Biol. Chem.** 208: 853-861.
- Thrall, M. A. 2004. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.** Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Tizzard, I. R. 2000. **Veterinary Immunology.** 6 ed WB Saunders, Philadelphia, USA.
- Vijaya, K., S. Ananthan and R. Nalini. 1995. Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (Camellia sinensis) and Euphorbia hirta on Shigella spp. a cell culture study. **J. Ethnopharmacol.** 49: 115-8.
- Vinetz, J.M. 2001. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 14: 527-538.
- Vernel-Pauillac, F., and F. Merien. 2006. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamster infected with a virulent variant of Leptospira interrogans. **Infect. Immun.** 74: 4172-4179.
- Wannissorn, B., S. Jarikasem, T. Siriwangchai and S. Thubthimthed. 2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia.** 76: 233-236.
- Watt, G., L. P. Padre, M. L. Tuazon, C. Calubaquib, E. Santiago, C. P. Ranoa and L.W. Laughlin. 1988. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. **Lancet.** 433.

- Wells, G. H. and Osbourne T. B. 1921. Anaphylaxis reactions with purified proteins from milk. **J. Infect. Dis.** 29: 200-216.
- Wentink, G. H., V. P. M. G. Rutten, T. S. G. A. M. van den Ingh, A. Hoek, K. E. Muller and Th. Wensing. 1997. Impaired specific immunoreactivity in cows with hepatic lipidosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 56: 77-83.
- Werts, C., R. I. Tapping, J. C. Mathison, T. H. Chuang, V. Kravchenko, I. Saint Girons, D. A. Haake, P. J. Godowski, F. Hayashi, A. Ozinsky, D. M. Underhill, C. J. Kirschning, H. Wagner, A. Aderem, P. S. Tobias and R. J. Ulevitch. 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activated cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat. Immunol.** 2: 346-52.
- Wessler S, P. Muenzner, T.F. Meyer and M. Naumann. 2005. The anti-inflammatory compound curcumin inhibits *Neisseria gonorrhoeae*-induced NF-kappa B signaling, release of pro-inflammatory cytokines/chemokines and attenuates adhesion in late infection. **Biol. Chem.** 286: 481-90.
- White, F. H., K. R. Sulzer and R. W. Engel. 1982. Isolations of *Leptospira interrogans* serovars hardjo, balcanica and pomona from cattle at slaughter. **Am. J. Vet. Res.** 43: 1172-1173.
- World Health Organization (WHO). 2003. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.** Malta.
- Wu, M. S., C. W. Yang, M. J. Pan, C. T. Chang and Y. C. Chen. 2004. Reduced renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ co-transporter activity and inhibited NKCC2 mRNA expression by *Leptospira shermani*: from bed-side to bench. **Nephrol. Dial. Transplant.** 19: 2472-9.

Xu, Y. A. Chen, S. Fry, R. A. Barrow, R. L. Marshall and T. K. S. Mukkar. 2007. Modulation of immune response in mice immunized with an inactivated *Salmonella* vaccine and gavaged with *Andrographis paniculata* extract or andrographolide. **Int. Immunopharmacol.** 7: 515-523.

Yang, C. W., C. C. Hung, M. S. Wu, Y. C. Tian, C. T. Chang, M. J. Pan, and A. Vandewalle 2006a. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. **Kidney Int.** 69: 785-7.

Yang, T., M. Jia, J. Meng, H. Wu and Q. Mei. 2006b. Immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Angelica sinensis*. **Int. J. Biol. Macromol.** 39: 179-184.

Younes-Ibrahim, M., Burth P., Faria M. V. 1995. Inhibition of Na, K-ATPase by and endotoxin extracted from *Leptospira interrogans*: a possible mechanism for the physiology of Leptospirosis. **C. R Acad. Sci. II.** 318:619-625.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ข้อมูลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ก1 อุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยของกลุ่มโคนม 2 กลุ่ม ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

สัปดาห์ที่	กลุ่ม	อุณหภูมิร่างกาย (°F) Mean ± SEM (n)
Before		102.2±0.2 (24)
(-5) – (-3)	No herb	101.7±0.2 (9)
	Herb	102.4±0.2 (9)
-2	No herb	102.2±0.3 (10)
	Herb	102.6±0.2 (14)
-1	No herb	102.7±0.3 (9)
	Herb	102.9±0.3 (11)
0	No herb	102.7±0.4 (6)
	Herb	102.7±0.2 (7)
1	No herb	102.6±0.5 (7)
	Herb	103.6±0.3 (10)
2	No herb	101.7±0.4 (8)
	Herb	103.1±0.4 (10)
4	No herb	101.6±0.2 (8)
	Herb	102.1±0.2 (13)

หมายเหตุ ระยะ before คือ ก่อนการทดลอง ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด ระยะ 0 คือ วันที่คลอด ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

ตารางผนวกที่ ก2 จำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit) ค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) ของกลุ่มโคนม ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

สัปดาห์ที่	กลุ่ม	Mean $\pm$ SEM (n)		
		RBC (10^9 cell/ml)	hematocrit (%)	hemoglobin (mg/dl)
Before		6.3 $\pm$ 0.1 (24)	28.3 $\pm$ 0.5 (24)	8.8 $\pm$ 0.2 (24)
(-5) – (-3)	No herb	6.2 $\pm$ 0.2 (9)	28.6 $\pm$ 1.1 (9)	8.7 $\pm$ 0.3 (9)
	Herb	6.4 $\pm$ 0.2 (12)	28.2 $\pm$ 1.0 (12)	8.9 $\pm$ 0.4 (12)
-2	No herb	6.3 $\pm$ 0.2 (11)	28.5 $\pm$ 1.2 (11)	8.9 $\pm$ 0.3 (11)
	Herb	6.3 $\pm$ 0.2 (14)	28.3 $\pm$ 0.9 (14)	8.8 $\pm$ 0.3 (14)
-1	No herb	6.3 $\pm$ 0.1 (11)	29.1 $\pm$ 0.7 (11)	8.8 $\pm$ 0.3 (11)
	Herb	6.4 $\pm$ 0.2 (12)	28.9 $\pm$ 1.0 (12)	8.7 $\pm$ 0.3 (12)
0	No herb	6.0 $\pm$ 0.1 (7)	27.6 $\pm$ 0.6 (7)	8.4 $\pm$ 0.3 (7)
	Herb	5.5 $\pm$ 0.3 (12)	29.2 $\pm$ 1.2 (12)	8.8 $\pm$ 0.4 (12)
1	No herb	5.8 $\pm$ 0.2 (9)	27.1 $\pm$ 0.9 (9)	8.0 $\pm$ 0.4 (9)
	Herb	6.0 $\pm$ 0.3 (13)	27.0 $\pm$ 1.1 (13)	7.8 $\pm$ 0.4 (13)
2	No herb	5.4 $\pm$ 0.2 (9)	28.7 $\pm$ 0.8 (9)	7.3 $\pm$ 0.4 (9)
	Herb	6.0 $\pm$ 0.3 (13)	26.4 $\pm$ 1.0 (13)	7.9 $\pm$ 0.3 (13)
4	No herb	5.4 $\pm$ 0.1 (9)	23.8 $\pm$ 0.5 (9)	7.2 $\pm$ 0.3 (9)
	Herb	5.8 $\pm$ 0.3 (13)	24.9 $\pm$ 0.8 (13)	7.2 $\pm$ 0.3 (13)

หมายเหตุ ระยะ before คือ ก่อนการทดลอง ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด ระยะ 0 คือ วันที่คลอด ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

ตารางผนวกที่ ก3 จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) เม็ดเลือด neutrophil เม็ดเลือด lymphocyte เม็ดเลือด monocyte และ เม็ดเลือด eosinophil ของกลุ่มโคนม ในระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

สัปดาห์ที่	กลุ่ม	Mean $\pm$ SEM (n)				
		WBC (10 ⁶ cell/ml)	neutrophil (10 ⁶ cell/ml)	Lymphocyte (10 ⁶ cell/ml)	Monocyte (10 ⁶ cell/ml)	Eosinophil (10 ⁶ cell/ml)
Before		10.3 $\pm$ 0.8 (24)	3.2 $\pm$ 0.3 (24)	5.7 $\pm$ 0.8 (24)	0.7 $\pm$ 0.2 (24)	0.9 $\pm$ 0.1 (24)
(-5) – (-3)	No herb	8.9 $\pm$ 0.6 (9)	3.4 $\pm$ 0.5 (9)	4.3 $\pm$ 0.6 (9)	0.5 $\pm$ 0.1 (9)	0.7 $\pm$ 0.1 (9)
	Herb	12.1 $\pm$ 1.9 (12)	35.0 $\pm$ 0.4 (12)	7.8 $\pm$ 1.3 (12)	1.0 $\pm$ 0.3 (12)	0.8 $\pm$ 0.2 (12)
-2	No herb	9.1 $\pm$ 0.5 (11)	3.9 $\pm$ 0.4 (11)	4.2 $\pm$ 0.5 (11)	0.6 $\pm$ 0.1 (11)	0.6 $\pm$ 0.1 (11)
	Herb	12.4 $\pm$ 1.8 (14)	3.5 $\pm$ 0.3 (14)	7.6 $\pm$ 1.7 (14)	0.7 $\pm$ 0.2 (14)	0.7 $\pm$ 0.1 (14)
-1	No herb	9.7 $\pm$ 0.8 (11)	4.9 $\pm$ 0.8 (11)	3.8 $\pm$ 0.4 (11)	0.6 $\pm$ 0.1 (11)	0.5 $\pm$ 0.1 (11)
	Herb	11.1 $\pm$ 0.9 (12)	4.8 $\pm$ 0.6 (12)	4.6 $\pm$ 0.6 (12)	1.0 $\pm$ 0.2 (12)	0.4 $\pm$ 0.1 (12)
0	No herb	10.9 $\pm$ 0.8 (7)	6.8 $\pm$ 1.1 (7)	3.2 $\pm$ 0.5 (7)	0.6 $\pm$ 0.1 (7)	0.4 $\pm$ 0.1 (7)
	Herb	13.4 $\pm$ 1.5 (12)	6.9 $\pm$ 1.1 (12)	5.0 $\pm$ 0.8 (12)	1.2 $\pm$ 0.3 (12)	0.2 $\pm$ 0.1 (12)
1	No herb	9.1 $\pm$ 0.7 (9)	4.5 $\pm$ 0.5 (9)	3.7 $\pm$ 0.6 (9)	0.6 $\pm$ 0.1 (9)	0.4 $\pm$ 0.1 (9)
	Herb	12.1 $\pm$ 0.2 (13)	5.3 $\pm$ 1.3 (13)	5.2 $\pm$ 0.9 (13)	1.3 $\pm$ 0.4 (13)	0.2 $\pm$ 0.1 (13)
2	No herb	8.6 $\pm$ 0.8 (9)	4.3 $\pm$ 0.9 (9)	3.7 $\pm$ 0.6 (9)	0.6 $\pm$ 0.2 (9)	0.2 $\pm$ 0.1 (9)
	Herb	10.9 $\pm$ 1.6 (13)	2.7 $\pm$ 0.3 (13)	7.4 $\pm$ 1.5 (13)	0.5 $\pm$ 0.1 (13)	0.3 $\pm$ 0.1 (13)
4	No herb	7.9 $\pm$ 0.9 (9)	3.4 $\pm$ 0.8 (9)	3.7 $\pm$ 0.5 (9)	0.5 $\pm$ 0.1 (9)	0.3 $\pm$ 0.1 (9)
	Herb	11.7 $\pm$ 1.6 (13)	3.4 $\pm$ 0.4 (13)	6.5 $\pm$ 1.4 (13)	0.9 $\pm$ 0.2 (13)	0.8 $\pm$ 0.2 (13)

หมายเหตุ ระยะ before คือ ก่อนการทดลอง ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ ก่อนคลอด ระยะ 0 คือ วันที่คลอด ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

ตารางผนวกที่ ก4 จำนวนเกล็ดเลือด และ โปรตีนในพลาสมาของกลุ่มโคนมในระยะก่อนคลอด
คลอด และหลังคลอด

สัปดาห์ที่	กลุ่ม	Mean $\pm$ SEM (n)	
		เกล็ดเลือด (10^5 cell/ul)	พลาสมาโปรตีน (mg%)
Before		2.9 $\pm$ 0.2 (24)	7.3 $\pm$ 0.1 (24)
(-5) – (-3)	No herb	2.7 $\pm$ 0.4 (9)	7.2 $\pm$ 0.6 (9)
	Herb	2.8 $\pm$ 0.2 (12)	7.1 $\pm$ 0.2 (12)
-2	No herb	2.1 $\pm$ 0.2 (11)	6.9 $\pm$ 0.2 (11)
	Herb	2.9 $\pm$ 0.2 (14)	7.0 $\pm$ 0.1 (14)
-1	No herb	2.5 $\pm$ 0.2 (11)	6.7 $\pm$ 0.2 (11)
	Herb	3.2 $\pm$ 0.3 (12)	6.9 $\pm$ 0.2 (12)
0	No herb	3.1 $\pm$ 0.2 (7)	6.2 $\pm$ 0.3 (7)
	Herb	3.2 $\pm$ 0.3 (12)	6.7 $\pm$ 0.1 (12)
1	No herb	3.9 $\pm$ 0.5 (9)	7.0 $\pm$ 0.2 (9)
	Herb	3.6 $\pm$ 0.2 (13)	7.1 $\pm$ 0.2 (13)
2	No herb	3.4 $\pm$ 0.4 (9)	7.0 $\pm$ 0.2 (9)
	Herb	3.7 $\pm$ 0.2 (13)	6.9 $\pm$ 0.2 (13)
4	No herb	3.3 $\pm$ 0.5 (9)	7.6 $\pm$ 0.3 (9)
	Herb	4.0 $\pm$ 0.3 (13)	7.3 $\pm$ 0.1 (13)

หมายเหตุ ระยะ before คือ ก่อนการทดลอง ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์
ก่อนคลอด ระยะ 0 คือ วันที่คลอดระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

ตารางผนวกที่ ก5 ความเป็นกรดต่างของปัสสาวะ (pH) creatinine และ BUN ของกลุ่มโคนมใน
ระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

สัปดาห์ที่	กลุ่ม	Mean $\pm$ SEM (n)		
		pH	creatinine (mg/dl)	BUN (mg/dl)
Before		8.5 $\pm$ 0.1 (24)	1.4 $\pm$ 0.0 (24)	16.4 $\pm$ 1.2 (24)
(-5) – (-3)	No herb	8.3 $\pm$ 0.2 (9)	1.4 $\pm$ 0.0 (9)	13.0 $\pm$ 1.4 (9)
	Herb	8.5 $\pm$ 0.1 (12)	1.3 $\pm$ 0.0 (12)	16.7 $\pm$ 1.6 (12)
-2	No herb	8.5 $\pm$ 0.2 (11)	1.3 $\pm$ 0.1 (11)	15.6 $\pm$ 1.6 (11)
	Herb	8.2 $\pm$ 0.3 (14)	1.4 $\pm$ 0.1 (14)	17.5 $\pm$ 1.0 (14)
-1	No herb	8.3 $\pm$ 0.2 (10)	1.3 $\pm$ 0.1 (11)	18.8 $\pm$ 1.6 (11)
	Herb	8.2 $\pm$ 0.2 (12)	1.4 $\pm$ 0.1 (12)	18.0 $\pm$ 1.7 (12)
0	No herb	7.6 $\pm$ 0.4 (6)	1.2 $\pm$ 0.1 (7)	20.4 $\pm$ 1.4 (7)
	Herb	8.0 $\pm$ 0.2 (11)	1.4 $\pm$ 0.1 (12)	16.8 $\pm$ 0.9 (12)
1	No herb	8.1 $\pm$ 0.4 (8)	1.2 $\pm$ 0.1 (9)	19.3 $\pm$ 2.4 (9)
	Herb	7.6 $\pm$ 0.3 (13)	1.2 $\pm$ 0.1 (13)	15.8 $\pm$ 1.5 (13)
2	No herb	7.8 $\pm$ 0.4 (9)	1.0 $\pm$ 0.1 (9)	18.7 $\pm$ 2.3 (9)
	Herb	8.2 $\pm$ 0.3 (13)	1.1 $\pm$ 0.1 (13)	14.9 $\pm$ 1.9 (13)
4	No herb	7.9 $\pm$ 0.2 (9)	0.9 $\pm$ 0.8 (9)	20.0 $\pm$ 2.1 (9)
	Herb	8.2 $\pm$ 0.2 (13)	1.1 $\pm$ 0.1 (13)	20.1 $\pm$ 1.4 (13)

หมายเหตุ ระยะ before คือ ก่อนการทดลอง ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์
ก่อนคลอด ระยะ 0 คือ วันที่คลอด ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

ตารางผนวกที่ 6 ระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ของกลุ่มโคนมในระยะก่อนคลอด
คลอด และหลังคลอด

สัปดาห์ที่	กลุ่ม	Mean $\pm$ SEM (n)	
		IFN- γ (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Before		24.5 $\pm$ 6.6 (21)	127.9 $\pm$ 38.0 (21)
(-5) – (-3)	No herb	20.1 $\pm$ 8.5 (7)	5.4 $\pm$ 4.0 (7)
	Herb	14.0 $\pm$ 7.5 (11)	129.9 $\pm$ 41.4 (11)
-2	No herb	21.4 $\pm$ 9.0 (9)	91.6 $\pm$ 32.5 (9)
	Herb	6.2 $\pm$ 2.4 (13)	172.5 $\pm$ 57.7 (13)
-1	No herb	8.3 $\pm$ 4.2 (9)	111.0 $\pm$ 55.0 (9)
	Herb	3.1 $\pm$ 1.1 (11)	200.4 $\pm$ 97.8 (11)
0	No herb	32.7 $\pm$ 24.4 (5)	161.5 $\pm$ 47.6 (5)
	Herb	2.0 $\pm$ 1.4 (10)	54.4 $\pm$ 36.1 (10)
1	No herb	33.9 $\pm$ 19.9 (7)	126.6 $\pm$ 49.4 (7)
	Herb	2.9 $\pm$ 1.5 (12)	208.0 $\pm$ 138.0 (12)
2	No herb	30.6 $\pm$ 20.7 (7)	54.2 $\pm$ 30.5 (7)
	Herb	2.0 $\pm$ 1.1 (12)	132.6 $\pm$ 57.7 (12)
4	No herb	25.0 $\pm$ 14.1 (7)	52.3 $\pm$ 20.4 (7)
	Herb	4.3 $\pm$ 2.4 (12)	119.1 $\pm$ 51.6 (12)

หมายเหตุ ระยะ before คือ ก่อนการทดลอง ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์
ก่อนคลอด ระยะ 0 คือ วันที่คลอด ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด

ตารางผนวกที่ 7 อุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยของกลุ่มโคนม 4 กลุ่ม ในช่วงระยะก่อนคลอด
คลอด และหลังคลอด

สัปดาห์ที่	กลุ่ม	อุณหภูมิร่างกาย (°F) Mean ± SEM (n)
Before		102.2±0.2 (24)
(-5) – (-3)	NH-SCH-	101.7±0.3 (2)
	NH-SCH+	101.7±0.2 (7)
	H -SCH+	102.2±0.1 (3)
	H -SCH-	102.6±0.3 (6)
-2	NH-SCH-	101.8±0.4 (3)
	NH-SCH+	102.3±0.5 (7)
	H -SCH+	102.3±0.1 (7)
	H -SCH-	102.9±0.3 (7)
-1	NH-SCH-	102.1±0.3 (2)
	NH-SCH+	102.9±0.4 (7)
	H -SCH+	102.8±0.3 (7)
	H -SCH-	103.0±0.7 (4)
0	NH-SCH-	102.7±0.5 (3)
	NH-SCH+	102.7±0.7 (3)
	H -SCH+	102.7±0.5 (2)
	H -SCH-	102.8±0.2 (5)
1	NH-SCH-	105.2±0.0 (1)
	NH-SCH+	102.2±0.4 (6)
	H -SCH+	103.3±0.4 (5)
	H -SCH-	103.9±0.3 (5)
2	NH-SCH-	102.5±0.7 (3)
	NH-SCH+	101.2±0.4 (5)
	H -SCH+	102.8±0.5 (6)
	H -SCH-	103.6±0.7 (4)
4	NH-SCH-	101.3±0.1 (2)
	NH-SCH+	101.7±0.3 (6)
	H -SCH+	102.0±0.3 (7)
	H -SCH-	102.2±0.5 (6)

หมายเหตุ ระยะ before คือ ก่อนการทดลอง ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด
ระยะ 0 คือ วันที่คลอด ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด NH-SCH- คือ กลุ่มโคที่ไม่
เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับสมุนไพรทดลอง NH-SCH+ คือ กลุ่มโคที่เป็น
แหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับสมุนไพรทดลอง H-SCH+ กลุ่มโคที่เป็นแหล่งรัง
โรคของเชื้อเลปโตสไปราและได้รับสมุนไพรทดลอง H-SCH- คือ กลุ่มโคที่ไม่เป็นแหล่งรังโรคของ
เชื้อเลปโตสไปราและได้รับสมุนไพรทดลอง

ตารางผนวกที่ ๘ จำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit) ค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) ของกลุ่มโคนม 4 กลุ่ม ในช่วงระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

สัปดาห์ที่	กลุ่ม	Mean $\pm$ SEM (n)		
		RBC (10^9 cell/ml)	hematocrit (%)	hemoglobin (mg/dl)
Before		6.3 $\pm$ 0.1 (24)	28.3 $\pm$ 0.5 (24)	8.8 $\pm$ 0.2 (24)
(-5) – (-3)	NH-SCH-	6.1 $\pm$ 0.5 (2)	29.9 $\pm$ 2.2 (2)	8.7 $\pm$ 0.6 (2)
	NH-SCH+	6.2 $\pm$ 0.2 (7)	28.3 $\pm$ 1.3 (7)	8.7 $\pm$ 0.4 (7)
	H -SCH+	6.5 $\pm$ 0.2 (6)	89.5 $\pm$ 0.3 (6)	9.2 $\pm$ 0.3 (6)
	H -SCH-	6.3 $\pm$ 0.3 (6)	26.9 $\pm$ 1.9 (6)	8.5 $\pm$ 0.7 (6)
-2	NH-SCH-	6.3 $\pm$ 0.5 (3)	29.3 $\pm$ 1.6 (3)	8.9 $\pm$ 0.8 (3)
	NH-SCH+	6.3 $\pm$ 0.2 (8)	28.3 $\pm$ 1.5 (8)	8.9 $\pm$ 0.4 (8)
	H -SCH+	6.3 $\pm$ 0.3 (7)	29.2 $\pm$ 1.2 (7)	9.0 $\pm$ 0.4 (7)
	H -SCH-	6.3 $\pm$ 0.3 (7)	27.3 $\pm$ 1.2 (7)	8.5 $\pm$ 0.6 (7)
-1	NH-SCH-	6.5 $\pm$ 0.4 (3)	30.2 $\pm$ 0.6 (3)	9.1 $\pm$ 0.8 (3)
	NH-SCH+	6.2 $\pm$ 0.1 (8)	28.8 $\pm$ 0.9 (8)	8.6 $\pm$ 0.3 (8)
	H -SCH+	6.5 $\pm$ 0.3 (7)	29.7 $\pm$ 1.5 (7)	8.9 $\pm$ 0.4 (7)
	H -SCH-	6.3 $\pm$ 0.3 (5)	27.7 $\pm$ 1.1 (5)	8.4 $\pm$ 0.6 (5)
0	NH-SCH-	6.2 $\pm$ 0.2 (3)	28.4 $\pm$ 0.9 (3)	8.7 $\pm$ 0.5 (3)
	NH-SCH+	6.0 $\pm$ 0.2 (4)	27.0 $\pm$ 0.8 (4)	8.1 $\pm$ 0.3 (4)
	H -SCH+	6.5 $\pm$ 0.3 (6)	29.8 $\pm$ 1.4 (6)	7.9 $\pm$ 0.7 (6)
	H -SCH-	6.6 $\pm$ 0.6 (6)	28.7 $\pm$ 2.0 (6)	5.7 $\pm$ 0.7 (6)
1	NH-SCH-	6.0 $\pm$ 0.3 (3)	27.6 $\pm$ 1.1 (3)	8.3 $\pm$ 0.6 (3)
	NH-SCH+	5.7 $\pm$ 0.2 (6)	26.9 $\pm$ 1.3 (6)	7.9 $\pm$ 0.6 (6)
	H -SCH+	5.8 $\pm$ 0.4 (6)	27.7 $\pm$ 1.9 (6)	7.9 $\pm$ 0.7 (6)
	H -SCH-	6.2 $\pm$ 0.5 (7)	26.3 $\pm$ 1.4 (7)	7.7 $\pm$ 0.5 (7)
2	NH-SCH-	5.2 $\pm$ 0.5 (3)	24.3 $\pm$ 1.9 (3)	7.3 $\pm$ 0.8 (3)
	NH-SCH+	5.4 $\pm$ 0.1 (6)	24.9 $\pm$ 0.9 (6)	7.3 $\pm$ 0.4 (6)
	H -SCH+	5.9 $\pm$ 0.4 (7)	27.4 $\pm$ 1.7 (7)	8.1 $\pm$ 0.6 (7)
	H -SCH-	6.0 $\pm$ 0.4 (6)	25.2 $\pm$ 0.9 (6)	7.7 $\pm$ 0.4 (6)
4	NH-SCH-	5.6 $\pm$ 0.1 (3)	24.8 $\pm$ 0.5 (3)	7.2 $\pm$ 0.1 (3)
	NH-SCH+	5.3 $\pm$ 0.2 (6)	23.3 $\pm$ 1.2 (6)	7.1 $\pm$ 0.4 (6)
	H -SCH+	5.7 $\pm$ 0.3 (7)	25.4 $\pm$ 1.2 (7)	7.2 $\pm$ 0.5 (7)
	H -SCH-	5.8 $\pm$ 0.4 (6)	24.2 $\pm$ 0.8 (6)	7.1 $\pm$ 0.3 (6)

หมายเหตุ ระยะ before คือ ก่อนการทดลอง ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด
 ระยะ 0 คือ วันที่คลอด ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด NH-SCH- คือ กลุ่มโคที่ไม่
 เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง NH-SCH+ คือ กลุ่มโค
 ที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง H-SCH+ กลุ่มโค
 ที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง H-SCH- คือ กลุ่มโคที่
 ไม่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง

ตารางผนวกที่ 9 จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) เม็ดเลือด neutrophil เม็ดเลือด lymphocyte เม็ดเลือด monocyte และ เม็ดเลือด eosinophil ของกลุ่ม โคนม4 กลุ่ม ในช่วงระยะก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

สัปดาห์ที่	กลุ่ม	Mean $\pm$ SEM (n)				
		WBC (10^6 cell/ml)	neutrophil (10^6 cell/ml)	Lymphocyte (10^6 cell/ml)	Monocyte (10^6 cell/ml)	Eosinophil (10^6 cell/ml)
Before		10.3 $\pm$ 0.8(24)	3.2 $\pm$ 0.3 (24)	5.7 $\pm$ 0.8 (24)	0.7 $\pm$ 0.2(24)	0.9 $\pm$ 0.1 (24)
(-5) – (-3)	NH-SCH-	9.1 $\pm$ 0.2 (2)	3.5 $\pm$ 0.5 (2)	4.4 $\pm$ 0.7 (2)	0.5 $\pm$ 0.1 (2)	0.7 $\pm$ 0.1 (2)
	NH-SCH+	8.9 $\pm$ 0.8 (7)	3.4 $\pm$ 0.6 (7)	4.3 $\pm$ 0.7 (7)	0.5 $\pm$ 0.1 (7)	0.6 $\pm$ 0.2 (7)
	H -SCH+	9.2 $\pm$ 1.2 (6)	2.6 $\pm$ 0.2 (6)	6.2 $\pm$ 1.4 (6)	0.7 $\pm$ 0.0 (6)	0.7 $\pm$ 0.1 (6)
	H -SCH-	15.0 $\pm$ 3.3 (6)	3.4 $\pm$ 0.7 (6)	9.3 $\pm$ 2.3 (6)	1.3 $\pm$ 0.5 (6)	0.9 $\pm$ 0.3 (6)
-2	NH-SCH-	9.5 $\pm$ 0.9 (3)	4.2 $\pm$ 0.9 (3)	4.4 $\pm$ 0.7 (3)	0.5 $\pm$ 0.2 (3)	0.4 $\pm$ 0.1 (3)
	NH-SCH+	9.0 $\pm$ 0.6 (8)	3.8 $\pm$ 0.5 (8)	4.1 $\pm$ 0.6 (8)	0.7 $\pm$ 0.2 (8)	0.6 $\pm$ 0.1 (8)
	H -SCH+	10.2 $\pm$ 1.1 (7)	3.4 $\pm$ 0.5 (7)	5.4 $\pm$ 1.0 (7)	0.8 $\pm$ 0.3 (7)	0.6 $\pm$ 0.1 (7)
	H -SCH-	14.5 $\pm$ 3.4 (7)	3.5 $\pm$ 0.3 (7)	9.8 $\pm$ 3.2 (7)	0.6 $\pm$ 0.2 (7)	0.8 $\pm$ 0.2 (7)
-1	NH-SCH-	10.3 $\pm$ 0.7 (3)	4.7 $\pm$ 0.8 (3)	4.3 $\pm$ 0.6 (3)	0.6 $\pm$ 0.2 (3)	0.6 $\pm$ 0.2 (3)
	NH-SCH+	9.5 $\pm$ 1.1 (8)	4.9 $\pm$ 1.1 (8)	3.6 $\pm$ 0.5 (8)	0.6 $\pm$ 0.2 (8)	0.5 $\pm$ 0.1 (8)
	H -SCH+	11.5 $\pm$ 1.2 (7)	4.6 $\pm$ 0.9 (7)	5.2 $\pm$ 0.7 (7)	1.1 $\pm$ 0.2 (7)	0.2 $\pm$ 0.1 (7)
	H -SCH-	10.4 $\pm$ 1.3 (5)	3.5 $\pm$ 0.3 (5)	3.8 $\pm$ 1.0 (5)	0.7 $\pm$ 0.2 (5)	0.6 $\pm$ 0.3 (5)
0	NH-SCH-	11.4 $\pm$ 1.1 (3)	6.8 $\pm$ 2.1 (3)	3.6 $\pm$ 1.0 (3)	0.7 $\pm$ 0.2 (3)	0.3 $\pm$ 0.1 (3)
	NH-SCH+	10.6 $\pm$ 1.2 (4)	6.7 $\pm$ 1.4 (4)	2.9 $\pm$ 0.6 (4)	0.6 $\pm$ 0.1 (4)	0.5 $\pm$ 0.2 (4)
	H -SCH+	11.3 $\pm$ 0.8 (6)	6.3 $\pm$ 1.3 (6)	3.8 $\pm$ 0.9 (6)	0.5 $\pm$ 0.1 (6)	0.3 $\pm$ 0.2 (6)
	H -SCH-	15.6 $\pm$ 2.6 (6)	7.5 $\pm$ 1.9 (6)	6.2 $\pm$ 1.3 (6)	1.8 $\pm$ 0.5 (6)	0.2 $\pm$ 0.1 (6)
1	NH-SCH-	10.5 $\pm$ 1.4 (3)	5.3 $\pm$ 1.5 (3)	4.2 $\pm$ 1.3 (3)	0.7 $\pm$ 0.3 (3)	0.4 $\pm$ 0.4 (3)
	NH-SCH+	8.4 $\pm$ 0.6 (6)	4.1 $\pm$ 0.2 (6)	3.5 $\pm$ 0.6 (6)	0.6 $\pm$ 0.1 (6)	0.4 $\pm$ 0.1 (6)
	H -SCH+	11.0 $\pm$ 2.9 (6)	5.5 $\pm$ 2.6 (6)	3.8 $\pm$ 0.6 (6)	1.3 $\pm$ 0.4 (6)	0.1 $\pm$ 0.0 (6)
	H -SCH-	13.1 $\pm$ 3.2 (7)	5.2 $\pm$ 1.3 (7)	6.3 $\pm$ 1.6 (7)	1.4 $\pm$ 0.6 (7)	0.2 $\pm$ 0.2 (7)
2	NH-SCH-	9.8 $\pm$ 2.0 (3)	5.9 $\pm$ 2.5 (3)	3.8 $\pm$ 1.3 (3)	0.6 $\pm$ 0.4 (3)	0.1 $\pm$ 0.1 (3)
	NH-SCH+	8.0 $\pm$ 0.8 (6)	3.5 $\pm$ 0.7 (6)	3.6 $\pm$ 0.7 (6)	0.6 $\pm$ 0.2 (6)	0.2 $\pm$ 0.1 (6)
	H -SCH+	8.9 $\pm$ 1.7 (7)	2.6 $\pm$ 0.5 (7)	5.5 $\pm$ 1.4 (7)	0.6 $\pm$ 0.2 (7)	0.2 $\pm$ 0.1 (7)
	H -SCH-	13.2 $\pm$ 2.7 (6)	2.7 $\pm$ 0.3 (6)	9.6 $\pm$ 2.7 (6)	0.4 $\pm$ 0.1 (6)	0.5 $\pm$ 0.1 (6)
4	NH-SCH-	11.0 $\pm$ 0.7 (3)	5.6 $\pm$ 1.6 (3)	4.4 $\pm$ 1.1 (3)	0.7 $\pm$ 0.2 (3)	0.3 $\pm$ 0.2 (3)
	NH-SCH+	6.3 $\pm$ 0.6 (6)	2.3 $\pm$ 0.4 (6)	3.3 $\pm$ 0.5 (6)	0.4 $\pm$ 0.1 (6)	0.4 $\pm$ 0.2 (6)
	H -SCH+	9.0 $\pm$ 1.2 (7)	3.4 $\pm$ 0.5 (7)	4.2 $\pm$ 0.8 (7)	0.7 $\pm$ 0.1 (7)	0.8 $\pm$ 0.3 (7)
	H -SCH-	14.9 $\pm$ 2.6 (6)	3.3 $\pm$ 0.6 (6)	9.1 $\pm$ 2.7 (6)	1.1 $\pm$ 0.4 (6)	0.8 $\pm$ 0.2 (6)

หมายเหตุ ระยะ before คือ ก่อนการทดลอง ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด
 ระยะ 0 คือ วันที่คลอด ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด NH-SCH- คือ กลุ่มโคที่ไม่
 เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง NH-SCH+ คือ กลุ่มโค
 ที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง H-SCH+ กลุ่มโค
 ที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง H-SCH- คือ กลุ่มโคที่
 ไม่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง

ตารางผนวกที่ ก10 จำนวนเกล็ดเลือด และ โปรตีนในพลาสมา ของกลุ่มโคนม4 กลุ่ม ในระยะ
ก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

สัปดาห์ที่	กลุ่ม	Mean $\pm$ SEM (n)	
		เกล็ดเลือด (10^5 cell/ul)	พลาสมาโปรตีน (mg%)
Before		2.9 $\pm$ 0.2 (24)	7.3 $\pm$ 0.1 (24)
(-5) – (-3)	NH-SCH-	3.6 $\pm$ 0.5 (2)	7.5 $\pm$ 0.5 (2)
	NH-SCH+	2.4 $\pm$ 0.4 (7)	7.1 $\pm$ 0.1 (7)
	H -SCH+	2.5 $\pm$ 0.1 (6)	7.1 $\pm$ 0.1 (6)
	H -SCH-	3.1 $\pm$ 0.4 (6)	7.2 $\pm$ 0.3 (6)
-2	NH-SCH-	2.2 $\pm$ 0.4 (3)	6.7 $\pm$ 0.7 (3)
	NH-SCH+	2.1 $\pm$ 0.3 (8)	6.9 $\pm$ 0.0 (8)
	H -SCH+	2.9 $\pm$ 0.2 (7)	6.9 $\pm$ 0.1 (7)
	H -SCH-	3.0 $\pm$ 0.3 (7)	7.2 $\pm$ 0.2 (7)
-1	NH-SCH-	2.8 $\pm$ 0.6 (3)	6.7 $\pm$ 0.7 (3)
	NH-SCH+	2.3 $\pm$ 0.2 (8)	6.7 $\pm$ 0.2 (8)
	H -SCH+	3.0 $\pm$ 0.6 (7)	6.9 $\pm$ 0.2 (7)
	H -SCH-	3.4 $\pm$ 0.3 (5)	6.9 $\pm$ 0.3 (5)
0	NH-SCH-	3.0 $\pm$ 0.4 (3)	6.4 $\pm$ 0.6 (3)
	NH-SCH+	3.2 $\pm$ 0.3 (4)	6.1 $\pm$ 0.4 (4)
	H -SCH+	2.9 $\pm$ 0.3 (6)	6.7 $\pm$ 0.2 (6)
	H -SCH-	3.6 $\pm$ 0.6 (6)	6.6 $\pm$ 0.2 (6)
1	NH-SCH-	4.0 $\pm$ 0.9 (3)	7.4 $\pm$ 0.5 (3)
	NH-SCH+	3.8 $\pm$ 0.6 (6)	6.8 $\pm$ 0.1 (6)
	H -SCH+	3.5 $\pm$ 0.3 (6)	7.1 $\pm$ 0.3 (6)
	H -SCH-	3.7 $\pm$ 0.3 (7)	7.1 $\pm$ 0.3 (7)
2	NH-SCH-	3.9 $\pm$ 0.7 (3)	7.4 $\pm$ 0.6 (3)
	NH-SCH+	3.2 $\pm$ 0.4 (6)	6.9 $\pm$ 0.1 (6)
	H -SCH+	3.7 $\pm$ 0.3 (7)	6.8 $\pm$ 0.4 (7)
	H -SCH-	3.7 $\pm$ 0.3 (6)	7.0 $\pm$ 0.1 (6)
4	NH-SCH-	4.3 $\pm$ 0.8 (3)	8.2 $\pm$ 1.0 (3)
	NH-SCH+	2.8 $\pm$ 0.5 (6)	7.3 $\pm$ 0.1 (6)
	H -SCH+	4.6 $\pm$ 0.5 (7)	7.4 $\pm$ 0.1 (7)
	H -SCH-	3.3 $\pm$ 0.4 (6)	7.3 $\pm$ 0.1 (6)

หมายเหตุ ระยะ before คือ ก่อนการทดลอง ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด
ระยะ 0 คือ วันที่คลอด ระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด NH-SCH-คือ กลุ่มโคที่ไม่เป็น
แหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง NH-SCH+ คือ กลุ่มโคที่เป็น
แหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง H-SCH+ กลุ่มโคที่เป็น
แหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง H-SCH- คือ กลุ่มโคที่ไม่เป็น
แหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง

ตารางผนวกที่ ก11 ระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α ของกลุ่มโคนม 4 กลุ่ม ในระยะ
ก่อนคลอด คลอด และหลังคลอด

สัปดาห์ที่	กลุ่ม	Mean $\pm$ SEM (n)	
		IFN- γ (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Before		24.5 $\pm$ 6.6 (21)	127.9 $\pm$ 38.0 (21)
(-5) – (-3)	NH-SCH-	14.4 $\pm$ 14.4 (2)	16.8 $\pm$ 12.1 (2)
	NH-SCH+	32.9 $\pm$ 14.0 (5)	0.8 $\pm$ 0.8 (5)
	H -SCH+	20.1 $\pm$ 16.2 (5)	131.3 $\pm$ 76.6 (5)
	H -SCH-	8.8 $\pm$ 4.2 (6)	128.7 $\pm$ 48.7 (6)
-2	NH-SCH-	38.9 $\pm$ 23.7 (3)	119.9 $\pm$ 31.2 (3)
	NH-SCH+	24.8 $\pm$ 13.3 (6)	77.4 $\pm$ 47.0 (6)
	H -SCH+	3.4 $\pm$ 2.5 (6)	195.0 $\pm$ 109.0 (6)
	H -SCH-	8.7 $\pm$ 3.8 (7)	153.3 $\pm$ 60.8 (7)
-1	NH-SCH-	1.9 $\pm$ 1.9 (3)	222.0 $\pm$ 203.0 (3)
	NH-SCH+	29.1 $\pm$ 19.2 (6)	73.9 $\pm$ 42.4 (6)
	H -SCH+	2.3 $\pm$ 1.7 (6)	244.0 $\pm$ 213.0 (6)
	H -SCH-	4.0 $\pm$ 1.6 (5)	132.4 $\pm$ 68.2 (5)
0	NH-SCH-	9.9 $\pm$ 9.9 (3)	171.1 $\pm$ 85.7 (3)
	NH-SCH+	55.4 $\pm$ 48.6 (2)	152.0 $\pm$ 62.4 (2)
	H -SCH+	0.0 $\pm$ 0.0 (5)	6.5 $\pm$ 3.5 (5)
	H -SCH-	4.1 $\pm$ 2.6 (6)	102.7 $\pm$ 68.6 (6)
1	NH-SCH-	36.7 $\pm$ 28.3 (3)	242.0 $\pm$ 53.0 (3)
	NH-SCH+	33.0 $\pm$ 26.2 (4)	88.1 $\pm$ 56.5 (4)
	H -SCH+	2.7 $\pm$ 2.7 (5)	390.0 $\pm$ 297.0 (5)
	H -SCH-	3.1 $\pm$ 2.0 (7)	56.6 $\pm$ 18.9 (7)
2	NH-SCH-	20.0 $\pm$ 14.7 (3)	77.2 $\pm$ 40.5 (3)
	NH-SCH+	35.8 $\pm$ 31.1 (4)	42.8 $\pm$ 42.8 (4)
	H -SCH+	1.4 $\pm$ 1.4 (6)	189.0 $\pm$ 110.0 (6)
	H -SCH-	2.7 $\pm$ 1.9 (6)	75.8 $\pm$ 35.4 (6)
4	NH-SCH-	14.5 $\pm$ 12.8 (3)	81.3 $\pm$ 26.6 (3)
	NH-SCH+	30.3 $\pm$ 20.7 (4)	37.7 $\pm$ 27.0 (4)
	H -SCH+	5.7 $\pm$ 4.2 (6)	152.6 $\pm$ 97.4 (6)
	H -SCH-	2.8 $\pm$ 2.8 (6)	85.6 $\pm$ 42.5 (6)

หมายเหตุ ระยะ before คือ ก่อนการทดลอง ระยะ -5 ถึง -3 -2 และ -1 คือ 5 ถึง 3 2 และ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด
ระยะ 0 คือ วันที่คลอดระยะ 1 2 และ 4 คือ 1 2 และ 4 สัปดาห์หลังคลอด NH-SCH-คือ กลุ่มโคที่ไม่
เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง NH-SCH+ คือ กลุ่มโค
ที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและไม่ได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง H-SCH+ กลุ่มโค
ที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง H-SCH- คือ กลุ่มโคที่
ไม่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราและได้รับตำรับพืชสมุนไพรทดลอง

ภาคผนวก ข
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1.1 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับงานเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ

กระบอกฉีดยา 20 ซีซี

เข็มฉีดยา เบอร์ 18 ยาว 1.5 นิ้ว

ถุงปลอดเชื้อ Stomacher bag

ถุงมือยางปลอดเชื้อ

หลอดเก็บเลือดสุญญากาศที่มีสารกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA

(Vacutainer EDTA[®], USA)

หลอดเก็บเลือดสุญญากาศชนิดมีสารกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด

(SST Gel & Clot activator vacutainer[®], USA)

สำลี

เอทิลแอลกอฮอล์ 70%

กระดิกเก็บความเย็น

1.2 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับงานเพาะเลี้ยงจุลชีพเลปโตสไปรา

หลอดทดลองขนาด 15 ซีซี

กระจกสไลด์และแผ่น Cover slip

อาหารเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปรา EMJH medium

น้ำยามาเชื้อ

1.3 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับงานปฏิกิริยาดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (พีซีอาร์)

Deoxynucleotidetriphosphate (dNTPs) mixture AR-C636-40UM[®] บริษัท Amresco
(USA)

Primers (synthesized by KU-VECTOR)

Taq polymerase บริษัท Invitrogen (USA)

PCR buffer

Ultrapure disfilled H₂O

Agarose powder บริษัท SIGMA (USA)

TrisAcetate EDTA (TAE) buffer

10X BlueJuice Gel Loading buffer บริษัท Invitrogen (USA)

SYBR[®] gold nucleic acid gel stain 1:10,000 final dilution บริษัท Molecular Probes (USA)

100 bp DNA ladder molecular weight บริษัท Invitrogen (USA)

1.4 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับงาน ตรวจวัดระดับเอนไซม์และความผิดปกติของเนื้อเยื่อไต

ชุดตรวจ BUN (หมายเลขผลิตภัณฑ์ GC.0302 บริษัท LIFE SCIENCE DYNAMICS OF ARNAPARN, Thailand)

ชุดตรวจ creatinine (หมายเลขผลิตภัณฑ์ GC.0502 บริษัท LIFE SCIENCE DYNAMICS OF ARNAPARN, Thailand)

กระดาษวัดกรด-ด่าง (pH-indicator strips) บริษัท Merck (Germany)

1.5 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับงาน ตรวจวัดระดับไซโตไคน์ IFN- γ และ TNF- α

ชุดตรวจ IFN- γ (Bovine IFN- γ Screening Set) บริษัท ENDOGEN (U.S.A)

ชุดตรวจ TNF- α (Bovine TNF- α Screening Set) บริษัท ENDOGEN (U.S.A)

96 wells ELISA plate บริษัท NUNC (Sweden)

1.6 เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ

เครื่องตรวจนับเม็ดเลือด รุ่น Abacus junior (U.S.A)

เครื่อง Refractometer (No.503 hand refractometer P.U.R. 1-12%) บริษัท Nippon optical work (Japan)

กล้องจุลทรรศน์ รุ่น BH-2 บริษัท Olympus (Japan)

เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น Kubota 6900 บริษัท Kubota Corporation (Japan)

เครื่องปั่นความเร็วสูงรุ่น H-103N บริษัท Kokusan Ensinki (Japan)

เครื่องปั่น Microcentrifuge รุ่น GMC-260 บริษัท LabTech

Vortex mixture รุ่น G560E genie-2 บริษัท Scientific Industries (U.S.A)

ปิเปตอัตโนมัติ รุ่น Pipetman (p20 p200 และ p1000) บริษัท Gilson (U.S.A)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น shimadzu UV-VIS บริษัท Shimadzu (Japan)

เครื่องชั่งละเอียด รุ่น B120S บริษัท Sartorius (Germany)

ตู้ Laminar flow สำหรับงานเพาะเลี้ยงเชื้อ รุ่น NU-425-300 บริษัท Nuair (U.S.A)

ตู้ Laminar flow สำหรับงานปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (พีซีอาร์) รุ่น SC1200 บริษัท

Astec (England)

อ่างต้มน้ำ (Boiling-sterilizer) บริษัท Applied Medic Limited partnership (Thailand)

Thermocycler รุ่น Biometra-UNOII (Germany)

Electrophoresis chamber กระบอก และหวี

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น PowerPac 200 บริษัท Biorad (U.S.A)

เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (Transilluminator) พร้อมกล้องดิจิทัลโคดัก EDAS 290 และโปรแกรม KODAK1-D Image Analysis Software®

เครื่องอ่าน ELISA และฟิลเตอร์ 450 นาโนเมตร

เครื่องเขย่าตั้งอุณหภูมิได้ (Incubator shaker) รุ่น IM550R บริษัท Clayson

ตู้ -20 องศาเซลเซียส รุ่น SHF320SAD บริษัท SANDEN intercool (Thailand)

ตู้ -40 องศาเซลเซียส รุ่น Chest Freezer 2857 บริษัท Climas (Spain)

2. วิธีการตรวจ

2.1 การวัดระดับซีรัม Tumor necrotic factor-alpha (TNF- α) โดยวิธี Enzyme Link Immunosorbant Assay (ELISA)

2.1.1 นำ TNF- α Coating Antibody หยอดลงใน plate แบบ 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปิด plate ด้วย sealing tape และตั้ง plate ไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.1.2 เท TNF- α Coating Antibody ที่

2.1.3 เตรียมตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจ และ ค่า TNF- α มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่ 500 250 125 62.5 46.875 31.25 และ 15.625 พิโคกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม ปิด plate พักไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

2.1.4 เทซีรัมและค่า TNF- α มาตรฐานทิ้ง และล้าง plate 3 ครั้งด้วย Wash buffer

2.1.5 นำ Detection Antibody หยอดลงใน plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปิด plate พักไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

2.1.6 เท Detection Antibody ที่ ล้าง plate 3 ครั้งด้วย Wash buffer

2.1.7 นำ Streptavidin -HRP หยอดลงใน plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปิด plate พักไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.1.8 เท Streptavidin -HRP ที่ ล้างด้วย Wash buffer 3 ครั้ง

2.1.9 นำ 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine (TMB) หยอดลงใน plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร พักไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในที่มืด

2.1.10 หยด 0.18 โมลาร์ Sulfuric Acid ลงแต่ละหลุมใน plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการเกิดสี

2.1.11 นำไปอ่านผลการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

2.1.12 นำค่า OD ของค่ามาตรฐาน มาสร้างกราฟระหว่างค่า OD กับ ความเข้มข้น (พิโคกรัม/มิลลิลิตร)

2.1.13 การแปลผลโดยนำค่า OD ที่วัดได้จากซีรัม มาเทียบกับกราฟเส้นมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น

2.2 การวัดระดับซีรัม Interferon-gamma (IFN- γ) โดยวิธี Enzyme Link Immunosorbant Assay (ELISA)

2.2.1 นำ IFN- γ Coating Antibody หยดลงใน plate แบบ 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปิด plate ด้วย sealing tape และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.2.2 เท IFN- γ Coating Antibody ทิ้ง

2.2.3 เตรียมตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจ และ ค่า IFN- γ มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น ที่ 400 200 100 75 50 25 และ 12.5 พิโคกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตรลงในหลุม ปิด plate พักไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

2.2.4 เทซีรัมและค่า IFN- γ มาตรฐานทิ้ง และล้าง plate 3 ครั้งด้วย Wash buffer

2.2.5 หยอด IFN- γ Detection Antibody ลงใน plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปิด plate พักไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

2.2.6 เท IFN- γ Detection Antibody ทิ้ง ล้าง plate 3 ครั้งด้วย Wash buffer

2.2.7 นำ Streptavidin -HRP หยดลงใน plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปิด plate พักไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.2.8 เท Streptavidin -HRP ทิ้ง ล้างด้วย Wash buffer 3 ครั้ง

2.2.9 นำ 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine (TMB) หยดลงใน plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร พักไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในที่มืด

2.2.10 หยด 0.18 โมลาร์ Sulfuric Acid ลง plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการเกิดสี

2.2.11 นำไปอ่านผลการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

2.2.12 นำค่า OD ของค่ามาตรฐาน มาสร้างกราฟระหว่างค่า OD กับ ความเข้มข้น (พิโคกรัม/มิลลิลิตร)

2.2.13 การแปลผลโดยนำค่า OD ที่วัดได้จากซีรัม มาเทียบกับกราฟเส้นมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น

2.3 การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

2.3.1 เตรียมตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ โดยนำปัสสาวะที่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อมาแล้ว 7 ถึง 10 วัน มาแยกใส่หลอด 1.5 ซีซี ปริมาณ 1.5 ซีซี วางในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยก โดยใช้เครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 15,100 รอบต่อนาที 15 นาที ควมคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อปั่นเสร็จ ดูดส่วนน้ำทิ้งให้หมด เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ที่อุณหภูมิ -20 ถึง -40 องศาเซลเซียส

2.3.2 นำส่วนตะกอนที่ได้จากข้อ 7.1.2.1 มาเติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร ต้มด้วยอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อต้มเสร็จจะได้ DNA template เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ถึง -40 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

2.3.3 วิธีการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) คำนวณปริมาณสารละลาย (premix) ที่เตรียมไว้ต่อ 1 ตัวอย่างจะเท่ากับ 28 ไมโครลิตร ส่วนประกอบของสารมีดังนี้

1 ปฏิกริยา

10X PCR buffer	3 ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	2.4 ไมโครลิตร
50 mM MgCl ₂	0.9 ไมโครลิตร
Primer GI	0.3 ไมโครลิตร
GII	0.3 ไมโครลิตร
BI	0.3 ไมโครลิตร
BII	0.3 ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.15 ไมโครลิตร
dH ₂ O	20.35 ไมโครลิตร

คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองจะอิงตาม Gravekamp และคณะ (1993) โดย ออกแบบจะใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ดังนี้

G1 5'-CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT-3'
 G2 5'-GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG-3'
 B64-I 5'-CTG AAT TCT CAT AAC TC-3'
 B64-II 5'-GAA GAA ATC TGG ACG ACG AT-3'

2.3.4 เตรียมตัวอย่าง DNA template 2 ไมโครลิตรลงในหลอดที่มีสารละลาย premix 28 ไมโครลิตร จะทำให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 30 ไมโครลิตร ผสมสารในหลอดให้เข้ากัน และปั่นในเครื่อง เซนตริฟิวจ์เพื่อให้สารละลายรวมที่กันหลอด

2.3.5 นำสารละลาย premix ที่ผสมแล้วเข้าเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้น ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยกำหนดเวลาและอุณหภูมิไว้ดังนี้

ขั้นที่ 1 จำนวน 3 cycles

Preheat ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที

ขั้นที่ 2 จำนวน 38 cycles

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ดีเอ็นเอที่ผลิตได้จะถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 20 นาที ก่อนจะเข้ากระบวนการ Electrophoresis

2.3.6 เตรียม agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.6% โดยใช้บัฟเฟอร์ เป็น 1% Tris-acetate buffer เป็นตัวทำละลาย อุ่นด้วยไมโครเวฟ เขย่าจนผง agarose gel ละลาย

2.3.7 ทิ้งให้ลดความร้อน แล้วเทลงในแม่พิมพ์ที่มีหัวอยู่ รอให้เย็นจนเจลแข็งตัว แกะหัวออกและแกะเจลออกจากแม่พิมพ์

2.3.8 นำเจลวางใน electrophoresis chamber ที่มี Tris Acetate Buffer อยู่จนท่วมเจล

2.3.9 นำ PCR product 15 ไมโครลิตรมาผสมกับ 10X BlueJuice Gel Loading buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 1 : 10,000 SYBR[®] gold ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้ดีโดยใช้ไมโครปิเปต ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำไปใส่ในแต่ละหลุมของเจล ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

2.3.10 ตั้งกระแสไฟฟ้า โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่ 100 มิลลิโวลต์ เป็นเวลา 50 นาที

2.3.11 เมื่อเสร็จให้ตรวจการเรืองแสงของ SYBR[®] gold แล้วถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิทัล โดยใช้โปรแกรม KODAK1-D Image Analysis Software[®]

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายนรสุทธิ์ บางภูมิ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 25 เมษายน 2524
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต (สพ.บ.) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2547
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นายสัตวแพทย์อิสระและนักวิจัย
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	--
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	1. ทุนโครงการวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2548 2. ทุนวิจัยวิทยานิพนธ์ บัณฑิตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปี 2548 3. ทุนมูลนิธิพระบรมราชานุสรณ์ พระบาทสมเด็จพระปกเกล้าเจ้าอยู่หัว และสมเด็จพระนางเจ้ารำไพพรรณี ประจำปี 2548