

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

- 1.1.1 Petri Dishes
- 1.1.2 Appendrof Tube
- 1.1.3 Conical Bottom Tube
- 1.1.4 96 Wells Plate
- 1.1.5 Erlenmeyer Flask
- 1.1.6 Beaker
- 1.1.7 Tip For Micropipettes
- 1.1.8 Triangle Spread Plate
- 1.1.9 Autopipett
- 1.1.10 Syringe
- 1.1.11 Cylinder
- 1.1.12 Aluminium Foil
- 1.1.13 Handle With Beaker
- 1.1.14 Loop For Streak Plate
- 1.1.15 Acrodise Syringe Filters
- 1.1.16 Spectrophotometer
- 1.1.17 Centrifuge
- 1.1.18 Refrigerated Centrifuge
- 1.1.19 Shaker
- 1.1.20 Incubator
- 1.1.21 Autoclave
- 1.1.22 Microplate Reader
- 1.1.23 สไลด์ และกระจกปิดสไลด์
- 1.1.24 ตู้แช่ HARRIS – 80 องศาเซลเซียส

- 1.1.25 เครื่องซังไฟฟ้าอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง
- 1.1.26 ตู้อบไฟฟ้า BINDER
- 1.1.27 กล้องจุลทรรศน์
- 1.1.28 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 1.1.29 บ่อปูนเลี้ยงเต่าขนาดความจุ้นน้ำทะเล 2 ตัน
- 1.1.30 กระบอกพร้อมเข็มฉีดยา
- 1.1.31 เครื่อง Automatic Tissue Processor
- 1.1.32 เครื่อง Microtome

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

- 1.2.1 Tryptic Soy Agar (คู่มือการเตรียมในภาคผนวก ก)
- 1.2.2 Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS)
- 1.2.3 0.01 PBS (คู่มือการเตรียมในภาคผนวก ก)
- 1.2.4 2% Saline
- 1.2.5 Cultrine Plus (Copper Sulfate)
- 1.2.6 Oxytetracyclin
- 1.2.7 Alcohol
- 1.2.8 Xylene
- 1.2.9 Paraffin
- 1.2.10 สี Hematoxylin และสี Eosin
- 1.2.11 น้ำยา Permount

2. วิธีการทดลอง

2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากเต่าตนุที่มีแผลเปื่อยจากการเลี้ยง

จำแนกชนิดตามหลักการทางจุลชีววิทยา คือ การเจริญบนอาหารและคุณสมบัติทางชีวเคมี และการตรวจความไวของยาชนิดต่าง ๆ ต่อเชื้อบนจานอาหารทดลอง

2.1.1 เต่าที่มีบาดแผลเปื่อย จะถูกแยกเชื้อจากแผลให้มีการเจริญบนอาหารทั่วไป TSA (Tryptic Soy Agar), MacConkey และอาหารพิเศษ TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Salt) ที่มีเกลือ 2% ทำการรายงานผลคือลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้น รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียหลังการย้อมสีแกรม

2.1.2 คุณสมบัติทางชีวเคมี จำแนกชนิดด้วยชีวเคมีพื้นฐานเช่น Cytochrome Oxidase, Motility, MR, VP, Indole, Catalase และชุดทดสอบ API 20E (บริษัท Biomerieux)

2.1.3 แบคทีเรียแต่ละตัวจะถูกส่งไปยืนยันชนิดที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร

2.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่อความเป็นกรดเป็นด่าง อุณหภูมิและความเค็ม

2.2.1 แบคทีเรียแต่ละชนิด ที่ได้แยกจากแผลเปื่อย (ในข้อ 2.1) 10 μ l ใส่ในอาหาร TSB ปริมาตร 190 μ l โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีปริมาณเริ่มต้นเท่ากันด้วยการนับจำนวนเซลล์ในเพลทที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Sterile Plate) ที่มีอาหารแข็ง TSA (Spread Plate Count) แล้วนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียเป็นค่า Colony Forming Unit (CFU/mL) หลังจากบ่มไว้ 24 - 48 ชั่วโมง เชื้อที่ทำการเจือจางแล้วนี้จะนำไปหาค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density, OD) จาก Spectrophotometer ที่ 550 นาโนเมตร เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD)

2.2 นำแบคทีเรียแต่ละชนิด มาศึกษาการเจริญเติบโตในอาหาร TSB ที่มีระดับของความเป็นกรดเป็นด่าง อุณหภูมิ และความเค็ม ดังนี้

- ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C
- อุณหภูมิ (4, 30, 37 และ 40 °C)
- ความเค็ม (0%, 2%, 4%, 6%, 8% และ 10% ของ NaCl)

โดยแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงในจาน 96 wells หลุมละ 200 μ L การเจริญเติบโตถูกวัดจาก ความขุ่น เป็นค่า Optical Density (OD) ทุก 6 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2.3. การทดสอบความรุนแรงของแบคทีเรียที่ก่อโรคแผลเปื่อย

นำแบคทีเรียแต่ละชนิด ที่แยกได้จากแผลเปื่อย (ในข้อ 1) ปริมาณ 0.1 mL (จำนวน 1×10^7 เซลล์/mL) มาฉีดเข้าบริเวณผิวหนังของเต่าตนุที่สุขภาพดีเช่น ผิวหนังที่คอ ขาคู่หน้าทั้งสอง และขา คู่หลังทั้งซ้ายและขวา ซึ่งปริมาณแบคทีเรียจำนวนนี้ น่าจะเหนี่ยวนำให้เกิดบาดแผลได้ ถ้าเป็นชนิดที่สามารถก่อโรคได้ จากนั้นสังเกตการณ์เกิดบาดแผล และการเปื่อยของผิวหนังเป็นระยะเวลา 15 วัน ถ้ามีบาดแผลเกิดขึ้นบริเวณที่ฉีด จะทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังบนอาหารวุ้น เพื่อยืนยันชนิดของแบคทีเรียต่อไป

2.4. การตรวจความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ

ทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ บนจานอาหาร Muller Hinton Agar กับยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ได้แก่ 0/129, Ampicillin (AM), Kanamycin (K), Nitrofurantoin (F), Sulphamethoxazole/Trimethoprim (SXT), Chloramphenicol (C), Oxolinic Acid (OA), Novobiocin (NB), Oxytetracycline (OT) และ Sulfadiazine (SD) โดยใช้เทคนิค Disc Diffusion Method ป้อนเฉพาะเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียและแผ่นของยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 °C รายงานผลโดยการวัด Clear Zone รอบ ๆ แผ่นยาบนจานเพาะเชื้อ (Whitman, 2004)

2.5. การรักษาเต่าตนุที่มีแผลเปื่อย

เต่าตนุที่มีแผลเปื่อยที่มีขนาด 311 ± 75 กรัม จะถูกทำการทดสอบรักษาจากการเลี้ยง โดยจะแบ่งเต่าตนุออกเป็น 4 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ด้วยการแช่ด้วยยาฆ่าเชื้อ คือ คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper Sulphate) เป็นเวลา 30 นาที ทุกวัน นาน 10 วัน

กลุ่มที่ 2 ด้วยการให้การให้เต่าตนุกินยาออกซีเตตราไซคลิน (Oxytetracycline) ความเข้มข้น 1 กรัมต่อเต่าหนัก 1 กิโลกรัม (ตามฉลากของยา) นาน 10 วัน

กลุ่มที่ 3 ด้วยการแช่ด้วยสาร คอปเปอร์ซัลเฟต และให้กินยาออกซีเตตราไซคลิน

กลุ่มที่ 4 ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษา

เมื่อจะมีการแช่สารเคมีหรือให้กินยา จะทำการแยกเต่าป่วยออกมาจากบ่อเลี้ยง หลังการรักษาและสารเคมีแล้วจะปล่อยเต่ากลับสู่บ่อเลี้ยง เต่ามีการให้อาหารปลาข้างเหลืองทุกวัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อเลี้ยงทุกวัน มีการบันทึกอัตราการป่วยแยกตามลักษณะของบาดแผล อัตราการตาย รายงานผลการเปลี่ยนแปลงภายนอกของบาดแผลเปื่อยตามระยะเวลาการรักษา กรณีมีการติดเชื้อซ้ำอีก อาจเปลี่ยนแปลงสารเคมีและยาตามความจำเป็น ทำการรักษาจากเต่ามีแผลเปื่อยซ้ำซ้อนจนหายขาดเป็นปกติ ไม่มีบาดแผล

2.6. การวิเคราะห์ข้อมูล

2.6.1 จำแนกชนิดแบคทีเรียก่อแผลเปื่อยบนผิวหนังเต่าตนุ ทางชีวเคมี

2.6.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่อปัจจัยสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่าง อุณหภูมิ และความเค็มที่ระดับต่าง ๆ วิเคราะห์ทางสถิติด้วย Three Way ANOVA

2.6.3 โอกาสของแบคทีเรียในการก่อแผลเปื่อยบนผิวหนังเต่าตนุอีกครั้ง บันทึกบาดแผลที่เกิดขึ้น ภายใน 10 วัน

2.6.4 ความไวของแบคทีเรียก่อโรคแผลเปื่อยต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Disc Diffusion Method บันทึกวงของยาที่ไวและต้านต่อยา

2.6.5 การรักษาโรคแผลเปื่อยในเต่าตนุ บันทึกลักษณะบาดแผลทุกวันในแต่ละชุดทดลอง จนแผลเด้าหาย