



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การสำรวจโรคเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลจาก
ศูนย์อนุรักษ์เต่าทะเล กองทัพเรือ จ.ชลบุรี

**Survey of Diseases in Juvenile Sea Turtles in
Conservation Centre, the Royal Thai Navy,
Chonburi Province**

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนาพร ชื่นอิม และคณะ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

พฤษภาคม 2552

การสำรวจโรคเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล

กองทัพเรือ จ.ชลบุรี

ธนาพร ขึ้นอิม

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม 73000

บทคัดย่อ

จากการสำรวจตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่ตายจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 ถึง 2550 จำนวนทั้งหมด 65 ตัว พบบาดแผลและอาการผิดปกติทางคลินิกทั้งอวัยวะภายนอก เช่น กระดอง ทรายัง บริเวณผิวหนัง หางและก้น และอวัยวะภายในร่างกายของลูกเต่าทะเล เช่น หัวใจ ตับ กระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต เป็นต้น ไม่พบลักษณะการติดเชื้อพยาธิ ปรสิตร หรือไข่ของพยาธิหรือ ปรสิตร อาการโรคชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบได้แก่ บาดแผลเน่าเป็นหนองบนผิวหนังตามลำตัว (ulcerative dermatitis) บาดแผลที่บริเวณกระดอง แผลเปื่อยและแผลอักเสบของเยื่อเมือกในช่องปาก (ulcerative stomatitis) ตับอักเสบ (necrotizing hepatitis) กระเพาะอาหารที่อักเสบมีอาการบวมพอง (gastrextasis) ลำไส้เล็กอักเสบมีอาการบวมพอง เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อจากบาดแผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม heamatoxyline และ eosin พบว่าอวัยวะต่างๆ เหล่านี้มีการติดเชื้อของแบคทีเรียรูปร่างต่างๆ ได้แก่ แบบกลม (coccus) แบบแท่ง (rod) และแบบแท่งโค้ง (curved rod) ไม่พบการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา และการติดเชื้อ papillomavirus เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบาดแผลไปทำการจำแนกชนิดสามารถจำแนกได้ 10 ชนิด คือ *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Micrococcus* spp., β -haemolytic *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* group C, *Edwardsiella* spp., *Corynebacterium* spp., และ *Aureobacterium* spp. ผู้วิจัยกำลังพัฒนาเทคนิค fluorescence in situ hybridization (FISH) เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อบาดแผลโดยเบื้องต้นใช้ probe สำหรับการตรวจหาแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *Vibrio* spp. และ *Staphylococcus aureus*

Survey of diseases in juvenile sea turtles in the conservation station at

Royal Navy Base, Chonburi Province

Thanaporn Chuen-Im

Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn University

Sanamchan Place, Nakorn Pathom Thailand 73000

Abstract

To survey diseases in juvenile sea turtles died at the Sea Turtle Conservation Station, the total of 65 samples were collected during 2005 and 2007. Investigation of these turtles revealed lesions and clinical signs in both external and internal organs such as shells, flippers, tails and anuses, stomachs, intestines, and livers. No infection of parasites or parasitic eggs was observed. The diseases found in these turtles were ulcerative dermatitis, ulcerative stomatitis, necrotizing hepatitis, gastrectasis, and impacted intestines. Using TEM and histology, lesion tissues were determined and the results showed clumps of bacteria distributing in the samples. These bacteria were either Gram-positive or –negative, and either in coccus, rod, or curved rod shapes. No hyphae of fungi or papillomavirus infection, a cause of fibrinopapillomatosis, found in the tissues. Identification of bacteria isolated from the lesions results in 10 genus or species, including *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Micrococcus* spp., β -haemolytic *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* group C, *Edwardsiella* spp., *Corynebacterium* spp., and *Aureobacterium* spp. Fluorescence in situ hybridization (FISH) are currently developed to use for study of bacteria infection in lesion tissues. Thus far, two probe sequences are developed to use for *Vibrio* spp. and *Staphylococcus aureus*.

การสำรวจโรคเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล กองทัพเรือ จ.ชลบุรี

Survey of diseases in juvenile sea turtles in conservation station at Royal Navy Base, Chonburi Province

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาพร ชื่นอิ่ม

เต่าทะเลเป็นสัตว์ทะเลที่ได้รับการคุ้มครองให้เป็นสัตว์สงวนที่ใกล้สูญพันธุ์ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ในปัจจุบันมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วและมีแนวโน้มว่าจะสูญพันธุ์ในไม่ช้าด้วยเหตุนี้กองทัพเรือจึงมีโครงการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลเพื่อเป็นการสนับสนุนตามโครงการ “สมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถ ดำเนินการโดยการเก็บและเพาะฟักไข่เต่าทะเลที่บริเวณหาดหน้าบ้านเกาะครามและทำการอนุบาลลูกเต่าจนกระทั่งมีอายุ 3 เดือนขึ้นไปก่อนที่จะทำการปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ ปัญหาหลักอันหนึ่งที่พบในการอนุบาลลูกเต่าทะเลในบ่ออนุบาล คือการเจ็บป่วยของลูกเต่า จากข้อมูลของศูนย์อนุรักษ์ของกองทัพเรือ อ. สัตหีบนั้นพบว่าอัตราการตายของลูกเต่าระหว่างการอนุบาลโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 30 - 70%

จากการสำรวจตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่ตายจากศูนย์อนุรักษ์ฯ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 ถึง 2550 จำนวนทั้งหมด 65 ตัว (ลูกเต่าตนุจำนวน 40 ตัวและลูกเต่ากระจำนวน 25 ตัว) อายุของตัวอย่างลูกเต่าอยู่ในช่วงระหว่าง 2-3 เดือน พบบาดแผลและอาการผิดปกติทางคลินิกทั้งอวัยวะภายนอก เช่น กระดอง รางรังค์ บริเวณผิวหนัง หางและก้น และอวัยวะภายในร่างกายของลูกเต่าทะเล เช่น หัวใจ ตับ กระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต เป็นต้น จากตรวจสอบด้วยตาเปล่าไม่พบลักษณะการติดเชื้อพยาธิ ปรสิตร หรือไข่ของพยาธิหรือปรสิต อาการโรคชนิดต่างๆ ที่ตรวจสรุปได้ดังนี้ บาดแผลเน่าเป็นหนองบนผิวหนังตามลำตัวและที่บริเวณกระดอง (ulcerative dermatitis) แผลเปื่อยและแผลอักเสบของเยื่อเมือกในช่องปาก (ulcerative stomatitis) ตับอักเสบซึ่งบางครั้งพบอาการลามไปที่ลำไส้เล็กด้วย (necrotizing hepatitis) กระเพาะอาหารที่อักเสบมีอาการบวมพอง (gastrectasis) และลำไส้เล็กอักเสบมีอาการบวมพอง เมื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากบาดแผลแล้วจำแนกชนิดของเชื้อสามารถจำแนกได้ถึงระดับยีนส์และสปีชีส์รวมทั้งหมด 10 ชนิดด้วยกันคือ *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Micrococcus* spp., β -haemolytic *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* group C, *Edwardsiella* spp., *Corynebacterium* spp., และ *Aureobacterium* spp.

ข้อสันนิษฐานต่อสาเหตุของการติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้และอาจส่งผลต่อการเสียชีวิตของลูกเต่าทะเลเหล่านี้ อันหนึ่งคือ ดังที่พบในสัตว์ชนิดอื่นรวมทั้งมนุษย์ที่ในวัยทารกหรือวัยเด็กจะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคต่างๆ ได้ต่ำกว่าวัยผู้ใหญ่หรือตัวเต็มวัยทำให้ลูกเต่าทะเลเหล่านี้ติดเชื้อแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมได้ง่ายส่งผลให้ป่วยเป็นโรคและหายจากโรคยากกว่าจึงตายในที่สุด เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อเปรียบเทียบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีการรายงานว่ามีมากแยกได้จากบาดแผลของเต่าทะเล (Gorge, 1997) กับชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบในงานวิจัยนี้ปรากฏว่าไม่มีการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Escherichia coli* และ *Pseudomonas* spp. ในตัวอย่างลูกเต่าทะเลในรายงานนี้ แสดงให้เห็นว่า

ลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มว่าเป็นเชื้อก่อโรคในเต่าทะเลในแต่ละท้องถิ่นที่อาจมีความแตกต่างกัน ดังนั้นในแต่ละท้องถิ่นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการตรวจสอบชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานแต่มีความสำคัญต่อการป้องกันและรักษาโรคในสัตว์ต่อไป

การสำรวจโรคเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล

กองทัพเรือ จ.ชลบุรี

Survey of diseases in juvenile sea turtles in conservation station at Royal Navy Base, Chonburi Province

แหล่งวางไข่ของเต่าทะเลในปัจจุบันเหลืออยู่น้อยมากทั้งในฝั่งทะเลอ่าวไทยและทางฝั่งทะเลอันดามัน การลดจำนวนลงของเต่าทะเลจนใกล้สูญพันธุ์นั้นเกิดจากหลายสาเหตุด้วยกัน เช่น การทำลายหรือรบกวนบริเวณชายหาดที่แม่เต่าทะเลใช้ในการวางไข่และการลักลอบเก็บไข่เต่าไปขาย การติดตั้งเครื่องมือแยกเต่าทะเลออกจากอวนลากกุ้ง เนื่องจากในปัจจุบันเต่าทะเลมีจำนวนเหลือน้อยมาก ด้วยเหตุนี้กองทัพเรือจึงมีโครงการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลเพื่อเป็นการสนับสนุนตามโครงการ “สมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถ ดำเนินการโดยการเก็บและเพาะฟักไข่เต่าทะเลที่บริเวณหาดหน้าบ้านเกาะครามและทำการอนุบาลลูกเต่าจนกระทั่งมีอายุ 3 เดือนขึ้นไปก่อนที่จะทำการปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ ปัญหาหลักอันหนึ่งที่เกิดในการอนุบาลลูกเต่าทะเลในบ่ออนุบาล คือการเจ็บป่วยของลูกเต่า จากข้อมูลของศูนย์อนุรักษ์ของกองทัพเรือ อ.สัตหีบนั้นพบว่าอัตราการตายของลูกเต่าระหว่างการอนุบาลอยู่ที่ 30 - 70% โดยเฉพาะ จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ของโครงการนี้เพื่อศึกษาและสำรวจโรคในลูกเต่าทะเลที่เสียชีวิตจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี

จากการสำรวจตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่ตายจากศูนย์อนุรักษ์ฯ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 ถึง 2550 จำนวนทั้งหมด 65 ตัว (ลูกเต่าตนุจำนวน 40 ตัวและลูกเต่ากระจำนวน 25 ตัว) อายุของตัวอย่างลูกเต่าอยู่ในช่วงระหว่าง 2-3 เดือน ความยาวและความกว้างของกระดองลูกเต่าส่วนด้านบนหรือด้านโค้งนั้นมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงระหว่าง 5.7 – 6.4 เซนติเมตร และ 7.3 – 8.5 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบบาดแผลและอาการผิดปกติทางคลินิกทั้งอวัยวะภายนอก เช่น กระดอง ไรยางค์ บริเวณผิวหนัง หางและก้น และอวัยวะภายในร่างกายของลูกเต่าทะเล เช่น หัวใจ ตับ กระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต เป็นต้น จากตรวจสอบด้วยตาเปล่าไม่พบลักษณะการติดเชื้อพยาธิ ปรสิตร หรือไข่ของพยาธิหรือปรสิต แต่พบอาการโรคชนิดต่างๆ สรุปได้ดังนี้

- บาดแผลเน่าเป็นหนองบนผิวหนังตามลำตัว (ulcerative dermatitis) พบมากที่ผิวหนังบริเวณลำคอ ก้นและหาง ที่ปลายครีบน้้าและครีบล้าง
- บาดแผลที่บริเวณกระดอง มีลักษณะเป็นวงขาวกึ่งลึกเข้าไปในเนื้อกระดอง
- แผลเปื่อยและแผลอักเสบของเยื่อเมือกในช่องปาก (ulcerative stomatitis) พบลักษณะลิ้นอักเสบ มีหนองสีเหลืองคล้ายเนยอยู่บนลิ้น
- ตับอักเสบ (necrotizing hepatitis) พบลักษณะแผลเป็นจุดสีเขียวยหรือเทากระจายอยู่ทั่วอวัยวะบางตัวอย่างตับมีลักษณะแข็งและสีเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองปนเขียว

- กระเพาะอาหารที่อักเสบมีอาการบวมพอง (gastrectasis) บางครั้งมีของเหลวสีเหลืองพร้อมแก๊สขมอยู่ภายใน

- ลำไส้เล็กอักเสบมีอาการบวมพอง ลักษณะมีของเหลวสีเหลืองและแก๊สอัดแน่นอยู่ในภายในลำไส้ ในบางครั้งพบอาการต่อเนื่องมาจากกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ลูกเต่าทะเลบางตัวอย่างที่มีอาการผิดปกติที่ตับโดยตับมีลักษณะแข็งและมีสีเหลืองปนเขียว นั่นจะมีอาการลามของโรคไปยังลำไส้เล็กส่วนที่อยู่ติดกับอวัยวะตัวอีกด้วย ลำไส้ส่วนนี้จะมีลักษณะแข็งและมีสิ่งอุดตันแน่นอยู่ภายใน

เมื่อนำเนื้อเยื่อจากบาดแผลเหล่านี้ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม heamatoxyline และ eosin แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาซึ่งจากการเปรียบเทียบขนาดและรูปร่างของจุลินทรีย์เหล่านี้ทำให้สันนิษฐานได้ว่าจุลินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย (มีขนาดเซลล์อยู่ในช่วงประมาณ 0.5 – 2 ไมโครเมตร) โดยพบว่าอวัยวะต่างๆ เหล่านี้มีการติดเชื้อของแบคทีเรียรูปร่างต่างๆ ได้แก่ แบบกลม (coccus) แบบแท่ง (rod) และแบบแท่งโค้ง (curved rod) อยู่ภายในเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก ไม่พบการเจริญของเส้นใยของเชื้อราในทุกเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบเบื้องต้นของการติดเชื้อ papillomavirus โดยใช้เทคนิค PCR และไพรเมอร์ L1C1/C2 ในบริเวณยีน L1 (Yoshikawa และคณะ, 1991) ผลการทดลองที่ได้ไม่มีการ amplify ขึ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าไม่มีการติดเชื้อของไวรัส

หลังจากที่ทำการจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบาดแผลโดยใช้เทคนิคการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical tests) ตามคุณสมบัติการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียใน the 8th edn. of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) พบเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมลบและแกรมบวก ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้มีรูปร่างทั้งแบบกลม ท่อน และท่อนโค้ง สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียถึงระดับยีนส์และสปีชีส์ได้จากทั้งหมด 56 isolates พบชนิดเชื้อรวมทั้งหมด 10 ชนิดด้วยกัน มีดังนี้คือ *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Micrococcus* spp., β -haemolytic *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* group C, *Edwardsiella* spp., *Corynebacterium* spp., และ *Aureobacterium* spp. นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียอีกจำนวนหนึ่งที่ไม่สามารถจำแนกได้โดยใช้คุณสมบัติจาก the 8th edn. of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ได้ เป็นแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกรูปร่างท่อนและกลม และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อนและกลมอีกจำนวนหนึ่ง จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อ *Vibrio alginolyticus* จากเนื้อเยื่อบาดแผลได้มากที่สุด (คิดเป็น 26.79%) เชื้อแบคทีเรียรองลงมาคือ *Staphylococcus* spp. (คิดเป็น 19.64%) เชื้อแบคทีเรียอันดับที่สามมีสองชนิด คือ *Citrobacter freundii* และ *Micrococcus* spp. (คิดเป็น 10.71%) สำหรับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่จำแนกได้ลำดับถัดมา คือ *Edwardsiella* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Aureobacterium* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus* group C และเชื้อ *Corynebacterium* spp.

ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาเทคนิค FISH สำหรับใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อ วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อต้องการประยุกต์ใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลสำหรับการศึกษาโรคในสัตว์ที่ได้รับการอนุรักษหรือการคุ้มครองพันธุ์เช่น เต่าทะเล โดยได้ทำการสืบหาข้อมูลจากวารสารที่มีการตีพิมพ์และจาก database ทาง internet เพื่อหาลำดับเบสที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็น probe ในการทดลอง จากนั้นทำการทดสอบความเหมาะสมของลำดับเบสที่ได้แต่ละตัวกับโปรแกรมทดสอบด้วยคอมพิวเตอร์ที่ได้จากเว็บไซต์ต่างๆ เช่น probe match programme ของ ribosomal database project จาก <http://rdp.cme.msu.edu/probematch> หรือ blast programme จาก <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast> โดยได้ลำดับเบสสำหรับ probe ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ 16s rRNA ของเชื้อแบคทีเรียทั่วไปคือ probe EUB338 และ probe สำหรับติดตามแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *Vibrio* spp. และ *Staphylococcus aureus* โดยอยู่ในขั้นตอนการหาสภาวะสำหรับ hybridization ที่เหมาะสมสำหรับ probe แต่ละตัวอยู่

ข้อสันนิษฐานต่อสาเหตุของการติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้และอาจส่งผลต่อการเสียชีวิตของลูกเต่าทะเลเหล่านี้หนึ่งคือ ดังที่พบในสัตว์ชนิดอื่นรวมทั้งมนุษย์ที่ในวัยทารกหรือวัยเด็กจะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคต่างๆ ได้ต่ำกว่าวัยผู้ใหญ่หรือตัวเต็มวัยทำให้ลูกเต่าทะเลเหล่านี้ติดเชื้อแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมได้ง่ายส่งผลให้ป่วยเป็นโรคและหายจากโรคนานกว่าจึงตายในที่สุด

เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อเปรียบเทียบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีการรายงานว่ามีแยกได้จากบาดแผลของเต่าทะเล (Gorge, 1997) กับชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบในงานวิจัยนี้ปรากฏว่าไม่มีการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Escherichia coli* และ *Pseudomonas* spp. ในตัวอย่างลูกเต่าทะเลในรายงานนี้ แสดงให้เห็นว่าลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มว่าเป็นเชื้อก่อโรคในเต่าทะเลในแต่ละท้องถิ่นอาจมีความแตกต่างกันดังนั้นในแต่ละท้องถิ่นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการตรวจสอบชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานแต่มีความสำคัญต่อการป้องกันและรักษาโรคในสัตว์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edn., Williams and Wilkins, Baltimore.
2. George, R.H., 1997. Health problems and disease of sea turtles. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), The Biology of Sea Turtles. CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 363-385.
3. Yoshikawa, H., Kawana, T., Kitagawa, K., Mizuno, M., Yoshikura, H., Iwamoto, A. 1991. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. Jpn. J. Cancer Res. 82, 524-531.

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 สารเคมี และวิธีการทดลอง	9
บทที่ 3 ผลการทดลอง	14
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	47
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	54

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 บริเวณแหล่งวางไข่ของเต่าทะเลในประเทศไทย	3
รูปที่ 2 กราฟแสดงช่วงเวลาวางไข่ของเต่าตนุและเต่ากระที่วางไข่ในประเทศไทย	4
รูปที่ 3 สถิติของจำนวนไข่เต่าที่เก็บได้ และอนุบาลที่ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์ฯ อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี ในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2541 ถึง 2547	5
รูปที่ 4 ลูกเต่าตนุและเต่ากระอายุประมาณ 1 เดือนในบ่ออนุบาลของศูนย์อนุรักษ์- พันธุ์เต่าทะเล อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี	14
รูปที่ 5 การให้อาหารลูกเต่าตนุและเต่ากระ (ซ้าย) สหรัยสีเหลือง และ (ขวา) เนื้อปลาข้างเหลืองสด	15
รูปที่ 6 อวัยวะภายในและบาดแผลที่พบบนอวัยวะของลูกเต่าตนุ	16
รูปที่ 7 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ที่พบบาดแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์- อิเล็กตรอน แบบส่องกราด	20
รูปที่ 8 เนื้อเยื่อบาดแผลมีหนองคล้ายเนยสีเหลืองในช่องปากของลูกเต่าตนุ	23
รูปที่ 9 เนื้อเยื่อ บริเวณตับของลูกเต่ากระตัวที่ 1 ย้อมด้วยสีย้อม H&E	24
รูปที่ 10 เนื้อเยื่อบริเวณตับของลูกเต่ากระตัวที่ 2 ย้อมด้วยสีย้อม H&E เปรียบ เทียบระหว่างเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลกับเนื้อเยื่อรอบบาดแผล	26
รูปที่ 11 เนื้อเยื่อบริเวณตับของลูกเต่าตนุตัวที่ 1 ย้อมด้วยสีย้อม H&E	27
รูปที่ 12 เนื้อเยื่อบริเวณตับของลูกเต่ากระตัวที่ 3 ย้อมด้วยสีย้อม H&E เปรียบ เทียบระหว่างเนื้อเยื่อรอบบาดแผลกับเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผล	28
รูปที่ 13 ผลการทดสอบความจำเพาะของ probe สำหรับการตรวจสอบเชื้อ แบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> จากบริเวณ 16s rRNA อ้างอิงจาก Trebesius และคณะ (2000) โดยการใช้ Probe Match Programme	33
รูปที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความจำเพาะของ probe สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อ แบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> จากบริเวณ 16s rRNA อ้างอิงจาก Trebesius และคณะ (2000) โดยใช้ Blast programme	35
รูปที่ 15 ผลการทดสอบความจำเพาะของ probe สำหรับการตรวจสอบเชื้อ แบคทีเรีย <i>Vibrio spp.</i> จากบริเวณ 16s rRNA อ้างอิงจาก http://bioinfo.unice.fr โดยการใช้ Probe Match Programme	39

รูปที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความจำเพาะของ probe สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อ แบคทีเรีย <i>Vibrio spp.</i> จากบริเวณ 16s rRNA อ้างอิงจาก http://bioinfo.unice.fr โดยใช้ Blast programme	41
รูปที่ 17 การใช้เทคนิค FISH ในการตรวจสอบแบคทีเรียในเนื้อเยื่อลูกเต๋าทะเล ตัวอย่างและแบคทีเรียที่แยกได้จากเนื้อเยื่อตัวอย่าง	45

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การติดเชื้อแบคทีเรียในเต่าทะเล	7
ตารางที่ 2 สรุปจำนวนตัวอย่างที่มีอาการผิดปกติและโรคในลูกเต่าตนุและกระจาก ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล อ.สัตหีบ จากจำนวนทั้งหมด 65 ตัวอย่าง ระหว่าง ปีพ.ศ. 2548 ถึง พ.ศ. 2550	18
ตารางที่ 3 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบาดแผลที่พบในตัวอย่างลูกเต่าตนุและ เต่ากระ	30

บทที่ 1 บทนำ

เต่าทะเลเป็นสัตว์ดึกดำบรรพ์ที่เกิดขึ้นบนโลกนี้ไม่ต่ำกว่า 130 ล้านปีก่อน การแพร่กระจายของเต่าทะเลพบอยู่เฉพาะในทะเลเขตร้อนและเขตอบอุ่น เต่าทะเลทั่วโลกพบอยู่ 8 ชนิดด้วยกัน คือ เต่ามะเฟือง (*Dermochelys coriacea*), เต่าตนุ (*Chelonia mydas*), เต่าหลังแบน (*Chelonia depressa*), เต่ากระ (*Eretmochelys imbricata*), เต่าหัวค้อน (*Caretta caretta*), เต่าหญ้า (*Lepidochelys olivacea*), เต่าหญ้าแอตแลนติก (*Lepidochelys kempii*) และเต่าดำ (*Chelonia agassizii*) ในประเทศไทยพบการวางไข่ของเต่าทะเลเพียง 4 ชนิด คือ

1. เต่ากระ (Hawksbill turtles) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Eretmochelys imbricata*

ลักษณะเด่นของเต่าชนิดนี้ คือ มีหัวแคบและปากเป็นจะงอยค่อนข้างแหลมจุ่มคล้ายปากเหยี่ยว เกล็ดบนหัวตอนหน้ามี 2 คู่ เกล็ดบนหลังแถวข้างมีจำนวนข้างละ 4 เกล็ด เกล็ดกระดองหลังเรียงซ้อนกันและมีสีสลับดลวยสวยงามเป็นสีเหลือง น้ำตาลและดำ กระดองส่วนท้องมีสันจากด้านหน้าไปด้านหลัง ขาใบพายคู่หน้ามีเล็บ 2 เล็บ เต่ากระตัวโตเต็มวัยมีขนาดกระดองอยู่ในช่วง 71 – 91 เซนติเมตร (28 – 36 นิ้ว) น้ำหนัก 36 – 64 กิโลกรัม (80 – 140 ปอนด์) เต่ากระเมื่อยังมีขนาดเล็กจะอาศัยอยู่ชายฝั่งเขตนํ้าตื้นและกินสัตว์พวกฟองน้ำ สาหร่ายทะเล ปู ปลา หอย แมงกะพรุน และสัตว์จำพวกไม่มีกระดูกสันหลังเป็นอาหาร พบการแพร่กระจายทั่วไปในเขตร้อนมหาสมุทรแปซิฟิก และมหาสมุทรแอตแลนติก

2. เต่าตนุ (Green turtles) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Chelonia mydas*

ลักษณะเด่นของเต่าตนุ คือ เกล็ดบนส่วนหัวตอนหน้า (prefrontal scale) มีจำนวน 1 คู่ เกล็ดบนกระดองข้าง (coastal scale) มีจำนวน 4 เกล็ด กระดองหลังเรียบและมีเกล็ดสันหลังขนาดเล็กกว่าแผ่นเกล็ดชายโครง แผ่นเกล็ดขอบกระดองมีขนาดเล็ก ลักษณะของเกล็ดจะเชื่อมต่อกันไม่ซ้อนกัน สีสันและลวดลายสวยงาม โดยกระดองมีสีน้ำตาลอมเหลืองมีลายสีจางกว่ากระจายจากส่วนกลางเกล็ด จึงมีอีกชื่อว่า เต่าแสงอาทิตย์ เมื่อโตเต็มที่วัดกระดองได้ 90 – 100 เซนติเมตร (36 – 43 นิ้ว) น้ำหนักประมาณ 113 – 182 (250 - 300 ปอนด์) เต่าตนุเป็นเต่ากระดองแข็งประเภทที่ใหญ่ที่สุด เต่าตนุกินพืชเป็นอาหารโดยเฉพาะสาหร่ายและหญ้าทะเล เต่าตนุในวัยอ่อนจะกินทั้งพืชและสัตว์เป็นอาหาร แหล่งวางไข่ของเต่าตนุพบมากในอ่าวไทย และพบประปรายทางฝั่งทะเลอันดามัน

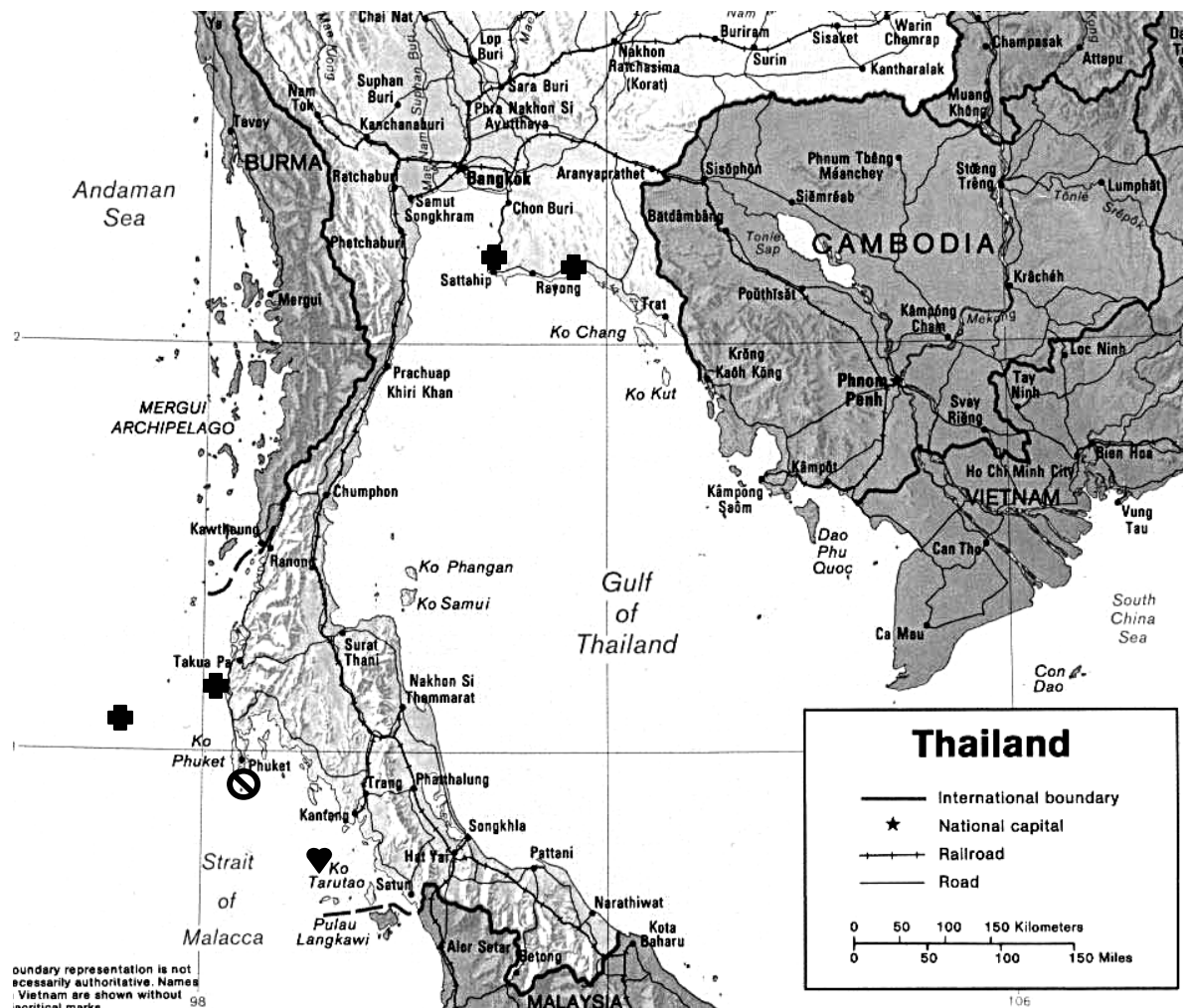
3. เต่าหญ้า (Olive ridley turtles) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lepidochelys olivacea*

ลักษณะเด่นของเต่าหญ้า คือ กระดองเรียบสีเทาอมเขียว สีของกระดองไม่ค่อยสวย จะอวยปากจะมนมากกว่าเต่าตนุ สิ่งที่แตกต่างจากเต่าตนุอย่างชัดเจนคือเกล็ดบนส่วนหัวตอนหน้ามีจำนวน 2 คู่ และเกล็ดบนกระดองหลังแถวข้างมีจำนวน 6 – 8 แผ่น นอกจากนี้ลักษณะพิเศษของเต่าหญ้ายังมีอีกอย่างคือมีกระดองส่วนท้องแถวกลาง (inframarginal scale) มีรูสำหรับขับถ่ายหรือรูเปิดสำหรับประสาทรับความรู้สึก จำนวน 5 คู่ กระดองมีสีน้ำตาลโอลีฟ ส่วนท้องสีเหลืองออกขาว เต่าหญ้าเป็นเต่าที่มีขนาดเล็กที่สุดเมื่อโตเต็มที่วัดขนาดกระดองได้ 58 – 66 เซนติเมตร (23 – 26 นิ้ว) น้ำหนัก 36 – 41 กิโลกรัม (80 – 90 ปอนด์) เต่าหญ้ามักจะอวยปากใหญ่คมและแข็งแรงสำหรับขบกัดหอยที่มีเปลือกหุ้มจึงสามารถกินกุ้ง แมงกะพรุน ปู ปลา หอยสาหร่าย และหญ้าทะเล เป็นอาหารได้ แหล่งวางไข่ของเต่าหญ้าพบมากทางชายฝั่งทะเลอันดามัน ตามชายฝั่งของจังหวัดภูเก็ต พังงา และหมู่เกาะต่าง ๆ

4. เต่ามะเฟือง (Leatherback turtles) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dermochelys coriacea*

เต่ามะเฟืองเป็นเต่าทะเลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในบรรดาเต่าทะเลทั้งหมดและสามารถจำแนกได้ง่ายที่สุด ทั้งนี้เต่ามะเฟืองไม่มีเกล็ดคลุมบนกระดอง มีเพียงแผ่นหนังสีดำหุ้มกระดองไว้เท่านั้นกลางหลังยังเห็นเป็นสันนูนขึ้นมา 7 สัน ขนาดกระดองของเต่ามะเฟืองตัวโตเต็มที่วัดได้ 150 – 178 เซนติเมตร (60 – 70 นิ้ว) น้ำหนัก 320 – 590 กิโลกรัม (710 – 1,300 ปอนด์) ส่วนมากเต่ามะเฟืองชอบหากินอยู่ในทะเลลึก ยกเว้นช่วงฤดูผสมพันธุ์ จึงพบเต่ามะเฟืองเป็นกลุ่มเล็ก ๆ เข้ามาหากินบริเวณชายฝั่ง อาหาร ได้แก่ แมงกะพรุน ทุเรียนทะเล กุ้ง ปู และปลา ที่หาได้ในบริเวณนั้นเพราะว่าเต่ามะเฟืองมีชั้นผิวหนังหนาและไขมันมากทำให้สามารถอยู่ในน้ำที่เย็นจัดได้นานกว่าเต่าทะเลชนิดอื่น จึงมีการแพร่กระจายไปทั่วโลกได้กว้างกว่าเต่าทะเลชนิดอื่น ๆ

แหล่งวางไข่ของเต่าทะเลในประเทศไทยนั้น (รูปที่ 1) เต่าตนุและเต่ากระจะพบการวางไข่ทั้งสองชายฝั่งทะเลของประเทศไทย โดยในฝั่งอ่าวไทย (Gulf of Thailand) นั้น พบการวางไข่ของเต่าทั้งสองชนิดมากบนชายหาดของเกาะคราม เกาะอีร้า เกาะจาน จ. ชลบุรี และเกาะมันใน จ. ระยอง ส่วนในฝั่งทะเลอันดามันนั้นพบการวางไข่มากที่บริเวณชายหาดของเกาะหุยง หมู่เกาะสุรินทร์ จ. พังงา สำหรับเต่ามะเฟืองและเต่าหญ้ายังพบการวางไข่ในฝั่งทะเลอันดามันเท่านั้น โดยแหล่งวางไข่ของเต่ามะเฟืองที่พบบ่อยคือที่บริเวณชายหาดท้ายเหมือง อุทยานแห่งชาติหาดท้ายเหมือง - เขาลำปี จ. พังงา และในหมู่เกาะตะรุเตา ส่วนเต่าหญ้านั้นในอดีตพบการวางไข่มากที่ จ. ภูเก็ต แต่ปัจจุบันพบการวางไข่ของเต่าชนิดนี้น้อยมากในประเทศไทย



รูปที่ 1 บริเวณแหล่งวางไข่ของเต่าทะเลในประเทศไทย

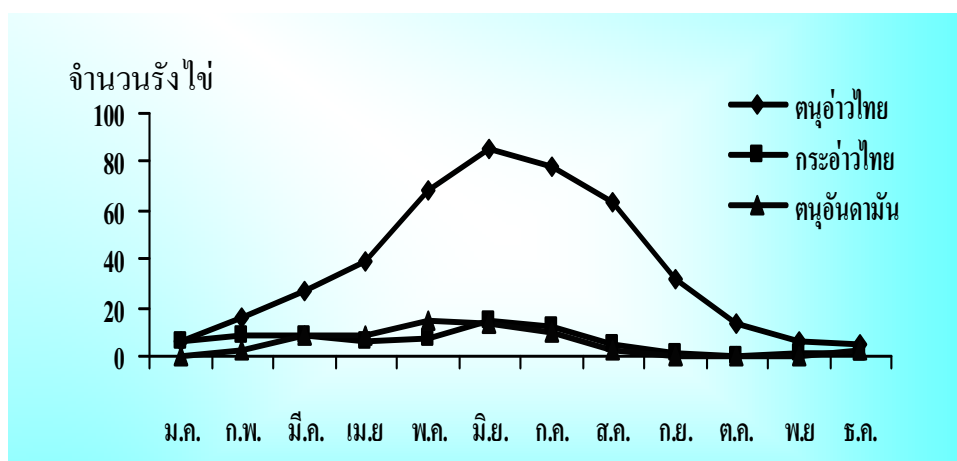
■ แหล่งวางไข่ของเต่าตนุและเต่ากระ, ⊗ แหล่งวางไข่ของเต่ามะเฟือง, ♥ แหล่งวางไข่ของเต่าหญ้า

การอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล

เนื่องจากจำนวนของเต่าทะเลในท้องทะเลมีการลดลงอย่างมากส่งผลให้เกิดการรวมตัวของกลุ่มผู้เชี่ยวชาญด้านเต่าทะเลของโลกขึ้นเมื่อปี พ.ศ.2512 ในรูปแบบของสหพันธ์นานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ (International Union of Conservation of Nature) และในปี 2518 ได้มีการทำสนธิสัญญาการค้าสัตว์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ระหว่างประเทศขึ้น (Convention of International Trade in Endangered Species, CITES) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาถึงชีววิทยาและนิเวศวิทยา

ของเต่าทะเล เพื่อให้เกิดความเข้าใจและมีประสิทธิภาพในการวางมาตรการอนุรักษ์และป้องกันการลดจำนวนของเต่าทะเล

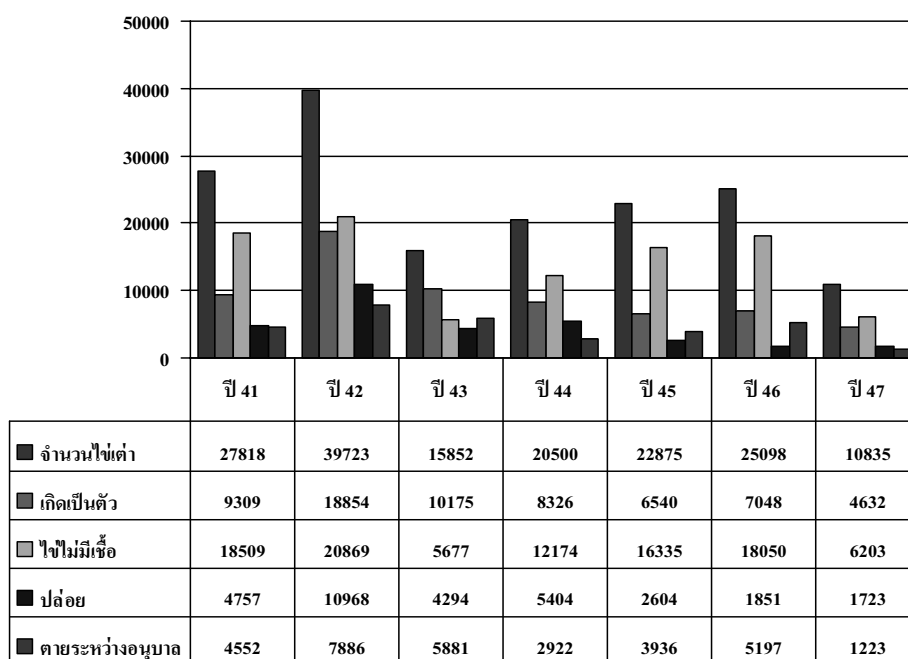
สำหรับประเทศไทยนั้นมียานหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนทำการรณรงค์และพัฒนาโครงการและกิจกรรมต่างๆ เพื่อการอนุรักษ์เต่าทะเลอย่างจริงจัง ทั้งนี้กองทัพเรือซึ่งเป็นหน่วยงานได้จัดทำโครงการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลโดยจัดตั้งศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลขึ้น โดยมีศูนย์อนุรักษ์อยู่ทั้งหมด 2 แห่ง คือ ที่หน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง อ.สัตหีบ จ. ชลบุรี และ กองเรือภาคที่ 2 ฐานทัพเรือพังงา จ. พังงา การดำเนินงานอนุรักษ์เต่าทะเลทำโดยทำการดูแลคุ้มครองแหล่งวางไข่ของเต่าทะเลในธรรมชาติ การรวบรวมและเพาะฟักไข่เต่าทะเล จากนั้นทำการอนุบาลลูกเต่าทะเล ก่อนที่จะปล่อยกลับสู่ทะเล



รูปที่ 2 กราฟแสดงช่วงเวลาวางไข่ของเต่าหัวไทยและเต่ากระที่วางไข่ในประเทศไทย

ที่มา: ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล หน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง อ.สัตหีบ จ. ชลบุรี

จากกราฟแสดงในรูปที่ 2 จะเห็นว่าช่วงเวลาวางไข่ของแม่เต่าทะเลทั้งเต่าหัวไทยและเต่ากระครอบคลุมระหว่างช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนกันยายนของทุกปีในทั้งสองชายฝั่งทะเลของประเทศ ซึ่งปัจจุบันนี้ศูนย์อนุรักษ์ฯ สามารถดำเนินการเพาะฟักและอนุบาลลูกเต่าหัวไทยและเต่ากระ รวมถึงปล่อยกลับสู่ท้องทะเลได้ผลสำเร็จโดยสามารถปล่อยลูกเต่ากลับสู่ท้องทะเลได้สูงถึง 10,000 ตัว ในปี พ.ศ. 2542 (รูปที่ 3) คิดเป็น 27 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไข่เต่าทะเลที่มีการวางไข่ทั้งหมด อย่างไรก็ตามตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 เป็นต้นมาจำนวนของลูกเต่าทะเลที่ฟักไข่และรอดชีวิตจนกระทั่งถูกปล่อยกลับสู่ท้องทะเลนั้นมีจำนวนลดลงเหลือไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุหนึ่งของจำนวนที่ลดลงนี้ คือ การตายระหว่างการอนุบาล โดยพบว่าลูกเต่าจำนวนมากมีบาดแผลและมีการติดเชื้อจุลินทรีย์



รูปที่ 3 สถิติของจำนวนไข่เต่าที่เก็บได้ และอนุบาลที่ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์ฯ อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี ในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2541 ถึง 2547

ที่มา: ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล หน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง อ.สัตหีบ จ. ชลบุรี

โรคชนิดต่างๆ ที่พบในเต่าทะเล

การศึกษาถึงโรคที่พบในเต่าทะเลในประเทศไทยนั้นยังมีน้อยมากซึ่งจากรายงานของศูนย์ต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่งหน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาชายฝั่ง ปี พ.ศ. 2527 นั้นพบว่าโรคที่เกิดกับเต่าทะเลและลูกเต่าทะเล เช่น

- โรคหนองในคอและจมูก โดยลูกเต่าจะมีอาการไม่ค่อยกินอาหารและไม่ว่ายน้ำ คอแข็ง ผิดปกติ เมื่ออ้าปากลูกเต่าจะพบหนองในคอ หรือ มีกลิ่นหนองไหลออกมา ถ้าเป็นมากจะพบหนองบริเวณโพรงจมูก ในปากและคอ โดยจะเห็นหนองเป็นก้อน
- โรคแผลบนกระดองและบริเวณผิวหนัง มักเกิดจากความหนาแน่นของลูกเต่าที่เลี้ยงอยู่ภายในบ่อเลี้ยงทำให้ลูกเต่าเกิดอาการเครียด เมื่อให้อาหารไม่เพียงพอจึงทำให้ลูกเต่าแย่งอาหารและกัดกัน มักเกิดกับลูกเต่าอายุประมาณ 2 เดือนขึ้นไป
- โรคเชื้อรา ลักษณะอาการคือที่บริเวณกระดองลูกเต่าและผิวหนังภายนอก มีลักษณะเป็นจุดขาว ๆ สังเกตเห็นได้ชัดเจน

- โรคตัวลอยและถ่ายไม่ออก ลูกเต่าจะดำน้ำไม่ลง ตัวลอย บางตัวเกิดการเสียศูนย์ขณะว่ายน้ำ ไม่กินอาหาร น้ำหนักเริ่มลดลง ขับถ่ายไม่ออก

การสำรวจโรคในเต่าทะเลชนิดต่างๆ ที่มีการรายงานในต่างประเทศทั้งเต่าทะเลที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติและที่มีการเพาะเลี้ยงไว้ในฟาร์มเพาะเลี้ยงเต่าทะเลหรือในพิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำนั้น พบว่ามีสาเหตุทั้งจากเชื้อจุลินทรีย์ ปรสิต และที่ไม่ใช่เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ การติดเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีพบทั้งการติดเชื้อไวรัส รา และแบคทีเรีย โดยโรคเนื่องจากเชื้อไวรัสมีดังนี้

- โรค grey-patch (Haines และคณะ, 2005) พบที่ผิวหนังบริเวณคอ และครีบ และอาจพบบริเวณหนังตา บริเวณบาดแผลจะมีสีเทา มีเชื้อไวรัสสาเหตุคือ herpes-type viruses

- โรค lung-eye-trachea (LETD) (Coberley และคณะ, 2002) มีสาเหตุมาจากเชื้อ lung-eye-trachea disease-associated herpesviruses (LETV)

- โรค fibropapillomatosis (Greenblatt และคณะ, 2005) เกิดเป็นเนื้องอกขึ้นบริเวณผิวหนังที่นุ่ม เช่น คอ คาง ปาก ตา คลีบ และบริเวณหาง เกิดจากเชื้อ fibropapilloma-associated turtle herpesviruses (FPTHV)

สำหรับการติดเชื้อรานี้มีการรายงานถึงการติดเชื้อ *Colletotrichum acutatum* ในเต่า Kemp's ridley (Manire และคณะ, 2002) เมื่อศึกษาเมดเลือดแดงโดยย้อมด้วย RapiDiff จะพบแควคิวิลจำนวนมากในไซโตพลาสซึม นอกจากนี้ยังพบอาการอักเสบของตับและไต และมีอาการปอดบวมรวมด้วย เมื่อทำการแยกเชื้อราในอาหาร Sabouraud dextrose agar และ broth (SAB) พบรา *C. acutatum* ที่มีการสร้างเส้นใย สร้าง conidium โดยบริเวณรอบ colony จะเปลี่ยนเป็นสีส้มภายใน 7 วัน หลังจากมีสี light rust เกิดขึ้น

โรคติดเชื้อแบคทีเรียในเต่าทะเลนั้นเป็นโรคที่มีการรายงานมากที่สุดโดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเต่าทะเลที่ป่วยและตายนั้นมีจำนวนมากดังสรุปในตารางที่ 1 เชื้อแบคทีเรียที่รายงานเหล่านี้บางชนิดเป็นแบคทีเรียจำพวก saprophyte หรือ normal flora ที่พบอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ บางชนิดเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ในสัตว์น้ำ ซึ่งปัจจุบันนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่ากลไกในการก่อให้เกิดโรคในเต่าทะเลนั้นเป็นอย่างไร นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่แยกได้จากตัวอย่างสัตว์ที่ป่วยนั้นอาจเป็นการติดเชื้อแบบฉวยโอกาสซึ่งอาจไม่ใช่สาเหตุของการเกิดโรคที่แท้จริงของสัตว์ก็ได้

ตารางที่ 1 การติดเชื้อแบคทีเรียในเต่าทะเล

อวัยวะ	เชื้อ	ลักษณะอาการ	เอกสารอ้างอิง
กระเพาะอาหาร	<i>Proteus</i> sp., <i>Vibrio alginolyticus</i> , และ <i>Staphylococcus</i> spp.	เกิดการอักเสบ และเนื้อเยื่อตาย	Oros และคณะ, 2005
ลำไส้	แบคทีเรียทั้งแกรมลบ และ แบคทีเรียแกรมบวก เช่น <i>Bacillus</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Pasteurella</i> spp. <i>Proteus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. และ <i>V. alginolyticus</i>	เกิดการอักเสบ เยื่อเมือกอักเสบ และเนื้อเยื่อตาย	Oros และคณะ, 2005
ตับ	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Citrobacter</i> spp., <i>E.</i> <i>coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. และ <i>V. alginolyticus</i>	เกิดการอักเสบ	Oros และคณะ, 2005
เลือด	<i>Vibrio</i> spp.	โรคผิวหนังในเต่าหัวสั้น การ อักเสบของเยื่อหุ้มหัวใจในเต่า มะเฟือง เยื่อเมือกในช่องจมูก อักเสบ ปอดบวม เยื่อเมือกใน ปากอักเสบ และ เลือดเป็นพิษ ใน เต่าตนุ	Wiles และRand, 1987; Obendorf และคณะ, 1987 ; Glazebrook และCampbell, 1990a,b
	<i>A. hydrophila</i> และ <i>Pseudomonas</i> spp.	ผิวหนังอักเสบ เยื่อเมือกในปาก อักเสบ เยื่อเมือกในช่องจมูกอักเสบ ปอดบวม ไชกระดูกอักเสบ และ เลือดเป็นพิษในเต่าตนุ	Glazebrook และ Campbell, 1990a,b

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อสำรวจโรคหรืออาการผิดปกติในลูกเต่าทะเลที่เสียชีวิตจาก ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล หน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เทคนิคการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม H&E แล้วสังเกตลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา และการใช้เทคนิคด้านจุลชีววิทยาเพื่อแยก เชื้อจุลินทรีย์และจำแนกชนิดเชื้อจุลินทรีย์ ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้จะถูกใช้เป็นข้อมูล พื้นฐานในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลต่อไป

บทที่ 2 สารเคมี และวิธีทดลอง

2.1 สารเคมี

Absolute alcohol

Potato Dextrose Agar (PDA)

Nutrient Agar (NA)

Nutrient Broth (NB)

Thiosulfate Citrate Bile Salt Agar (TCBS)

NaCl

Gram stain reagents

Saturated picric acid

40%formalin

Glacial acetic acid

Glycerol

xylene

พาราฟินเหลว

น้ำยา coarse abrasive

น้ำยา fine abrasive

เจลาติน

สีย้อม Hematoxylin

สีย้อมEosin

lithium carbonate

DPX

2.5% glutraaldehyde

phosphate buffer pH 7.2

1% osmium tetroxide (OsO_4)

propylene oxide

epoxy resin

5% ยูเรนิลอะซิเตต (UO_2) ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)₂.2H₂O

เลดซีเทรต $\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7).3\text{H}_2\text{O}$

2.2 วิธีทดลอง

2.2.1 การศึกษาเชื้อจุลินทรีย์จากเนื้อเยื่อบาดแผลด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยา

1. ทำการวัดขนาดกระดองของลูกเต่าตัวอย่างก่อนทำการตรวจสอบบาดแผลที่ปรากฏทั้งบาดแผลภายในและภายนอก
2. ทำการล้างชิ้นเนื้อที่ต้องการเก็บตัวอย่างด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ เช็ดให้แห้ง แล้วใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดชิ้นเนื้อของลูกเต่าที่บริเวณบาดแผล
3. ใช้เข็มเย็บเชื้อเย็บบริเวณบาดแผลที่ปรากฏ นำมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ NA + 1 และ 3% NaCl
4. บ่มจานเพาะเชื้อทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ 25°C สังเกตผลการทดลองทุกวัน แล้วทำการแยกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้วิธีการย้อมแกรมและการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เก็บเชื้อใน 15% glycerol เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C
5. ทำการตรวจสอบชนิดของเชื้อ (identification) โดยใช้ selective media และ เทคนิคด้าน biochemical test จาก the 8th edn. of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

2.2.2 การศึกษาเนื้อเยื่อด้วยการย้อมด้วยสีย้อม heamatoxylin และ eosin

1. ตัดชิ้นเนื้อของลูกเต่าที่มีบาดแผลในข้อ 1 (จาก 2.2.1 การจำแนกเชื้อสาเหตุที่ก่อโรคในลูกเต่าทะเลและการเก็บดองเนื้อเยื่อ) แช่ใน Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ล้าง Bouin's fluid ออกจากเนื้อเยื่อของลูกเต่าด้วย 70% แอลกอฮอล์ จนกระทั่งหมดสีเหลืองของ picric acid
3. เก็บเนื้อเยื่อของลูกเต่าใน 70% แอลกอฮอล์ เพื่อศึกษาด้านมิถุนวิทยาต่อไป
4. นำเนื้อเยื่อของลูกเต่าใน 70% แอลกอฮอล์จากข้อ 3.2.3 แช่ใน 95% แอลกอฮอล์ 2 ครั้งๆ ละ 2 ชั่วโมง
5. แช่ใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง ก่อนผ่านขั้นตอนเพื่อเตรียมเนื้อเยื่อก่อนฝังลงในพาราฟิน
6. ทำการตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบ rotary microtome ด้วยความหนา $5\text{ }\mu\text{m}$ ลอยชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดได้ในอ่างลอยเนื้อเยื่อควบคุมอุณหภูมิ นำสไลด์ซ้อนชิ้นเนื้อเยื่อขึ้นเรียงน้ำทั้งบนกระดาษซับ
7. นำสไลด์เนื้อเยื่ออบให้แห้งที่ 60°C นาน 45 นาที
8. ทำการย้อมสีเนื้อเยื่อ ด้วยสี hematoxylin และ eosin
9. ศึกษาสไลด์ เนื้อเยื่อถาวรลูกเต่าทะเลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2.3 การศึกษาเนื้อเยื่อบาดแผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

(Transmission electron microscope; TEM)

1. นำชิ้นตัวอย่างล้างของเหลวออกด้วยบัฟเฟอร์ 0.1M phosphate buffer pH 7.2 แล้งคงสภาพตัวอย่างด้วย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1M phosphate buffer pH 7.2 นาน 24 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ก่อนที่จะแช่ในน้ำยาคงสภาพตัวที่สองคือ 1% osmium tetroxide (OsO_4) ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 2 ชั่วโมงแล้วล้างตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์

2. ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ตามลำดับดังนี้ 30, 50, 70, 80, 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแช่ตัวอย่างใน propylene oxide นาน 20 นาที ทำทั้งหมด 3 ครั้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วแช่ชิ้นตัวอย่างในของเหลวผสมที่มี epoxy resin อยู่กับ propylene oxide เพื่อให้ epoxy resin ค่อยๆแทรกซึมเข้าไปในตัวอย่างได้ดี แล้วทำการระเหย propylene oxide ระเหยออกให้หมด ก่อนที่จะฝังชิ้นตัวอย่าง (embedding) ลงใน pure epoxy resin

3. เมื่อ pure epoxy resin แข็งตัวให้ตัดแต่ง block ตัวอย่างให้ได้ให้ได้ความหนา 60-90 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอัลตราไมโครทอม (ultra microtome) แล้วทำการย้อมตัวอย่างด้วย 5% ยูเรนิลอะซิเตต (UO_2) ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) $_2$ ·2H $_2$ O และเลดซิเทรต $\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ·3H $_2$ O เพื่อเพิ่มความเปรียบต่าง (contrast) และตัวอย่างนำไฟฟ้าได้ดี ก่อนศึกษาตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านที่ 20 kV.

2.2.4 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากเนื้อเยื่อบาดแผลและการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธีการทดสอบด้านชีวเคมี (biochemical tests)

1. ล้างชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ต้องการศึกษาด้วยบัฟเฟอร์ 0.1M phosphate buffer pH 7.2 ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ซับให้สะอาดด้วยผ้าก๊อซที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ

2. ตัดชิ้นเนื้อด้วยกรรไกรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วบริเวณบาดแผล

3. ทำการ swab เนื้อเยื่อตัวอย่างบริเวณส่วนตัดขวางเนื้อเยื่ออย่างระมัดระวังโดยไม่ให้มีการแตะส่วนอื่นเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ แล้ว streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ได้แก่ NA และ PDA ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการเกลือในการเจริญ (Glazebrook และ Campbell, 1990ก)

4. ทำการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25°C และตรวจสอบการเจริญของจุลินทรีย์หลังการเพาะเชื้อ 24°C และทุกวันเป็นเวลา 3 วัน

5. ในการกรณีของแบคทีเรียและยีสต์ซึ่งมีการเจริญของจุลินทรีย์เป็นโคโลนีเหมือนกันจะทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการความแตกต่างด้านลักษณะ ขนาด สีของโคโลนี และการย้อมติดสีแกรมของจุลินทรีย์

6. จำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยตรวจสอบคุณสมบัติด้านชีวเคมีด้วย biochemical tests ตามหลักเกณฑ์ใน the 8th edn. of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) เช่น การใช้ น้ำตาลชนิดต่างๆ ในการเจริญ การหมัก น้ำตาล การเจริญบนอาหาร O/F การทดสอบ IMViC การย่อยสลายเจลาติน การเจริญบนอาหาร TSI และการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ urease การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ catalase การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ oxidase การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย ความต้องการเกลือในการเจริญเติบโตและความสามารถในการทนเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ ความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ความสามารถในการหมัก น้ำตาลแลคโตส เป็นต้น

2.2.5 ศึกษาและพัฒนาเทคนิคในการตรวจหาการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่คาดว่าเป็นเชื้อสาเหตุก่อโรค ด้วยวิธี *in situ* hybridisation

2.2.5.1 การตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยการตรึงบนสไลด์

1. ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 คืนโดยเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส
2. ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียแล้วทิ้งส่วนน้ำใส เก็บส่วนตะกอนเซลล์ไว้
3. ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย PBS buffer โดยการดูดไปเปิดขึ้นลงหลายครั้ง ก่อนที่จะทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์
4. ดูดส่วน PBS buffer ทิ้งไป แล้วล้างตะกอนเซลล์ดังข้อ 3. อีกครั้ง
5. ทำการ fix เซลล์ใน 4% paraformaldehyde 1 ชั่วโมง แล้วถ่าย paraformaldehyde ออกเติม 70% EtOH ปั่นไว้ 30 นาที จากนั้นเก็บเซลล์ไว้ในส่วนผสม EtOH:PBS ที่อัตราส่วน 1:1
6. หยดสารละลายเซลล์ 1 ไมโครลิตรลงบนสไลด์ ปล่อยให้แห้ง
7. ทำการดึงน้ำออกโดยใช้ ethanol series grade (50%, 80%, และ 98%) เก็บสไลด์ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน
8. สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกย่อยผนังเซลล์ด้วย lysozyme (1 mg/ml ใน 10 mM Tris-HCl pH 8.0) นาน 15 นาที และ lysostaphin (10 ug/ml ใน 10 mM Tris-HCl pH 8.0) นาน 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย ethanol series grade ก่อนทำ hybridization
9. สำหรับแบคทีเรียแกรมลบทำ hybridize กับ probe ได้โดยไม่ต้องผ่านการย่อยด้วย lysozyme

10. ปล่อยให้สไลด์แห้งแล้วเติม hybridization buffer 10 ไมโครลิตร (0.9 M NaCl; 0.02 M Tris-HCl pH 8.0; 0.01% SDS; 20% formamide) พร้อม probe ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ng/ml (ลำดับเบสของ probe ที่ใช้แสดงในตารางที่ 2) บ่มที่ 46 องศาเซลเซียส นาน 1.30 ชั่วโมง
11. ทำการล้าง probe ส่วนเกินออกด้วย washing buffer (0.225 M NaCl; 0.02 M Tris-HCl; 0.01% SDS) บ่มนาน 15 นาทีที่ 48 องศาเซลเซียส
12. ย้อมยีนโนมด้วย DAPI นาน 5 นาที

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของ probe ที่ใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

probe	ลำดับเบส	ที่มา
<i>Staphylococcus</i> spp.	5'-TCC TCC ATA TCT CTG CGC-3'	Trebesius และคณะ, 2000
<i>Vibrio</i> spp.	5'-AGG CCA CAA CCT CCA AGT AG-3'	http://bioinfo.unice.fr
(16s rRNA) EUB338	5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	Amann และคณะ, 1990

บทที่ 3 ผลการทดลอง

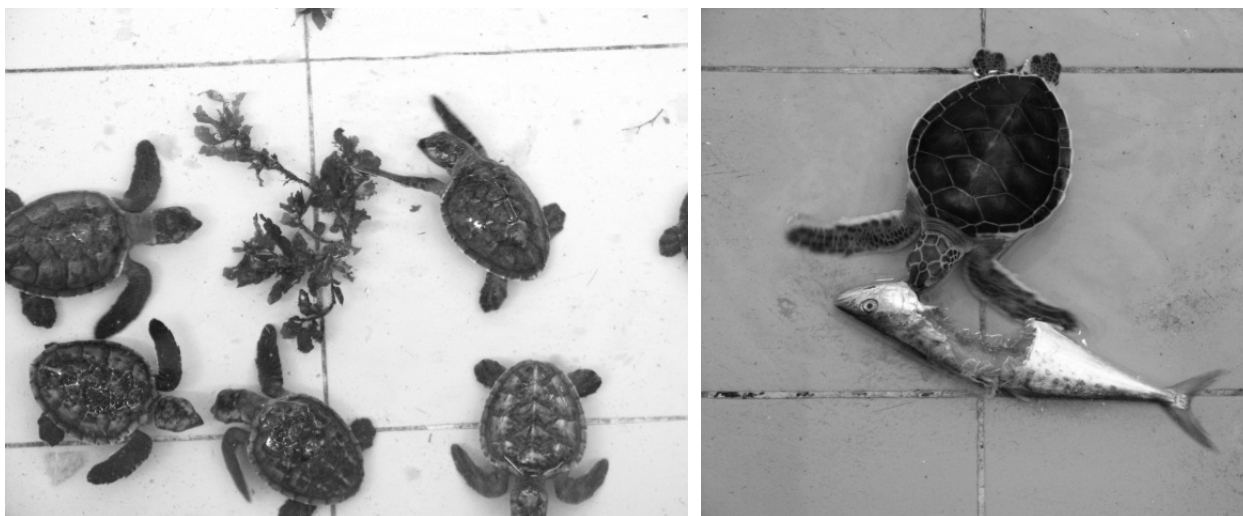
3.1 การอนุบาลลูกเต่าทะเลในศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล

การดำเนินโครงการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลของหน่วยหน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง นั้น จะทำการเก็บไข่เต่าที่แม่เต่าวางไข่ไว้ตามเกาะต่างๆ ในเขต อ. สัตหีบ ซึ่งอยู่ภายใต้การดูแลของกองทัพอากาศซึ่งไข่เต่าส่วนมากจะได้มาจากเกาะคราม จากนั้นทำการเพาะฟักไข่จนกระทั่งเกิดเป็นลูกเต่าแล้วอนุบาลไว้ที่บ่อเต่าของศูนย์อนุรักษ์ (รูปที่ 4) จนกระทั่งลูกเต่าอายุประมาณ 3-6 เดือนก็จะทำการปล่อยกลับคืนสู่ท้องทะเล

ในการอนุบาลลูกเต่านั้นจะให้อาหาร 2 ครั้งต่อวัน อาหารส่วนใหญ่เป็นเนื้อปลาข้างเหลือง และบางครั้งอาจมีเนื้อปลาหมึกผสมด้วย (รูปที่ 5) เจ้าหน้าที่จะเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อ 1 ครั้งต่อวัน โดยใช้น้ำทะเลที่บริเวณศูนย์อนุรักษ์ โดยจะทำความสะอาดบ่อหลังอาหารเข้าก่อนเติมน้ำทะเลใหม่ลงสู่บ่อเต่า นอกจากนี้หากในช่วงระหว่างวันหากน้ำทะเลในบ่ออนุบาลมีความขุ่นมาก เจ้าหน้าที่จะถ่ายน้ำออกครึ่งหนึ่งแล้วเติมน้ำทะเลกลับให้มีระดับเท่าเดิมเพื่อรักษาน้ำภายในบ่อไม่ให้มีการเน่าเสีย



รูปที่ 4 ลูกเต่าตนุและเต่ากระอายุประมาณ 1 เดือนในบ่ออนุบาลของศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล อ.สัตหีบ จ. ชลบุรี

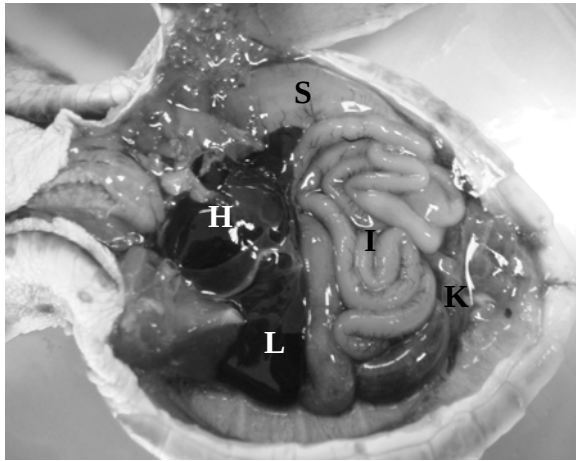


รูปที่ 5 การให้อาหารลูกเต่าตนุและเต่ากระ (ซ้าย) สำหรับายสีเหลือง และ (ขวา) เนื้อปลาข้างเหลืองสด

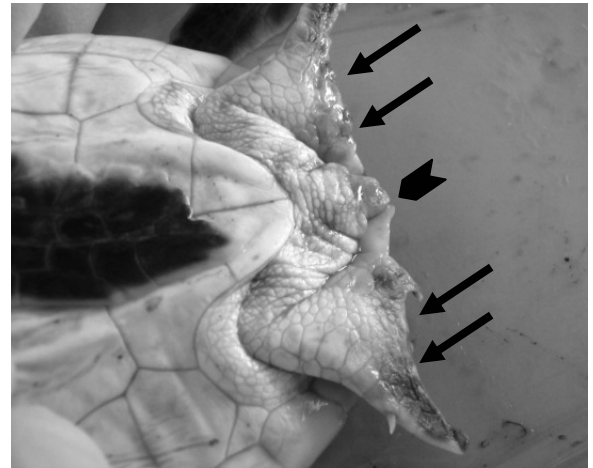
3.2 การสำรวจโรคในลูกเต่าทะเลที่ตายจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล

จากการสำรวจตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่ตายจากศูนย์อนุรักษ์ฯ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 ถึง 2550 จำนวนทั้งหมด 65 ตัว (ลูกเต่าตนุจำนวน 40 ตัวและลูกเต่ากระจำนวน 25 ตัว) อายุของตัวอย่างลูกเต่าอยู่ในช่วงระหว่าง 2-3 เดือน ความยาวและความกว้างของกระดองลูกเต่าส่วนด้านบนหรือด้านโค้งนูนมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงระหว่าง 5.7 – 6.4 เซนติเมตร และ 7.3 – 8.5 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบบาดแผลและอาการผิดปกติทางคลินิกทั้งอวัยวะภายนอก เช่น กระดอง ไรยางค์ บริเวณผิวหนัง หางและก้น และอวัยวะภายในร่างกายของลูกเต่าทะเล (รูปที่ 6 ก) เช่น หัวใจ ตับ กระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต เป็นต้น จากตรวจสอบด้วยตาเปล่าไม่พบลักษณะการติดเชื้อพยาธิปรสิต หรือไข่ของพยาธิหรือปรสิต แต่พบอาการโรคชนิดต่างๆ สรุปได้ดังนี้

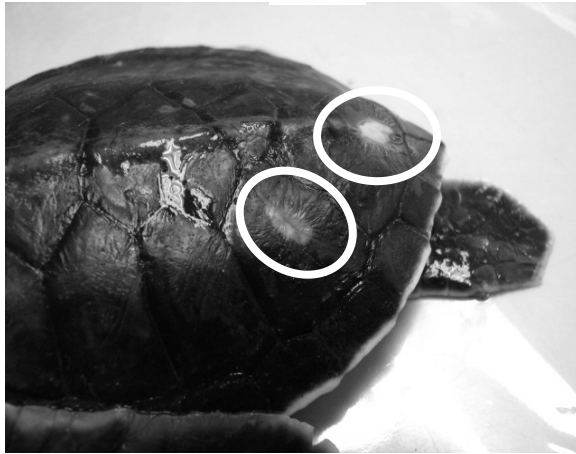
- บาดแผลเน่าเป็นหนองบนผิวหนังตามลำตัว (ulcerative dermatitis) พบมากที่ผิวหนังบริเวณลำคอ ก้นและหาง ที่ปลายครีบหน้าและครีบหลัง (รูปที่ 6ข)
- บาดแผลที่บริเวณกระดอง มีลักษณะเป็นวงขาวกินลึกเข้าไปในเนื้อกระดอง (รูปที่ 6ค)
- แผลเปื่อยและแผลอักเสบของเยื่อเมือกในช่องปาก (ulcerative stomatitis) พบลักษณะลิ้นอักเสบ มีหนองสีเหลืองคล้ายเนยอยู่บนลิ้น (รูปที่ 6 ง)
- ตับอักเสบ (necrotizing hepatitis) พบลักษณะแผลเป็นจุดสีเขียวยหรือเทากระจายอยู่ทั่วอวัยวะ บางตัวอย่างตับมีลักษณะแข็งและสีเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองปนเขียว (รูปที่ 6 จ)



ก



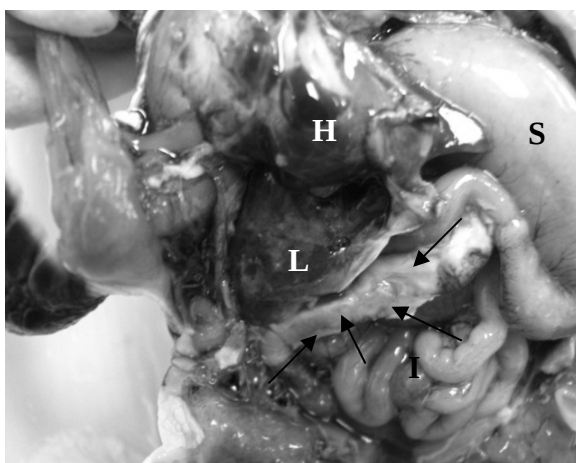
ข



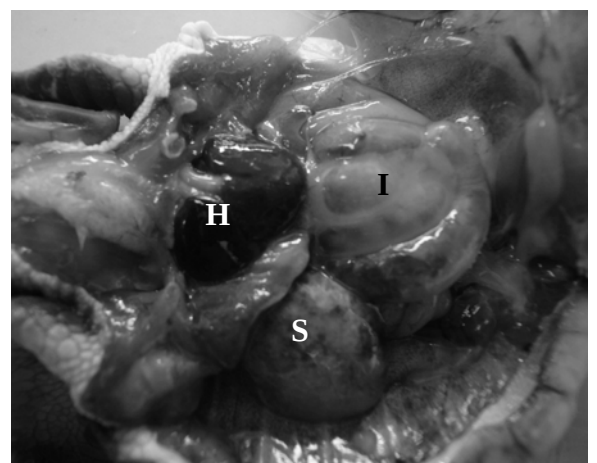
ค



ง



จ



ฉ

(คำบรรยายได้ภาพของรูปที่ 6 อยู่หน้าถัดไป)

รูปที่ 6 อวัยวะภายในและบาดแผลที่พบบนอวัยวะของลูกเต่าตนุ

(ก) อวัยวะภายในของลูกเต่าตนุอายุ 2 เดือน (H=หัวใจ; S=กระเพาะอาหาร; L=ตับ; I=ลำไส้เล็ก)
(ข) แผลเน่าที่บริเวณส่วนกันและหาง (หัวลูกศร) และบริเวณคืบหลังลูกเต่าทะเลภายในบ่ออนุบาลเดียวกันกัดแหว่ง (ลูกศร) (ค) ลักษณะวงสีขาวยที่พบบนกระดองของลูกเต่า (วงกลม) (ง) แผลอักเสบภายในช่องปาก มีหนองสีเหลืองคล้ายเนยอยู่บริเวณบาดแผล (วงกลม) (จ) ลักษณะแผลที่ตับ อวัยวะมีลักษณะแข็งและมีสีเหลืองปนเขียว ซึ่งในตัวอย่างลูกเต่านี้พบว่าการลามของโรคไปยังลำไส้เล็กบริเวณที่อยู่ติดอยู่ตับ (ลูกศร) (ในภาพ L=ตับ; H=หัวใจ; S=กระเพาะอาหาร; I=ลำไส้เล็ก) (ฉ) ลักษณะผิดปกติของกระเพาะอาหาร พบว่าอวัยวะมีของเหลวสีเหลืองและแก๊สอัดแน่นอยู่ภายใน (S) โดยโรคมีการลามไปยังลำไส้เล็ก (I) ซึ่งมีลักษณะอาการเหมือนกัน

- กระเพาะอาหารที่อักเสบมีอาการบวมพอง (gastrextasis) บางครั้งมีของเหลวสีเหลืองพร้อมแก๊สอยู่ภายใน (รูปที่ 6 ฉ)

- ลำไส้เล็กอักเสบมีอาการบวมพอง ลักษณะมีของเหลวสีเหลืองและแก๊สอัดแน่นอยู่ในภายในลำไส้ในบางครั้งพบอาการต่อเนื่องมาจากกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ลูกเต่าทะเลบางตัวอย่างที่มีอาการผิดปกติที่ตับโดยตับมีลักษณะแข็งและมีสีเหลืองปนเขียวนั้นจะมีการลามของโรคไปยังลำไส้เล็กส่วนที่อยู่ติดกับอวัยวะตับอีกด้วย ลำไส้ส่วนนี้จะมีลักษณะแข็งและมีสิ่งอุดตันแน่นอยู่ภายใน (รูปที่ 6 ค)

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่พบอาการของโรคต่างๆ ซึ่งจะเห็นว่าอาการอักเสบช่องปากเป็นหนองและลักษณะผิดปกติที่ตับนั้นมีจำนวนสูงมากกว่าโรคอื่นๆ เป็นที่น่าสนใจว่าอัตราส่วนของโรคที่เกิดในลูกเต่าในแต่ละปีจะแตกต่างกันไป เนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ของลูกเต่าที่มีอาการผิดปกติเหล่านี้ถูกเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาโดยเทคนิคทางจุลชีววิทยา และการย้อมเนื้อเยื่อต่อไป

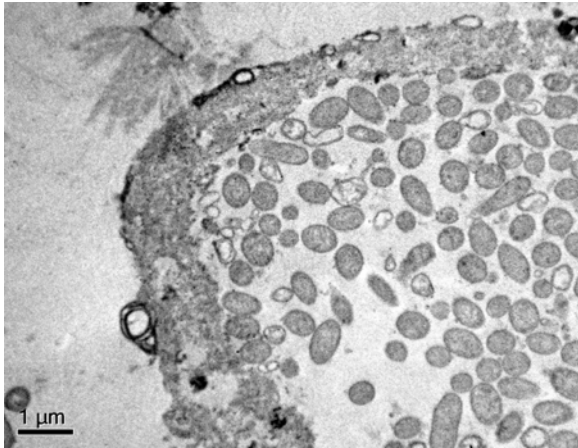
ตารางที่ 3 สรุปจำนวนตัวอย่างที่มีอาการผิดปกติและโรคในลูกเต่าตนุและกระดองจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล อ.สัตหีบ จากจำนวนทั้งหมด 65 ตัวอย่าง ระหว่างปีพ.ศ. 2548 ถึง พ.ศ. 2550

อวัยวะและลักษณะอาการที่พบ	จำนวนลูกเต่าที่พบอาการ/จำนวนลูกเต่าที่ตรวจสอบทั้งหมด			
	2548	2549	2550	Total
Ulcerative stomatitis	9/20 (45%)	6/20 (30%)	4/25 (16%)	19/65 (29.23%)
Ulcerative stomatitis + ulcerative shell	-	2/20 (10%)	-	2/65 (3.08%)
Ulcerative stomatitis + traumatic ulcerative dermatitis (skins and appendages)	-	2/20 (10%)	-	2/65 (3.08%)
Ulcerative stomatitis + gastrectasis	-	1/20 (5%)	-	1/65 (1.54%)
Ulcerative stomatitis + necrotizing hepatitis	4/20 (20%)	-	4/25 (16%)	8/65 (12.31%)
Ulcerative stomatitis + traumatic ulcerative dermatitis (skins and appendages)	-	-	1/25 (4%)	1/65 (1.54%)
+ necrotizing hepatitis				
Necrotizing hepatitis	3/20 (15%)	1/20 (5%)	6/25 (24%)	10/65 (15.38%)
Necrotizing hepatitis + enteritis or impacted intestine	-	2/20 (10%)	1/25 (4%)	3/65 (4.62%)
Necrotizing hepatitis + traumatic ulcerative dermatitis (skins and appendages)	-	-	1/25 (4%)	1/65 (1.54%)
Traumatic ulcerative dermatitis (skins and appendages)	-	3/20 (15%)	1/25 (4%)	4/65 (6.15%)
Enteritis or impacted intestine	-	-	2/25 (8%)	2/65 (3.08%)
No traumatic observed	4/20 (20%)	3/20 (15%)	5/25 (20%)	12/65 (18.46%)

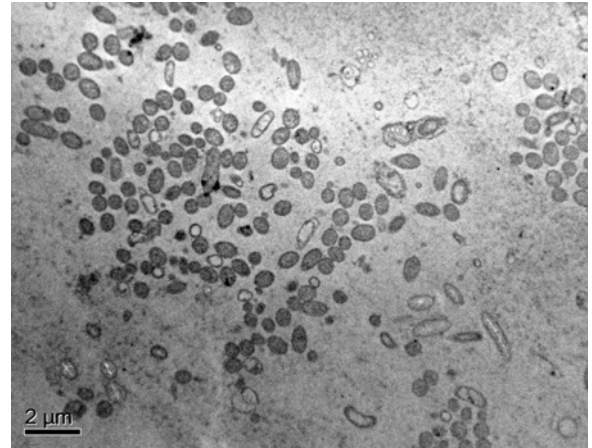
3.3 การศึกษาเนื้อเยื่ออวัยวะที่พบบาดแผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (TEM)

หลังจากที่ทำการดองเนื้อเยื่อและนำเนื้อเยื่อผ่านขั้นตอนต่างๆ แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดนั้นพบว่าอวัยวะต่างๆ ได้แก่ แผลหนองในช่องปาก แผลเน่าที่ผิวหนังส่วนหาง และก้น แผลถูกกัดที่ปลายครีบ และเนื้อเยื่อจากตับที่มีลักษณะผิดปกติ (รูปที่ 7) โดยในภาพแสดงให้เห็นถึงการติดเชื้อของจุลินทรีย์อยู่ภายในเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก

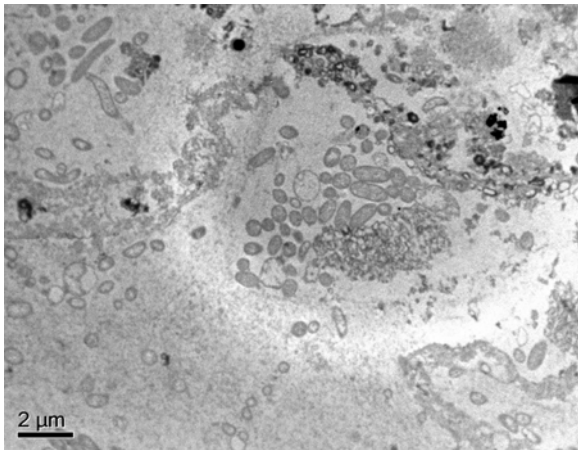
จากการเปรียบเทียบขนาดและรูปร่างของจุลินทรีย์เหล่านี้ทำให้สันนิษฐานได้ว่าจุลินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย (มีขนาดเซลล์อยู่ในช่วงประมาณ 0.5 – 2 ไมโครเมตร) โดยไม่พบการเจริญของเส้นใยของเชื้อราในทุกเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบ รูปที่ 7ก และ ข แสดงภาพถ่ายบาดแผลบนกระดองของลูกเต่าตนุจากภาพจะพบว่าแบคทีเรียรูปร่างต่างๆ ได้แก่ แบบกลม (coccus) แบบแท่ง (rod) และแบบแท่งโค้ง (curved rod) มีขนาดตั้งแต่ 0.5 – 2.5 ไมโครเมตร รูปที่ 7ค แสดงภาพถ่ายเนื้อเยื่อบาดแผลบริเวณหางและก้นพบแบคทีเรียรูปร่างแท่งและแท่งโค้งจำนวนมากอยู่ในไซโตรพลาสซึมของเซลล์ในภาพ และเซลล์ข้างเคียง รูปที่ 7ง เป็นเนื้อเยื่อบาดแผลเป็นหนองลักษณะคล้ายเนยสีเหลืองภายในช่องปาก จากภาพจะเห็นว่าแบคทีเรียรูปร่างกลมและกลมรี วัดขนาดได้ประมาณ 0.5 – 2 ไมโครเมตรเป็นจำนวนมากอยู่ในไซโตรพลาสซึมของเซลล์และเซลล์ข้างเคียง นอกจากนี้แบคทีเรียแล้วยังพบสิ่งมีชีวิตที่มีรูปร่าง ลักษณะคล้าย parasite อยู่ในเนื้อเยื่อบาดแผลผิวหนังเน่าที่บริเวณหาง (รูปที่ 7จ) รูปที่ 7ฉ เป็นเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลที่มีลักษณะแข็งและมีสีเหลืองปนเขียวในตับซึ่งจากภาพเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อในรูปอื่นๆ จะเห็นว่าเนื้อเยื่อในบริเวณนี้ถูกทำลายอย่างมากจนแทบไม่สามารถบอกขอบเขตของเซลล์ได้ ลักษณะของเซลล์ในเนื้อเยื่อมีรูปร่างที่ผิดปกติ บิดเบี้ยว และพบแบคทีเรียเป็นจำนวนมากที่บริเวณตรงกลางและด้านขวามือของรูป



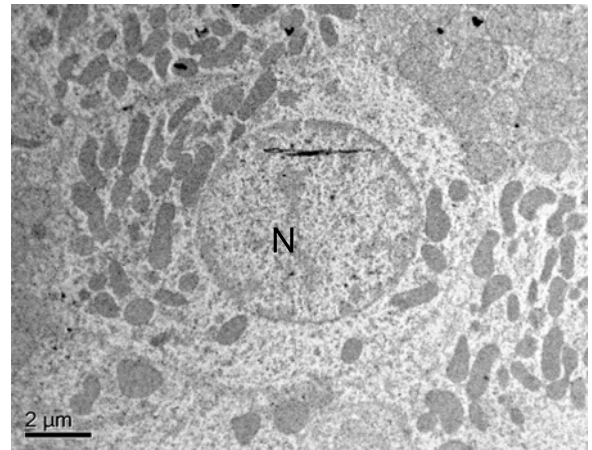
ก



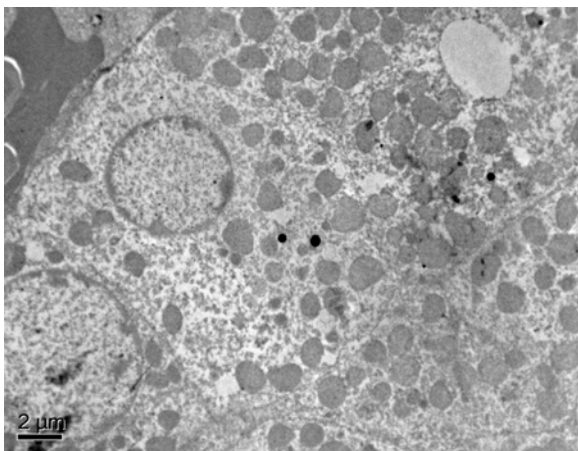
ข



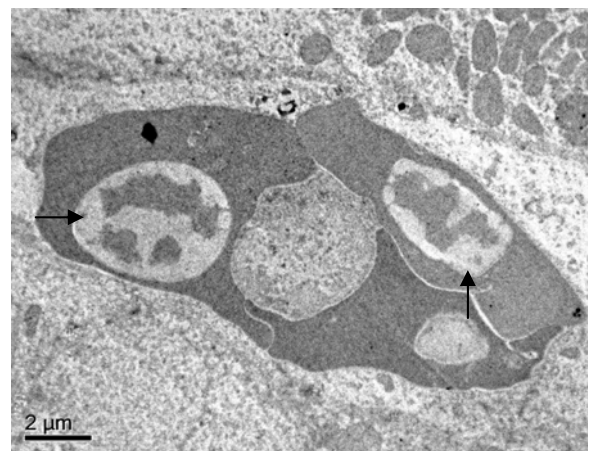
ค



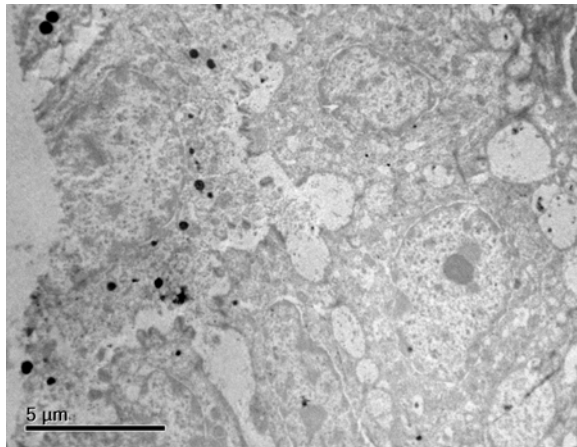
ง



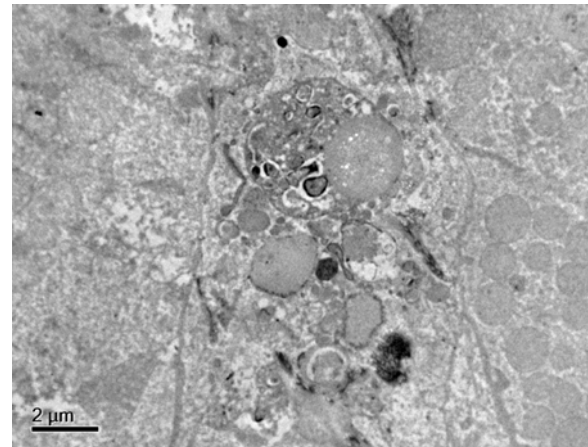
จ



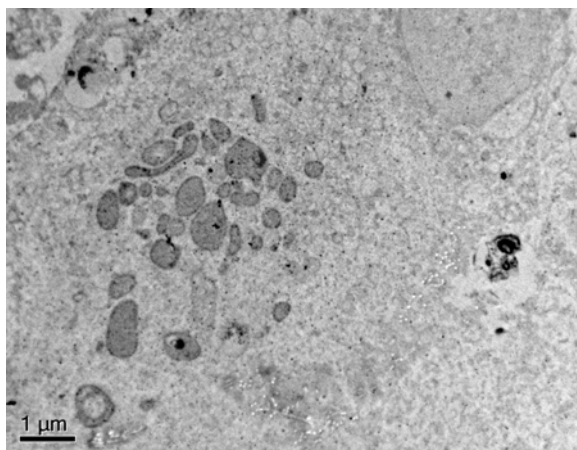
ฉ



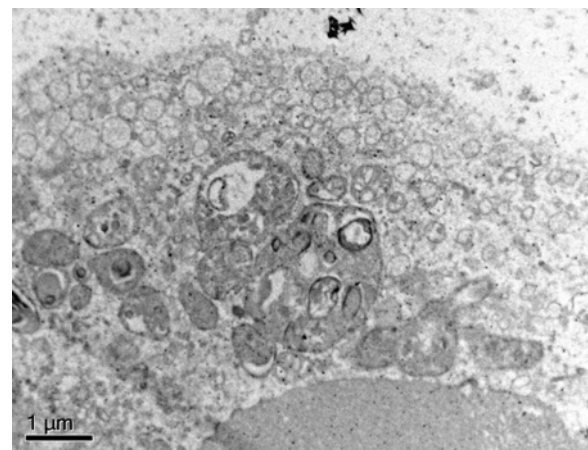
ก



ข



ค



ง

รูปที่ 7 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ที่พบบาดแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

(ก) แผลเน่าเปื่อยบนกระดอง (ข และ ค) กลุ่มแบคทีเรียชนิดรูปร่างต่างๆ ภายในบาดแผลที่กระดองในภาพ ก ภาพถ่ายที่กำลังขยายต่ำ แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียมากกว่าหนึ่งชนิดปรากฏอยู่ในเนื้อเยื่อบาดแผล (ง) เซลล์จากบาดแผลผิวหนังเน่าที่บริเวณหางพบแบคทีเรียรูปร่างท่อนโค้งยาวจำนวนมากอยู่ภายในเซลล์ (N=นิวเคลียส) (จ) เซลล์จากบาดแผลผิวหนังเน่าในช่องปากพบแบคทีเรียรูปร่างกลมขนาดประมาณ 0.5 ไมโครเมตร และขนาดประมาณ 2 ไมโครเมตรอยู่ภายในเซลล์ (ฉ) ลักษณะสิ่งมีชีวิตคล้าย parasite (ลูกศร) จากเนื้อเยื่อบาดแผลมีหนองที่บริเวณหางโดยมีการติดเชื้อของแบคทีเรียอยู่ภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อร่วมด้วย (ช) เนื้อเยื่อตับจากบริเวณบาดแผลสีเขียวเนื้อเยื่อมีลักษณะแข็งผิดปกติแสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อตายและมีการเสื่อมสลายอย่างมาก (ซ) ลักษณะเนื้อเยื่อจากตับที่มีบาดแผลเนื้อตายสีเขียวกระจายทั่วอวัยวะในบริเวณที่ไม่มีบาดแผลจากภาพจะเห็นว่าเซลล์ภายในเนื้อเยื่อมีรูปร่างผิดปกติอย่างมาก พบแบคทีเรียอยู่เป็นกลุ่มจำนวนมากอยู่ภายในเซลล์

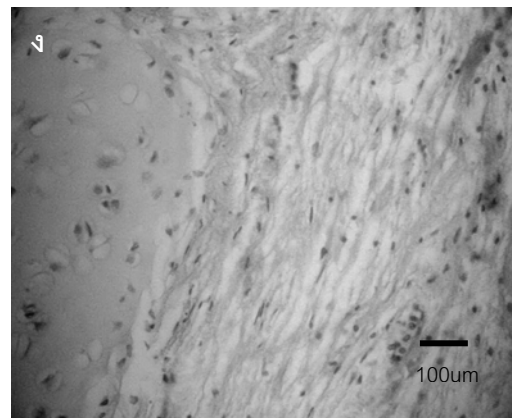
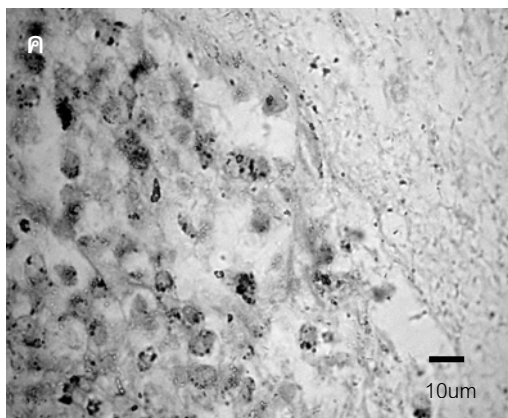
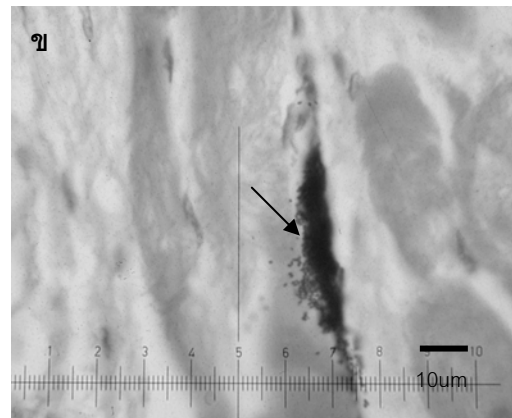
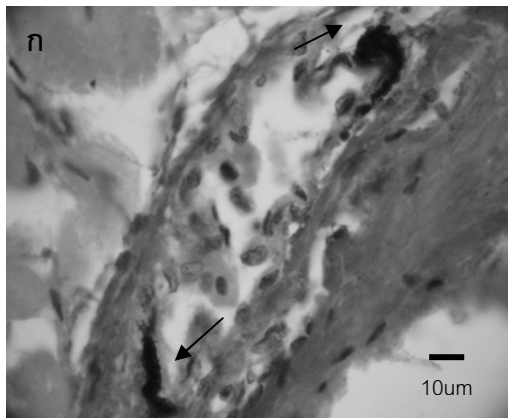
รูปที่ 7 (ต่อ)

(ณ และ ณ) แบคทีเรียชนิดต่างๆอยู่เป็นกลุ่มปรากฏอยู่ในไซโตรพลาสซึมของเซลล์จากเนื้อเยื่อตับที่มีบาดแผลจุดเขียว

3.4 การศึกษาเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ที่พบบาดแผลโดยใช้การย้อมชิ้นเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม hematoxylin และ eosin (histology)

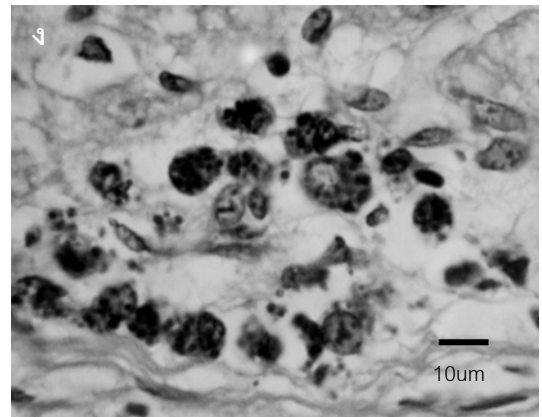
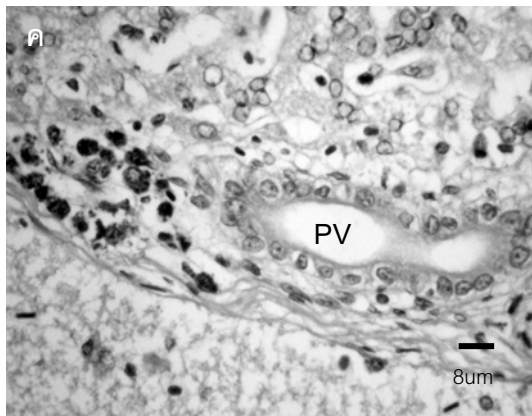
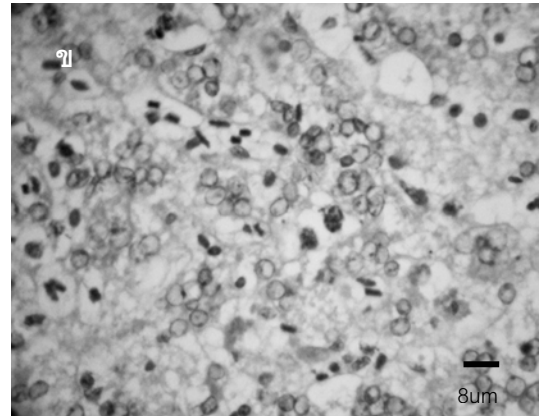
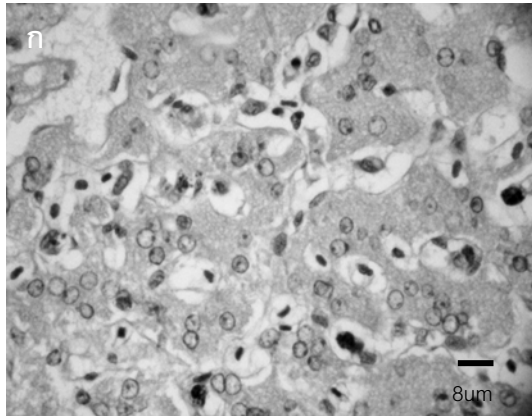
ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อของอวัยวะที่พบบาดแผลหรืออาการผิดปกติทางด้านคลินิกโดยการย้อมชิ้นเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม hematoxylin และ eosin และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อส่วนใหญ่พบกลุ่มของแบคทีเรียเจริญอยู่ภายในเนื้อเยื่อ ในกรณีของเนื้อเยื่อปากมีบาดแผลหนองสีเหลืองคล้ายเนยนั้นส่วนใหญ่จะมีลักษณะของเนื้อเยื่อคล้ายคลึงกันหมด ดังเช่น ตัวอย่างลูกเต๋าดูในรูปที่ 8 พบว่าเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลเน่ามีการเสื่อมสลายมากและพบกลุ่มเซลล์แบคทีเรียหลงเหลืออยู่ภายในเนื้อเยื่อ เมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อบริเวณรอบบาดแผลพบกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มใหญ่เจริญอยู่ในเนื้อเยื่อทั้งบริเวณเซลล์เยื่อบุผิว (รูปที่ 8 ภาพ ก) และในเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อในช่องปาก (รูปที่ 8 ภาพ ข) สำหรับภาพ ง แสดงลักษณะเนื้อเยื่อรอบๆ บาดแผลที่กำลังขยายตัว เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลในภาพ ค จะเห็นว่าลักษณะของเนื้อเยื่อในภาพ ง ยังคงอยู่ในสภาพปกติ มีการเรียงตัวของเซลล์ค่อนข้างเป็นระเบียบ นิวเคลียสย้อมติดสีทั่วทั้งนิวเคลียสและมีรูปร่างกลมปกติ ดังนั้นเนื้อเยื่อที่แสดงในภาพดังกล่าวนี้แสดงหลักฐานว่าตัวอย่างลูกเต๋าทะเลนี้ยังคงอยู่ในสภาพสดขณะเก็บตัวอย่างและผลการทดลองที่ได้จากการย้อมเนื้อเยื่อเป็นผลเนื่องมาจากอาการของโรคในลูกเต๋ามากกว่าไม่ใช่อะไรเนื่องจากการย่อยสลายของซากสิ่งมีชีวิต

ตับเป็นอวัยวะที่พบอาการผิดปกติหรือเป็นโรครองลงมาจากแผลในช่องปากซึ่งลักษณะเนื้อเยื่อเมื่อย้อมติดสี H&E แล้วทำการสังเกตเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเนื้อเยื่อจากตับของตัวอย่างมีลักษณะต่างๆ ในตัวอย่างลูกเต๋ากะตักที่ 1 (รูปที่ 9) ตับมีอาการ necrosis โดยพบมีการสะสมของไขมันอยู่ในบริเวณ necrotic cord (รูปที่ 9 ภาพ ก) มีการเรียงตัวของเซลล์ยุ่งเหยิง ไม่เป็นระเบียบ เซลล์มีแวคิวโอลอยู่ภายในไซโตรพลาสซึมมาก ในบางเซลล์มีการย้อมติดสีนิวเคลียสไม่ทั่วทั้งนิวเคลียสหรือย้อมติดสีเข้มที่ขอบนิวเคลียส นอกจากนี้ยังพบ granulocytes infiltration อยู่บริเวณข้างๆ portal vein (ภาพ ค และ ง)



รูปที่ 8 เนื้อเยื่อบาดแผลมีหนองคล้ายเนยสีเหลืองในช่องปากของลูกเต่าตนุ

ในภาพ ก และ ข แสดงให้เห็นกลุ่มแบคทีเรียที่ติดเชื้ออยู่ในเนื้อเยื่อ (ลูกศร) ภาพ ค เป็นเนื้อเยื่อจากบริเวณบาดแผลและภาพ ง เป็นเนื้อเยื่อบริเวณรอบบาดแผล



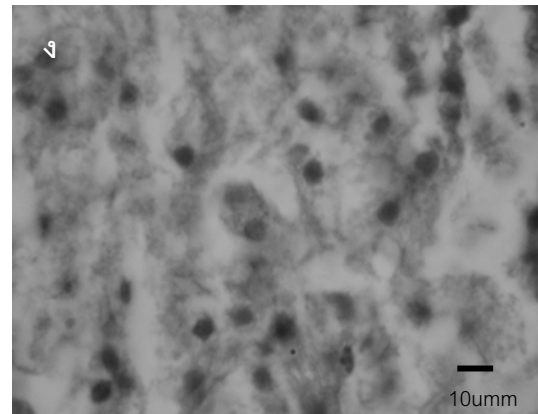
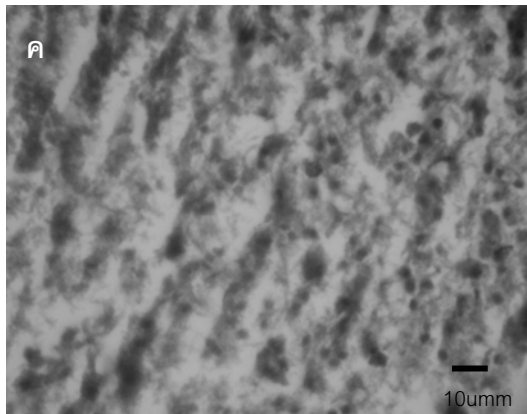
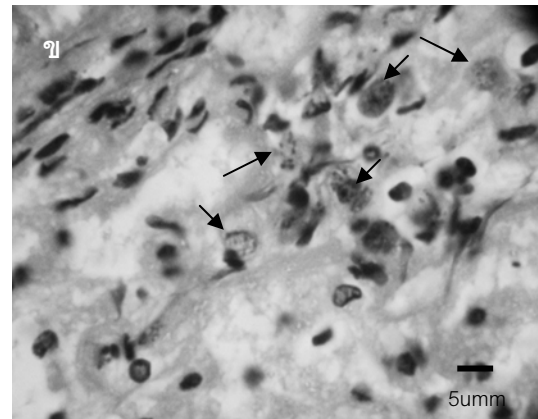
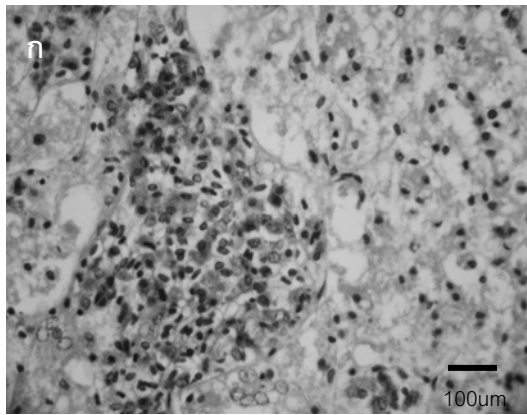
รูปที่ 9 เนื้อเยื่อ บริเวณตับของลูกเต่ากระตัวที่ 1 ย้อมด้วยสีย้อม H&E

ในภาพ ก แสดงเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลจุดดีเทาเขียวพบกลุ่มของ necrotic debris (ND) อยู่ภายในเนื้อเยื่อ ภาพ ข แสดงลักษณะ hepatocytes ใน hepatic cord บริเวณรอบบาดแผล ภาพ ค แสดง granulocytes อยู่รอบๆ portal vein (PV) ในชั้นเนื้อเยื่อตับ ภาพ ง แสดงลักษณะ granulocytes จากบริเวณเนื้อเยื่อเดียวกับภาพ ค ถ่ายที่กำลังสูงขึ้น

รูปที่ 10 แสดงภาพเนื้อเยื่อตับจากตัวอย่างลูกเต่ากระตัวที่ 2 ลักษณะตับมีอาการจุดเขียวกระจายบนอวัยวะ จากการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม H&E พบว่าบริเวณแผลมีการสลายตัวของเนื้อเยื่ออย่างมากจนไม่สามารถระบุลักษณะเซลล์หรือขอบเขตเซลล์ได้ (ภาพ ค และ ง) สำหรับเนื้อเยื่อบริเวณรอบแผลมีลักษณะคล้ายการสะสมของไฟบรินอยู่ในเนื้อเยื่อ (ภาพ ก ซ้ายมือ) hepatocytes มีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบและมีลักษณะบวมไม่สามารถบอกขอบเขตของ sinusoid ได้ ในภาพ ก พบการรวมตัวของเซลล์เป็นกลุ่มใหญ่อยู่ในบริเวณ hepatic cord นอกจากนี้ยังพบสิ่งที่มีลักษณะคล้ายพยาธิขนาดประมาณ 5 ไมครอนอยู่ในส่วนไซโทพลาสซึมของ hepatocytes โดยในภาพจะเห็นว่านิวเคลียสของเซลล์เหล่านี้ถูกเบียดไปชิดด้านหนึ่งของผนังเซลล์ โดยมี macrophages กระจายอยู่รอบบริเวณเซลล์ที่มีการติดเชื้อเหล่านี้ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะเนื้อเยื่อระหว่างเนื้อเยื่อบริเวณแผล (ภาพ ก และ ข) กับเนื้อเยื่อรอบแผล (ภาพ ค และ ง) เห็นได้ชัดว่าการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อในภาพ ก และ ข นั้นเป็นผลเนื่องจากอาการของโรคไม่ไข้เนื่องจากย่อยสลายตามธรรมชาติของซากสิ่งมีชีวิตทั้งนี้เนื้อเยื่อในภาพ ค และ ง ยังคงสภาพของเซลล์อยู่ไม่ได้มีการเสื่อมสลายเนื่องจากการเสียชีวิตด้วย

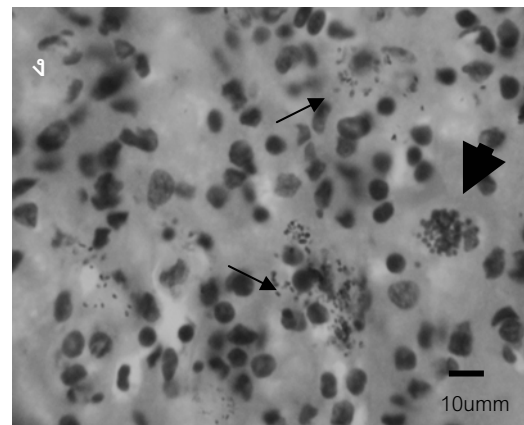
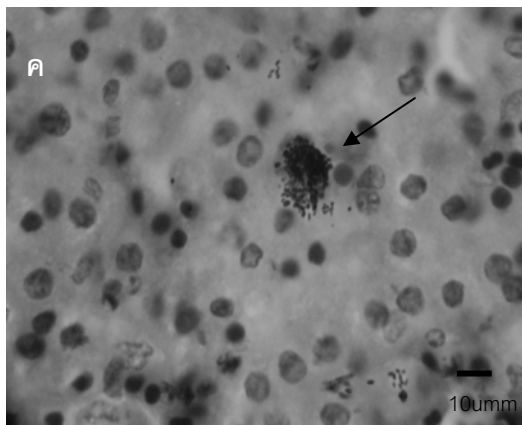
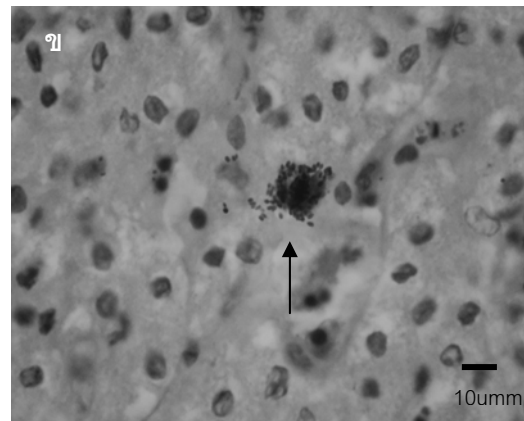
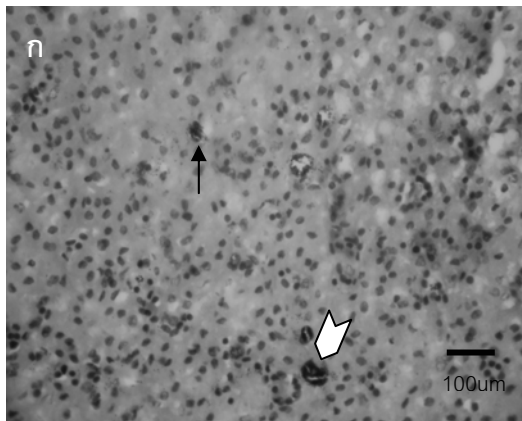
รูปที่ 11 แสดงเนื้อเยื่อตับที่ไม่ตรวจพบบาดแผลหรืออาการผิดปกติใดๆ อวัยวะมีสีแดงสด เมื่อย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม H&E และตรวจสอบภาพได้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเนื้อเยื่อมีลักษณะอาการ necrosis โดยมีการสะสมของไฟบรินอยู่ในส่วน hepatic cord นิวเคลียสของ hepatocytes มีการย้อมติดสีของนิวเคลียสสม่ำเสมอดี อย่างไรก็ตามเซลล์มีอาการบวมไม่สามารถระบุบริเวณของ sinusoid ได้ นอกจากนี้ยังพบการสะสมของ hepatocellular pigment (ภาพ ก; ลูกศรใหญ่) อยู่ทั่วเนื้อเยื่อและการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อ (ภาพ ก ข และ ค; ลูกศรเล็ก) โดยแบคทีเรียที่พบการเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อมีรูปร่างท่อน ความยาวประมาณ 1 ไมครอน (ภาพ ข และ ค) นอกจากนี้ยังพบ granulocytes อยู่ภายในเนื้อเยื่อ (ภาพ ง; หัวลูกศร) แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดของเซลล์ได้

รูปที่ 12 แสดงเนื้อเยื่อตับที่มีอาการจุดเขียว-เทากระจายทั่วอวัยวะ เมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลมีการเสื่อมสภาพมาก (ภาพ ก และ ข) โดยในภาพ ก นั้นยังคงมีร่องรอยของการสะสมไฟบรินให้เห็นอยู่ ภาพ ค และ ง เป็นเนื้อเยื่อจากบริเวณรอบบาดแผลลักษณะเซลล์และเนื้อเยื่อยังคงสภาพดีไม่เกิดการย่อยสลาย ในเนื้อเยื่อบริเวณนี้ยังสามารถเห็น sinusoid ได้ชัดเจนดี



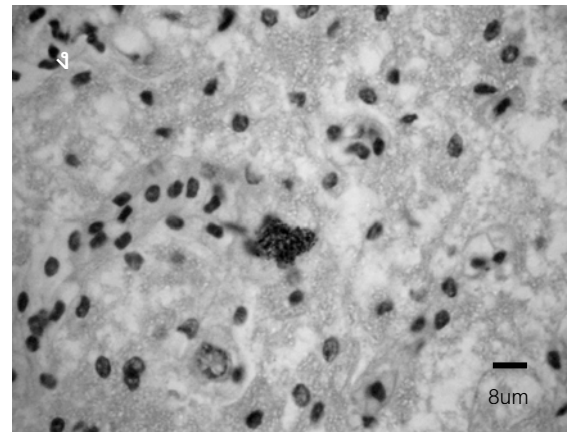
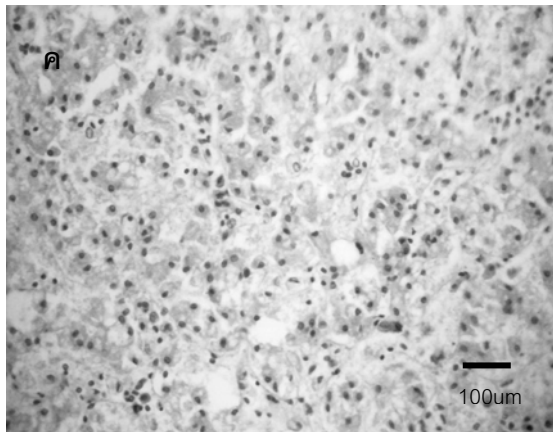
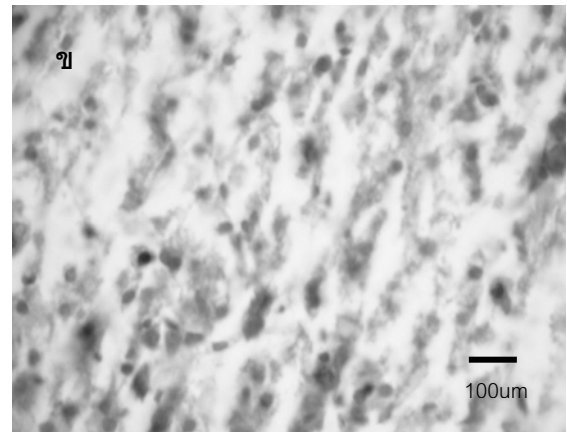
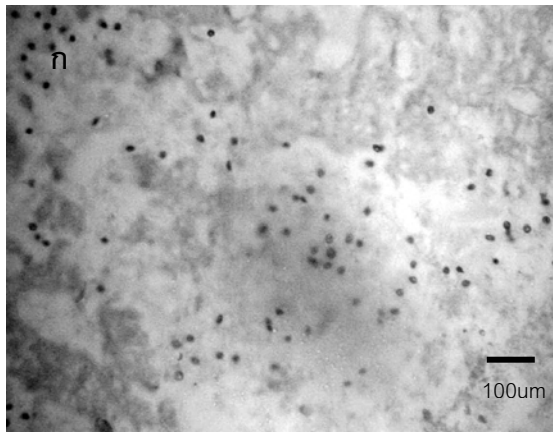
รูปที่ 10 เนื้อเยื่อบริเวณตับของลูกเต่ากระตัวที่ 2 ย้อมด้วยสีย้อม H&E เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลกับเนื้อเยื่อรอบบาดแผล

ภาพ ก แสดงเนื้อเยื่อบริเวณรอบบาดแผล ลักษณะเนื้อเยื่อมีสีแดงสดปกติ ไม่มีอาการผิดปกติใดๆ บนอวัยวะในภาพมีการสะสมของกลุ่มเซลล์ ภาพ ข เป็นภาพขยายเนื้อเยื่อที่กำลังขยายสูงในภาพมีสิ่งลักษณะคล้ายพยาธิ (ลูกศร) อยู่ในไซโตรพลาสซึมของเซลล์โดยนิวเคลียสของเซลล์ถูกเปิดไปอยู่ด้านข้าง ภาพ ค แสดงเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลจุดเขียว-เทาที่พบบนอวัยวะโดยภาพ ง เป็นการถ่ายภาพที่กำลังขยายสูงจากเนื้อเยื่อบริเวณเดียวกับภาพ ค จากภาพจะเห็นว่าเนื้อเยื่อในบริเวณนี้ถูกทำลายอย่างมากจนไม่สามารถบอกขอบเขตของเซลล์ได้ซึ่งการที่เนื้อเยื่อถูกย่อยสลายนี้น่าจะมีสาเหตุมาจากอาการที่พบบนอวัยวะไม่ใช่เกิดจากการย่อยสลายเนื้อเยื่อเนื่องจากการเสียชีวิตของลูกเต่า



รูปที่ 11 เนื้อเยื่อบริเวณตับของลูกเต่าตนุตัวที่ 1 ย้อมด้วยสีย้อม H&E

อวัยวะตับของลูกเต่าตนุตัวนี้ไม่พบบาดแผลหรืออาการผิดปกติใดๆ โดยในภาพ ก แสดงเนื้อเยื่อตับที่กำลังขยายตัวในภาพพบกลุ่มของแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในเนื้อเยื่อ (ลูกศร) และพบตะกอนสะสมของกลอบบูลิน (หัวลูกศรสีขาว) อยู่ในเนื้อเยื่อ ภาพ ข, ค, และ ง แสดงเนื้อเยื่อถ่ายที่กำลังขยายสูงในภาพพบกลุ่มแบคทีเรียที่ติดเชื้ออยู่ในเนื้อเยื่อ (ลูกศร) และมีการกระจายตัวอยู่รอบๆ นอกจากนี้ยังพบ granulocytes อยู่ในเนื้อเยื่อ (ภาพ ง; หัวลูกศรสีดำ)



รูปที่ 12 เนื้อเยื่อบริเวณตับของลูกเต่ากระตัวที่ 3 ย้อมด้วยสีย้อม H&E เปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อรอบบาดแผลกับเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผล

อวัยวะตับของตัวอย่างลูกกระนี้ มีลักษณะอาการจุดสีเขียว-เทากระจายอยู่ทั่วอวัยวะ ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมาทำการย้อมด้วยสีย้อม H&E แล้วตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์สิ่งที่พบคือ ในภาพ ก เนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลมีลักษณะถูกทำลายเหมือนตัวอย่างเนื้อเยื่อตับด้วยอาการบาดแผลเดียวกันในลูกเต่ากระตัวที่ 2 (รูปที่ 9) ภาพ ข แสดงตัวอย่างเนื้อเยื่อบาดแผลที่กำลังขยายสูง ลักษณะเนื้อเยื่อถูกทำลายมากจนไม่สามารถบอกขอบเขตของเซลล์ได้ ภาพ ค และ ง แสดงเนื้อเยื่อบริเวณรอบบาดแผล ในภาพจะเห็นว่าเนื้อเยื่อยังคงมีสภาพปกติ นิวเคลียสของเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะปกติ กล่าวคือนิวเคลียสมีการย้อมติดสีสม่ำเสมอทั่วทั้งเซลล์ รูปร่างนิวเคลียสค่อนข้างปกติเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่ออื่นที่มีอาการผิดปกติ

3.5 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อเยื่อบาดแผลจากอวัยวะต่างๆ (isolation) และการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ (identification of bacterial isolates)

เมื่อตรวจพบบาดแผลทั้งบนอวัยวะภายนอกและอวัยวะภายในของลูกเต่าทะเลตัวอย่างเนื้อเยื่อจะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งจะทำการดองในน้ำยาสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และใช้ในการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม ส่วนเนื้อเยื่ออีกส่วนจะใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ทำโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (sterile technique) ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) และ potatoes dextrose agar (PDA) ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 3% เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่อาศัยในน้ำทะเล ผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียเจริญขึ้นเป็นจำนวนมากและพบการเจริญของยีสต์หนึ่งชนิดได้แยกได้จากบาดแผลผิวหนังเน่าเท่านั้น ไม่พบการเจริญเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

หลังจากที่ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์โดยใช้หลักการของลักษณะต่างๆ และสีของโคโลนี และการทดสอบแกรมของแบคทีเรีย ผู้วิจัยได้ทำการจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้เหล่านี้เพิ่มเติมจากที่เคยทำมาในโครงการวิจัยก่อนหน้านี้โดยใช้เทคนิคการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical tests) ตามคุณสมบัติการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียใน the 8th edn. of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1974) (โปรดดูรายละเอียดคุณสมบัติที่ใช้ในการจำแนกในบทที่ 2 สารเคมีและวิธีทดลอง) จากผลการทดลองพบเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมลบและแกรมบวกซึ่งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบนี้มีรูปร่างทั้งแบบกลม ท่อน และท่อนโค้ง สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียถึงระดับยีสและสปอร์ได้จากทั้งหมด 56 isolates พบชนิดเชื้อรวมทั้งหมด 10 ชนิดด้วยกัน มีดังนี้คือ *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *Micrococcus* spp., β -haemolytic *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* group C, *Edwardsiella* spp., *Corynebacterium* spp., และ *Aureobacterium* spp. นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียอีกจำนวนหนึ่งที่ไม่สามารถจำแนกได้โดยใช้คุณสมบัติจาก the 8th edn. of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ได้ เป็นแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกรูปร่างท่อนและกลม และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อนและกลม อีกจำนวนหนึ่ง

ตารางที่ 4 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบาดแผลที่พบในตัวอย่างลูกเต่าตนุและเต่ากระ (no.=จำนวนบาดแผลที่ตรวจสอบทั้งหมด, N=จำนวนบาดแผลที่ตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้, n=จำนวน isolate ทั้งหมดที่ทำารจำแนก)

Bacterial strains	Oral cavity (no. = 19)		Liver (no. = 12)		Impacted Intestine (no. = 4)		Stomach (no. = 1)		Skin and Appendages (no. = 6)		Total	
	N	% (n=27)	N	% (n=12)	N	% (n=7)	N	% (n=1)	N	% (n=9)	N	% (n=56)
<i>Citrobacter freundii</i>	4	14.81	2	16.67	-	-	-	-	-	-	6	10.71
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	2	16.67	2	28.57	-	-	-	-	4	7.14
<i>Vibrio alginolyticus</i>	5	18.52	5	41.67	4	57.14	1	100	-	-	15	26.79
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	3.70	-	-	1	14.29	-	-	-	-	2	3.57
<i>Micrococcus</i> spp.	4	14.81	2	16.67	-	-	-	-	-	-	6	10.71
β -haemolytic <i>Staphylococcus</i> spp.	7	25.93	-	-	-	-	-	-	4	44.44	11	19.64
<i>Streptococcus</i> group C	2	7.41	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3.57
<i>Edwardsiella</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	5	55.56	5	8.93
<i>Corynebacterium</i> spp.	2	7.41	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3.57
<i>Aureobacterium</i> spp.	2	7.41	1	8.33	-	-	-	-	-	-	3	5.36

จากตารางที่ 4 จะพบว่าจำนวนของ isolates ของแบคทีเรียที่ตรวจพบแต่ละชนิดแตกต่างกันไปในอวัยวะชนิดต่างๆ โดยสามารถแยกเชื้อ *V. alginolyticus* จากเนื้อเยื่อบาดแผลได้มากที่สุด (แยกได้ 15 isolates คิดเป็น 26.79% ของจำนวนแบคทีเรียที่จำแนกได้ทั้งหมด) บาดแผลที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียคือ บาดแผลมีหนองคล้ายเนยในช่องปาก (5 isolates คิดเป็น 18.52% ของจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากช่องปากทั้งหมด) บาดแผลในตับ (5 isolate คิดเป็น 41.67% ของจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากตับทั้งหมด) ของแข็งอุดตันในลำไส้เล็ก (4 isolates คิดเป็น 57.14% ของจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้เล็กทั้งหมด) และจากของเหลวในกระเพาะอาหาร (1 isolates คิดเป็น 100% ของจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากกระเพาะอาหารทั้งหมด)

เชื้อแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อบาดแผลรองลงมาคือ เชื้อ *Staphylococcus* spp. (แยกได้ 11 isolates คิดเป็น 19.64% ของจำนวนแบคทีเรียที่จำแนกได้ทั้งหมด) เนื้อเยื่อบาดแผลที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ คือ บาดแผลเป็นหนองคล้ายเนยในช่องปาก (7 isolates คิดเป็น 25.93% ของจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากช่องปากทั้งหมด) และบาดแผลผิวหนังเน่าตามร่างกายรวมทั้งศรีษะและบริเวณหาง (4 isolates คิดเป็น 44.44% ของจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากบาดแผลผิวหนังเน่าทั้งหมด)

เชื้อแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อบาดแผลอันดับที่สามมีสองชนิด คือ *C. freundii* และ *Micrococcus* spp. (แยกได้ 6 isolates คิดเป็น 10.71% ของจำนวนแบคทีเรียที่จำแนกทั้งหมด) เชื้อทั้งสองชนิดนั้นสามารถแยกได้จากบาดแผลในช่องปากเป็นอันดับหนึ่งด้วยจำนวน isolates ที่แยกได้เท่ากัน (4 isolates คิดเป็น 14.81% ของจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากช่องปากทั้งหมด) และรองลงมาคือบาดแผลในตับด้วยจำนวน isolates ที่แยกได้เท่ากันเช่นเดียวกัน (2 isolate คิดเป็น 16.67% ของจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากตับทั้งหมด)

สำหรับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่จำแนกได้ลำดับถัดมา คือ *Edwardsiella* spp. เป็นอันดับที่สี่แยกได้เฉพาะจากบาดแผลผิวหนังเน่าเท่านั้น อันดับที่ห้าคือ เชื้อ *A. hydrophila* แยกได้จากบาดแผลในตับ และจากลำไส้เล็กที่อุดตัน เชื้อ *Aureobacterium* spp. เป็นอันดับที่หก แยกได้จากบาดแผลมีหนองคล้ายเนยในช่องปากและจากตับที่มีบาดแผล และเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้เป็นอันดับสุดท้ายมีสามชนิดด้วยกัน คือ เชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งแยกได้จากแผลมีหนองคล้ายเนยในช่องปากและลำไส้เล็ก เชื้อ *Streptococcus* group C และเชื้อ *Corynebacterium* spp. ซึ่งแยกได้จากบาดแผลมีหนองคล้ายเนยในช่องปากเท่านั้น

เมื่อพิจารณาตามจำนวน isolates ที่แยกได้จากอวัยวะชนิดต่างๆ นั้นพบว่าบาดแผลมีหนองคล้ายเนยในช่องปากสามารถแยกจำนวน isolates ได้มากที่สุด จากจำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้งหมด 19 ตัวอย่างพบทั้งหมด 27 isolates ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ *C. freundii*, *V.*

alginolyticus, *Micrococcus* spp., *Streptococcus* group C, *Corynebacterium* spp., และ *Aureobacterium* spp. ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *A. hydrophila* และ *Edwardsiella* spp.

บาดแผลในตับเป็นลำดับถัดมาจากจำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมด 12 ตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 12 isolates ประกอบด้วยเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่ *C. freundii*, *A. hydrophila*, *V. alginolyticus*, *Micrococcus* spp., และ *Aureobacterium* spp.

บาดแผลผิวหนังเน่าตามร่างกายภายนอกพบเป็นอันดับที่สามจากเนื้อเยื่อตัวอย่างทั้งหมด 6 ตัวอย่างสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 9 isolates ประกอบด้วยเชื้อ 2 ชนิดด้วยกัน คือ เชื้อ β -haemolytic *Staphylococcus* spp. และ *Edwardsiella* spp.

โรคในลำไส้เล็กพบเป็นอันดับที่สี่จากตัวอย่างทั้งหมด 4 ตัวอย่าง แยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 7 isolates ประกอบด้วยเชื้อทั้งหมด 3 ชนิด คือ *A. hydrophila*, *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* และอันดับสุดท้ายคืออาการกระเพาะอาหารอักเสบพบเพียง 1 ตัวอย่างแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 1 ตัวอย่างเช่นกัน

3.6 การพัฒนาเทคนิค fluorescence in situ hybridization (FISH) เพื่อใช้ตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อ

ผู้วิจัยได้ทำการวิจัยเพื่อพัฒนาเทคนิค FISH สำหรับใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อ วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อต้องการประยุกต์ใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลสำหรับการศึกษาโรคในสัตว์ที่ได้รับการอนุรักษ์หรือการคุ้มครองพันธุ์เช่น เต่าทะเล ผู้วิจัยทำการสืบหาข้อมูลจากวารสารที่มีการตีพิมพ์และจาก database ทาง internet เพื่อหาลำดับเบสที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็น probe ในการทดลอง จากนั้นทำการทดสอบความเหมาะสมของลำดับเบสที่ได้แต่ละตัวกับโปรแกรมทดสอบด้วยคอมพิวเตอร์ที่ได้จากเว็บไซต์ต่างๆ เช่น probe match programme ของ ribosomal database project จาก <http://rdp.cme.msu.edu/probematch> หรือ blast programme จาก <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast> แล้วคัดเลือกลำดับเบสที่มีค่าคะแนนความเหมือนของลำดับเฉพาะกับแบคทีเรียชนิดที่ต้องการมากที่สุดเพื่อใช้เป็น probe ในการทดลอง ดังเช่น รูปที่ 13 และ 14 เป็นการวิเคราะห์ความเหมาะสมของลำดับเบสสำหรับใช้เป็น probe ติดตาม *Staphylococcus aureus* และสำหรับ *Vibrio* spp. ในรูปที่ 15 และ 16

จากการทดลองโดยใช้ probe EUB338 ซึ่งเป็น probe ใช้ตรวจสอบแบคทีเรียทั่วไปโดยปรับสภาวะการทดลองที่ค่าเปอร์เซ็นต์ของฟอร์มามาไต์ในช่วงระหว่าง 0% ถึง 50 % ปรากฏว่า probe สามารถ hybridize กับบริเวณ 16s rRNA ได้ดี (รูปที่ 17 ภาพ ง) ได้ผลเป็นที่น่าพอใจดี งานวิจัยขณะนี้กำลังดำเนินการทดสอบตรวจหาแบคทีเรียที่ติดเชื้ออยู่ในเนื้อเยื่อบาดแผลซึ่งอยู่ในช่วงการปรับสภาวะสำหรับการทดลองอยู่

Ribosomal Database Project: Release 10

[Browsers](#) | [Classifier](#) | [LibCompare](#) | [SeqMatch](#) | [Probe Match](#) | [Tree Builder](#) | [Pyro](#) |
[Taxomatic](#) | [seqCart](#) | [AssignGen](#)
[RDP Home](#) | [About](#) | [Announcements](#) | [Citation](#) | [Contacts](#) | [Resources](#) | [Related Sites](#) | [Tutorials](#)

Probe Match Result

[[start over](#) | [help](#) | [options](#)]

Lineage (*click node to return it to hierarchy view*):

[Root](#) (748/920643) ; [Bacteria](#) (748/875571) ; [Firmicutes](#) (748/222467) ; ["Bacilli"](#) (747/83874) ; [Bacillales](#) (746/43512)

Hierarchy View:

family "Staphylococcaceae" (745/11794) (hits/total searched) [[list results for this node](#)]

- genus [Staphylococcus](#) (745/11425)
- genus [Jeotgalicoccus](#) (0/156)
- genus [Macrococcus](#) (0/91)
- genus [Salinicoccus](#) (0/87)
- unclassified_"Staphylococcaceae" (0/35)

Strain: View only sequences from species type strains, non-type strain sequences or both. Type strain information is provided by [bacterial taxonomy](#).
Hint: Type strains link taxonomy with phylogeny. Include type strain sequences in your analysis to provide documented landmarks.

Source: View only environmental (uncultured) sequences, only sequences from individual isolates, or both. Source classification is based on sequence annotation and the [NCBI taxonomy](#).

Size: View only near-full-length sequences (≥ 1200 bases), short partials, or both.

Quality: View only good quality sequences, suspect quality sequences, or both. Sequences were flagged (*) as suspect quality using Pintail. [[more quality detail](#)]

Note: You must start a new Hierarchy Browser session to change your taxonomy choice.

Questions/comments: rdpstaff@msu.edu

[top](#) [top](#)

รูปที่ 13 ผลการทดสอบความจำเพาะของ probe สำหรับการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* จากบริเวณ 16s rRNA อ้างอิงจาก Trebesius และคณะ (2000) โดยการใช้ Probe Match Programme

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
NZ_ACPZ01000009.1	Staphylococcus warneri L37603 contig00210, whole genome shotgun sequence >gb ACPZ01000009.1 Staphylococcus warneri L37603 contig00210, whole genome shotgun sequence	36.2	36.2	100%	0.034	100%	
	Staphylococcus hominis SK119 contig00043, whole genome shotgun sequence >gb ACLP01000023.1 Staphylococcus hominis SK119 contig00043, whole genome shotgun sequence	36.2	36.2	100%	0.034	100%	
	Staphylococcus epidermidis BCM-HMP0060 contig00074, whole genome shotgun sequence >gb ACHE01000056.1 Staphylococcus epidermidis BCM-HMP0060 contig00074,	36.2	36.2	100%	0.034	100%	
NZ_ACJA01000069.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus MN8 contig00090, whole genome shotgun sequence >gb ACJA01000069.1 Staphylococcus aureus subsp. aureus MN8 contig00090, whole genome shotgun sequence	36.2	36.2	100%	0.034	100%	

NZ_ACJC01000191.1	Staphylococcus epidermidis W23144 contig00249, whole genome shotgun sequence >gb ACJC01000191.1 Staphylococcus epidermidis W23144 contig00249, whole genome shotgun sequence	36.2	36.2	100%	0.034	100%
NZ_ACJB01000071.1	Staphylococcus epidermidis M23864:W1 contig00084, whole genome shotgun sequence >gb ACJB01000071.1 Staphylococcus epidermidis M23864:W1 contig00084, whole genome shotgun sequence	36.2	36.2	100%	0.034	100%
NZ_AASB02000198.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_TCH959 contig00368, whole genome shotgun sequence >gb AASB02000198.1 Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_TCH959 contig00368, whole genome shotgun sequence	36.2	36.2	100%	0.034	100%
NZ_ACHD01000259.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus TCH130 strain 130/ST-72 contig00392, whole genome shotgun sequence >gb ACHD01000259.1 Staphylococcus aureus subsp. aureus TCH130 contig00392, whole genome shotgun sequence	36.2	36.2	100%	0.034	100%

 [ref|NZ_ACPZ01000009.1](#) Staphylococcus warneri L37603 contig00210, whole genome
shotgun
sequence
[gb|ACPZ01000009.1](#) Staphylococcus warneri L37603 contig00210, whole genome shotgun
sequence
Length=1598

Score = 36.2 bits (18), Expect = 0.034
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TCCTCCATATCTCTGCGC 18
 |||||
Sbjct 871 TCCTCCATATCTCTGCGC 888

>  [ref|NZ_ACLP01000023.1](#) Staphylococcus hominis SK119 contig00043, whole genome
shotgun
sequence
[gb|ACLP01000023.1](#) Staphylococcus hominis SK119 contig00043, whole genome shotgun
sequence
Length=1293

Score = 36.2 bits (18), Expect = 0.034
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TCCTCCATATCTCTGCGC 18
 |||||
Sbjct 547 TCCTCCATATCTCTGCGC 564

>  [ref|NZ_ACHE01000056.1](#) Staphylococcus epidermidis BCM-HMP0060 contig00074, whole
genome
shotgun sequence
[gb|ACHE01000056.1](#) Staphylococcus epidermidis BCM-HMP0060 contig00074, whole genome
shotgun sequence
Length=1626

Score = 36.2 bits (18), Expect = 0.034
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TCCTCCATATCTCTGCGC 18
 |||||
Sbjct 719 TCCTCCATATCTCTGCGC 702

>  [ref|NZ_ACJA01000069.1](#) Staphylococcus aureus subsp. aureus MN8 contig00090, whole
genome
shotgun sequence
[gb|ACJA01000069.1](#) Staphylococcus aureus subsp. aureus MN8 contig00090, whole genome
shotgun sequence
Length=1675

Score = 36.2 bits (18), Expect = 0.034
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TCCTCCATATCTCTGCGC 18
 |||||
Sbjct 770 TCCTCCATATCTCTGCGC 753

>  [ref|NZ_ACJC01000191.1](#) Staphylococcus epidermidis W23144 contig00249, whole genome
shotgun
sequence
[gb|ACJC01000191.1](#) Staphylococcus epidermidis W23144 contig00249, whole genome shotgun
sequence
Length=1692

Score = 36.2 bits (18), Expect = 0.034
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TCCTCCATATCTCTGCGC 18
 |||||
Sbjct 866 TCCTCCATATCTCTGCGC 883

>  [ref|NZ_ACJB01000071.1](#) Staphylococcus epidermidis M23864:W1 contig00084, whole
genome
shotgun sequence
[gb|ACJB01000071.1](#) Staphylococcus epidermidis M23864:W1 contig00084, whole genome
shotgun sequence
Length=1739

Score = 36.2 bits (18), Expect = 0.034
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TCCTCCATATCTCTGCGC 18
 |||||
Sbjct 831 TCCTCCATATCTCTGCGC 814

รูปที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความจำเพาะของ probe สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย
Staphylococcus aureus จากบริเวณ 16s rRNA อ้างอิงจาก Trebesius และคณะ (2000) โดยใช้
Blast programme

Ribosomal Database Project: Release 10

[Browsers](#) | [Classifier](#) | [LibCompare](#) | [SeqMatch](#) | [Probe Match](#) | [Tree Builder](#) | [Pyro](#) |
[Taxomatic](#) | [seqCart](#) | [AssignGen](#)
[RDP Home](#) | [About](#) | [Announcements](#) | [Citation](#) | [Contacts](#) | [Resources](#) | [Related Sites](#) | [Tutorials](#)



Probe Match Result

[[start over](#) | [help](#) | [options](#)]

Display depth: Errors Allowed: **Probe:** 5'ACCACCTGCATGCGCTTT 3'
Target: 5'AAAGCGCATGCAGGTGGT 3'

Lineage (*click node to return it to hierarchy view*):

[Root](#) (4988/920643) ; [Bacteria](#) (4988/875571) ; [Proteobacteria](#) (4972/316335)
; [Gammaproteobacteria](#) (4971/128650) ; [Vibrionales](#) (4959/7615) ; [Vibrionaceae](#) (4959/7615)

Hierarchy View:

▼genus [Vibrio](#) (4231/5016) (hits/total searched) [[list results for this node](#)]

[S000000270](#) [Vibrio vulnificus](#); ATCC 29307; X74727
[S000000837](#) [Vibrio cincinnatiensis](#) (T); ATCC 35912T; X74698
[S000000839](#) [Vibrio metschnikovii](#) (T); CIP69.14T; X74711
[S000001193](#) [Vibrio nereis](#) (T); ATCC 25917T; X74716
[S000001880](#) [Vibrio shilonii](#) (T); AK-1; AF007115
[S000002053](#) [Vibrio cholerae](#); asiaticus; ATCC14035; Z21856
[S000002054](#) [Vibrio mimicus](#) (T); ATCC 33653T; X74713
[S000002215](#) [Vibrio](#) sp. Torgnes 1; AJ278426
[S000002810](#) [Vibrio cholerae](#) (T); ATCC 14035T; X74695
[S000003703](#) [Vibrio penaeicida](#); DSM 14398T; AJ421444
[S000003988](#) [Vibrio cholerae](#); CECT 514 T; X76337
* [S000004409](#) [Aliivibrio fischeri](#); NCMB 1281; X70640
[S000004811](#) [Vibrio fluvialis](#) (T); ATCC 33809T; X74703

S000004812	<i>Vibrio vulnificus</i> ; ATCC 27562 T; X76333
S000004813	<i>Aliivibrio wodanis</i> ; Y17575
S000004951	<i>Vibrio ichthyenteri</i> ; LMG 19664T; AJ437192
S000005173	<i>Vibrio cholerae</i> ; ATCC 14033; X74694
S000005174	<i>Vibrio gazogenes</i> (T); ATCC 29988T; X74705
S000005176	<i>Vibrio tubiashii</i> (T); ATCC 19109T; X74725
S000005651	<i>Vibrio lentus</i> (T); 4OM4T, CECT 5110T, DSM 13757T; AJ278881
S000005815	unidentified bacterium 4c; AF293974
S000005875	marine bacterium DPT1.1; AJ002566
S000005930	<i>Aliivibrio logei</i> ; ATCC 15382; X74708
S000006315	<i>Vibrio cholerae</i> ; ATCC 14731; X74697
S000006316	<i>Vibrio furnissii</i> ; ATCC 35016 T; X76336
S000006317	<i>Aliivibrio fischeri</i> (T); ATCC774T; X74702
S000006450	<i>Vibrio penaeicida</i> ; LMG 19663T; AJ437191
S000006752	<i>Vibrio lentus</i> ; 3OM21, CECT 5293, DSM 13759; AJ278880
S000007051	<i>Vibrio orientalis</i> (T); ATCC 33934T; X74719
S000007400	<i>Vibrio furnissii</i> (T); ATCC 350116T; X74704
S000007401	<i>Vibrio natriegens</i> (T); ATCC 14048T; X74714
S000007402	<i>Listonella pelagia</i> (T); ATCC 25916T; X74722
S000007404	<i>Aliivibrio salmonicida</i> (T); NCMB 2262; X70643
S000007850	<i>Vibrio splendidus</i> (T); ATCC 33125T; X74724
S000008029	<i>Vibrio splendidus</i> ; ATCC33789; AB038030
S000008226	<i>Vibrio vulnificus</i> ; C7184; X76334
S000008311	<i>Vibrio</i> sp. SYS6-01; AJ414132
S000008971	<i>Vibrio harveyi</i> (T); ATCC 14126T; X74706
S000008973	<i>Aliivibrio wodanis</i> (T); NVI 88/441T; AJ132227
S000009325	<i>Vibrio campbellii</i> ; ATCC 25920T; X74692
S000009720	<i>Vibrio mediterranei</i> (T); CIP 10320T; X74710
S000009721	<i>Vibrio ordalii</i> (T); ATCC 33509T; X74718
S000010324	<i>Vibrio</i> sp. Da4; AF242272
S000010404	marine bacterium DPT1.2; AJ002567
S000010467	<i>Vibrio diazotrophicus</i> (T); ATCC 33466T; X74701
S000010642	<i>Vibrio harveyi</i> ; M58172
S000010701	<i>Vibrio</i> sp. EN280; AB038024
S000010702	<i>Vibrio</i> sp. OM02; AB038029
S000011123	<i>Vibrio</i> sp. Sk1; AF242274
S000011291	<i>Vibrio navarrensis</i> (T); X74715

รูปที่ 15 ผลการทดสอบความจำเพาะของ probe สำหรับการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. จากบริเวณ 16s rRNA อ้างอิงจาก <http://bioinfo.unice.fr> โดยการใช้ Probe Match Programme

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NZ_ACKB01000032.1	Vibrio parahaemolyticus K5030 gcontig_1118352721693, whole genome shotgun sequence >gb ACKB01000032.1	40.1	40.1	100%	0.013	100%	
NZ_ACKB01000056.1	Vibrio parahaemolyticus K5030 gcontig_1118352721693, whole genome shotgun sequence >gb ACKB01000056.1	40.1	40.1	100%	0.013	100%	
NZ_ACKB01000119.1	Vibrio parahaemolyticus K5030 gcontig_1118352721679, whole genome shotgun sequence >gb ACKB01000119.1	40.1	40.1	100%	0.013	100%	
NZ_ACFO01000001.1	Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711476, whole genome shotgun sequence >gb ACFO01000001.1	40.1	40.1	100%	0.013	100%	
NZ_ACFO01000016.1	Vibrio parahaemolyticus	40.1	40.1	100%	0.013	100%	

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	AN-5034 gcontig_1113976711414, whole genome shotgun sequence >gb ACFO01000016.1 Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711414, whole genome shotgun sequence Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711458, whole genome shotgun sequence						
NZ_ACFO01000017.1	>gb ACFO01000017.1 Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711458, whole genome shotgun sequence Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711522, whole genome shotgun sequence	40.1	40.1	100%	0.013	100%	
NZ_ACFO01000043.1	>gb ACFO01000043.1 Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711522, whole genome shotgun sequence Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711448, whole genome shotgun sequence	40.1	40.1	100%	0.013	100%	
NZ_ACFO01000054.1	>gb ACFO01000054.1 Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711448, whole genome shotgun sequence	40.1	40.1	100%	0.013	100%	

>  [ref|NZ_ACKB01000032.1|](#) Vibrio parahaemolyticus K5030 gcontig_1118352721693,
whole genome
shotgun sequence
[gb|ACKB01000032.1|](#) Vibrio parahaemolyticus K5030 gcontig_1118352721693, whole genome
shotgun sequence
Length=27970

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.013
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 AGGCCACAACCTCCAAGTAG 20
|||||
Sbjct 1043 AGGCCACAACCTCCAAGTAG 1024

>  [ref|NZ_ACKB01000056.1|](#) Vibrio parahaemolyticus K5030 gcontig_1118352721679,
whole genome
shotgun sequence
[gb|ACKB01000056.1|](#) Vibrio parahaemolyticus K5030 gcontig_1118352721679, whole genome
shotgun sequence
Length=88494

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.013
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 AGGCCACAACCTCCAAGTAG 20
|||||
Sbjct 55 AGGCCACAACCTCCAAGTAG 36

>  [ref|NZ_ACKB01000119.1|](#) Vibrio parahaemolyticus K5030 gcontig_1118352721765,
whole genome
shotgun sequence
[gb|ACKB01000119.1|](#) Vibrio parahaemolyticus K5030 gcontig_1118352721765, whole genome
shotgun sequence
Length=20825

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.013
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AGGCCACAACCTCCAAGTAG 20
|||||
Sbjct 19801 AGGCCACAACCTCCAAGTAG 19820

>  [ref|NZ_ACFO01000001.1|](#) Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711476,
whole
genome shotgun sequence
[gb|ACFO01000001.1|](#) Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711476, whole
genome shotgun sequence

Length=263706

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.013
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 AGGCCACAACCTCCAAGTAG 20
|||||
Sbjct 114410 AGGCCACAACCTCCAAGTAG 114391

>  ref|NZ_ACFO01000016.1 Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711414, whole genome shotgun sequence
gb|ACFO01000016.1 Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711414, whole genome shotgun sequence
Length=413428

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.013
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus

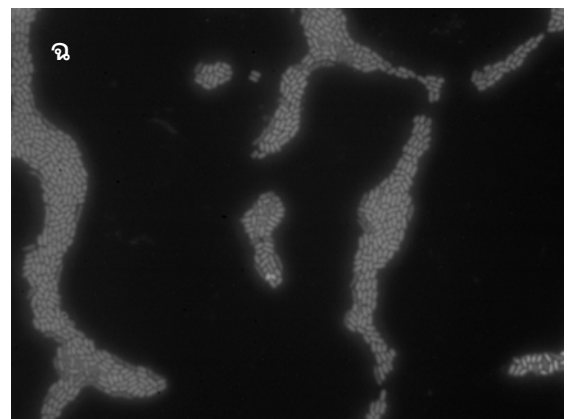
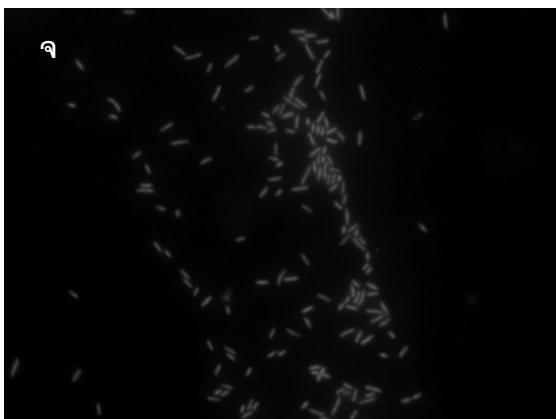
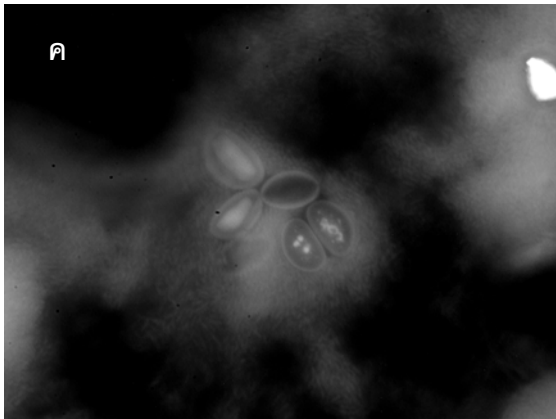
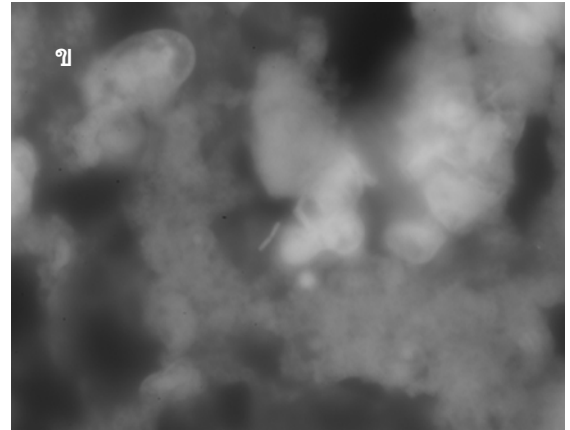
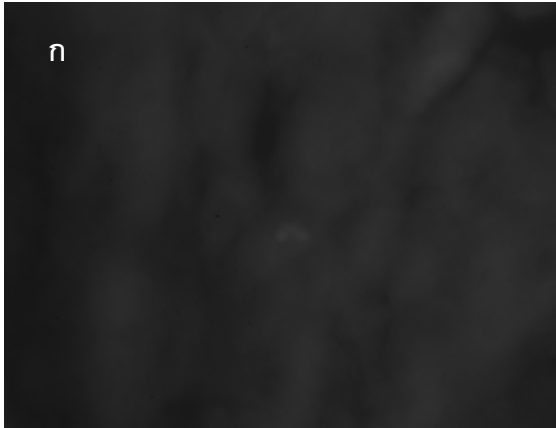
Query 1 AGGCCACAACCTCCAAGTAG 20
|||||
Sbjct 948 AGGCCACAACCTCCAAGTAG 929

>  ref|NZ_ACFO01000017.1 Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711458, whole genome shotgun sequence
gb|ACFO01000017.1 Vibrio parahaemolyticus AN-5034 gcontig_1113976711458, whole genome shotgun sequence
Length=34114

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.013
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AGGCCACAACCTCCAAGTAG 20
|||||
Sbjct 33271 AGGCCACAACCTCCAAGTAG 33290

รูปที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความจำเพาะของ probe สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio spp.* จากบริเวณ 16s rRNA อ้างอิงจาก <http://bioinfo.unice.fr> โดยใช้ Blast programme



รูปที่ 17 การใช้เทคนิค FISH ในการตรวจสอบแบคทีเรียในเนื้อเยื่อลูกเต่าทะเลตัวอย่างและแบคทีเรียที่แยกได้จากเนื้อเยื่อตัวอย่าง ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 1000x

(ก) เนื้อเยื่อที่ผ่านเทคนิค FISH โดยใช้ probe ติดตาม *Vibrio* spp. (ข) เนื้อเยื่อที่ผ่านเทคนิค FISH ในภาพ ก แล้วย้อม counterstain ด้วย DAPI ในภาพแสดงพบการติดเชื้อแบคทีเรียรูปร่างท่อน (ลูกศร)
(ค) เนื้อเยื่อที่ผ่านเทคนิค FISH โดยใช้ probe ติดตาม *Vibrio* spp. แล้วย้อม counterstain ด้วย DAPI ในภาพพบลักษณะแคปซูลของเชื้อแบคทีเรียอยู่ภายใน (กลางภาพ) (ง) เชื้อ *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากบาดแผลในตัวอย่างลูกเต่าทะเลย้อมด้วย probe EUB338 ติดฉลากด้วย FITC ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย (จ) *Vibrio* spp. ที่ได้จากการแยกเชื้อจากบาดแผลในตัวอย่างลูกเต่าทะเลย้อมด้วย probe ติดตาม *Vibrio* spp. ในภาพเป็นการแสดงการเรืองแสงเนื่องจาก DAPI (ฉ) เชื้อ *V. parahaemolyticus* อ้าวจิงในห้องปฏิบัติการ ที่ผ่านการทำ FISH ด้วย probe ติดตาม *Vibrio* spp. แล้วย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI

บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบโรคหรืออาการผิดปกติที่เกิดขึ้นในตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่ตายจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล ศูนย์ต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง อ.สัตหีบ จ. ชลบุรี การทดลองดำเนินการโดยการเก็บตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่ตายในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2548 ถึง พ.ศ. 2550 ซึ่งตายไม่เกิน 30 นาทีแล้วเก็บตัวอย่างที่ 4 องศาเซลเซียสตลอดเวลาการขนส่งสู่ห้องปฏิบัติการทำการตรวจสอบภายใน 24 ชั่วโมงหลังการตาย จากผลการทดลองที่ได้สรุปได้ว่าในตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่ตายเหล่านี้มีการติดเชื้อแบคทีเรียอยู่หลายชนิดแตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่าง พบการเจริญของยีสต์ 1 ชนิดซึ่งผู้วิจัยไม่ได้ทำการจำแนกชนิด ไม่พบร่องรอยการเจริญของรา และจากการตรวจสอบเนื้อเยื่อตัวอย่างโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและจาก histology พบสิ่งมีชีวิตลักษณะคล้ายตัวอ่อนของพยาธิติดเชื้ออยู่ภายในเนื้อเยื่อแผ่นเน่าบริเวณหางและภายในตับของลูกเต่าซึ่งได้มีรายงานถึงการติดเชื้อพยาธิอยู่บางชนิดในเต่าทะเลเช่นกัน ได้แก่ genus *Anisakis* (Oros และคณะ, 2004) แต่ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการวินิจฉัยว่าเป็นพยาธิกลุ่มใด นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบเบื้องต้นของการติดเชื้อ papillomavirus โดยใช้เทคนิค PCR และไพรเมอร์ L1C1/C2 ในบริเวณยีน L1 (Yoshikawa และคณะ, 1991) ผลการทดลองที่ได้ไม่มีการ amplify ขึ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าไม่มีการติดเชื้อของไวรัสดังกล่าว มีรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงโรคชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในเต่าทะเลทั้งที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติหรือที่มีการเลี้ยงดูอยู่ในฟาร์มหรืออะควาเรียมในประเทศต่างๆ เช่น ประเทศออสเตรเลีย (Raidal และคณะ, 1998; Glazebrook และ Campbell, 1990g; 1990x) ฮาวาย (Work และ Balazs, 1998) และในหมู่เกาะคานารี ประเทศสเปน (Oros และคณะ, 2004; Oros และคณะ, 2005) จากรายงานเหล่านี้พบว่าโรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งในเต่าทะเลซึ่งมีอัตราการเจ็บป่วยและการตายสูงจากการตรวจสอบเบื้องต้นในทั้งอวัยวะภายนอกของตัวอย่างลูกเต่ากระและตนุ ได้แก่ ผิวหนัง ครีบ กระดอง และอวัยวะภายในเช่น ช่องปาก หัวใจ กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กและใหญ่ ตับ ไต พบว่ามีลูกเต่าทั้งหมด 53 ที่มีอาการของโรคหรืออาการผิดปกติต่างๆ ได้แก่ แผลเน่ามีหนองคล้ายเนยในช่องปาก (ulcerative stomatitis) พบมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 45.83 โรคแผลเน่ามีหนองในช่องปากนี้จัดว่าเป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งในเต่าทะเลโดยจากรายงานของโรคในเต่าทะเลในต่างประเทศทั้งธรรมชาติและที่มีการเลี้ยงดูในฟาร์มหรือในอะควาเรียมก็มีการรายงานอัตราการเจ็บป่วยของโรคและการเสียชีวิตเนื่องจากโรคนี้สูงเช่นกัน (Glazebrook และ Campbell, 1990g; 1990x; Oros และคณะ 2004) โรคที่ตรวจพบมากเป็นอันดับสองในตัวอย่างลูกเต่าทะเลคืออาการเนื้อเน่าตายที่ตับ (necrotizing hepatitis) คิดเป็นร้อยละ 31.94 ซึ่งโรคนี้จัดว่าเป็นโรคที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียที่มีความสำคัญไม่แพ้ ulcerative stomatitis เนื่องจากเป็นโรคที่มีอัตราการเป็นโรค

ในลูกเต่าทะเลสูงเช่นกันโดยจากการสำรวจโรคในเต่าทะเลที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติในหมู่เกาะคานารี ประเทศสเปน พบว่าเต่ามีอัตราการป่วยของโรคนี้สูงมากเช่นกัน (Oros และคณะ, 2004) โรคที่พบมากเป็นอันดับสามคือ แผลอักเสบเน่าที่บริเวณผิวหนัง ครีบ และบนกระดูกคิดเป็นร้อยละ 12.89 โรคนี้มักพบในเต่าทะเลที่เลี้ยงอยู่ในฟาร์มที่มีการเพาะเลี้ยงสาเหตุหลักเนื่องจากการกักกัน ซึ่งจากการสังเกตของผู้วิจัยเองและจากการวิเคราะห์ของ Glazebrook และ Campbell (1990g) พบว่าหากในบ่อเพาะเลี้ยงมีจำนวนเต่าหนาแน่นมากจะทำให้มีอัตราการเกิดของโรคสูงขึ้นตามไปด้วยซึ่งเป็นไปได้ว่าจำนวนที่หนาแน่นมากทำให้สัตว์เกิดความเครียดซึ่งทำให้เกิดพฤติกรรมของการกักกันได้และแผลที่เกิดจากการกักกันนี้เป็นช่องทางของการติดเชื้อแบคทีเรียต่อไป

ผลจากการตรวจสอบตัวอย่างด้วยเทคนิคทางด้านจุลชีววิทยาและ histology แสดงให้เห็นว่ามีการเจริญของแบคทีเรียอยู่ในเนื้อเยื่อบาดแผลซึ่งผลการทดลองในตารางที่ 1 และ 2 แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างลูกเต่าบางตัวอาจมีการติดเชื้อในกระแสเลือดเกิดขึ้นด้วยโดยสันนิษฐานว่าอาจมีการติดเชื้อแบคทีเรียเริ่มแรกที่บาดแผลหนึ่งก่อนที่จะมีการเดินทางของเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่กระแสเลือดแล้วเป็นช่องทางของการแพร่กระจายเชื้อไปสู่อวัยวะต่างๆ จากจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากเนื้อเยื่อ บาดแผลพบแบคทีเรียชนิดต่างๆ ทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบมีรูปร่างทั้งที่เป็นกลม หรือเป็นท่อน จนถึงปัจจุบันนี้มีแบคทีเรีย 10 ชนิดที่ผู้วิจัยและทีมวิจัยทำการจำแนกชนิดได้มีดังนี้ *C. freundii*, *A. hydrophila*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. (β -haemolytic), *Streptococcus* group C, *Edwardsiella* spp., *Corynebacterium* spp., และ *Aureobacterium* spp. แบคทีเรียเหล่านี้มีการรายงานว่าเป็นจุลินทรีย์พหุโอกาสในการติดเชื้อ (opportunistic bacteria) หรือจุลินทรีย์ท้องถิ่น (normal flora) ในเต่าทะเลทั้งในธรรมชาติและที่มีการเลี้ยงดู (Buchanan และ Gibbons, 1974; George, 1997; Glazebrook และ Campbell, 1990a; Santoro และคณะ, 2006)

ในตารางที่ 2 แสดงชนิดของแบคทีเรียและจำนวนครั้งที่สามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อบาดแผลของตัวอย่างลูกเต่าทั้งหมดที่ได้ทำการศึกษาโดยมี *V. alginolyticus* เป็นแบคทีเรียชนิดที่สามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อบาดแผลบ่อยที่สุดโดยสามารถแยกได้จากบาดแผลเน่ามีหนองในช่องปาก (ulcerative stomatitis) แผลเนื้อเน่าตายในตับ (necrotizing hepatitis) อาการลำไส้บวมและอุดตันหรือลำไส้อักเสบ (enteritis) และในกระเพาะอาหาร ซึ่งผลการทดลองเบื้องต้นของทีมผู้วิจัยพบว่า *V. alginolyticus* เป็นแบคทีเรียหนึ่งในไม่กี่ชนิดที่ตรวจพบได้บ่อยในน้ำทะเลจากบ่อเพาะเลี้ยงบ่งบอกว่าแบคทีเรียนี้เป็นส่วนหนึ่งของแบคทีเรียท้องถิ่นในน้ำทะเลหรือในสภาพแวดล้อมของบ่อเพาะเลี้ยง Santoro และคณะ (2006) ทำการสำรวจแบคทีเรียท้องถิ่นที่อาศัยอยู่ในช่องโพรงจมูกและช่อง cloacal ของเต่าตนุที่ขึ้นมาจากไขในอุทยานแห่งชาติ Tortuguero ประเทศคอสตาริกาโดยพบว่า *V. alginolyticus* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียท้องถิ่นจำนวนหลายชนิด นอกจากนี้

ยังพบว่าเป็นแบคทีเรียท้องถิ่นในผิวหนังทั้งส่วนบริเวณเนื้องอกและผิวหนังบริเวณปกติของเต่าตนุที่อาศัยอยู่บริเวณเกาะฮาวายทั้งที่เป็นโรคเนื้องอกชนิด fibropapillomatosis และที่ไม่เป็นโรค (Aguirre et al., 1994) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสามารถแยกเชื้อ *V. alginolyticus* ได้จากกระแสน้ำที่ไหลผ่านการติดเชื้อมะเร็งของเต่าตนุที่เป็นโรคเนื้องอกชนิด fibropapillomatosis (Work และคณะ, 2003) และจากบาดแผลของเต่าทะเลชนิดต่างๆ เช่น เต่าตนุทั้งที่อาศัยในธรรมชาติและในฟาร์มเพาะเลี้ยงในประเทศออสเตรเลีย (Glazebrook และ Campbell, 1990ก; 1990ข) เต่าหัวสั้นที่พบป่วยอยู่บริเวณชายหาดหมู่เกาะคานารี (Oros และคณะ, 2005) และใน Bermuda Aquarium (Wiles และ Rand, 1987) จากข้อมูลเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคในลูกเต่าทะเลที่ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี

นอกจาก *V. alginolyticus* แล้วยังมีแบคทีเรียชนิดอื่นอีก เช่น *Micrococcus* spp. และ *Staphylococcus* spp. ที่เป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญอยู่ได้ในน้ำทะเลและในสภาพแวดล้อมทะเล แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้พบว่าเป็นแบคทีเรียท้องถิ่นอาศัยอยู่ที่บริเวณผิวหนังของเต่าตนุที่มีการเพาะเลี้ยงอยู่ในฟาร์ม (Glazebrook และ Campbell, 1990ก) ในโพรงจมูกและช่อง cloacal ของเต่าตนุที่ขึ้นมารวมตัวบริเวณอุทยานแห่งชาติ Tortuguero ประเทศคอสตาริกา (Santoro และคณะ, 2006)

สำหรับ *C. freundii* นั้นมีการรายงานว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียท้องถิ่นอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นเชื้อจุลินทรีย์ช่วยโอกาสในการติดเชื้อเต่าตนุที่มีการเป็นพยาธิ spirorchid cardiovascular fluke ในประเทศออสเตรเลีย (Raidal และคณะ, 1998) การติดเชื้อของ *C. freundii* นี้พบได้ในตับ ปอด และไตของเต่าตนุดังกล่าวโดย Raidal และคณะ (1998) สรุปว่าการติดเชื้อ *C. freundii* นี้เป็นโรคแทรกซ้อนหลังจากการติดเชื้อพยาธิซึ่งการติดเชื้อแบคทีเรียนี้ส่งผลให้เกิดโรคต่างๆในร่างกายและทำให้ตายในที่สุด ยังมีการรายงานถึงการติดเชื้อ *C. freundii* ในเต่าตนุที่ฮาวายทั้งที่เป็นโรค fibropapillomas (Aguirre และคณะ, 1994) แต่ที่ผู้วิจัยยังไม่สามารถระบุความเกี่ยวข้องของเชื้อแบคทีเรียกับการเกิดโรคในเต่าทะเล

มีรายงานถึงโรคในเต่าทะเลหลายฉบับ (Aguirre และคณะ, 1994; Raidal และคณะ, 1998; Work และคณะ, 2003) ด้วยกันที่ระบุว่าโรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นโรคแทรกซ้อน (secondary diseases) ในเต่าทะเลทั้งที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติและที่มีการเพาะเลี้ยงซึ่งเต่าทะเลที่ป่วยเป็นโรคเนื่องจากแบคทีเรียมักมีอาการของโรคอื่นด้วย เช่น โรคเนื้องอกชนิด fibropapillomatosis และการติดเชื้อพยาธิชนิดต่างๆ ซึ่ง Raidal และคณะ (1998) ตั้งสมมุติฐานว่าการที่เต่าทะเลป่วยเป็นโรคข้างต้นทำให้มีอาการของภูมิคุ้มกันลดลง (immunosuppression) ทำให้ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ง่ายขึ้นและการติดเชื้อแบคทีเรียนี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สัตว์

เสียชีวิตในที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการชันสูตรหรือผลการตรวจสอบโรคในเต่าทะเลจากต่างประเทศกับผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเห็นว่าในขณะที่งานวิจัยอื่นพบการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกับการติดเชื้อจุลินทรีย์อื่น เช่น รา ไวรัส หรือการติดเชื้อพยาธิแต่ตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่ตรวจสอบในงานวิจัยนี้กลับแต่การติดเชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการเสียชีวิตของลูกเต่าเหล่านี้มีสาเหตุหลักเนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรียโดยที่ดังที่พบในสัตว์ชนิดอื่นรวมทั้งมนุษย์ที่ในวัยทารกหรือวัยเด็กจะมีภูมิคุ้มกันต้านต่อเชื้อโรคต่างๆ ได้ต่ำกว่าวัยผู้ใหญ่หรือตัวเต็มวัยทำให้ลูกเต่าทะเลเหล่านี้ติดเชื้อแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมได้ง่ายส่งผลให้ป่วยเป็นโรคและหายจากโรคยากกว่าจึงตายในที่สุด

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคจุลชีววิทยานั้นแสดงให้เห็นว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดอยู่ในบาดแผลหนึ่งบาดแผลซึ่งลักษณะการติดเชื้อผลนี้สามารถพบได้บ่อยในรายงานการติดเชื้อแบคทีเรียสำหรับเต่าทะเลในประเทศอื่นเช่นกัน (Glazebrook และ Campbell, 1990ก; 1990ข) ได้มีผู้ตั้งสมมุติฐานไว้ว่าการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกันเหล่านี้อาจเป็นการทำงานร่วมกันหรือเสริมกันในการก่อโรค (Gorge 1997) เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดเชื้อแบคทีเรียที่มีการรายงานว่ามักแยกได้จากบาดแผลของเต่าทะเล (Gorge, 1997) ปรากฏว่าไม่มีการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Escherichia coli* และ *Pseudomonas* spp. ในตัวอย่างลูกเต่าทะเลในรายงานนี้ แสดงให้เห็นว่าลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มว่าเป็นเชื้อก่อโรคในเต่าทะเลในแต่ละท้องถิ่นอาจมีความแตกต่างกันดังนั้นในแต่ละท้องถิ่นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการตรวจสอบชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานแต่มีความสำคัญต่อการป้องกันและรักษาโรคในสัตว์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล หน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างลูกเต่าทะเลและข้อมูลต่างๆ ขอขอบคุณ ผศ. ดร. มยุรา อารีกิจเสรี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และดร. นครินทร์ กิตกำธร ภาควิชาทันตแพทยวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ช่วยให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย

ข้อเสนอแนะและปัญหาในการทำวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจโรคหรืออาการผิดปกติในตัวอย่างลูกเต่าทะเลที่เสียชีวิตจากศูนย์อนุรักษ์พันธุ์ฯ จาก จ. ชลบุรี ผู้วิจัยต้องระมัดระวังและตรวจสอบในเรื่องของการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสมกับงานวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องที่สุดทำให้ต้องเก็บตัวอย่างบ่อยครั้งมากและมี

พบว่าตัวอย่างจำนวนมากที่ไม่สามารถใช้งานได้ เนื่องจากลูกเต๋าทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงในบ่อเพาะเลี้ยงนั้นมีจำนวนมากจึงมีความลำบากพอสมควรในการตรวจสอบหาลูกเต๋าที่เสียชีวิตโดยถึงแม้ว่าจะมีการตรวจสอบหาลูกเต๋าที่เสียชีวิตในบ่อเลี้ยงอยู่อย่างสม่ำเสมอก็ตาม

นอกจากนี้ในระหว่างที่ผู้วิจัยได้รับทุนวิจัยนั้นผู้วิจัยกำลังตั้งครรภอยู่ซึ่งระยะเวลาของทุนวิจัยนี้ได้ต่อเนื่องมาถึงการเลี้ยงดูบุตรของผู้วิจัยที่กำลังอยู่ในวัยทารกทำให้ผู้วิจัยจำเป็นต้องจัดสรรเวลาเพื่อการทำวิจัยและการเลี้ยงดูบุตรในวัยทารกไปด้วย เมื่อผู้วิจัยได้ทำเรื่องขอย้ายเวลาทุนเพื่อทำการทดลองในส่วนสุดท้ายให้สำเร็จแต่ได้รับการอนุมัติให้ขยายเวลาเพียง 6 เดือน คืองานการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค FISH แต่ผลการทดลองที่ได้ยังไม่เป็นที่น่าพอใจอย่างไรก็ตามผู้วิจัยโดยความเห็นส่วนตัวยังไม่สรุปว่าเทคนิคนี้ไม่สามารถใช้ได้หรือไม่สำเร็จและผู้วิจัยยังคงมีความตั้งใจในการดำเนินการทดลองให้สำเร็จต่อถึงแม้ว่าระยะเวลาทุนจะสิ้นสุดลง เนื่องจากผู้วิจัยมั่นใจว่าจะมีแนวโน้มที่จะได้ผลสำเร็จและสามารถตีพิมพ์ผลงานในวารสารต่างประเทศที่มี Impact Factor ได้

เอกสารอ้างอิง

1. Aguirre A.A., Balazs, G.H., Zimmerman, B., Spraker, T.R. 1994. Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomatosis. J. Wildl. Dis.
2. Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172: 762-770.
3. Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edn., Williams and Wilkins, Baltimore.
4. George, R.H., 1997. Health problems and disease of sea turtles. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), The Biology of Sea Turtles. CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 363-385.
5. Glazebrook, J.S., Campbell R.S.F., 1990a. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. I. Farmed turtles. Dis. Aquat. Org. 9, 83-95.
6. Glazebrook, J.S., Campbell R.S.F., 1990b. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. II. Oceanarium-reared and wild turtles. Dis. Aquat. Org. 9, 97-104.
7. Greer, L.L., Strandberg, J.D., and Whitaker, B.R., 2003. *Mycobacterium chelonae* Osteoarthritis in a Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempi*). J. Wildl. Dis. 39, 736-741.
8. Manire, C.A., Rhinehart, H.L., Sutton, D.A., Thompson, E.H., Rinaldi, M. G., Buck, J.D., Jacobson E., 2002. Disseminated Mycotic Infection Caused by *Colletotrichum acutatum* in a Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempi*). J. Clin. Microbiol. 40: 4273– 4280.
9. Oros, J., Calabuig, P., Deniz, S., 2004. Digestive pathology of sea turtles stranded in the Canary Islands between 1993 and 2001. Vet. Rec. 155, 169-174.
10. Oros, J., Torrent, A., Calabuig, P., Deniz, S., 2005. Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). Dis. Aquat. Organ. 25, 13-24.

11. Raidal, S.R., Ohara, M., Hobbs, R.P., Prince, R.I., 1998. Gram-negative bacterial infections and cardiovascular parasitism in green sea turtles (*Chelonia mydas*). Aust. Vet. J. 76, 415-417.
12. Santoro, M., Hernandez, G., Caballero M., and Garica F, 2006. Aerobic bacterial flora of nesting green turtles (*Chelonia mydas*) from tortuguero national park, Costa Rica. J. Zoo Wildl. Med. 37, 549-552.
13. Torrent, A., Deniz, S., Ruiz, A., Calabuig, P., Sicilia, J., and Oros, J., 2002. Esophageal diverticulum associated with *Aerococcus viridans* infection in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). J. Wildl. Dis. 38, 221-223.
14. Trebesius, K., Leitritz, L., Adler, K., Schubert, S., Autenrieth, I.B., and Heesemann, J., 2000. Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotizing fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridisation. Med. Microbiol Immunol. 188, 169-175.
15. Wiles, M., Rand, T.G., 1987. Integumental ulcerative disease in a loggerhead turtle *Caretta caretta* at the Bermuda Aquarium: microbiology and histopathology. Dis. Aquat. Org. 3, 85-90.
16. Work, T.M., Balazs G.H., 1998. Causes of sea turtle mortality in Hawaii. In : Epperly S., Braun J. (Eds.), Proc. 17th Annu. Symp. Sea Turtle Biol. Conserv., March 4-8, 1997, Orlando, FL, US, Dept. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC 415, 291-292.
17. Work, T.M., Balazs G.H., Wolcott G.H., Morris, R. 2003. Bacteraemia in free-ranging Hawaiian green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. Dis. Aquat. Org. 53, 41-46.
18. Yoshikawa, H., Kawana, T., Kitagawa, K., Mizuno, M., Yoshikura, H., Iwamoto, A. 1991. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. Jpn. J. Cancer Res. 82, 524-531.

ภาคผนวก

1. ได้เสนอผลงานวิชาการ แบบโปสเตอร์ ใน 24th Annual Conference the Microscopy Society of Thailand, February 14-16, 2007. At the Golden Jubilee Building, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

2. ได้ทำการ submit manuscript เพื่อการตีพิมพ์บทความทางวิชาการในวารสารต่างประเทศไปแล้วหนึ่งครั้งในวารสาร Veterinary Microbiology แต่ได้รับการปฏิเสธอย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้นำคำแนะนำของ reviewer มาแก้ไขและปรับปรุงการดำเนินงานวิจัยโดยในช่วงนี้กำลังเตรียม manuscript เพื่อส่งพิจารณาการตีพิมพ์ใกล้เสร็จสมบูรณ์แล้วและจะส่งบทความเพื่อรับการพิจารณาการตีพิมพ์ใหม่อีกครั้งเรื่อง “Histology and microbiological investigation of bacteria-associated lesions in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) and hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) from the Sea Turtle Conservation Centre of Thailand” นอกจากนี้ผู้วิจัยจะยังคงดำเนินการทดลองในส่วนการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อบาดแผลของลูกเต่าทะเลด้วยเทคนิค fluorescence in situ hybridization (FISH) ต่อไป ด้วยความเชื่อมั่นว่าจะสามารถดำเนินการทดลองให้ได้ผลสำเร็จและเมื่อได้ผลสำเร็จผู้วิจัยจะทำการเรียบเรียงผลงานเพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารต่างประเทศต่อไป

2. จากผลการทดลองที่ได้จากโครงการนี้ผู้วิจัยได้สรุปและรวบรวมเป็นรายงานและมอบให้แก่ทางศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี ไปแล้ว ทั้งนี้ อย่างที่เป็นที่ทราบกันดีว่าการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่สาเหตุของการก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำนั้นต้องใช้เวลาทั้งนี้ทำได้ยากกว่าในสิ่งมีชีวิตที่อยู่บนบกมาก ดังนั้นงานวิจัยจึงควรต้องมีการดำเนินต่อไปเพื่อเป็นการเก็บข้อมูลอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังคงมีการติดต่อกับเจ้าหน้าที่ศูนย์ฯ เป็นระยะ ซึ่งตัวผู้วิจัยเองได้พยายามให้ข้อมูลและความรู้แก่เจ้าหน้าที่อย่างเต็มที่เพื่อที่เจ้าหน้าที่จะได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อการจัดการอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลของศูนย์ฯ ต่อไป

3. ผู้วิจัยมีแผนงานที่จะจัดโครงการให้ความรู้แก่ประชาชนทั่วไปที่สนใจเข้าเยี่ยมชมเต่าทะเลที่ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์ฯ อ.สัตหีบ โดยจะนำข้อมูลของโรคที่ตรวจพบ และเชื้อแบคทีเรียที่แยกและจำแนกได้จากบาดแผล รวมถึงตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียแสดงให้แก่บุคคลที่สนใจ ขณะนี้กำลังอยู่ในขั้นตอนการดำเนินการเพื่อขอทุนสนับสนุนการจัดโครงการอยู่