

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน



1. แหล่งของเชื้อ Plasmodium inui

*P. inui* (Thai strain) ได้รับจากโครงการวิจัยทางการแพทย์ สบอ. โดยนำเลือดที่ติดเชื้อ *P. inui* จำนวน 10 ล.บ.ท.ม. มาฉีดในลิง (*Macaca irus*) ที่อายุซึ่งมีอายุประมาณ 3 ปีที่ไม่เคยติดเชื้อมาก่อน นำลิงที่ทำการติดเชื้อ *P. inui* ไปเลี้ยงไว้ในสถานที่เลี้ยงสัตว์ ของคณะอายุรศาสตร์เขตร้อน ซึ่งมีเครื่องป้องกันยุงได้ เพื่อให้เป็นแหล่งของเชื้อ *P. inui* สำหรับการวิจัยครั้งนี้

2. ยุงก้นปล่องและอุปกรณ์ในการเลี้ยง

ยุงก้นปล่องที่นำมาศึกษา 4 ชนิด คือ *Anopheles maculatus* (American strain), *A. stephensi* (Calcutta strain), *A. vagus* (Bangkok strain), & *A. subpictus* (Bangkok & Paknam strains) นำยุงทั้ง 4 ชนิดมาเลี้ยงในทองเลี้ยงแมลง (Insectary) ของคณะอายุรศาสตร์เขตร้อนตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน 2510 ภายในทองเลี้ยงแมลงมีตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นแบบอัตโนมัติ โดยปรับอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 27-29° C. ความชื้นอยู่ระหว่าง 80-90 % ติ๊กไฟนิออนมีให้แสงสว่างส่องทั่วทั้งทองเลี้ยงกลางวัน ไฟฟ้าจะเปิดตั้งแต่เวลา 6.00-18.00 น. และจะปิดเวลา 18.00 น. เพื่อให้มีช่วงเวลากลางวัน และ เวลากลางคืน เหมือนธรรมชาติ

3. การเลี้ยงยุงก้นปล่องให้เป็น โคโลนี (colony)

เอายุงก้นปล่องมาให้กินเลือดหนูขาว แล้วทำการผสมพันธุ์เทียม (artificial mating) ยกเว้นยุง *A. stephensi* ซึ่งสามารถผสมพันธุ์เองได้ในกรงเลี้ยงยุง กรงที่ใช้เลี้ยงยุง เป็นกรงอลูมิเนียม ที่ควบคุมอุณหภูมิอย่างละเอียด ขนาดของกรง 30"x30"x30" (ตามรูปที่ 1)

นำยุงที่ผสมพันธุ์แล้วมาเลี้ยงในกรงเลี้ยงแมลงพร้อมทั้งใส่ภาชนะที่มีสำลี และปัดด้วยกระดาษกรองที่ทำให้ชื้นไว้สำหรับให้ยุงไข่ นำไข่ยุงมาลงในภาคน้ำที่มีน้ำสะอาดเพื่อให้ไข่เจริญเป็นลูกน้ำ (Larva) และตัวโม่ง (Pupa) อาหารของลูกน้ำเป็นอาหารผสมประกอบด้วย Nestum 90 กรัม Yeast 10 กรัม และ Powdered Liver 5-10 กรัม โดยโรยอาหารบนผิวหน้า ลูกน้ำที่กลายเป็นตัวโม่งแล้ว คุ้ยใส่ในกรงเลี้ยงยุงเพื่อเก็บเป็นตัวแก่ของยุง อาหารสำหรับตัวแก่เป็นน้ำเชื่อม 10 % ผสมกับ มัลติวิตามิน โดยขุบสำลีวางไว้ที่ปากขวดขนาดเล็ก ใส่ไว้ในกรงเลี้ยงยุง ตัวแก่ของยุงเหล่านี้จะใช้เพื่อศึกษาการเป็นพาหะของเชื้อ P. inui ต่อไป .

4. วิธีทดลองการเป็นพาหะ

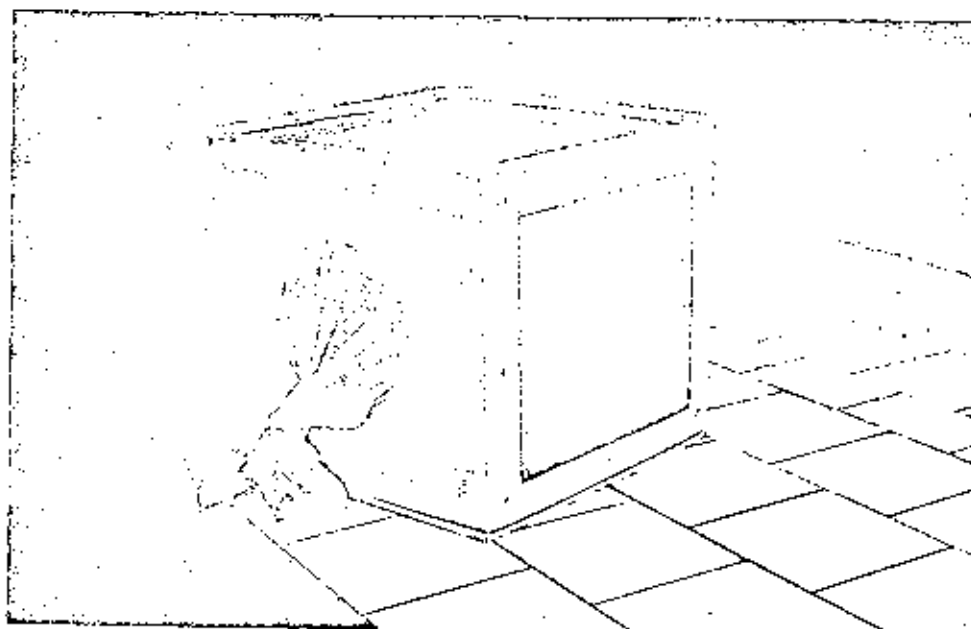
ทำการตรวจสิ่ง (Macaca irus) ที่ทำให้คิดเชื้อด้วย P. inui (ตามข้อ 1) ทุกวันเพื่อดูระยะ gametocytes ของ P. inui โดยทำ thin film และย้อมควยสี J.S.B. ตรวจจกจนกระทั่งพบ gametocytes มีจำนวนอย่างน้อย 1/1000 ของเม็ดเลือดแดง จึงนำยุงที่เลี้ยงไว้มากัดกินเลือดลิง ที่โกนหน้าทองและทำให้ลิงเชื่องด้วย Nembutal แล้วเอาคานที่โกนพามบนกรงเลี้ยงยุง เพื่อให้ยุงกัดได้ง่าย ยุงที่นำมากัดกินเลือดลิง จะต้องเป็นยุงที่บริสุทธิ์ และออกอาหารมาแล้ว 1 - 2 วัน เพื่อให้ยุงกระหายรวมทั้งจะกัดกินเลือด โดยวิธีดังกล่าวแล้ว ยุง A. vagus & A. subpictus ไม่ค่อยยอมกินเลือด ต้องใช้วิธีให้กินเลือดลิงที่จำกัดโดยกูดยุงตัวเมียที่ดูดอาหารแล้วควยหลอดดูดยุง (Aspirator) ตามรูปที่ 2 ใส่ยุงลงในกระบอกไม้ไผ่ โดยปิดกระบอกไม้ไผ่ข้างหนึ่งด้วยยาสีค่า และอีกข้างหนึ่งปิดด้วยผ้ามุงใบลอน เอาปากกระบอกคานที่ปิดด้วยผ้ามุงใบลอนทามที่ทองลิง เมื่อยุงส่วนใหญ่กินเลือดคิมแล้ว เลือดกูดยุงที่เห็นว่ามีเลือดที่เกาะเพาะอาหารเต็ม มาเลี้ยงไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาดเล็ก ตามรูปที่ 3 ซึ่งภายในทำให้ชื้นด้วยสำลีชุบน้ำ และปัดด้วยกระดาษกรองที่ปากกรงเลี้ยงแมลงขนาดเล็กฝาจะเป็นมุ้งลวดชนิดละเอียด ภายในกรงใส่ยุงทดลองละไม่เกิน 2 ตัว อาหารที่ให้ยุงที่รับเชื้อ P. inui แล้ว เป็นน้ำเชื่อม 10 % ผสมกับมัลติวิตามินเลี้ยงยุงไว้จนกระทั่งถึงวันถัดมา

5. วิธีฆ่าและยุงเพื่อระยะ oocyst & sporozoite ของ P. inui

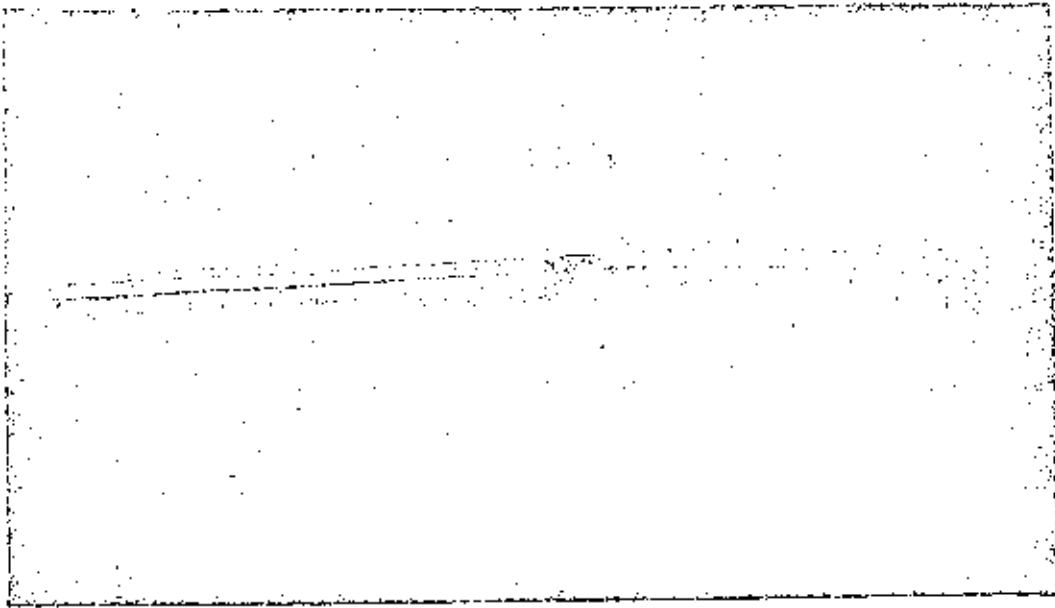
ทำการฆ่าและยุงเพื่อตรวจระยะ oocyst ที่เกาะเพาะของยุง และ sporozoite ที่คอมน้ำลายของยุง โดยเริ่มตรวจตั้งแต่วันที่ 5 จนกระทั่งถึงวันที่ 21 หลังจากยุงได้รับเชื้อ

P. inui ตามวิธีของ Garnham, 1951; Bano, 1959; & Collins et al, 1966

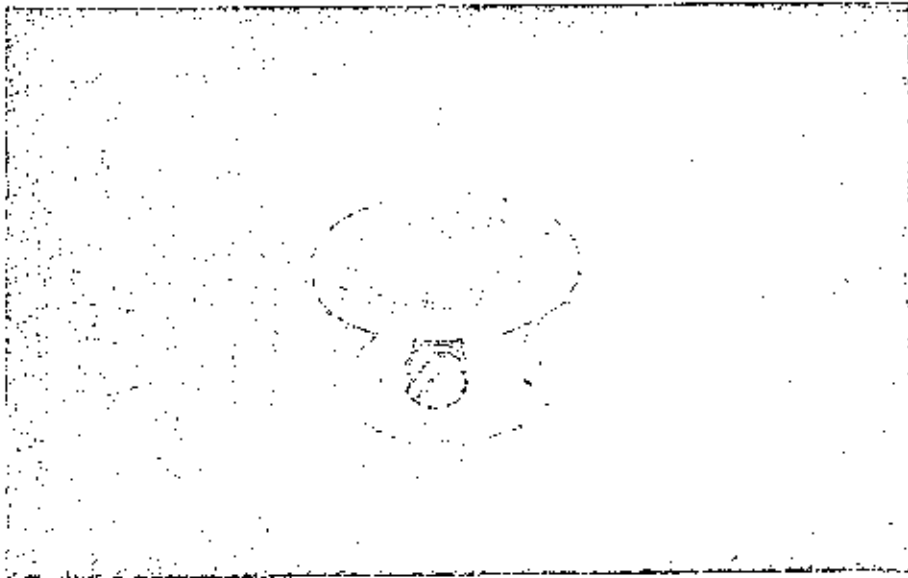
ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.4 %



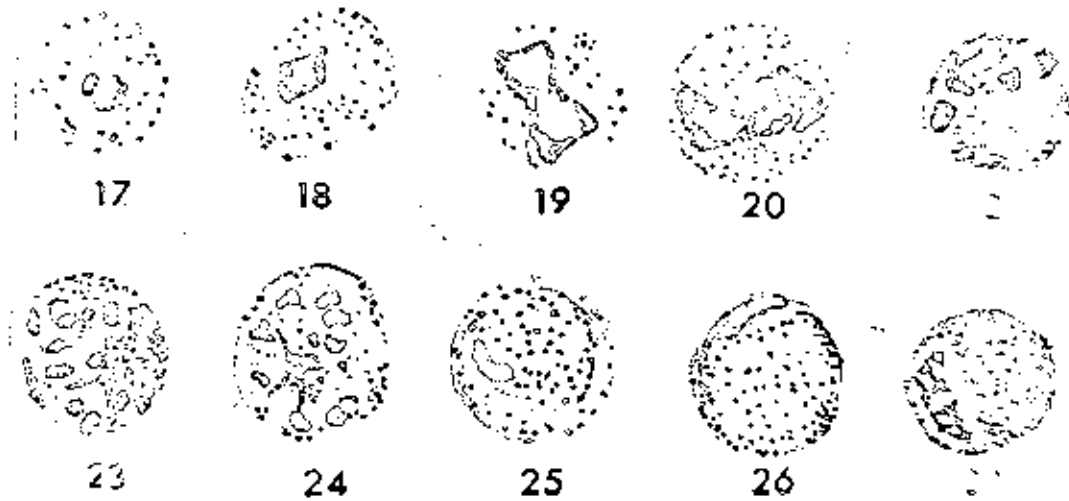
ภาพที่ 1    กรงเลี้ยงยุงที่เป็นโคโลนี



ภาพที่ 2 เครื่องดูดยุง (aspirator)



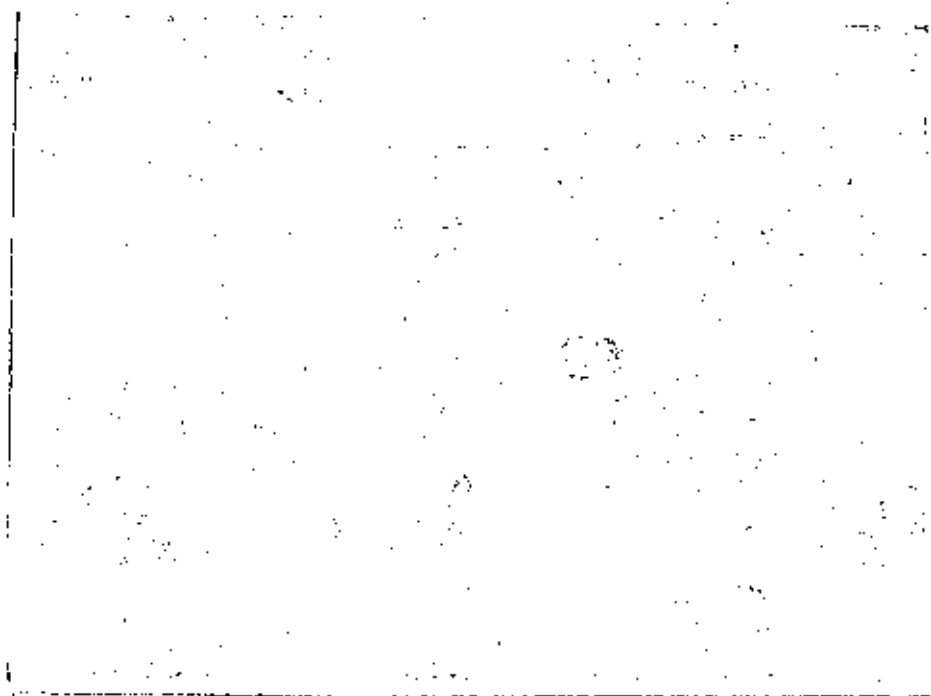
ภาพที่ 3 กรงเลี้ยงยุงหลังจากได้รับเชื้อ Plasmodium inui



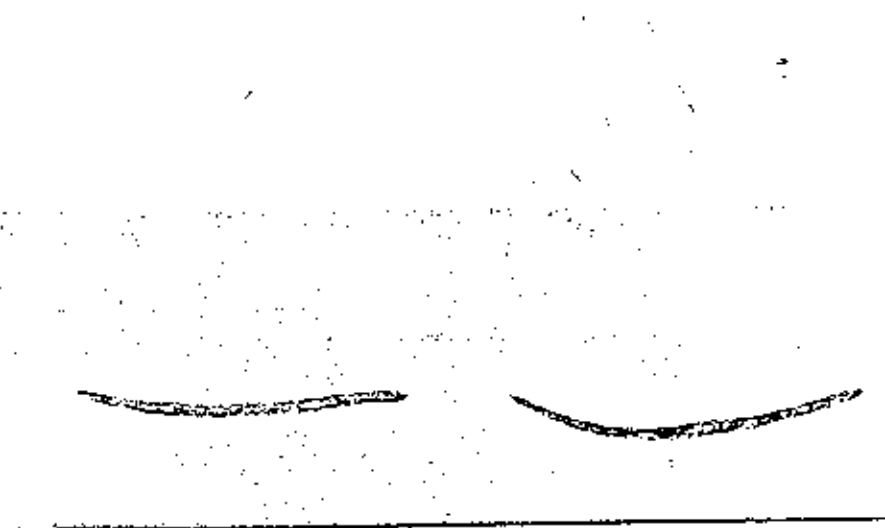
Shortt et al, 1961

ЛАНН 4 Plasmodium inui (x 3,200)

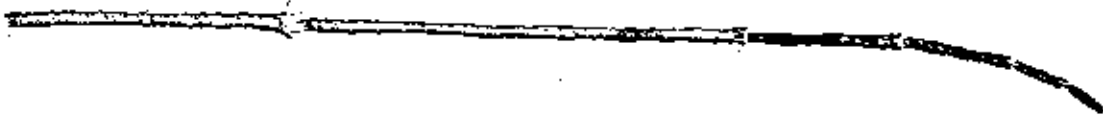
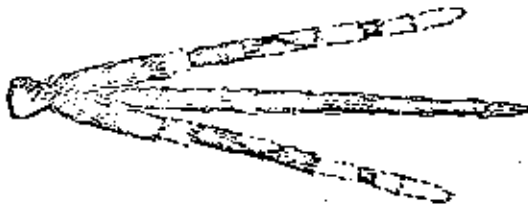
- 17-18, Rings
- 19-20, Trophozoites
- 21, Immature Schizont
- 23-24, Mature Schizonts
- 25-26, Macrogametocytes
- 27, Microgametocyte



ภาพที่ 5 Gametocyte of Plasmodium inui (x 1000)



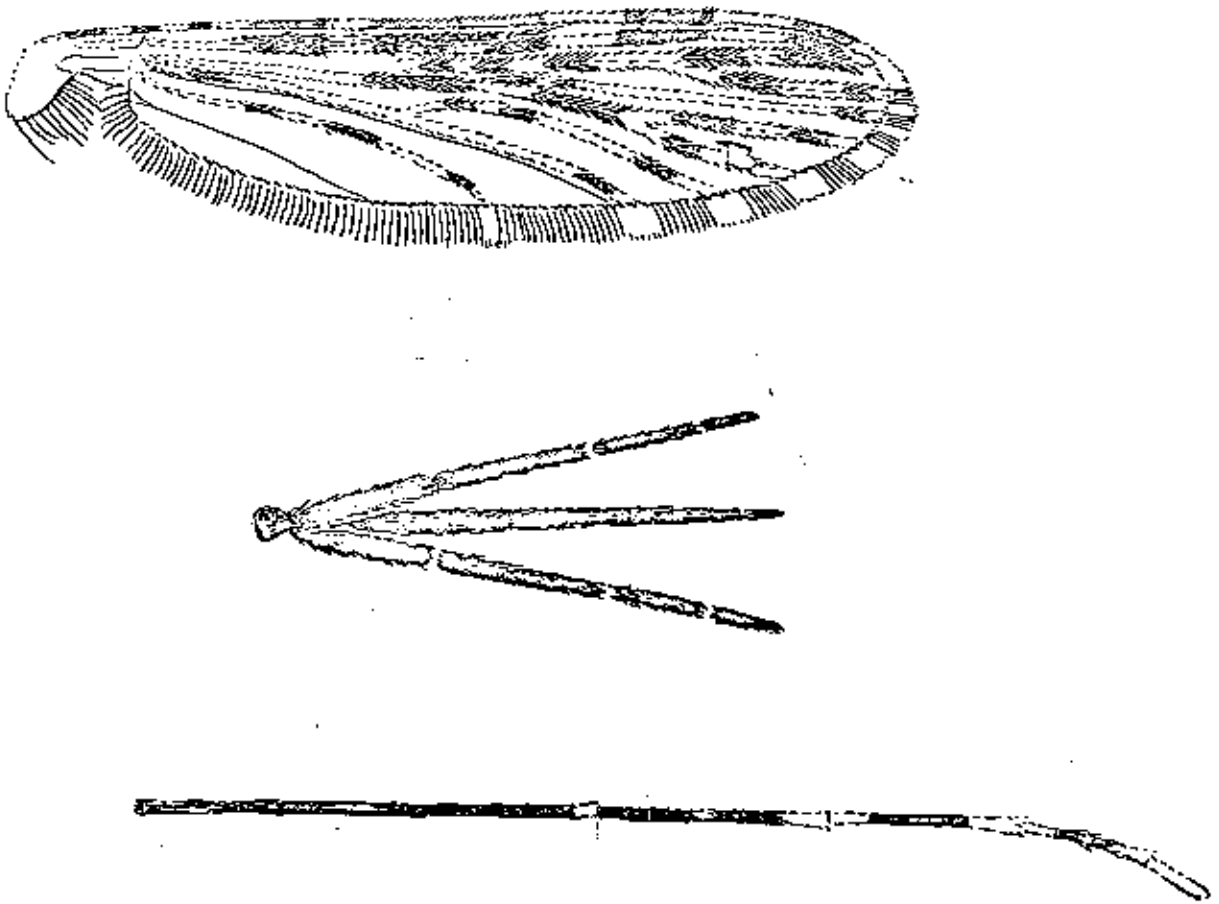
ภาพที่ 6 Sporozoites of Plasmodium inui (x 1000)



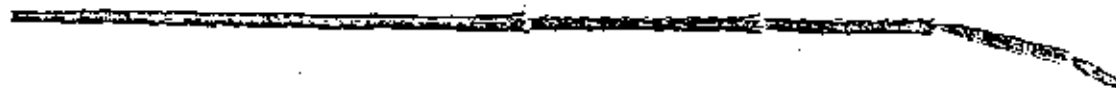
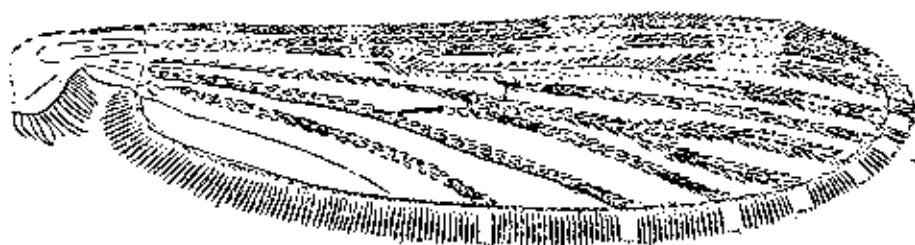
ภาพที่ 7

ลักษณะของ Anopheles stephensi Liston





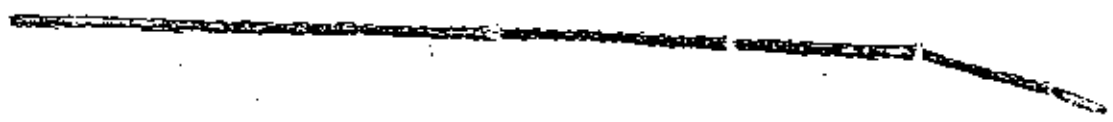
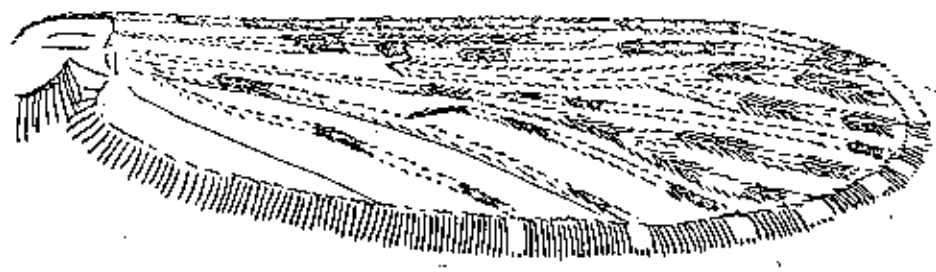
ภาพที่ 8    ลักษณะของ Anopheles maculatus Theobald



ภาพที่ 9

ลักษณะของ Anopheles vagus Donitz

001322



ภาพที่ 10 ลักษณะของ Anopheles subpictus Grassi