อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : ผลของสารขับถ่ายคัดหลั่งของตัวอ่อนแมลงวันต่อการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aerugunosa*

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน - 2 SEP 2011
เลขทะเบียน 156294
เลขเรียกหนังสือ ว QR
201
.S64
ร44ว
2550

โดย นายพงษ์พิทักษ์ ภูติวัตร และคณะ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : ผลของสารขับถ่ายคัดหลั่งของตัวอ่อนแมลงวันต่อการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aerugunosa*

คณะผู้วิจัยและสังกัด

1. นายพงษ์พิทักษ์ ภูติวัตร

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. นายแสงชัย นทีวรนารถ

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

3. นายนพดล จำรูญ

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

4. นายจิรภาส จงจิตวิมล

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนทุนวิจัยโดย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1. ชื่อโครงการวิจัย

ภาษาไทย: ผลของสารขับถ่ายคัดหลั่งของตัวอ่อนแมลงวันต่อการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aerugunosa*

ภาษาอังกฤษ: The effect of maggot excretory secretory product on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aerugunosa*

บทคัดย่อ

สารขับถ่ายคัดหลั่ง **ES** ของตัวอ่อน **green-bottle-blow-fly** มีคุณสมบัติต้านแบคทีเรีย ตัวอ่อนของ ***Chrysomya* spp.** ที่พบในจังหวัดพิษณุโลกน่าจะมีคุณสมบัตินี้เช่นกัน วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือศึกษา **antimicrobial activity** ของ **ES** ตัวอ่อนของ ***Chrysomya* spp.** ในการต้านการเจริญเติบโตของ **coagulase- positive *Staphyloccocus aureus*** และ ***Pseudomonas aeruginosa*** โดยบ่มกับ **ES** ที่เก็บได้จากตัวอ่อน ***Chrysomya*** ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า **ES** ที่ความเข้มข้นโปรตีน **0.25** และ **0.125 mg/dl** สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ **coagulase-positive *S. aureus*** แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบดตของ ***P. aeruginosa*** การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า **ES** จากตัวอ่อนของ ***Chrysomya* spp.** สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ ***S. aureus*** ได้

Abstract

The excretory-secretion product(ES) of green-bottle-blow- fly larvae are known to have antibacterial properties. Maggot of *Chrysomya* spp., which are the blow flies often found in Phitsanulok province, may be well have antibacterial properties. The objective of this study is to study antimicrobial activity of excretory-secretion product of *Chrysomya* spp. maggot for inhibitory activity toward the growth of coagulase- positive *Staphyloccocus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The pathogenic bacterias were incubated with ES product from *Chrysomya* maggot. The result showed that the ES product, with protein concentration at 0.25 and 0.125 mg/dl, can inhibit the growth of coagulase- positive *S. aureus* but not on *P. aeruginosa*. This study showed an evidence that ES product from maggots of *Chrysomya* spp. contain inhibit activity on the growth of *S. aureus*.

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
บทที่ 1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย	1
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	6
บทที่ 4 ผลการศึกษา	8
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	12
เอกสารอ้างอิง	15
ภาคผนวก	17

บทที่ 1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

แมลงวันนอกจากจะเป็นตัวก่อให้เกิดความรำคาญแก่คน สัตว์เลี้ยงและสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจแล้ว แมลงวันยังเป็นพาหะนำเชื้อจุลชีพก่อโรคหลายชนิดมาสู่คน นอกจากนี้ตัวอ่อนแมลงวันยังสามารถบุกรุกเนื้อเยื่อและอวัยวะในร่างกายของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมอื่น เรียกว่า myiasis ทำให้เกิดเสียหายของเนื้อเยื่อและทำให้เกิดความเจ็บปวด เสียหายและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาล อย่างไรก็ตามแมลงวันเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ คศ.1829 Baron Dominic Larrey ศัลยแพทย์ของ Napoleon's battle field พบว่าบาดแผลของทหารที่ทำการรบที่พบ maggot บนแผลจะไม่มีการติดเชื้อและแผลหายอย่างรวดเร็ว (Nigam *et al.* 2006) หลังสงครามโลกครั้งที่1 Wiliam Baer ศาสตราจารย์ด้าน ศัลยกรรมกระดูกของ John Hopkin school of Medicine Maryland ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าแมลงวันหัวเขียวชนิดที่มีชื่อสามัญแมลงวัน แกะ (sheep blow fly) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์*Phaenicer*(*Lucilia*) *sericata* สามารถกินเนื้อเยื่อเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อที่ตาย(necrotic tissue) ซึ่ง Baer คิดว่าเป็นการทำความสะอาดแผล และทำให้เนื้อเยื่อทดแทนเป็นการทำให้แผลหายได้เร็วขึ้น( ) หลังจากนั้นมีการค้นพบยา penicillin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ได้รับความนิยม maggot therapy จึงไม่นิยมใช้รักษาแผลติดเชื้อ อย่างไรก็ตามได้มีรายงานการศึกษาโดยใช้ตัวอ่อนแมลง(maggot therapy)ในการรักษาแผลเรื้อรังและแผลติดเชื้อที่ไม่สามารถรักษาด้วยการรักษาด้วยวิธีทั่วไปและยาปฏิชีวนะที่มีมาในอดีต โดยแผลดังกล่าวได้แก่ แผลติดเชื้อและแผลหายยาก (poor healing) โดยในรายงานการศึกษาใช้วิธีนี้ ในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย Alexandria ประเทศอียิปต์ แพทย์ได้ทำการรักษาด้วยการใช้ maggot เพื่อกำจัดเอาสิ่งแปลกปลอมหรือเนื้อเยื่อที่ตายจากแผล (wound debridement) เป็นผลสำเร็จ โดยพบผู้ป่วยที่มีแผลด้วยโรคจากหลอดเลือดดำและเบาหวานสามารถรักษาด้วย maggot therapy จนกระทั่งหายจากแผลเรื้อรังดังกล่าวมากกว่า 250 ราย() รวมทั้งมีรายงานการใช้ mggot ในการรักษาแผลหลายๆชนิดเช่น ฝี แผลไฟไหม้ แผลเนื้อตายเน่า (gangrenous wound) แผลจากหลอดเลือดกระดูกอักเสบจากเชื้อหนอง(osteomyelitis) แผลเบาหวานที่เท้า แผลกดทับ (Nigam *et al.* 2006)

การติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่อเป็นโรคที่พบได้บ่อยในเวชปฏิบัติแพทย์สามารถให้การวินิจฉัยได้ด้วยประวัติและรอยโรคที่เห็นแต่การติดเชื้อที่ผิวหนังและมีการลามลึกลงไปในเนื้อเยื่อเป็นปัญหาอย่างมากในการวินิจฉัยโรคเป็นเหตุให้ผู้ป่วยจำนวนไม่น้อยเสียชีวิตหรือพิการจากการติดเชื้อแบบนี้การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจะช่วยให้แพทย์ตัดสินใจและรักษาโรคได้อย่าง

ถูกต้องยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม การวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียต้องใช้เวลาในการบ่มเพาะเพื่อให้แบคทีเรียเจริญเติบโตและการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งปัจจุบันการดื้อยาปฏิชีวนะของกลุ่มแบคทีเรียกำลังเข้าสู่ภาวะวิกฤต เนื่องจากมีแบคทีเรียหลายชนิดดื้อยาปฏิชีวนะหลายตัว(multidrug resistamce) และบางชนิดมีการดื้อยาปฏิชีวนะทุกตัว (panresistance) จึงเริ่มมีการพบโรคติดเชื้อที่รักษาไม่ได้ ที่ไม่ใช่เอดส์เพิ่มขึ้นตลอดเวลา (มณฑล, 2548)

Coagulase positive *Staphylococcus* เป็นแบที่เรียที่มีความสำคัญในการก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ส่วนใหญ่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่มีลักษณะอักเสบเป็นหนองเช่น ฝี ผื่นตามผิวหนัง เยื่อหุ้มกระดูกอักเสบ หนองในช่องเยื่อหุ้มปอด การติดเชื้อในเลือดและอาหารเป็นพิษ เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอ็นไซม์และสารพิษหลายชนิดซึ่งเป็นปัจจัย ให้เชื้อก่อโรคได้รุนแรง โดยเฉพาะ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลได้บ่อย (อรุณลักษณ์, 2548)

Pseudomonas aerugunosa เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบบ่อยชนิดหนึ่ง *Pseudomonas aerugunosa* เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอ็นไซม์ได้หลายชนิดเอ็นไซม์บางตัวสามารถทำลายเนื้อเยื่อทำให้เกิดการเน่าตายของเนื้อเยื่อรวมถึงการทำลายหลอดเลือดเอ็นไซม์เหล่านี้จึงเพิ่มความสามารถในการรุกรานเนื้อเยื่อของเชื้อและทำให้เกิดการเน่าตายของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้เชื้อยังสามารถทำลายคอมพลีเมนต์และอิมมูโนกลอบูลินจีได้เป็นสาเหตุให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลง เชื้อสามารถก่อโรคได้ทุกระบบของร่างกายเช่น เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ เลือดเป็นพิษ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อในหู ตา กระดูกและข้อ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและการติดเชื้อที่ผิวหนัง (พิพัฒน์, 2543)

เนื่องปัญหาการต้านการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะหลายชนิดของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Psuedomonas aeruginosa* ผู้วิจัยจึงนำสารคัดหลั่งจากแมลงวัน ที่พบในจังหวัดพิษณุโลก มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลชีพดังกล่าว เนื่องจากมีรายงานการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง2ชนิดด้วยสารขับถ่ายคัดหลั่งจากตัว maggot เพื่อเป็นการป้องกันและควบคุมแบคทีเรียบางชนิดดื้อต่อยาปฏิชีวนะและเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อแพทย์สามารถให้การรักษาด้วยmaggot therapy ควบคู่การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการน่าจะส่งเสริมให้สามารถรักษาแผลติดเชื้อแบคทีเรียได้ทันท่วงทีรวมทั้งยังอาจจะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ในด้านการรักษาและอาจจะช่วยหยุดยั้งการแพร่ของเชื้อทั้งสองชนิดอันเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อย รวมทั้งด้านการใช้ประโยชน์ในอนาคต หากร่วมมือกับนักเคมีหรือชีวเคมีเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสารสำคัญในสารขับถ่ายคัดหลั่งจาก maggot จะเป็นประโยชน์ในการรักษาแผลติดเชื้อเรื้อรังที่มีสาเหตุจาก *Staphylococcus aureus* และ

Psuedomonas aeruginosa ต่อไป วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ ศึกษาผลของสารขับถ่ายคัดของแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya* spp. ที่พบในจังหวัดพิษณุโลกต่อการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในหลอดทดลอง

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

วงชีวิตของแมลงวัน

แมลงวันเป็นแมลงที่มีขบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis)โดยมีการเจริญเติบโตจากไข่ฟักเป็นตัวอ่อน(larva or maggot) จากนั้นเจริญเป็นpupaและเจริญต่อไปเป็นตัวเมวัยต่อไปแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ได้แก่ แมลงวันบ้าน (common fly) แมลงวันหัวเขียว(metallic flies, blow flies) แมลงวันหลังลาย (flesh flies)และแมลงวันคอกม้า (stable flies)

แมลงวันกับนิติกีฏวิทยาศาสตร์

แมลงวันเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางด้านนิติวิทยาศาสตร์โดยสามารถประมาณระยะการตายที่แม่นยำมากวิธีหนึ่ง เนื่องจากแมลงวันหัวเขียว (blow fly) เป็นแมลงกินศพกลุ่มแรกที่จะมาถึงศพหลังการตายไม่กี่นาทีและจะวางไข่บนศพ ซึ่งการเจริญจากระยะตัวอ่อน (larvae) ไปเป็นดักแด้ (pupate) มีระยะเวลาที่แน่นอนจึงเป็นการประมาณระยะเวลาการตายที่แม่นยำมากวิธีหนึ่ง

Maggot therapy

หลังสงครามโลกครั้งที่1 Wiliam Baer ศาสตราจารย์ด้าน ศัลยกรรมกระดูกของJohn Hopkin school of Medicine Maryland ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าแมลงวันหัวเขียวชนิดที่มีชื่อสามัญแมลงวัน แกะ(sheep blow fly) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Phaenicer*(*Lucilia*) *sericata* สามารถกินเนื้อเยื่อเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อที่ตาย(necrotic tissue) ซึ่ง Baer คิดว่าเป็นการทำความสะอาดแผล และทำให้เนื้อเยื่อทดแทนเป็นการทำให้แผลหายได้เร็วขึ้น (Nigam *et al*. 2006) หลังจากนั้นมีการค้นพบยา penicillin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ได้รับความนิยม maggot therapy จึงไม่นิยมใช้รักษาแผลติดเชื้อ อย่างไรก็ตามได้มีรายงานการศึกษาโดยใช้ตัวอ่อนแมลง (maggot therapy) ในการรักษาแผลเรื้อรังและแผลติดเชื้อที่ไม่สามารถรักษาด้วยการรักษาด้วยวิธีทั่วไปและยาปฏิชีวนะที่มีมาในอดีต โดยแผลดังกล่าวได้แก่ แผลติดเชื้อและแผลหายยาก(poor healing) โดยในรายงานการศึกษาใช้วิธีนี้ ในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย Alexandria ประเทศอียิปต์ แพทย์ได้ทำการรักษาด้วยการใช้ maggot เพื่อกำจัดเอาสิ่งแปลกปลอมหรือเนื้อเยื่อที่ตายจากแผล (wound debridement) เป็นผลสำเร็จ โดยพบผู้ป่วยที่มีแผลด้วยโรคจากหลอดเลือดดำและเบาหวานสามารถรักษาด้วย maggot therapy จนกระทั่งหายจากแผลเรื้อรังดังกล่าวมากกว่า 250 ราย(Tantawi, 2004) รวมทั้งมีรายงานการใช้ mggot ในการรักษาแผลหลายๆชนิดเช่น ฝี แผลไฟไหม้ แผลเนื้อตายเน่า (gangrenous wound)แผลจากหลอด

เลือด กระดูกอักเสบจากเชื้อหนอง (osteomyelitis) แผลเบาหวานที่เท้า แผลกดทับ (Nigam *et al*. 2006 Sherman *et al*, 2000)

โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection)

โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) หมายถึงโรคติดเชื้อที่เกิดจากการได้รับเชื้อขณะที่ผู้ป่วยได้รับการตรวจและรักษาตัวในโรงพยาบาลไม่ใช่การติดเชื้อมาก่อนจะข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลหรืออยู่ในระยะฟักตัวของโรค *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ผิวหนังและเป็นเชื้อที่สามารถต้านการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ รวมทั้งยังเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่นอกจากจะเป็นอันตรายต่อตัวผู้ป่วยเองแล้ว เชื้อดังกล่าวยังอาจเป็นสาเหตุของโรคที่เกิดกับญาติและบุคคลากรทางการแพทย์ที่ปฏิบัติงานในหอผู้ป่วย ดังนั้นการรักษาผู้ป่วยด้วยโรคดังกล่าวตั้งแต่ต้นจึงเป็นการป้องกันโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลได้อีกทางหนึ่ง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

กรงเลี้ยงแมลง

Autocleave

จานเลี้ยงเชื้อ

หลอดแก้ว

rack

น้ำยาและสีที่ใช้ในการย้อมแบคทีเรียในงานประจำ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในการเลี้ยงตัวอ่อนหนอนแมลงวัน

Ethanol

ถุงพาสติก

ช้อนและบีกเกอร์สำหรับเก็บตัวอย่างหนอน

เครื่องชั่ง

(1.)การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงตัวอ่อนแมลงวันหัวเขียว

(1.1)ทำการดักแมลงวันหัวเขียวโดยใช้เหยื่อล่อวางบนกับดัก เก็บตัวอย่างแมลงวันในจังหวัดพิษณุโลก

(1.2)สลบแมลงวันด้วย Ether แยกเฉพาะแมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya* spp.

(1.3)ทดสอบสภาพที่เหมาะในการเลี้ยงแมลงวันหัวเขียวจนกระทั่งแมลงวันวางไข่จนกระทั่งเจริญเป็นตัวอ่อน

(2)การทำให้maggot ไร้เชื้อเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษา

(2.1)ทดสอบระยะเวลาในการสัมผัสของ maggot กับสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ สังเกตุการรอดชีวิตของ maggot และระยะเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ

(2.2)นำ maggot ผ่านการฆ่าไปเก็บสารขับถ่ายคัดหลั่งต่อไป

(3)เลี้ยง maggot เพื่อเก็บสารขับถ่ายคัดหลั่ง

(3.1)เลี้ยง maggot ใน Hank balance

(3.2)นำน้ำเลี้ยงใน(3.1)ไปแยกด้วยเยื่อเลือกผ่านเพื่อแยก Hank balanceออกจากสารขับถ่ายคัดหลั่ง

(3.4)นำสารขับถ่ายคัดหลั่งมาหาความเข้มข้นของโปรตีนรวม

(4)ทดสอบผลของสารขับถ่ายคัดต่อการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa*

(4.1)เจือจางสารขับถ่ายคัดที่ความเข้มข้นโปรตีนรวมต่างๆกัน

(4.2)ศึกษาความสามารถในการยั้บยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยหลักการของdisc diffusion

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

โรงพยาบาลพุทธชินราช จ. พิษณุโลก

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

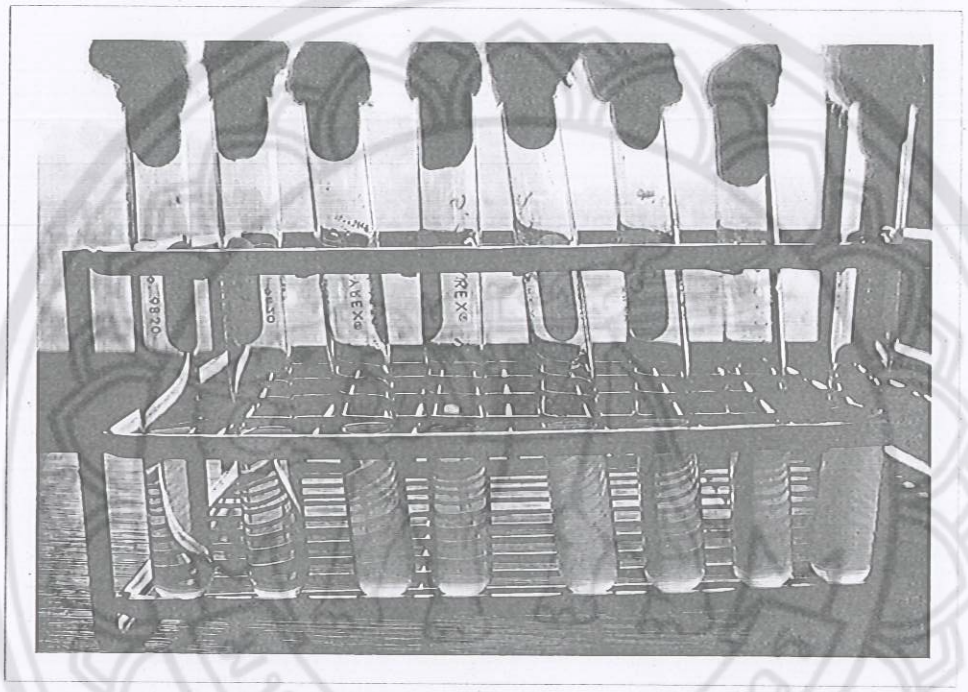
บทที่ 4
ผลการศึกษา

ในการศึกษานี้ได้พยายามเลี้ยงตัวอ่อนหนอนแมลงวันในห้องปฏิบัติการ แต่คณะผู้วิจัยพบข้อจำกัดในเรื่องปริมาณของหนอนที่รอดชีวิตมีจำนวนน้อยมาก จึงนำซากไก่ตายจำนวน 10 ตัวไปทิ้งบริเวณข้างคลองหนองเหล็กเพื่อเก็บตัวอ่อนจากซากไก่โดยตรง ซึ่งสามารถเก็บตัวอ่อนหนอนได้จำนวนมาก คณะผู้วิจัยจึงปรับเปลี่ยนการเก็บตัวอย่างหนอนแมลงวันโดยเก็บจากซากไก่ตลอดการทดลองโดยทำการเลือกตัวหนอนออกจากบีกเกอร์เก็บตัวอย่าง ล้างตัวอ่อนหนอนแมลงวันที่เก็บได้ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นล้างในเอทานอลความเข้มข้น 70 % 3 ครั้งและแช่ Dettol 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราสจากเชื้ออีก 3 ครั้ง ก่อนแช่ตัวอ่อนหนอนแมลงวันในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำตัวอ่อนเข้าตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน และเลือกตัวหนอนทิ้งไปและเก็บน้ำที่แช่ตัวอ่อนเพื่อทำการทดลองสารขับถ่ายคัดหลั่ง(excretion/secretion product; ES) ต่อไป

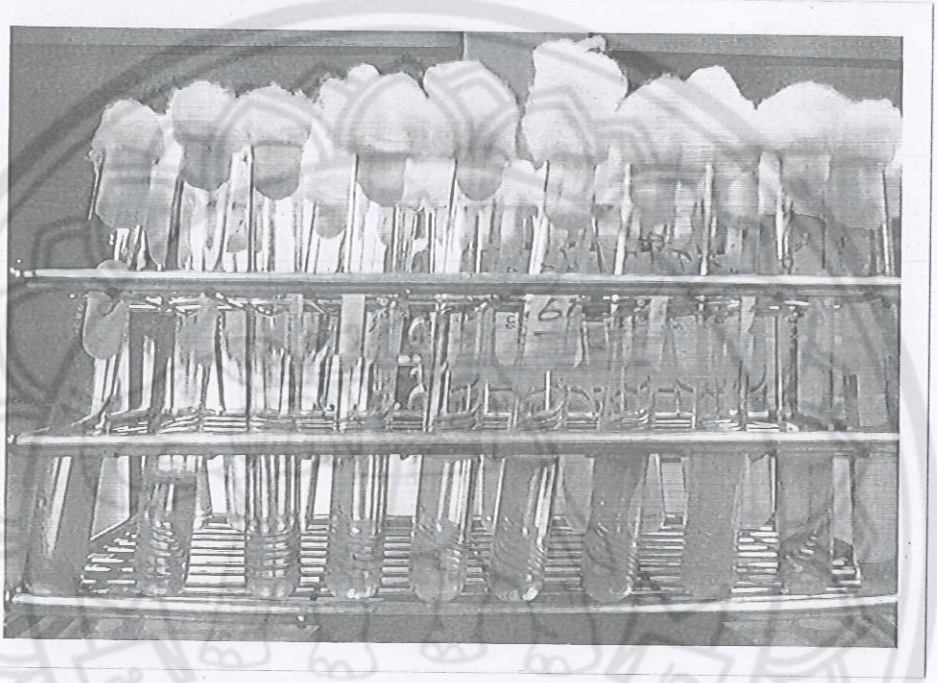
วัดปริมาณของโปรตีนใน ES ของตัวอ่อนหนอนแมลงวันด้วยวิธี Biuret ได้ความเข้มข้นของโปรตีนใน ES เท่ากับ 0.25 มก/ดล เมื่อนำบางส่วนของสารนี้มาทำการเพาะเชื้อบน nutrient agar และ blood agar คณะผู้วิจัยไม่พบเชื้อใดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อแช่กระดาษทดสอบใน ES แล้วนำไปวางบน Mueler Hinton agar ป้ายเชื้อตามวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกทั่วไป ผลปรากฏว่าไม่เกิด inhibition zone ซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของสารยับยั้งแบคทีเรียใน ES ค่อนข้างเจือจางจึงไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด

เมื่อทำการเจือจางสาร ES ของตัวอ่อนหนอนแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya* spp.แบบ two fold dilution และทดสอบกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudo monas aeruginosa* พบว่า สาร ES สามารถยับยั้ง *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 0.125 มก/ดลโดยหลอดทดสอบใสและไม่มีเชื้อขึ้นเมื่อนำไปเพาะเชื้อบน nutrient agar และ blood agar แต่เมื่อความเข้มข้นของสาร ES น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.0625 มก/ดล ES ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดสอบขุ่นและมีเชื้อขึ้นเมื่อเพาะเชื้อบน nutrient agar และ blood agar ในขณะที่ ES ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ในหลอดทดลองได้ โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดสอบสารสีขียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เมื่อทำการเพาะเชื้อบน nutrient agar

และ blood agar พบว่ามีเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสอง เมื่อนำเชื้อดังกล่าว ทำการทดสอบทางชีวเคมี พบว่ามีคุณสมบัติที่ตรงกับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (รูปที่ 1 และ 2)



รูปที่ 1 แสดงผลการทดสอบสารขับถ่ายคัดหลั่งที่ได้จากตัวอ่อนแมลงวัน *Chrysomya* spp. กับเชื้อ *Staphyloccocus aureus* ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 2 แสดงผลการทดสอบสารขับถ่ายคัดหลั่งที่ได้จากตัวอ่อนแมลงวัน *Chrysomya* spp. กับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ความเข้มข้นต่างๆ

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

คณะผู้วิจัยไม่สามารถเพาะเลี้ยงหนอนแมลงวันหนอนแมลงวันหัวเขียวในห้องปฏิบัติการ โดยพบว่าแมลงวันที่นำมาเพาะเลี้ยงมีชีวิตไม่ถึงร้อยละ 1 ผู้วิจัยจึงปรับการเก็บโดยเก็บจากซากไก่ ซึ่งสามารถได้ตัวอ่อนหนอนแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya* spp. ระยะ L1 ถึง L3 จำนวนมากพอ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าอาจเกิดจากขั้นตอนการนำแมลงจากแหล่งเก็บ(ลานตากปลาบ้านวังเป็ดจังหวัดพิษณุโลก มายังห้องปฏิบัติการทำให้ตัวเต็มวัยของหนอนกระทบกระเทือน รวมทั้งความชื้นในห้องปฏิบัติภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยาไม่เหมาะสม จึงทำให้แมลงวันตัวเต็มวัยตายเป็นจำนวนมาก ส่วนการเก็บจากซากไก่ผู้วิจัยทำการเก็บในวันที่ 1 ถึง 4 ของการวางซากเพื่อจะได้ตัวอ่อนระยะ L1 ถึง L3 เนื่องจากระยะดังกล่าวเป็นช่วงที่หนอนแมลงวันมีกิจกรรมต่างๆในการเจริญเติบโต หากหนอนแมลงวันเจริญเป็นระยะ pupa จะมีกิจกรรมน้อยลงซึ่งคาดว่าจะมีการขับสารต่างๆน้อยลงด้วย เมื่อทำการวัดปริมาณโปรตีนในสารขับถ่ายคัดหลั่งที่เก็บจากตัวอ่อนแมลงวันมีความเข้มข้นเพียง 0.25 มก/ดล อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยพบวาความเข้มข้นดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *P. auruginosa* ได้ ซึ่งตรงกับการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งพบว่า ES ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 500 Da สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Escherichia coli* โดยวิธี flow cytometry และ confocal microscope ยิ่งไปกว่านั้นคณะผู้วิจัยกลุ่มเดียวกันยังพบอีกว่าสารดังกล่าวทำให้ *Bacillus cereus* และ *E. coli* มีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากสัมผัสกับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 500 Da (Bexfield et al, 2008)

การศึกษาในทางเดินอาหารของ *Phaenicia* (*Lucilia*) *sericata* พบว่า *Proteus* mirabilis เป็นแบคที่เรียประจำถิ่นของตัวอ่อนแมลงวันนี้และมีผลทำให้ความเป็นกรดด่างของบริเวณแผลที่มีการติดเชื้อนั้นเปลี่ยนเป็นด่างซึ่งสภาวะดังกล่าวเชื้อ ก่อพยาธิสภาพไม่สามารถเจริญได้ สารที่หลั่งจาก *P. mirabilis* คือ phenylacetic acid และ phenulacetaldehyde (Messer and Mcclellan, 1935; Robinson 194; Edmann, 1987; Thomas 1999) ในการศึกษานี้ผู้วิจัยไม่พบ *Proteus mirabilis* ในสารขับถ่ายคัดหลั่งที่เก็บได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุจากสารที่ได้มีความเข้มข้นของสารขับถ่ายหลั่งน้อยมากเนื่องจากมีการเจือจางด้วยน้ำกลั่นก่อนนำตัวอ่อนหนอนเข้าแช่เย็น โดยคณะผู้วิจัยคาดว่าการแช่เย็นอาจจะช่วยรักษาสภาพของสารชีวโมเลกุลบางอย่างที่หลั่งออกมาจากตัวอ่อนหนอน อย่างไรก็ตามการพบจุลชีพดังกล่าวคาดว่าน่าจะมีผลต่อการยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพได้ กลไกที่เชื่อว่าตัวอ่อนหนอนแมลงวันยับยั้งเชื้อ MRSA ได้เนื่องมาจากการ

เปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างบริเวณที่เชื้อเจริญอยู่ นอกจากนี้ตัวอ่อนที่กินเชื้อเข้าไปจะมีการทำลายเชื้อในระบบทางเดินอาหารของหนอน และทั้งตัวอ่อนยังหลั่งสารที่กระตุ้นให้ macrophage เจริญ รวมทั้งมีการกำจัดเนื้อเยื่อที่ตาย มีการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนโดยมีการทำลาย extracellular matrix ที่เสื่อมสภาพโดย protease ซึ่งหลั่งจาก neutrophil, macrophage, fibroblast epithelialและendothelial cell นอกจากนี้สารคัดหลั่งยังสามารถกระตุ้นการสร้าง collagen elastin และ proteoglycan ซึ่งทำให้มีการทดแทนเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายไปและเป็นการเสริมสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้น(Schultz GS et al, 2003)

ในการศึกษานี้ทำการบ่มเชื้อเพียงข้ามคืนผู้วิจัยพบว่า ES สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้เมื่อบ่มเชื้อกับ ES ข้ามคืน อย่างไรก็ตาม ES ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ซึ่งอาจมีสาเหตุจาก biofilm ของ *P. aeruginosa* จะใช้เวลาประมาณ 10 ชั่วโมงในการสลาย biofilm ของเชื้อนี้ การบ่มเชื้อกับES ข้ามคืนที่ไม่ถึง 10 ชั่วโมงจึงไม่สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Vanderplas และคณะ ในปี 2008 ซึ่งพบว่า ES ที่มีปริมาตร 0.2 ไมโครลิตรจะมีผลต่อ biofilm ของ *S. aureus* อย่างรวดเร็ว ในขณะที่มีผลต่อ microfilm ของ *P. aeruginosa* ที่ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และต้องสัมผัสสารเป็นเวลา 10 ชั่วโมง (Vanderplas et al 2008)

ในการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากตัวอ่อนของ *Lucilia sericata* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ในหลอดทดลองได้ซึ่งผลการศึกษานี้ตรงกับการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งทำการทดลองในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองพบว่า ES มีผลต่อ *S. aureus* แต่กลับไม่มีผลต่อ *P. aeruginosa* และ *Proteus* spp. (Hubeman et al., 2007) ในทางกลับกันมีการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารขับถ่ายจากตัวอ่อน *L. sericata* ที่สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes, S. faecalis, S.mitor, Clostridium perfringes, Proteus vulgaris* และ *Salmonella typhi*(Simmons, 1935,1957)

แมลงวันหัวเขียวที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ *Chrysomya megacephala* และ *C. rufifacies* โดยคัดเลือกตัวอ่อนโดยสังเกตุจาก posterior spiracle ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิดสเตอริโอและพยายามเก็บหนอนในวันที่1 ถึง 3 วันหลังจากทิ้งซากไก่ เนื่องจากแมลงวันหัวเขียวจะวางไข่และมีการเจริญเติบโตในช่วงเวลาดังกล่าว อย่างไรก็ตามในการศึกษาที่ผ่านมาในต่างประเทศส่วนใหญ่จะทำการศึกษาใน green bottle fly ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Phaenicia* (*Lucilia*) *sericata* (Nigam .et al, 2003; 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาที่นำแมลงวันหัวเขียวชนิด *Phormia terraenavae* มาใช้ในการศึกษาโดย Pavillard และ Wright ในปี 1957(Pavillard and Wright,

1957) การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ทำการศึกษาการยับยั้งเชื้อในหลอดทดลองที่ทำการศึกษาในแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya* sppในจังหวัดพิษณุโลก คณะผู้วิจัยพบว่าสารขับถ่ายคัดหลั่งจากแมลงวันที่พบในจังหวัดพิษณุโลกสามารถยับยั้ง MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยจริงซึ่งผลการศึกษานี้สามารถนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาเป็นการรักษาแบบทางเลือกได้ เนื่องจากปัจจุบันเชื้อมีการต้านการรักษาต่อสารต้านจุลชีพ รวมทั้งยังเป็นการลดการใช้ยาต้านจุลชีพ เพื่อเป็นการลดการดื้อยาของเชื้อ MRSA ควรมีการส่งเสริมให้มีการศึกษาลักษณะเดียวกันนี้กับเชื้อจุลชีพอื่น เช่น แบคทีเรียชนิดอื่น เชื้อราและไวรัส เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. มณฑล เลิศคณาวนิชกุล, พงศ์พันธ์ พงศ์พนิตานนท์ม สุชาดา อัครสุต. การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ Methicillin- resistant Staphylococcus sureus(MRSA)โดยแบคทีเรียกรดแลคติควารสารเทคนิคการแพทย์และ กายภาพบำบัด.2548; 17: 39-46

2. พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์, อรุณลักษณ์ ลุลิตานนท์.แบคทีเรียวิทยาคลินิก.พิมพ์ครั้งที่2.ขอนแก่น. 2543.

3. อรุณลักษณ์ ลุลิตานนท์, อรุณวดี ชนะวงศ์, พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์, ภูมิพันธ์ พงศ์ชาญวิทย์, สรินทร์ญา พึ่งเทียน. สปีชีส์ของเชื้อ coagulase positive Staphylococcus ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด.2548; 17: 39-46

4. Tantawi TI.Maggot therapy in Egypt, reviewd. The beter Leter. 2004; 1: 1-3.

5. Nigam Y.Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe NA. Maggot therapy: The science and implication for CAM part I-history and bacterial resistance. Evi Based complement Altermat Med.2006; 3: 223-7.

6. Nigam Y, Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe NA. Maggot therapy: The science and implication for CAM part II-Maggots combat infection. Evi Based Complement Alternat Med. 2006; 3: 303-8.

7. Sherman RA, Hall MJ, Thomas S. Medicinal maggot: an ancient remedy for some contemporary affliction. Annu Rev Entomol 2000; 45: 55-81.

8. Bexfield A, BondAE, Robert EC, Dudley E, Nigam Y, Thomas S *et al*. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500 Da fraction from maggot excretions/secretions of Lucilia sericata. Microb infect 2008; 10: 325-33.

9. Messer FC, Mcclellan R, Surigical maggots, A study of their functions in wound healing. J Lab Clin Med 1935; 20: 1219-26.

10. Robinson W, Ammonium bicarbonate secreted by surgical maggots stimulates healing in purulent wounds. Am J Surg 1940; 47: 111-5.

11. Edmann ER. Antibacterial action of myiasis-causing flies. Parasitol Today 1987; 3: 214-6.

12. Thomas S, Andrew A, Hay P, Bourgoise S. The anti-microbial activity of maggot secretions: result of a preliminary study. J Tissue Viability 1999: 9 : 127-32.
13. Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. Wound Repair Regen. 2003; 11: 1-28.
14. Vanderplas MJA, Jukema GN,Wai SW, Doogterom-Ballering HCM, Lagenduk EL,Vangulpen CO et al. Maggot excretions/ secretions are differentially effective against bioflims of Staphyloccocus aureuse and Pseudomonas aeruginosa.
15. Hubeman L, Gollop N, Muncuoglu KY, Block C, Galun R. Antibacterial properties of whole body extracts and haemolymph of Lucillia sercata maggots. J Wound Care 2007; 16: 123-7.
16. Pravilard ER and Wright EA. An antibiotic from maggot. Nature 1957; 180: 916-7.

ภาคผนวก

ผลงานที่นำเสนอในงานประชุมวิชาการ

In vitro study of inhibitory activity of coagulase- positive Staphyllococcus aureus growth by Chrysomya spp. Maggot excretory-secretion products.

Saengchai Nateeworanart[1], Jirapas Jongjitwimol[1], Phongpitak Putiwat[2], Noppadon jumrun[1]

[1]Department of Medical technology , Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan university. [2]Department of Anatomy, faculty of Medical Science, Naresuan University.

Abstract

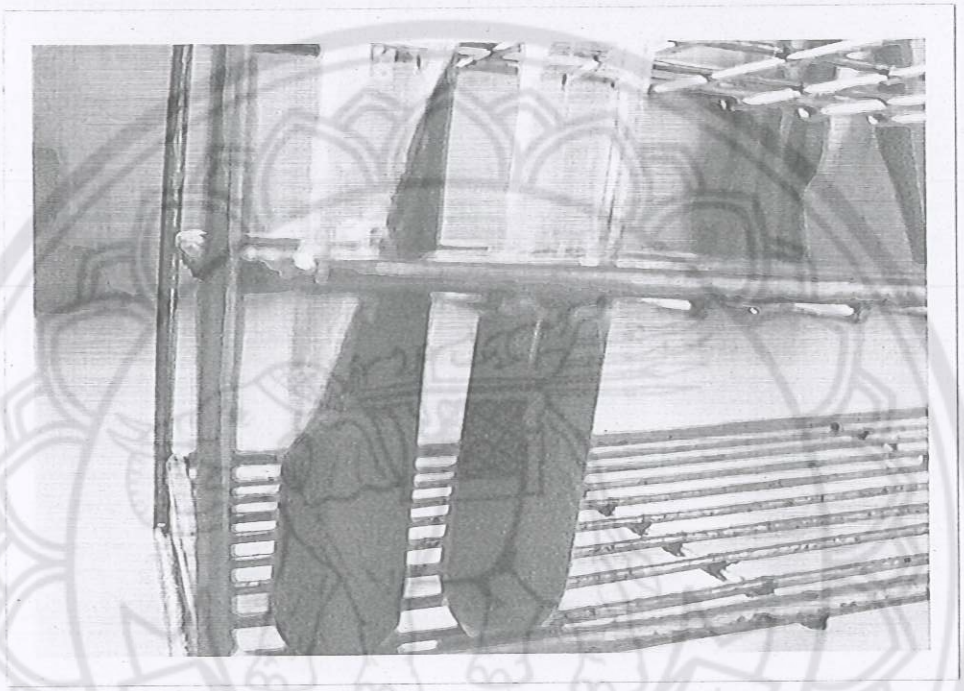
Background : Maggots of the green blowfly, Lucilia sericata are used as an alternative to surgical intervention and long-term antiseptic therapy for the treatment of chronic wounds. The excretory-secretorion products(ES) of maggots are known to have antibacterial properties. Maggots of Chrysomya spp, which are the blow flies often found in Phitsanulok province, could well have antibacterial properties. Objective: The aim of this trial is to study antimicrobial activity of excretory-secretion product of Chrysomya spp. maggots for inhibitory activity toward the growth of coagulase-positive Staphylococcus aureus. Methods: The pathogenic bacteria was incubated with ES product from Chrysomya maggots. Results: The ES products, with protein concentration at 2.25 g/L, can inhibit the growth of coagulase-positive Staphylococcus aureus. Conclusion: This study showed an evidence that ES products from maggots of Chrysomya spp. Contain inhibitory activity on the growth of Staphyllococus areus. Acknowledgements: This investigation was supported by a grant from Faculty of Medical Science, Nresuan University. The authors would like to appreciate very much for comments of Dr Sukkid yasothornsrikul, faculty of Medical Science, Naresuan University.

References:

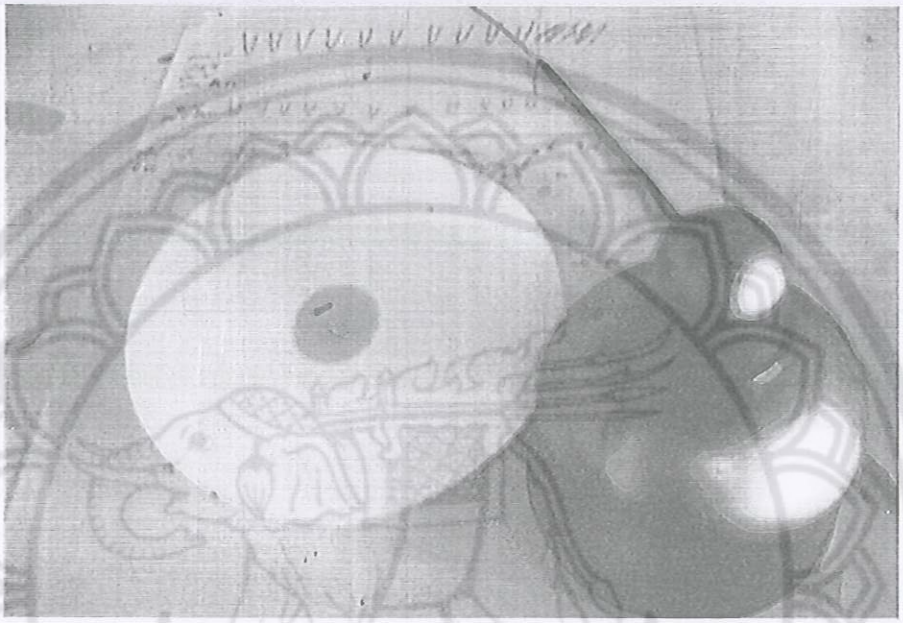
Nigam Y, Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe NA. Maggot therapy: The science and implication for CAM part I-history and bacterial resistance. Evid Based Complement Altermat Med 2006; 3: 303-8.

Nigam Y, Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe NA. Maggot therapy: The science and implication for CAM part II-maggot combat infection. Evid Based Complement Altermat Med 2006; 3: 223-7.

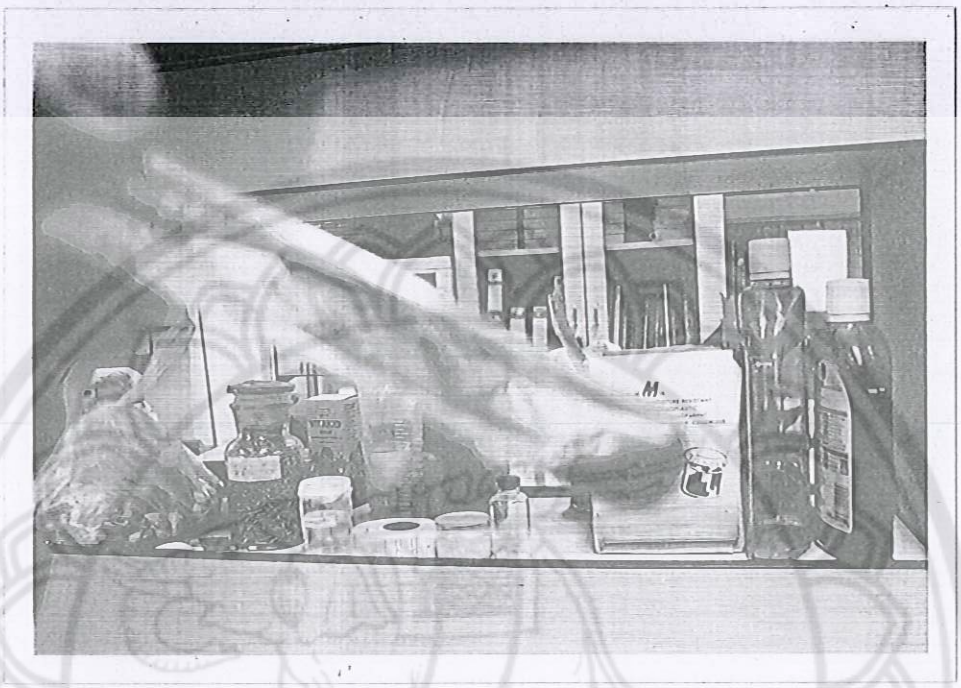
แสดงการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ ***Pseudomonas aeruginosa***



การทดสอบ **oxidase** ของ ***Pseudomonas aeruginosa***



สำนักหอสมุด

- 2 SEP 2011

การทดสอบ **coaglurase** ของ ***Pseudomonas aeruginosa***