บทที่ 3

วิธีการศึกษา

3.1 สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 ตัวอย่างกบนาจากธรรมชาติระยะโตเต็มวัย จำนวน 160 ตัว

3.1.2 ตัวอย่างกบนาอายุ 1 เดือน จากฟาร์มเลี้ยงกบแบบบ่อซีเมนต์ถาวรในจังหวัดนครปฐม จำนวน 120 ตัว

3.1.3 ตัวอย่างปลิงน้ำจืดจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

3.2 วัสดุอุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ภาคสนามที่ใช้เก็บตัวอย่างกบนาจากธรรมชาติ

- ถุงพลาสติก
- ไฟฉาย
- ตะกร้าสำหรับใช้บรรจุตัวอย่างกบนาจากธรรมชาติในระหว่างการเดินทาง

3.2.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงกบ

- ถังพลาสติกสีทึบมีฝาปิดสำหรับเลี้ยงกบจากธรรมชาติ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 26 เซนติเมตร
- ภาชนะพลาสติกสำหรับเลี้ยงแยกกบที่ทำการทดลอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 เซนติเมตร
- ถังพลาสติกขนาดใหญ่สำหรับเก็บกักน้ำ
- ตู้กระจกขนาด 50 x 80 x 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร สำหรับเลี้ยงลูกกบจากฟาร์มเลี้ยง
- กระติกน้ำสำหรับขนส่งน้ำกรอง
- อาหารเม็ดสำหรับกบ
- สวิง

3.2.3 อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

- เครื่องชั่งน้ำหนักแบบหน้าปัดตาชั่ง รับน้ำหนักสูงสุด 1 กิโลกรัม
- เครื่องมือผ่าตัด ได้แก่ กรรไกรผ่าตัด เข็มเขี่ย ปากคีบ และถาดพลาสติก
- หลอดฉีดยา ขนาดความจุ 1 มิลลิลิตร
- เข็มฉีดยาขนาด 26 Gx ½”
- แผ่นสไลด์

- กระจกปิดสไลด์
- กระบอกตวง ขนาด 100, 200, 300, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- ขวดแก้ว ขนาด 5 มิลลิลิตร
- Petri-dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
- ขวดเก็บสารเคมี ขนาดความจุ 300 มิลลิลิตร
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ยี่ห้อ Zeiss รุ่น Stemi DV4
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30
- กล้องถ่ายภาพดิจิตอล ยี่ห้อ Canon รุ่น Powershot S80
- อุปกรณ์การวาดภาพ (drawing attachment; Olympus)
- stage micrometer และ occular micrometer
- เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (ultramicrotome) ยี่ห้อ Ultotome รุ่น V

3.3. สารเคมี

- Formalin
- Methyl alcohol (Merck Darmstadt, Germany)
- Ethyl alcohol (องค์การสุรา กรมสรรพสามิต จังหวัดฉะเชิงเทรา ประเทศไทย)
- Permount (Fisher Scientific, New Jersey, USA)
- Xylene (Fisher Scientific, UK Limited, UK.)
- สี Giemsa (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Sodium dihydrogen orthophosphate (Asia Pacific Specialty Chemicals Limited, New South-Wales, Australia)
- Disodium hydrogen orthophosphate (Asia Pacific Specialty Chemicals Limited, New South-Wales, Australia)
- Glutaraldehyde (APS, Auckland, New Zealand)
- Osmium tetroxide (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Toluidine blue (Spectrum Chemicals & Laboratory Products, California, USA)
- Propylene oxide (Rhodia Pharma Solutions, Cranbury, UK)
- Spurr resin (TAAB Laboratories Equipment Ltd Aldermaston, UK)
- Uranyl acetate (Noah Technologies coporation, Texas USA)
- Lead citrate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

3.4. วิธีดำเนินการ

3.4.1 การตรวจหาเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบนาจากธรรมชาติ

3.4.1.1 ใช้เข็มฉีดยาเจาะเลือดจากหัวใจ ทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางและย้อมด้วยสี Giemsa ตามวิธีการดังนี้

- รักษาสภาพเนื้อเยื่อบนสไลด์โดยการจุ่ม 100% methyl alcohol แล้วผึ่งให้แห้ง
- ย้อมด้วยสี Giemsa ที่เจือจางใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:10 เป็นเวลา 10-20 นาที
- ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปาแล้วผึ่งให้แห้ง

3.4.1.2 ตรวจหาค่าการติดเชื้อ (%prevalence) และความหนาแน่นของเชื้อ (% parasitaemia) ตามวิธีการดังนี้

- นำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางที่ย้อมด้วยสี Giemsa แล้วมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า
- นับและบันทึกจำนวนกบที่พบสปอโรซอยท์และบันทึกจำนวนสปอโรซอยท์ที่พบในแผ่นฟิล์มชนิดบางที่ได้จากกบแต่ละตัว
- คำนวณค่าการติดเชื้อและความหนาแน่นของเชื้อตามวิธีการดังนี้

$$\text{ค่าการติดเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนกบที่ติดเชื้อ } \textit{Lankesterella} \text{ sp. ในตัวอย่างกบที่ศึกษา}}{\text{จำนวนตัวอย่างกบที่ศึกษา}} \times 100$$

$$\text{ค่าความหนาแน่นของเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนสปอโรซอยท์ต่อเม็ดเลือดแดง 10,000 เซลล์}}{100}$$

3.4.1.3 นำกบตัวที่มีความหนาแน่นเชื้อสูงสุดไปใช้เป็นกบตัวให้เชื้อในการทดลองต่อไป

3.4.2 การเตรียมปลิงพาหะ

- เก็บตัวอย่างปลิงน้ำจืดจากกบนาธรรมชาติ
- ตรวจสอบชื่อชนิดของปลิง
- เพาะเลี้ยงปลิงในห้องปฏิบัติการโดยเลี้ยงในภาชนะใส่น้ำกรองและให้ดูดเลือดกบนาปลอดเชื้อเป็นอาหาร
- สังเกตและบันทึกการเจริญและชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปลิงที่เพาะเลี้ยง
- เพิ่มจำนวนปลิงให้ได้ขนาดและจำนวนเพียงพอสำหรับการทดลองแพร่เชื้อในกบนาผ่านปลิงพาหะ โดยในการทดลองใช้ลูกปลิงขนาดความยาวลำตัว (BL: body length) ประมาณ 0.5 เซนติเมตรขณะเกาะพัก แยกปลิงที่จะใช้ทดลองเลี้ยงในภาชนะพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ภาชนะละ 15 ตัว

3.4.3 การทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิง

การทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิงโดยบันทึกผลจำนวนวันที่พบเชื้อในทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายในปลิงเพื่อให้ทราบจำนวนวันที่เชื้อเดินทางจากทางเดินอาหารมายังต่อมน้ำลายนำไปสู่การกำหนดจำนวนวันสำหรับการทดลองแพร่เชื้อจากปลิงไปสู่กบต่อไป

3.4.3.1 ปลิงกลุ่มทดลอง

- เตรียมปลิงขนาด BL ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.4.2 นำมาดูดเลือดกบนาติดเชื้อที่ได้คัดเลือกไว้จากข้อ 3.4.1
- หลังจากปลิงดูดเลือดกบแล้วแยกไปเลี้ยงในภาชนะใส่น้ำกรอง นับวันที่ดูดเลือดกบเป็นวันที่ 0

3.4.3.2 ปลิงกลุ่มควบคุม

- เตรียมปลิงเช่นเดียวกับปลิงกลุ่มทดลองแต่ให้ปลิงดูดเลือดกบที่ไม่ติดเชื้อ

3.4.4 การตรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิงพาหะ

ทำการตรวจเชื้อ 3 วิธี ดังต่อไปนี้

3.4.4.1 การตรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิงโดยวิธีผ่าตัดและย้อมสี Giemsa

การตรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิงโดยวิธีผ่าตัดและย้อมสี Giemsa เพื่อให้ทราบจำนวนวันโดยประมาณที่เชื้อเดินทางจากทางเดินอาหารมายังต่อมน้ำลายของปลิง

- นำปลิงกลุ่มทดลองจากข้อ 3.4.3.1 มาตรวจหาเชื้อในปลิง ในวันที่ 14, 21, 28, 35, 42 และ 49 วันละ 3 ตัว และปลิงกลุ่มควบคุมจากข้อ 3.4.3.2 มาตรวจหาเชื้อในปลิงในวันที่ 28, 35, 42 และ 49 วันละ 1 ตัว
- นำตัวอย่างปลิงไปทำให้หยุดการเคลื่อนไหวด้วยการใส่ใน 30% ethyl alcohol
- นำปลิงวางบนสไลด์เปล่าที่สะอาด และผ่าตัดปลิงด้วยเข็มเขี่ยและปากคีบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- แยกต่อมน้ำลายและทางเดินอาหารของปลิงบนสไลด์และนำไปผึ่งอากาศให้แห้ง
- นำสไลด์ไปรักษาสภาพใน 100% methyl alcohol และย้อมสี Giemsa (ตามวิธีการในข้อ 3.4.1.1)
- นำสไลด์ไปตรวจหาเชื้อในต่อมน้ำลายและทางเดินอาหารของปลิงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.4.4.2 การตรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิงพาหะโดยการวิธีตัดชิ้นเนื้อเยื่อแบบ ultra-thin ทำสไลด์ถาวรและย้อมด้วยสี toluidine blue

นำปลิงกลุ่มทดลองจากข้อ 3.4.3.1 มาตัดชิ้นเนื้อเยื่อแบบ ultra-thin และย้อมด้วยสี toluidine blue โดยใช้จำนวนวันหลังจากปลิงดูดเลือดกบเช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.1 โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ทำให้ปลิงหยุดการเคลื่อนไหวและผ่าตัดตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.1
- นำชิ้นเนื้อเยื่อมาผ่านวิธีสำหรับเตรียม ultra-thin ตามวิธีการเช่นเดียวกับการเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อสำหรับการศึกษาเชื้อด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.4.3
- ตัดชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ ultramicrotome ยี่ห้อ Ultotome รุ่น V ที่ความบาง 0.5-1 ไมครอน วางชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์แก้ว
- ย้อมด้วยสี toluidine blue เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีที่เกินออกด้วยน้ำประปา นำสไลด์มาผึ่งให้แห้ง
- นำสไลด์มาศึกษาลักษณะของเชื้อ *Lankesterella* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า
- บันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิตัล ยี่ห้อ Canon รุ่น S80

3.4.4.3 การตรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิงพาหะด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy: TEM) ตามวิธีการดังนี้

- ใช้ปลิงจากกลุ่มทดลองในข้อ 3.4.3.1 โดยใช้จำนวนวันสำหรับตัวอย่างปลิงที่นำมาศึกษาหลังจากการให้ดูดเลือดกบเช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.1
- ทำให้ปลิงหยุดการเคลื่อนไหว ผ่าตัดชิ้นเนื้อเยื่อทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายของปลิงด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.1
- นำชิ้นเนื้อเยื่อมาผ่านวิธีสำหรับเตรียม ultra-thin section เพื่อนำไปใช้กับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตามขั้นตอนดังนี้
- ตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อให้มีขนาดด้านละประมาณ 0.5 มิลลิเมตร
- รักษาสภาพชิ้นเนื้อเยื่อใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน
- แช่ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 28 °C 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที
- แช่ใน 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 1-2 ชั่วโมง
- แช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที
- ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยการนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อแช่ใน 35, 50, 70, 95 และ 100 % ethyl alcohol ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลาอย่างละ 15 นาที
- ใช้ Spurr resin แทนที่ ethyl alcohol โดยเริ่มจากการแช่ใน propylene oxide 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 15 นาที แช่ใน propylene oxide + spurr resin อัตราส่วน 3:1 เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอัตราส่วนเป็น 1: 1 เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ต่อด้วยอัตราส่วน 1:3 เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง และ spurr resin อย่างเดียว 3 ครั้ง สอง

ครั้งแรกเป็นเวลาครั้งละ 2 ชั่วโมง ส่วนครั้งที่สามทิ้งไว้ข้ามคืน

- วางชิ้นส่วนเนื้อเยื่อในแม่พิมพ์ ใส่ spurr resin ลงไปจนเต็มแม่พิมพ์แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง
- ตัดชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ ultramicrotome ด้วยความบางชิ้นเนื้อเยื่อ 60-90 นาโนเมตร วางชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วบน grid
- ย้อมเนื้อเยื่อด้วย 0.5% uranyl acetate ใน 50% ethyl alcohol ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10-15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นและย้อมด้วย lead citrate เป็นเวลา 5-10 นาที
- ศึกษาลักษณะของเชื้อ *Lankesterella* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-2100

3.4.5 การทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. จากปลิงพาหะไปสู่กบนาปลอดเชื้อ

3.4.5.1 การเตรียมลูกกบปลอดเชื้อ

- นำลูกกบนาอายุ 1 เดือน จำนวน 120 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงมาเลี้ยงในตู้ทดลองขนาดกว้าง 50 เซนติเมตร ยาว 80 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร จำนวนกบ 20 ตัวต่อ 1 ตู้ภายในโรงเลี้ยงกบของหน่วยปฏิบัติการวิจัยสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงกบด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปตามการวิธีเลี้ยงของผุสตี ปริยานนท์ (2535)
- สุ่มตัวอย่างลูกกบในอัตรา 1 ใน 10 ของจำนวนลูกกบจากฟาร์มเลี้ยงเดียวกันมาทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบาง ย้อมด้วยสี Giemsa ตามวิธีการในข้อ 3.4.1.1 และทำแผ่นฟิล์มเนื้อเยื่อ ย้อมด้วยสี Giemsa (ตามวิธีการในข้อ 3.4.6.2) เพื่อตรวจหาเชื้อในเลือดและอวัยวะภายใน ของลูกกบ ได้แก่ ตับ ไต ม้าม ลำไส้เล็ก หัวใจ และปอด นำลูกกบในชุดเดียวกันกับที่สุ่มตัวอย่าง ไปตรวจแล้วว่าไม่พบเชื้อไปเลี้ยงในตู้ทดลองต่อเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน นำลูกกบที่สมบูรณ์และแข็งแรงไปใช้เป็นกบปลอดเชื้อสำหรับการทดลอง

3.4.5.2 วิธีการแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. จากปลิงไปสู่ลูกกบปลอดเชื้อ

นำปลิงที่ดูดเลือดกบที่มีเชื้อมาแล้ว 35 วัน ทดลองแพร่เชื้อสู่กบสองวิธีต่อไปนี้

3.4.5.2.1 วิธีการให้กบกินปลิง

- กลุ่มทดลอง ใช้ลูกกบปลอดเชื้อจำนวน 45 ตัว มาบังคับป้อนด้วยปลิงที่ดูดเลือดกบติดเชื้อมาแล้ว 35 วัน โดยป้อนปลิง 1 ตัวต่อกบ 1 ตัว แล้วแยกเลี้ยงกบที่ทำการทดลองแล้วในภาชนะพลาสติก ภาชนะละ 1 ตัว
- กลุ่มควบคุม ใช้ลูกกบปลอดเชื้อจำนวน 15 ตัว ทำเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง แต่ให้กินปลิงที่ดูดเลือดกบที่ไม่ติดเชื้อ

3.4.5.2.2 วิธีการให้ปลิงดูดเลือดกบ

- กลุ่มทดลอง ใช้กบปลอดเชื้อจำนวน 45 ตัว มาแยกใส่ในภาชนะพลาสติก ภาชนะละ 1 ตัว ใส่ปลิงที่ดูดเลือดกบติดเชื้อมาแล้ว 35 วันจำนวน 1 ตัวอยู่ร่วมกับกบ เมื่อปลิงดูดเลือดกบเต็มที่ แยกปลิงออกจากกบและเลี้ยงกบในภาชนะเดิมต่อไป
- กลุ่มควบคุม ใช้กบปลอดเชื้อจำนวน 15 ตัว ทำเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง แต่ใช้ปลิงที่ดูดเลือดกบที่ไม่ติดเชื้อ

3.4.5.3 การตรวจผลการติดเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบ

ตรวจผลการติดเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบกลุ่มทดลองในข้อ 3.4.5.2 โดยตรวจเชื้อในเลือดและอวัยวะภายในทุก 4 วัน ตั้งแต่วันที่ 4 - 60 วันละ 3 ตัว ส่วนกบกลุ่มควบคุมตรวจผลการติดเชื้อในเลือดและอวัยวะภายในทุก 4 วัน ตั้งแต่วันที่ 4 - 60 วันละ 1 ตัว

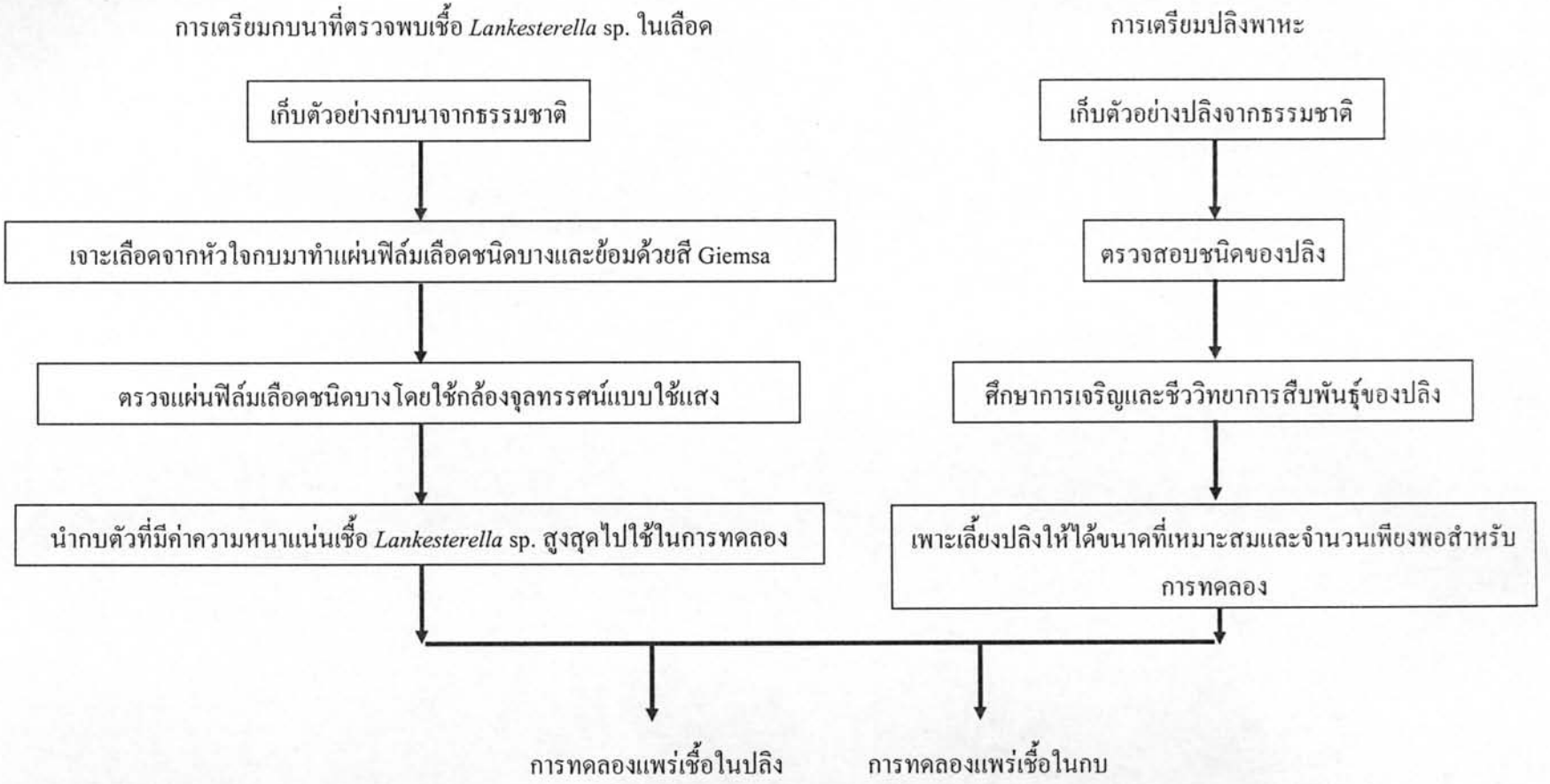
3.4.6 การตรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. ในเลือดและเนื้อเยื่อจากอวัยวะภายในของกบนาโดยการย้อมสี Giemsa

3.4.6.1 การทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบาง ตามวิธีการในข้อ 3.4.1

3.4.6.2 การทำแผ่นฟิล์มเนื้อเยื่อ

- ใช้กรรไกรตัดแยกชิ้นส่วนอวัยวะภายใน 6 อย่างได้แก่ ตับ ไต ม้าม ลำไส้เล็ก หัวใจ และปอดนำไปกดบนสไลด์ทำเป็นแผ่นฟิล์มเนื้อเยื่อ ผึ่งไว้ให้แห้ง
- รักษาสภาพแผ่นฟิล์มเนื้อเยื่อด้วย 100% methyl alcohol และย้อมสี Giemsa

แผนผังแสดงขั้นตอนปฏิบัติการศึกษาการแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบนาโดยปลิง *Alboglossihponia weberi*



การทดลองการติดเชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิง *Alboglossiphonia weberi*
โดยนำปลิงไปดูดเลือดกบนาที่ติดเชื้อ *Lankesterella* sp. นำมาตรวจผลการติดเชื้อ 3 วิธี