# บทที่ 2

## วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. วัสดุ อุปกรณ์

1.1 วัสดุ อุปกรณ์สำหรับแยกชนิดแบคทีเรีย

ก. อุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
2. ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
3. ชุดผ่าตัด
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. สไลด์
6. หลอดทดลอง
7. แท่งแก้วสามเหลี่ยม
8. ไมโครไปเปต
9. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
10. กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) ยี่ห้อ Olympus
11. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

ข. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ ( NaCl )
2. Tryptic soy agar (TSA)
3. Thiosulphate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar
4. Mueller-Hinton agar (MHA)
5. สีย้อมแบคทีเรีย (Gram stain) (ภาคผนวก ก)
6. ชุดทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมี api 20 E(ผลิตโดยบริษัท Biomerieux S.A.) และอาหารทดสอบอื่นๆ (ภาคผนวก ก)

1.2 วัสดุ อุปกรณ์ สำหรับทดสอบการเกิดโรค

ก. อุปกรณ์

1. ตู้กระจกสำหรับเลี้ยงสัตว์น้ำ
2. อุปกรณ์ให้อากาศ (หัวทราย สายยาง)

ข. สัตว์ทดลอง อาหารสัตว์

1. หอยเป๋าฮื้อ (*H. asinina*)
2. สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria* sp.)

1.3 วัสดุ อุปกรณ์ สำหรับการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อ

ก. อุปกรณ์

1. พลาสติกสี่เหลี่ยมสำหรับใส่ชิ้นตัวอย่าง (embedding ring)
2. บล็อกโลหะ (mold)
3. ตะกร้าโลหะ
4. เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor)
5. เครื่องหยอดพาราฟิน (paraffin dispenser)
6. เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (sliding microtome)
7. มีดตัดเนื้อเยื่อ (microtome blade)
8. ถาดทำน้ำอุ่นสำหรับลอยเนื้อเยื่อ
9. สไลด์
10. กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์สำหรับถ่ายรูปยี่ห้อ Olympus AX 70

ข. สารเคมี

1. สารละลาย Davidson's fixative (ภาคผนวก ก)
2. เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
3. เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
4. แอบโซลูท แอลกอฮอล์ (absolute alcohol)
5. ไอโซโพรพิว แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol)
6. ไซลีน (xylene)
7. พาราฟิน (paraffin)
8. สีย้อม Hematoxylin และ Eosin (H&E) (ภาคผนวก ก)

1.4 วัสดุ อุปกรณ์ สำหรับการศึกษาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

ก. อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. สำลีพันไม้ (swab)
3. ไมโครไปเปต (micropipet)

ข. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารละลาย McFarland เบอร์ 0.5 (ภาคผนวก ก)
2. แผ่นยามาตรฐานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่บรรจุยาต้านจุลชีพต่างๆ คือ chloramphenicol (C ) 30 µg, norfloxacin (NOR)10 µg, oxolinic acid (OA) 2 µg, sulfamethoxazole 23.75 µg /trimethoprim 1.25 µg (SXT) และ oxytetracycline (OT) 30 µg ผลิตโดยบริษัท Oxoid จำกัด
3. อาหาร MHA

1.5 วัสดุ อุปกรณ์ สำหรับการศึกษาปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย

ก. อุปกรณ์

1. เครื่องวัดความเค็ม (salinometer)
2. เครื่องวัดพีเอ็ช (pH meter )
3. เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (oxygen meter)
4. บิวเร็ต

**2. วิธีการศึกษา**

**2.1 การศึกษาลักษณะอาการและการแยกเชื้อแบคทีเรียจากหอยป่วย**

2.1.1 เก็บตัวอย่างหอยเป๋าฮื้อที่มีอาการป่วยซึ่งสังเกตจากการแสดงอาการเหล่านี้ เช่น มีแผลหรือมีตุ่มหนองที่ใต้กล้ามเนื้อเท้า กล้ามเนื้อเท้าหดลีบไม่แข็งแรงและชอบเกาะขอบบ่อบริเวณผิวน้ำ หรือหอยมีการตายเกิดขึ้น เป็นต้น โดยหอยที่มีอาการป่วยอย่างรุนแรงจนไม่สามารถใช้เวลาลำเลียงมายังห้องปฏิบัติการได้ จะแยกเชื้อและคองตัวอย่างให้แล้วเสร็จที่ฟาร์ม ส่วนหอยที่มีอาการป่วยไม่รุนแรงมากและที่ตั้งฟาร์มอยู่ไม่ไกล จะลำเลียงมาแยกเชื้อและคองตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2.1.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากหอยป่วยโดยแยกเชื้อจากส่วน แผล เลือด และทางเดินอาหาร โดยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) ในการเก็บตัวอย่างจากแผลนั้นใช้สำลีพันไม้จุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ทาที่บริเวณแผลแล้วใช้มีดกรีดแผลลงไปลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร ต่อจากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะมา 1 ห่วง เกลี่ย(streak) บนอาหาร TSA และ อาหาร TCBS เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ส่วนการแยกเชื้อจากเลือดนั้น ใช้สำลีพันไม้จุ่มแอลกอฮอล์ทาที่บริเวณหลังกล้ามเนื้อเท้า แล้วใช้มีดกรีดให้เป็นแผลยาวใช้ปากคีบปลายแหลม (forcep) ถ่างแผล รอให้ของเหลวไหลออกมา แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะมา 1 ห่วง เกลี่ยบนอาหาร TSA และ อาหาร TCBS เช่นกัน ส่วนการเก็บตัวอย่างจาก

ทางเดินอาหารนั้นใช้สำลีพันไม้จุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ทาบริเวณภายนอกกระเพาะอาหาร ก่อนที่จะใช้มีดกรีด แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะมา 1 ห่วง เกลี่ยบนอาหาร TSA และ TCBS (ดัดแปลงจาก Elston, 1983a)

2.1.3 นำตัวอย่างทั้งหมดบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เลือกโคโลนีที่แตกต่างกันให้ได้มากที่สุดมาถ่ายเชื้อ (subculture) บนอาหาร TSA จนได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ (pure culture) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยการย้อมสีแกรม ก่อนที่จะเก็บในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร TSA (slant)

2.1.4 นำเชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์มาแยกชนิดโดยการทดสอบลักษณะทางกายภาพและทางชีวเคมีดังต่อไปนี้ การติดสีแกรม (gram stain) การเคลื่อนที่ (motility test) การมีแฟลกเจลลา (flagella) การเกิดปฏิกิริยากลูโคสออกซิเดชัน-เฟอร์เมนเตชัน (glucose oxidation-fermentation test) การเจริญบนอาหารแมคค็องกี (McConkey agar) การสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส(cytochrome oxidase test) การสร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase test) การสร้างเอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส ($\beta$-D-galactosidase test) อาร์จินีน ไดไฮโดรเลส (arginine dihydrolase) ไลซีน ดีคาร์บอกซิเลส (lysine decarboxylase) ออร์นิทีน ดีคาร์บอกซิเลส (ornithine decarboxylase) การทดสอบอินโดล (indole test) การทดสอบยูรีเอส (urease test) การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ ($H_2S$) การทดสอบการสร้างสารอะเซโตอีน (VogesProskauer test) การทดสอบเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase test) การทดสอบความสามารถในการหมักย่อยน้ำตาล (กลูโคส (glucose) แมนนิทอล (mannitol) อินโนซิทอล (inositol) ซอร์บิทอล (sorbitol) แรมโนส (rhamnose) ซูโครส (sucrose) เมลลิไบโอส (melibiose) อะมิกดาลิน (amygdalin) อะราไบโนส (arabinose) L-อะราบิโนส (L-arabinose) และ แลคโตส (lactose)) ความสามารถในการผลิตไนไตรท์ ($NO_2$ production) และแกสไนโตรเจน ($N_2$) การสร้างแกสจากการหมักย่อยน้ำตาล D-กลูโคส (gas from D-glucose) การทดสอบความไวของเชื้อต่อ vibrostat O/129 10 μg และ 150 μg แอมพิซิลลิน (ampicillin) 10 μg การเจริญในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

2.1.5 นำผลการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรียมาตรวจผลโดยเทียบเคียงจาก Finegold และ Baron (1986), Alsina และ Blanch (1994) และ นันทนา (2537) เพื่อจำแนกแบคทีเรียในระดับสกุล (genus) และระดับชนิด (species)

**2.2 การทดสอบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคที่แท้จริง (Koch' postulate)**

2.2.1 นำหอยเป๋าฮื้อปกติมาเลี้ยงในตู้กระจกตู้ละ 3 ตัว แต่ละตู้มีหอยขนาดความยาวเปลือกระหว่าง 4.2-6 เซนติเมตร เลี้ยงปรับสภาพให้เข้ากับการทดลองเป็นเวลา 5 วัน

2.2.2 เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้แต่ละเชื้อความเข้มข้น $10^7$-$10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ฉีดเข้าไปในบริเวณกล้ามเนื้อเท้าด้านข้างของหอยปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร/ตัว สังเกตอาการ ถ่ายรูป และบันทึกอัตราการป่วยและการตาย

2.2.3 นำหอยที่มีอาการป่วยมาแยกเชื้อแบคทีเรียอีกครั้งจากส่วนของเลือดและแผล แล้วทดสอบคุณสมบัติของเชื้ออีกครั้งตามวิธีการเดิม เพื่อเป็นการยืนยันว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการของโรคเป็นแบคทีเรียชนิดเดิมหรือไม่

**2.3 การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของหอยป่วย**

2.3.1 ตัดเนื้อหอยออกจากเปลือกโดยให้อวัยวะทุกส่วนอยู่ในสภาพสมบูรณ์ ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 25 ฉีดสารละลาย Davidson's fixative เข้าไปในอวัยวะต่างๆ เช่น กล้ามเนื้อเท้า ตับ ทางเดินอาหาร แล้วจึงแช่ในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 3-4 วัน (อย่างน้อย 24 ชั่วโมง) หลังจากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรอทำขั้นตอนต่อไปตามวิธีของ Bancroft (1967)

2.3.2 นำตัวอย่างหอยมาแยกอวัยวะต่างๆ หรือตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในพลาสติกสี่เหลี่ยม แล้วใส่ในตะกร้าโลหะนำไปลงในเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ เพื่อผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) จนถึงการให้ wax แทรกตัวเข้าไปในเนื้อเยื่อ (ภาคผนวก ก) หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อฝังในพาราฟิน (embedding)

2.3.3 ตัดตัวอย่างที่ได้ด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร แล้วนำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ใช้สไลด์ตักแผ่นเนื้อเยื่อให้ติดกับแผ่นสไลด์ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 ชั่วโมง

2.3.4 นำเนื้อเยื่อที่ติดแน่นบนแผ่นสไลด์มาผ่านขั้นตอนการย้อมสี H&E (ภาคผนวก ก) แล้วปิดทับด้วยแผ่นแก้วบาง (cover glass) ที่ทาด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) วางทิ้งไว้ให้แห้ง

2.3.5 นำเนื้อเยื่อนี้มาศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพจากการทำลายเนื้อเยื่อของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาแล้วถ่ายภาพบันทึกไว้

**2.4 การศึกษาเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในหอยเป๋าฮื้อ**

2.4.1 แยกเนื้อหอยออกจากเปลือกก่อนที่จะแยกอวัยวะส่วนเหงือก ตับ และลำไส้ออกมาชั่งน้ำหนักแต่ละส่วน แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เพื่อฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน ต่อจากนั้นล้างด้วยน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำแต่ละส่วนมาบดด้วยโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนละเอียด แล้วเจือจางด้วยน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วนที่เหมาะสมซึ่งได้ทดสอบมาก่อนนี้แล้ว จากนั้นเพาะเชื้อจากแต่ละอัตราส่วนเจือจางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี

เกลี่ยเพลท (spread plate) นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดและจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายๆ กันแต่ละลักษณะโคโลนี เพื่อที่จะคำนวณปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดต่อกรัม

2.4.2 ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแต่ละลักษณะโคโลนีเพื่อทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ แล้วทำการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อด้วยวิธีทางกายภาพและทางชีวเคมี เพื่อแยกชนิดแบคทีเรียเช่นเดียวกับวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค แล้วคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดต่อกรัมในแต่ละอวัยวะ

2.4.3 ศึกษาลักษณะรูปร่าง (morphology) ของแบคทีเรียบางชนิดที่จำเป็นต้องศึกษา โดยวิธีทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนทั้งแบบส่องผ่าน (transmision electron microscope, TEM) และแบบลำแสงส่องกราด (scanning electron microscope, SEM)เพื่อใช้ในการจำแนกกลุ่มแบคทีเรีย (ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างในภาคผนวก ก)

2.4.4 ศึกษาความเป็นไปได้ในการสร้างสารที่อาจจะผลิตออกมานอกเซลล์ (extracellular product) หรือสารที่ผลิตภายในเซลล์ (intracellular product) ของแบคทีเรียประจำถิ่นบางชนิดที่ได้ตรวจพบมาก่อน (budding และ/หรือ appendaged bacteria) ที่อาจมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นโดยการเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ในอาหาร tryptic soy broth ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่อัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสหยดลงบนเชื้อต่างๆ ที่ป้ายไว้บนอาหาร TSA แล้วล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ 3-4 ครั้ง นำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เสียงคลื่นความถี่สูง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่อัตราเร็วและเวลาเดิม ใช้ส่วนใสหยดลงบนสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วนำตัวอย่างทั้งหมดบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อ

**2.5 การศึกษาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disc sensitivity test (ตามวิธีของ Bauer และ คณะ, 1966 อ้างโดย นันทนา, 2537)**

นำเชื้อบริสุทธิ์มาละลายด้วยน้ำเกลือ 1. 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเทียบความขุ่นกับสารละลาย McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งเชื้อจะมีความเข้มข้นเท่ากับ $1.5 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ใช้สำลีพันไม้จุ่มในสารละลายเชื้อป้ายลงบนอาหาร MHA ให้ทั่ว แล้ววางแผ่นยาต่างๆ ที่ต้องการทดสอบ คือ คลอแรมเฟนนิคอล 30 ไมโครกรัม ออกซีเตตราซัยคลิน 30 ไมโครกรัม นอร์ฟล็อกซาซิน 10 ไมโครกรัม ออกโซลินิก แอซิด 2 ไมโครกรัม ซัลฟาเมทท็อกซาโซล 23.75 ไมโครกรัมร่วมกับไตรเมทโทปริม 1.25 ไมโครกรัมลงบนอาหารนั้น นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วจึงวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเกิดรอยใส (clear zone) ลบด้วยค่ามาตรฐานช่วงที่มีความไว

(sensitive) ของยาแต่ละชนิด (ภาคผนวก ข) ยาที่ก่อให้เกิดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยใสเท่ากับหรือมากกว่าค่ามาตรฐานแสดงว่าเชื้อมีความไวต่อยานั้นๆ

**2.6 การศึกษาปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย**

วัดคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงทุกครั้งที่ออกเก็บตัวอย่างโดยวิเคราะห์ ความเค็ม วัดโดยใช้เครื่องวัดแบบหักเหแสง (salinometer) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ วัดโดยใช้เครื่องวัดออกซิเจนยี่ห้อ YSI ศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำในบ่อเลี้ยงหอยโดยเพาะเชื้อบนอาหาร TSA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และศึกษาปริมาณวิบริโอทั้งหมดโดยเพาะเชื้อลงบนอาหาร TCBS นำมาบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ห้องปฏิบัติการ 18-24 ชม. ส่วนพารามิเตอร์ที่วัดในห้องปฏิบัติการ คือ pH วัดโดยใช้เครื่องวัด pH (pH meter) และค่าความเป็นด่างวัดโดยใช้วิธีการไตเตรท