บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง แบ่งออกเป็นสัตว์ทดลอง 2 กลุ่ม คือ

ก. กลุ่มเต่าที่มีอาการทางคลินิกปกติ

ทำการสุ่มตัวอย่างเต่าบัวโตเต็มวัย (Yellow-headed Temple Turtle; *Hieremys annandalii*) จากแหล่งน้ำต่างๆ ในกรุงเทพฯ และเขตปริมณฑล (ระบุสถานที่ในรายงานภาคผนวก ค.) เลือกตัวอย่างเต่าที่ดูปกติจากการสังเกตลักษณะทางกายภาพ กินอาหาร มีพฤติกรรมที่ปกติ ไม่มีภาวะขาดน้ำ โดยประเมินตามนันทริกา (2549) แบ่งเพศผู้ และเพศเมีย เพศละ 20 ตัว แยกเพศตามลักษณะรูปร่างภายนอก โดยอ้างอิงจากข้อมูลของเพ็ญศรี (2536) โดยเลือกใช้เต่าที่มีน้ำหนักมากกว่า 5 กิโลกรัมขึ้นไป บันทึกข้อมูลน้ำหนัก และวัดความยาวเส้นตรงของกระดองหลัง (straight carapace length: SCL) เต่าทุกตัว รวมทั้งตำแหน่งของพื้นที่ที่พบเต่า ลักษณะสิ่งแวดล้อม และอุณหภูมิ รวมทั้งบันทึกเดือนที่ทำการเก็บตัวอย่าง (ภาคผนวก ก.)

ข. กลุ่มเต่าที่มี หรือแสดงอาการป่วย

ตัวอย่างเต่าบัวโตเต็มวัยที่เจ็บป่วย จากประชาชนนำมารักษาที่ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ จุฬาฯ ด้วยสาเหตุต่างๆ ในช่วงเวลาที่ทำการวิจัย (1 มีนาคม - 30 ธันวาคม 2550) โดยบันทึกตำแหน่งที่ประชาชนพบเต่า เพศ ความยาวเส้นตรงของกระดองหลัง น้ำหนัก อาการทางคลินิก/รอยโรคที่พบในเต่าทุกตัว ซึ่งจะระบุรายละเอียดและจำนวนตัวอย่างที่สำรวจได้ในรายงาน (ภาคผนวก ก.)

3.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการเจาะเก็บเลือดเต่าทั้งในกลุ่ม ก. และ ข. ในช่วงเช้าถึงบ่าย จับบังคับเต่าโดยไม่ใช้ยาหรือสารเคมีในการทำให้ซึมหรือสลบ โดยการยืดคอเต่าออก ทำการเจาะเลือดด้วยเข็มเบอร์ 21 G จากตำแหน่งเส้นเลือดดำใหญ่ที่คอ (jugular vein) เนื่องจากเป็นตำแหน่งเก็บเลือดตำแหน่งที่ไม่มีการปนเปื้อนน้ำเหลือง เพื่อลดปัจจัยที่อาจทำให้เกิดผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตได้ โดยเก็บเลือดไม่เกิน 2 มิลลิลิตร/เต่าน้ำหนัก 1 กิโลกรัม (Wilkinson, 2003) ซึ่งในการทดลองนี้จะเก็บตัวอย่างเต่าที่มีน้ำหนัก 5 กิโลกรัมขึ้นไป จึงสามารถเก็บเลือดได้ประมาณ 5 มิลลิลิตร/ตัว และทำการสังเกตอาการเต่าให้มีการฟื้นตัวที่ปกติก่อนปล่อยลงแหล่งน้ำ

ตัวอย่างเลือดของเต่าทุกตัวแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งเก็บไว้ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิดลิเธียมเฮปาริน (lithium heparin) และอีกส่วนหนึ่งเก็บในโซเดียมฟลูออไรด์ (NaF) เพื่อนำมาตรวจวัดค่ากลูโคสในเลือด เลือดที่เหลือนำมาทำการสเมียร์แผ่นเลือด (blood smear) ด้วยเทคนิค slide and coverglass method (เฉลียว, 2548) ทันที จำนวน 3 แผ่น ยกเว้นเต่าบัวเพศผู้

และเพศเมีย เพศละ 5 ตัวอย่างที่ทำการสุ่มเลือกทำการป้ายแผ่นฟิลม์เลือด จำนวน 10 แผ่น เพื่อไปย้อมสีดูปฏิกิริยาไซโตเคมีของเซลล์ (Thrall et al., 2004)

3.3 การตรวจทางโลหิตวิทยาและเคมีโลหิต

3.3.1 กลุ่มเต่าที่มีอาการทางคลินิกปกติ (กลุ่ม ก.)

3.3.1.1 การศึกษาลักษณะรูปร่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

เลือดเต่าในกลุ่ม ก. ทั้งหมด 40 ตัว ที่ได้ทำการสเมียร์เลือดแล้วจำนวน 3 แผ่น นำ 1 แผ่นมาทำการตรึงสภาพทันทีด้วย methanol (fixation) เป็นเวลา 1 นาที และย้อมด้วยสี Diff-Quick อีก 2 แผ่นทำการย้อมด้วยสี Wright's stain และสี Wright's Giemsa stain โดยมีการประยุกต์ขั้นตอนให้การย้อมสี Wright's Giemsa stain ติดดีขึ้นจากการทดลองย้อมสีก่อนในเบื้องต้น (preliminary) ดังนี้

- หยดด้วยสี Wright's stain ให้ท่วมแผ่น 3 นาที
- หยด buffer pH 7 ผสมในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ทิ้งไว้ 15 นาที
- ย้อมซ้ำด้วยสี Giemsa stain นาน 20 นาที

เลือดที่ย้อมด้วยสี Wright's Giemsa stain แล้วจึงนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Olympus, CX31, Japan) ทำการสังเกตและบันทึกลักษณะรูปร่าง แกรนูล หรือองค์ประกอบภายในต่างๆ และทำการวัดความยาวของเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดโดยใช้เส้นมาตราวัดที่เลนส์ตาของกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

3.3.1.2 การย้อมติดสีไซโตเคมีพิเศษภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

เลือดของเต่าบัวเพศผู้ และเพศเมีย เพศละ 5 ตัวอย่าง ที่มีแผ่นสเมียร์เลือดเหลืออีก 7 แผ่น จะนำไปย้อมสีไซโตเคมี พร้อมกับใช้ส่วน buffy coat ของเลือด โดยทำการแบ่งเลือดที่เก็บอยู่ในลิเธียมเฮปารินด้วย hematocrit tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ได้ชั้น buffy coat เพื่อนำมาตัดและทำ buffy coat smear บนแผ่นสไลด์ ต่อมาจึงนำมาผ่านกระบวนการตามขั้นตอนในการย้อมสีพิเศษไซโตเคมีแต่ละชนิดภายใน 1-2 ชั่วโมงหลังจากเก็บเลือด เนื่องจากจะทำให้สีติดได้ดีกว่า (เฉลียว, 2548) ดังนั้นในเต่าที่สุ่มเลือก 1 ตัวจะมีแผ่นสไลด์ที่ทำการย้อมสีทางไซโตเคมีทั้งหมด 14 แผ่น (สเมียร์เลือด 7 แผ่น และสเมียร์ buffy coat 7 แผ่น โดยย้อมสีพิเศษทั้งหมด 7 สี ย้อมพร้อมเลือดสุนัขที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวก (positive control)

1) Sudan black B: SBB (Sigma, Procedure No. 380) โดยการเตรียมสารละลาย Glutaraldehyde fixation solution โดยใส่ Reagent grade acetone 25 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย Glutaraldehyde 75 มิลลิลิตร เก็บให้พ้นแสง ที่ 2-6 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที แกว่งสไลด์เบาๆ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำแผ่นสไลด์มาจุ่มลงในสารย้อมสี Sudan black B

นาน 5 นาที นำแผ่นสไลด์ไปจุ่มในเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จุ่ม 3 ครั้ง หรือจนสีถูกชะล้างออกจนหมด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ย้อมทับด้วยสารละลาย Hematoxylin solution นาน 5 นาที จากนั้นล้างสไลด์โดยให้น้ำไหลผ่าน ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ xylene based mounting medium

2) Peroxidase : PO (Sigma, Procedure No. 391) ทำการตึงสภาพสไลด์ที่ อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ในสารละลาย Glutaraldehyde-acetone fixative solution ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 วินาที บ่มสไลด์ที่ตรึงสภาพแล้วด้วยการเติม 1% hydrogen peroxide 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลาย diaminodenzidine 1 ขวด ซึ่งผสมกับสารละลาย Trizmul working 50 มิลลิลิตร นาน 45 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 วินาที จุ่มสารละลายในสารละลาย copper nitrite นาน 2 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 วินาที จุ่มสไลด์ในสารละลาย Hematoxylin grill หมายเลข 3 นาน 8 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5 วินาที จุ่มสไลด์ในสารละลาย Scot tape water substitute working นาน 12 วินาทีล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5 วินาที จุ่มสไลด์ลงในสารละลาย grill modified EA นาน 1 นาที ล้างออกด้วยเอทานอลเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 วินาที ล้างออกด้วยเอทานอลเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 วินาที ล้างออกด้วย xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 3 วินาที ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ xylene based mounting medium

3) Acid phosphatase : AcP (Sigma, Procedure No. 181) อุ่นน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนใช้ นำสารละลาย sodium nitrate solution 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย fast garnet GBC solution 1 มิลลิลิตร นำมาคนให้เข้ากัน 2-5 นาที นำสารละลายดังกล่าวผสมกับน้ำอุ่นปริมาณ 38 มิลลิลิตร เติมสารละลาย acetate solution 5 มิลลิลิตร และสารละลาย Naphtol AS-BI acid solution ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง แล้วจึงเทลงใน coplin jar นำสไลด์แผ่นฟิลม์เลือดมาตรึงสภาพด้วย Citrate acetone formaldehyde fixation นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างน้ำเป็นเวลา 45-60 วินาที ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง แล้วนำมาแช่ในสารละลาย Naphtol AS-BI acid solution อีกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนำมาล้างในน้ำไหลนาน 2 นาที ทิ้งสไลด์ให้แห้งอย่างน้อย 15 นาทีก่อนนำมาย้อมทับด้วย methylene blue ล้างด้วยน้ำกลั่นทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ xylene based mounting medium

4) Alpha-naphthyl acetate esterase : ANAE (Sigma, Procedure No. 90) ตรึงสภาพเซลล์ในแผ่นสเมียร์เลือดด้วยสารละลาย Citrate acetone methanol fixation นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (18-26 องศาเซลเซียส) ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 20 นาที เตรียม

สารละลาย Trizmal buffer solution ที่ pH 7.6 โดยเจือจางสารละลาย Trizmal 7.6 buffer concentrate ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:9 อุ่นสารละลาย Trizmal buffer solution 50 มิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเกลือ Fast blue RR salt จำนวน 1 แคปซูล ทำการเตรียมสารละลาย alpha-naphthyl aectate esterase โดยละลายแคปซูลของสารดังกล่าวจำนวน 1 แคปซูลใน ethylene glycol monomethyl ether 2 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำสารละลาย alpha-naphthyl aectate esterase เทผสมลงในสารละลาย Trizmal buffer solution pH 7.6 ที่เติมเกลือ Fast blue RR salt แล้ว จะพบว่าสารละลายที่ได้จะมีลักษณะขุ่นเล็กน้อย จากนั้นเทลงใน coplin jar ที่หุ้มด้วยกระดาษฟรอยด์เพื่อกันแสง ทำการจุ่มสไลด์ที่ตรึงสภาพแล้วลงไปนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนาน 3 นาที จุ่มสไลด์ในสารละลาย Mayer's hematoxylin solution จากนั้นล้างออกโดยให้น้ำไหลผ่านตลอด 2 นาที ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ xylene based mounting medium

5) Alkaline phosphatase : ALP (Sigma, Procedure No.8) เตรียมสารละลายเกลือของ diazonium โดยการเติมสารละลาย sodium nitrate solution 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย Fast red violate - Alkaline solution ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 2 นาที นำสารละลายที่เตรียมได้เทผสมลงในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง (18-26 องศาเซลเซียส) จากนั้นผสมสารละลาย Naphtol AS-BI alkaline solution เพื่อเจือจางสารละลายเกลือของ diazonium ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงใน coplin jar นำแผ่นสเมียร์เลือดมาตึงสภาพด้วย Citrate acetone formaldehyde fixation ซึ่งเตรียมจากสารละลาย citrate solution 25 มิลลิลิตร acetone 65 มิลลิลิตร และ formaldehyde เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ทำการแช่ในสารละลายดังกล่าว 30 วินาที จากนั้นล้างน้ำ 45 วินาที แล้วจึงนำสไลด์มาจุ่มแช่ในสารละลายที่เตรียมไว้ นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 18-26 องศาเซลเซียส หลีกให้พ้นแสง แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 2 นาที ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง ย้อมทับด้วยสารละลาย Hematoxylin solution นาน 2 นาทีจากนั้นล้างสไลด์โดยให้น้ำไหลผ่าน ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ xylene based mounting medium

6) Periodic acid – Schiff : PAS (เฉลียว, 2548) ตั้งแผ่นสเมียร์เลือดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วจึงทำการตรึงสภาพเซลล์ด้วย absolute methanol 10 นาที ล้างในน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง แช่ใน periodic acid 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง และบ่มใน Schiff's reagent 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างใน potassium metabisulfite-water 2 ครั้ง ครั้งละ 15 วินาที ต่อมาจึงนำมาแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที และย้อมด้วยสี methyl green 8 นาที สุดท้ายจึงล้างด้วยน้ำไหลผ่านตากแห้ง แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ xylene based mounting medium

7) Toluidine blue (TB) (อัจฉริยา และคณะ, 2549) ทำการตรึงสภาพเซลล์ในแผ่นสเมียร์เลือดด้วย absolute methanol นาน 1 นาที ปล่อยให้สไลด์แห้ง จึงนำแผ่นสไลด์มาจุ่มลงในสี toluidine blue นาน 1-2 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกโดยการผ่านน้ำไหล ตากให้แห้ง จึงนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.3.1.3 การศึกษาลักษณะ และโครงสร้างอย่างละเอียด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ในการศึกษากล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแต่ละชนิด จะจัดส่งตัวอย่างเต่าบัวเพศผู้และเต่าบัวเพศเมีย เพศละ 2 ตัวอย่าง

ก) การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

ส่งทั้งตัวอย่างเลือด และตัวอย่างที่เป็น buffy coat โดยใช้ hematocrit tube ที่ใช้ปั่นหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Pack cell volume) ใส่ลงใน 1% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer 10 มิลลิลิตร ที่ 4 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เพื่อทำการตรึงสภาพเซลล์เม็ดเลือดทันทีที่เก็บตัวอย่างเลือดได้ แล้วเตรียมตัวอย่างต่อไปตามวิธีของรุจิพร (2541) และอ่านด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราด (JEOL, JSM-5410, Japan) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการสังเกตเม็ดเลือดทั้งหมด พิจารณาความเป็น uniformity ของเม็ดเลือดอย่างน้อย 100 เซลล์ และบันทึกลักษณะสามมิติและพื้นผิวของเม็ดเลือดแต่ละชนิด ชนิดละ 10 เซลล์

ข) การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM)

ส่งทั้งตัวอย่างเลือด และตัวอย่างที่เป็น buffy coat โดยใช้ hematocrit tube ที่ใช้ปั่นหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ใส่ลงใน 2.5% glutaraldehyde ใน phosphate buffer แช่ที่ 4 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 วัน ส่งตัวอย่าง ทำกระบวนการตามวิธีของ Flegler et al. (1995) และอ่านด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องผ่านที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (JEOL, JEM-2100, Japan) และศูนย์กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องผ่าน ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล (JEOL, JEM-1230, Japan) โดยทำการสังเกตและบันทึกลักษณะของเม็ดเลือดทั้งหมด ศึกษาโครงสร้างนิวเคลียส แกรนูล และปริมาณขององค์ประกอบภายในต่างๆ และทำการวัดความกว้าง-ยาว (maximum–minimum lengths) ของเม็ดเลือดแต่ละชนิด ชนิดละ 2-10 เซลล์

3.3.1.4 **การศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา** (Complete blood count; CBC)

ในการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา และเคมีโลหิต ใช้ตัวอย่างเลือดเต่าทั้ง 40 ตัว

ก) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Pack cell volume; PCV) ด้วยวิธี microhematocrit method โดยการนำเลือดมาใส่ใน hematocrit tube และปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นก็นำมาวัดอ่านค่า PCV ด้วย microhematocrit reader อ่านค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ (%)(Thrall et al., 2004)

ข) ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hemoglobin concentration; Hb) ด้วยวิธี Cyanmethemoglobin method เริ่มด้วยดูดน้ำยา Drabkin's reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และดูดเลือด 2 ไมโครลิตร ใส่ลงไปเขย่าหลอดให้เลือดผสมกันด้วย vertex mixer แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อนำนิวเคลียสออกก่อนใส่ลงในหลอด cuvetle ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอ่านค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินจากสูตร

ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (g/dL) ในตัวอย่าง

$$= \frac{\text{OD.ตัวอย่าง} \times \text{ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในสารละลายมาตรฐาน}}{\text{OD. มาตรฐาน}}$$

โดยที่ห้องปฏิบัตินี้การค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในสารละลายมาตรฐาน = 14.35 g/dL

(ข้อมูลจากห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ค) การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (TRBC count:) โดยดูดเลือดให้ถึงขีด 0.5 ของ RBC pipette จากนั้นดูดน้ำยา Natt – Herrick's solution ให้จนถึงขีด 101 เขย่าเบาๆ นาน 1 นาที จะได้สารละลายเม็ดเลือด 1:200 จากนั้นนำไปหยดใน Hemocytometer หรือ Neubauer counting chamber โดยทิ้งไว้สักครู่ก่อน เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดอยู่นิ่ง การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงให้นับที่หัวกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 40x โดยนับจากสี่เหลี่ยมจตุรัส 5 ช่อง (medium size square) ซึ่งเม็ดเลือดแดงจะไม่ติดสี นำจำนวนที่นับได้คูณด้วย 10,000 จะได้ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงต่อ 1 ไมโครลิตร (Thrall et al., 2004)

ง) ค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง (RBC indices) มี 3 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ประโยชน์ในการแยกชนิดของโลหิตจาง (Thrall et al., 2004) ได้แก่

- ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (Mean corpuscular volume; MCV) โดยคำนวณจากสูตร

$$\frac{\%PCV \times 10}{\text{RBC count } (10^6/\mu l)} = \text{MCV (femtoliter, fL)}$$

- ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular hemoglobin concentration; MCHC) โดยคำนวณจากสูตร

$$\frac{\text{Hb (g/dL)} \times 100}{\%\text{PCV}} = \text{MCHC (g/dL)}$$

- ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงหนึ่งเม็ด (Mean corpuscular hemoglobin; MCH) โดยคำนวณจากสูตร

$$\frac{\text{Hb (g/dL)} \times 10}{\text{RBC count } (10^6/\mu l)} = \text{MCH (pictogram, pg)}$$

จ) การนับจำนวนเรติคูโลไซต์ (reticulocyte; %) โดยใช้สี New Methylene Blue stain (NMB) โดยวิธี wet preparation คือ หยดเลือด 1 หยดผสมกับ สี NMB หยด ผสมในเข้ากันในหลอดแก้วขนาดเล็ก รอ 15-20 นาที ดูดมาสเมียร์เป็นแผ่นเลือดบางบนสไลด์ ตากให้แห้ง นับแยกร้อยละของเรติคูโลไซต์จากเม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์ เรติคูโลไซต์ที่ติดสีเป็นกลุ่ม (distinct aggregate reticulum) และมักอยู่รอบนิวเคลียสนับเป็น aggregate reticulocyte ส่วนเรติคูโลไซต์ที่ติดสีเป็นจุดเล็กๆ นับเป็น punctuate reticulocyte แล้วนำมาคำนวณดังนี้ % reticulocyte = จำนวนเรติคูโลไซต์ชนิดนั้นที่นับได้ x 0.1 (เฉลียว, 2548)

ฉ) การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (TWBC count:) และจำนวนทรอมโบไซต์ ทำตามวิธีของ McCracken (2005) โดยใช้ RBC pipette และสาร Natt and Herrick's solution เช่นเดียวกันกับการนับเม็ดเลือดแดง โดยนับเม็ดเลือดขาว และทรอมโบไซต์ร่วมกันใน Hemocytometer เนื่องจากแยกกันได้ยาก โดยเซลล์ทั้งสองจะติดสีน้ำเงินเข้ม หรือเห็นเป็นแกรนูลอัดแน่นอยู่ในไซโตพลาสซึม ทำการนับใน counting chamber ในสี่เหลี่ยมจตุรัสทั้ง 9 ช่อง แล้วคำนวณจำนวนรวมของเม็ดเลือดขาวและทรอมโบไซต์จากสูตร

TWBC + thrombocyte count^1/ µL = (จำนวนทั้งหมดที่นับได้ของ WBCs และทรอมโบไซต์ ทั้งหมด 9 ช่อง + 10% ของจำนวนทั้งหมดที่นับได้) x 200

เมื่อทำการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว ทำการนับจำนวนทรอมโบไซต์ที่พบต่อการพบเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์ ในแผ่นสเมียร์เลือด ซึ่งนำมาใช้คำนวณได้ทั้งค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดและจำนวนทรอมโบไซต์ดังนี้

Thrombocyte count^2 (cells/ µL) =

$$\frac{\text{TWBC+ thrombocyte count}^1 \times \text{จำนวนทรอมโบไซต์ที่พบต่อการพบเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์}}{\text{จำนวนทรอมโบไซต์ที่พบ} + 100}$$

โดย TWBC count (cells/ µL) = (TWBC+ Thrombocyte count^1) - Thrombocyte count^2

ช) การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (Differential count) และจำนวนจริงของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด (absolute count) นำแผ่นฟิล์มเลือด ที่ย้อมด้วยสี Wright's Giemsa stain ทำการนับเม็ดเลือดขาวทั้งหมด 100 เซลล์ โดยแยกแยะชนิด ภายใต้เลนส์ 100x ตามวิธีของ Campbell and Ellis (2007) ซึ่งได้ค่าเป็นร้อยละ แล้วนำมาคำนวณเป็นค่าจำนวนจริง (absolute) จากสูตร

$$\text{ค่าจำนวนจริงของเม็ดเลือดขาวชนิดใดชนิดหนึ่ง} = \frac{\text{ค่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวนั้น} \times \text{TWBC}}{100}$$

ซ) การตรวจหาปรสิตในเลือด (blood parasite; cells/ slide) ทำการนับปรสิตที่พบในเลือดจากแผ่นสเมียร์เลือดที่ย้อมด้วยสี Wright's Giemsa stain โดยทำการตรวจทั่วทั้งแผ่นสไลด์

3.3.1.5 การศึกษาค่าทางเคมีโลหิต

นำตัวอย่างเลือดเต่าทั้ง 40 ตัว ที่เก็บไว้ด้วยสารกันแข็งตัวของเลือดชนิด lithium heparin มาปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที ภายใน 4-6 ชั่วโมง (Metin et al., 2006) และนำพลาสม่าที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่าทางเคมีโลหิต โดยการใช้เครื่องตรวจทาง spectrophotometer (Reflotron® plus, Roche, Germany) ซึ่งให้หน่วย SI units ในการตรวจค่าการทำงานของเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), glucose, uric acid, blood urea nitrogen, calcium, phosphorus และ creatinine ในพลาสม่า ส่วนค่า total protein, albumin, globulin วิเคราะห์ด้วยเครื่อง protein electrophoresis (ส่งตรวจห้องปฏิบัติการเอกชน) แล้วบันทึกข้อมูล

3.3.2 กลุ่มเต่าที่มี/หรือแสดงอาการป่วย (กลุ่ม ข.)

นำเลือดที่ได้ในเต่าป่วยแต่ละตัวที่ได้ มาทำการศึกษาเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 3.3.1.4 (การศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา) และ 3.3.1.5 (การศึกษาค่าทางเคมีโลหิต)

3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ (Statistic data analysis)

ความกว้าง-ยาว (maximum–minimum lengths) ของเม็ดเลือดแต่ละชนิด นำมาคำนวณค่า mean, variance และ Standard Deviation (SD) ทั้งตัวผู้และตัวเมีย

คำนวณหาค่า mean, variance และ standard deviation (SD) โดยใช้โปรแกรม SPSS® for Window™ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $p<0.05$ โดยวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวปกติของข้อมูล (normally distributed data) ที่ 95% ของประชากรทั้งหมด (95% confidence interval) ด้วย independent t- test ในปัจจัยเปรียบเทียบดังนี้

- เปรียบเทียบค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตของเต่าบัวโตเต็มวัยระหว่างเพศผู้กับเพศเมีย ในกลุ่ม ก. ที่มีอาการทางคลินิกปกติ

- เปรียบเทียบค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตของเต่าบัวโตเต็มวัยระหว่างเต่าที่พบ และไม่พบปรสิตในเลือด (กลุ่ม ก.)

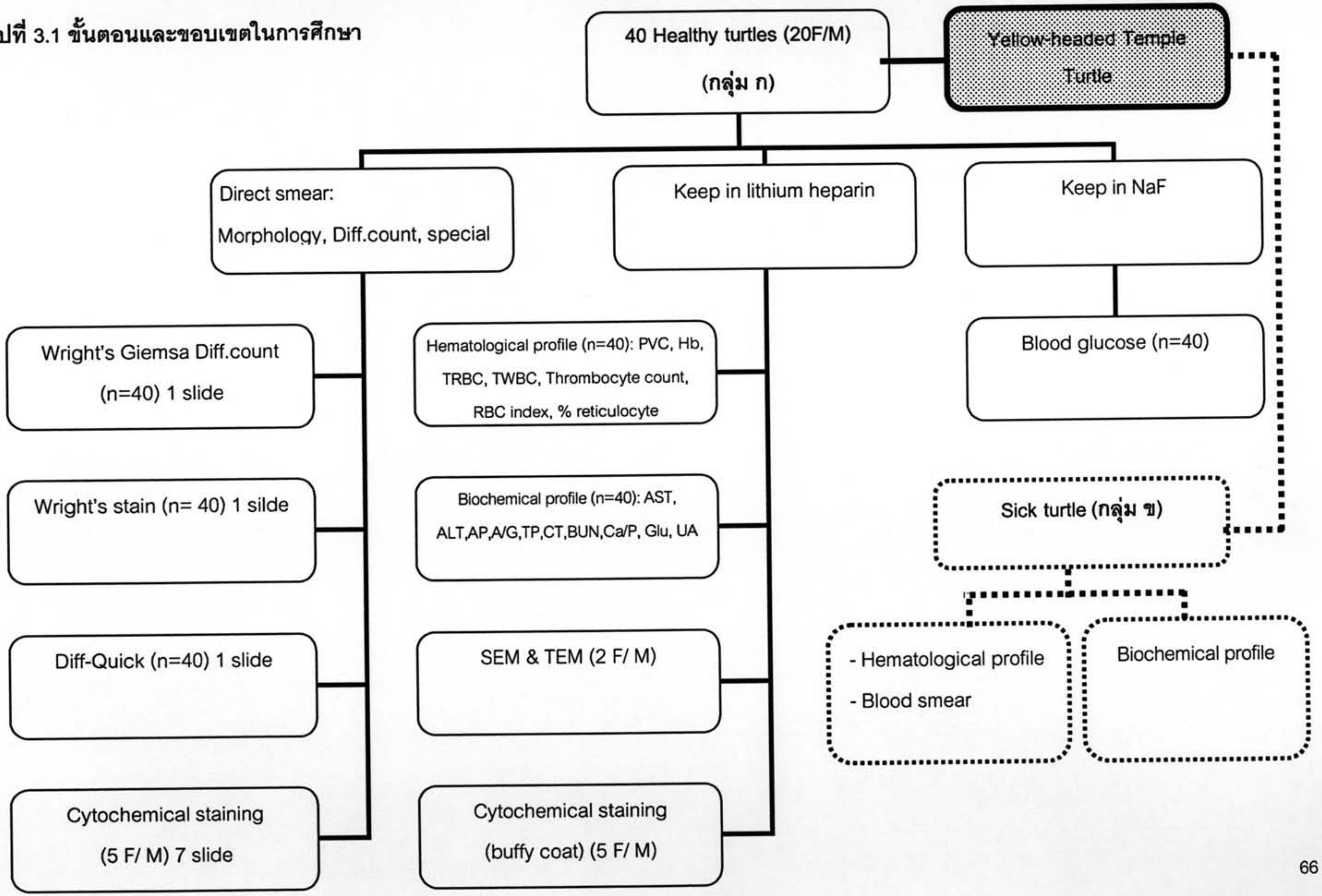
- เปรียบเทียบค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตของเต่าบัวโตเต็มวัยระหว่างเต่ากลุ่ม ก และเต่ากลุ่ม ข. ที่มีหรือแสดงอาการป่วย

หาความสัมพันธ์ของน้ำหนัก และความยาวกระดองหลังกับค่าโลหิตวิทยาโดยใช้ Spearman rank correlation coefficient ($p<0.05$)

3.5 การขออนุญาตใช้สัตว์ป่าคุ้มครอง

ดำเนินการตามระเบียบกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ว่าด้วยการอนุญาตให้ทางราชการกระทำการล่า เพาะพันธุ์ ครอบครอง นำเข้าส่งออก หรือนำผ่าน ซึ่งสัตว์ป่าหรือซากของสัตว์ป่า การเก็บ ทำอันตรายหรือมีไว้ครอบครองซึ่งรังของสัตว์ป่า และการเก็บและชำระค่าใช้จ่ายค่าบริการ หรือค่าตอบแทนและราคาสัตว์ป่า พ.ศ. 2540 ตามหลักการและข้อบังคับกรมประมง (ภาคผนวก ข.)

3.6 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical consideration)

ปฏิบัติตามหลักการและข้อบังคับว่าด้วยจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองที่ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ภาคผนวก ค.)

รูปที่ 3.1 ขั้นตอนและขอบเขตในการศึกษา