บทที่ 4

การดำเนินการทดลอง

1. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่ง RPMI 1640 หนัก 10.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่กลั่น 3 ครั้ง ประมาณ 900 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ใส่ Hepes buffer 5.94 กรัม คนให้ละลาย ใส่ garamycin 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรทั้งหมดให้เท่ากับ 960 มิลลิลิตร สเตอไรล์โดยกรองผ่านเครื่องกรองมิลลิพอร์ แบ่งใส่ลงในขวดแก้วที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 100 มิลลิลิตร เก็บเข้าตู้เย็นอุณหภูมิ 4°ซ อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ก่อนนำมาใช้ต้องเติม 5 % ของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่สเตอไรล์โดยกรองผ่านเครื่องกรองมิลลิพอร์ จำนวน 4.2 มิลลิลิตร และใส่ซีรัม 10.4 มิลลิลิตร ซึ่งต่อไปจะเรียกอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ใส่ 5 % สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตว่า "อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีซีรัม" และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้ง 5 % สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตและซีรัมว่า " อาหารเลี้ยงเชื้อ"

การเตรียมซีรัม เตรียมได้จากเลือดคนหมู่ AB ซึ่งปล่อยให้แข็งตัวโดยไม่ใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เมื่อเลือดแข็งตัวดีแล้ว ดูดเฉพาะส่วนชั้นบนนำไปปั่นแยกเม็ดเลือดแดงออกจากซีรัม ด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดซีรัมใส ๆ ข้างบนใส่ในหลอดที่อบฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 10.4 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 55–56°ซ 30 นาที เก็บซีรัมที่เตรียมได้นี้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ –10°ซ

2. วิธีเตรียมเลือดที่ไม่มีเชื้อพัลซิปารัมเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง

นำเลือดคนหมู่ AB ที่มีอายุนับจากการเจาะจากผู้บริจาคไม่เกิน 4 สัปดาห์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตรมาปั่นเพื่อแยกเอาพลาสมาและบัฟฟีโคต (buffy coat) ออกโดยใช้ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ค่อย ๆ ใช้ปาสเตอร์

ปิเปตดูดแยกเอาพลาสมาและส่วนบัฟฟี่โคตออกให้หมด แล้วล้างเม็ดเลือดที่เหลืออยู่ด้วยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีซีรัมลงไปประมาณ 2 เท่าของปริมาตรเม็ดเลือดแดง ใช้ปิเปตวัดปริมาตร ดูดขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันดี แล้วนำไปปั่นอีกด้วยเวลาและความเร็วเท่าเดิม ดูดเอาส่วนใสชั้นบนออก เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีซีรั่มลงไปอีก ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ครั้งสุดท้ายเติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปปริมาตรเท่ากับเม็ดเลือดแดงที่เหลืออยู่ ผสมให้เข้ากันดี นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°ซ เม็ดเลือดแดงที่เตรียมแต่ละครั้งนี้สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 1 สัปดาห์

3. วิธีเตรียมเลือดที่มีเชื้อพัลซิปารัมเมื่อเริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยง

3.1 วิธีทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางและย้อมด้วยสียิมซา

หยดเลือดลงบนแผ่นสไลด์ที่แห้ง และสะอาดที่ปลายด้านหนึ่ง ใช้ขอบสไลด์ของสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง แตะหยดเลือด ทำมุมประมาณ 45 องศา เลื่อนขอบสไลด์ที่ทำมุมอยู่ออกไปทางปลายโดยเร็วและสม่ำเสมอ อย่าให้มีการหยุดชะงัก เลือดจะแผ่เป็นแผ่นฟิล์มบางบนแผ่นสไลด์ อังบนเปลวไฟอ่อน ๆ เพื่อให้แห้งสนิท จุ่มลงในแอบโซลูท เมธิลแอลกอฮอล ครึ่งนาที ผึ่งให้แห้งสนิท แล้วจึงย้อมด้วยสียิมซา

การเตรียมสียิมซา

ส่วนประกอบ ผงสียิมซา 0.6 กรัม
กลีเซอรอล 50.0 มิลลิลิตร
แอบโซลูท เมธิลแอลกอฮอล 50.0 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. บดสียิมซา กับกลีเซอรอลทีละน้อยให้ละเอียดในโกร่งจนเข้ากันและเป็นเนื้อเดียวกันดี ทำเช่นนี้จนผงสีหมด

2. ล้างสีที่ติดโกร่งด้วยกลีเซลรอล แล้วเทรวมใส่ขวดแก้วทรงกรวย

3. นำสีไปอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 55–60 °ซ นาน 6–8 ชั่วโมง คอยเขย่าขวดให้สีอุ่นทั่วกันทุกครึ่งชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4. เติมแอบโซลูท เมธิลแอลกอฮอล และเขย่าให้เข้ากัน

5. ปิดปากขวดทรงกรวย แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในตู้อบเป็นเวลา 2 สัปดาห์

6. กรองสารละลายของสีลงในขวดสีน้ำตาล แล้วเก็บไว้ใช้ต่อไป

วิธีย้อม

ผสมสียิมซา โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่าง 7.0 ซึ่งเตรียมจาก $\frac{1}{15}$ M ของสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 ส่วน ผสมกับ $\frac{1}{15}$ M ของสารละลายโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 ส่วน จำนวน 10 มิลลิลิตร ต่อสียิมซา 1 มิลลิลิตร ผสมทันทีก่อนใช้ แล้วหยดสีลงบนสไลด์ให้ท่วมบริเวณที่จะย้อม ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จึงล้างออกด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้ง แล้วเก็บไว้นับจำนวนเชื้อพัลซิปารัมต่อไป

3.2 วิธีนับจำนวนเชื้อพัลซิปารัม

ใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 x 10 เลื่อนหาบริเวณที่ปริมาณเม็ดเลือดแดงบนแผ่นฟิล์มเลือดกระจายสม่ำเสมอ และเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ซึ่งมักจะพบบริเวณปลายฟิล์มเลือดเปลี่ยนกำลังขยายเป็น 10 x 100 นับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่พบในวงกล้อง 3 วงกล้อง คำนวณหาจำนวนวงกล้องที่จะพบเม็ดเลือดแดง – ทั้งหมด 10,000 เซล แล้วนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพัลซิปารัมต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซล โดยนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพัลซิปารัมที่พบในวงกล้องเท่ากับจำนวน วงกล้องที่คำนวณได้ นับแยกระยะรูปวงแหวน โทรโฟซอยต์ ไชซอนต์ และระยะแกมมีโตไซต์ โดยมีหลักการนับคือ

ระยะรูปวงแหวน โครมาตินติดสีแดงเข้ม ไซโตรพลาสม เป็นรูปวงแหวนติดสีฟ้า

ระยะโทรโฟซอยต์ ไซโตพลาสมเริ่มเปลี่ยนรูปร่างไป อาจเป็นรูปยาวรีหรือหนาขึ้น โครมาตินติดสีแดงเข้ม

ระยะไชซอนต์ ไซโตพลาสมใหญ่ขึ้นมากติดสีฟ้า โครมาตินแบ่งออกเป็น 2 หรือมากกว่า 2 อัน ติดสีแดงเข้ม มีรงควัตถุสีดำตาลเป็นแท่ง ๆ อยู่ในไซโตพลาสม

ระยะแกมีโตไซต์ มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว ติดสีแดงหรือสีน้ำเงิน แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์จำนวนเชื้อฟัลซิปารัม ตัวอย่างเช่น นับจำนวนเม็ดเลือดแดงในวงกล้อง 3 วงกล้อง ได้เท่ากับ 855 เซล จำนวนวงกล้องที่จะพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลเท่ากับ $\frac{10,000 \times 3}{855}$ เท่ากับ 35 วงกล้อง ดังนั้นจะต้องนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อฟัลซิปารัมที่พบใน 35 วงกล้อง สมมุตินับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อฟัลซิปารัมระยะรูปวงแหวนได้เท่ากับ 200 เซล โทรโฟซอยต์ 50 เซล และไชซอนต์ 10 เซล จำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อฟัลซิปารัมเท่ากับ 200 + 50 + 10 เท่ากับ 260 เซล ต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซล ดังนั้นเปอร์เซ็นต์จำนวนเชื้อฟัลซิปารัมเท่ากับ 2.6

3.3 วิธีเลี้ยงเชื้อฟัลซิปารัม

เชื้อฟัลซิปารัมที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นเชื้อที่ได้เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการวิจัยมาเลเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาก่อนแล้ว โดยวิธีของ Trager & Jensen (1976) และได้นำมาเลี้ยงต่อเพื่อใช้ในการทดลองด้วยวิธีเดียวกัน ดังนี้คือ ดูดเลือดที่มีเชื้อฟัลซิปารัมใส่ในหลอดเซ็นติฟิวก์ ปั่นด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อชั้นบนออก เติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ลงไปในปริมาณเท่ากับปริมาตรของเม็ดเลือดแดงที่เหลืออยู่ ผสมให้เข้ากัน แล้วนับจำนวนเชื้อในเลือดที่จะทำการเพาะเลี้ยงนี้ จากนั้นผสมให้มีจำนวนเชื้อเหลือประมาณ 0.5 % ด้วยเลือดที่เตรียมไว้สำหรับการเลี้ยง

เชื้อ แล้วใส่อาหารเลี้ยงเชื้อลงไป 5.4 มิลลิลิตรต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปต วัดปริมาตรดูดใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 35 x 10 มิลลิเมตร จำนวน 1.5 มิลลิลิตร และขนาด 60 x 15 มิลลิเมตร จำนวน 5 มิลลิลิตร นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อนี้วางในเดสซิเคเตอร์ จุดเทียนไขแล้วปิดผาแต่เปิดจุกไว้ ทันทีที่เทียนดับหมุนปิดจุก เพื่อให้บรรยากาศภายในเดสซิเคเตอร์มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูง (5–8 %) นำเดสซิเคเตอร์ที่บรรจุจานเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37° ซ

การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ปาสเตอร์ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ชั้นบนออกให้มากที่สุด โดยระวังไม่ดูดเม็ดเลือดแดงออกมาด้วย เติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ลงไปอีก 1.5 มิลลิลิตร สำหรับจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 35 x 10 มิลลิเมตร และ 5 มิลลิลิตร สำหรับจานเพราะเลี้ยงเชื้อขนาด 60 x 10 มิลลิเมตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันดี

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อฟัลซิปารัมติดต่อกันเป็นเวลานาน มีข้อปฏิบัติดังนี้

1. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง และในกรณีที่มีจำนวนเชื้อสูงกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ จะต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง

2. เติมเลือดใหม่เมื่อครบกำหนด 4 วัน หลังจากการเติมเลือดครั้งสุดท้าย หรือเมื่อต้องการลดจำนวนเชื้อลง

3. ทุก 24 ชั่วโมง ดูดเลือดจากจานเพาะเลี้ยงแต่ละจานมาทำฟิล์มเลือดชนิดบางบนกระจกสไลด์ ย้อมด้วยสียิมซา ตรวจดูลักษณะรูปร่างของเชื้อ นับจำนวน แล้วบันทึกผลไว้

การทำฟิล์มเลือดชนิดบางบนกระจกสไลด์ จากจานเพาะเลี้ยงเชื้อทำขณะที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนใส่อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ลงไปโดยดูดเลือดขัน ๆ ที่ติดอยู่ก้นจานเพาะเลี้ยงหยดบนสไลด์ แล้วทำตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.1

เชื้อฟัลซิปารัมทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้ทำการเพาะเลี้ยงไว้ใน

ห้องปฏิบัติการตลอดการทดลอง

3.4 วิธีทำให้จำนวนเชื้อลดลง

ในกรณีที่จำนวนเชื้อสูงเกินกว่าที่ต้องการสามารถทำให้จำนวนลดลงได้ โดยการเติมเม็ดเลือดแดงที่เตรียมไว้ในการเพาะเลี้ยงลงไป ตัวอย่างเช่น ถ้านับจำนวนเชื้อได้เท่ากับ 5 % ต้องการเลือดที่มีจำนวนเชื้อ 1 % ทำได้โดยการดูดเลือดทั้งหมดจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดเซ็นติฟิวก์ ปั่นแยกส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ลงไปปริมาณเท่ากับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากัน สมมุติวัดปริมาตรทั้งหมดได้เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตวัดปริมาตรดูดเลือดนี้จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ผสมลงในเลือดที่เตรียมไว้สำหรับเพาะเลี้ยงจำนวน 0.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เลือดใหม่ที่ได้นี้จะมีจำนวนเชื้อประมาณ 1 % จำนวน 1 มิลลิลิตร สามารถนำไปใช้ทดสอบยาหรือเพาะเลี้ยงต่อไป

4. วิธีเตรียมยาเมโฟลควินและยาอะโมไดอาควิน

ยาเมโฟลควินและอะโมไดอาควินที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้มาจากองค์การอนามัยโลกในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-3} M นำมาเตรียมให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

4.1 ยาเมโฟลควิน

เตรียมยาเมโฟลควินให้มีความเข้มข้น 10^{-9}, 5×10^{-9}, 10^{-8}, 5×10^{-8} และ 10^{-7} M ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 วิธีเตรียมยาเมโฟลควินความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของยาเมโฟลควิน (M) และจำนวนที่ใช้ (มิลลิลิตร)			จำนวนอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของยาเมโฟลควิน (M)
10^{-3}	จำนวน	0.1	9.9	10^{-5}
10^{-5}	"	0.1	9.9	10^{-7}
10^{-7}	"	4	4	5×10^{-8}
5×10^{-8}	"	2	8	10^{-8}
10^{-8}	"	4	4	5×10^{-9}
5×10^{-9}	"	2	8	10^{-9}

4.2 ยาอะโมไดอาควิน

เตรียมยาอะโมไดอาควิน ให้มีความเข้มข้น 10^{-9}, 5×10^{-9}, 10^{-8}, 2.5×10^{-8}, 5×10^{-8} และ 10^{-7} M ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 วิธีเตรียมยาอะโมไดอาควินความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของยาอะโมไดอาควิน(M) และจำนวนที่ใช้ (มิลลิลิตร)			จำนวนอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของยาอะโมไดอาควิน(M)
10^{-3}	จำนวน	0.1	9.9	10^{-5}
10^{-5}	"	0.1	9.9	10^{-7}
10^{-7}	"	4	4	5×10^{-8}
10^{-7}	"	2.5	7.5	2.5×10^{-8}
5×10^{-8}	"	2	8	10^{-8}
10^{-8}	"	4	4	5×10^{-9}
5×10^{-9}	"	2	8	10^{-9}

หมายเหตุ (1) การเตรียมยาอะโมไดอาควินนี้ จะไม่ใช้เครื่องแก้วเลย ใช้เครื่องมือที่เป็นพลาสติคทั้งหมด

(2) ยาทั้งสองชนิดนี้จะเตรียมใหม่ทุกครั้งในแต่ละการทดลอง

5. วิธีทดสอบยา

ในการทดสอบจะใช้เชื้อพัลซิปารัมที่ได้เพาะเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา ด้วยวิธี Candle Jar Method และแต่ละครั้งพยายามเลือกเวลาทดสอบเมื่อเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในระยะรูปวงแหวน ถ้าจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพัลซิปารัมสูงเกินต้องการ สามารถทำให้ลดลงได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.4

ในการทดลองใช้จานเพาะเลี้ยงสำหรับทดลองยา ซึ่งมี 8 x 12 หลุม ดังแสดงในรูปที่ 1 แถว A คือตำแหน่งที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่ยา (กลุ่มควบคุม) แถว B-H คือตำแหน่งที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาความเข้มข้นต่าง ๆ เรียงลำดับจากต่ำไปสูง เช่น ยาเมโฟลควินจะใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-9}, 5×10^{-9}, 10^{-8},

5×10^{-8} และ 10^{-7} ตามลำดับ และยาอะโมไดอาควินใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-9}, 5×10^{-9}, 10^{-8}, 2.5×10^{-8}, 5×10^{-8} และ 10^{-7} M ตามลำดับ แถวที่ 1–12 คือ ตำแหน่งของเชื้อพัลซิปารัม ไอโซเลทต่าง ๆ

วิธีทดสอบใช้ไมโครปิเปตเตอร์ ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียาและที่มียาความเข้มข้นต่าง ๆ ใส่ลงในหลุมต่าง ๆ หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วจึงใส่เลือดที่มีเชื้อพัลซิปารัมลงไปอีกหลุมละ 10 ไมโครลิตร ตามตำแหน่งที่จัดไว้ปิดฝา เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน นำไปเพาะเลี้ยงในเดสซิเคเตอร์ที่อุณหภูมิ 37°ซ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำโดยใช้ไมโครปิเปตเตอร์ขนาด 100 ไมโครลิตร ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียาและที่มียาความเข้มข้นเท่าเดิมลงไปอีกหลุมละ 100 ไมโครลิตร

วิธีทำแผ่นฟิล์มเลือดจากจานเพาะเลี้ยงสำหรับทดสอบยา ใช้ไมโครปิเปตเตอร์ขนาด 100 ไมโครลิตร ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกประมาณ 100 ไมโครลิตร – แล้วค่อย ๆ ดูดเลือดข้น ๆ ที่ก้นหลุม ให้เลือดติดอยู่เฉพาะที่ปลายปิเปต หยดบนปลายข้างหนึ่งของสไลด์ ใช้ขอบสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง และย้อมสีตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว

การทดลองได้แบ่งออกเป็น 2 ตอนคือ

5.1 ทดสอบหาจำนวนเชื้อที่เหมาะสมกับการเริ่มต้นทดสอบยาทั้งสองชนิดโดยใช้ไอโซเลท K_1

นำเชื้อไอโซเลท K_1 ที่มีจำนวนเชื้อต่าง ๆ กัน 5 ชุด คือ ประมาณ 2, 1.5, 1, 0.5 และ 0.25 % ทดสอบกับยาเมโฟลควินและอะโมไดอาควิน ศึกษาผลภายหลังสัมผัสยาเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยแบ่งจานเพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบยาออกเป็นชุดละ 3 แถว สำหรับทำแผ่นฟิล์มเลือดเมื่อ

เชื้อสัมผัสยาเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง อย่างละ 1 แถว อ่านผลการทดลองจากแผ่นฟิล์มเลือด

5.2 เปรียบเทียบผลของยาที่มีต่อไอโซเลทและสายพันธุ์ต่าง ๆ

นำเชื้อไอโซเลทและสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีจำนวนเชื้อเท่ากับจำนวนที่เหมาะสมกับการเริ่มต้นทดสอบยาที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 5.1 ทดสอบกับยาเมโฟลควินและอะโมไดอาควิน ศึกษาผลภายหลังสัมผัสยาเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง โดยแบ่งจานเพาะเลี้ยงสำหรับทดสอบยาออกเป็นไอโซเลทหรือสายพันธุ์ละ 2 แถว สำหรับทำแผ่นฟิล์มเลือดเมื่อสัมผัสยาเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง อย่างละ 1 แถว และการทดสอบแต่ละครั้งจะใช้ไอโซเลท K_1 เป็นมาตรฐานด้วยทุกครั้ง ซึ่งไอโซเลท K_1 นี้ . Thaithong & Beale (1981) ได้ใช้เป็นมาตรฐานในการทดสอบยาคลอโรควินและไพริเมทามีน อ่านผลการทดลองจากแผ่นฟิล์มเลือด บันทึกผลไว้

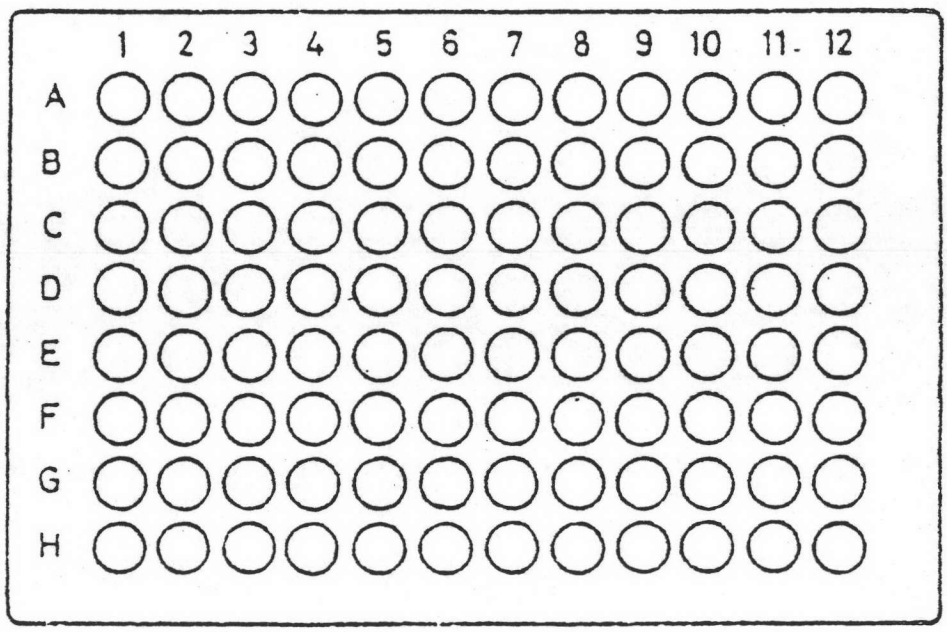
6. วิธีบันทึกผลการทดลอง

ศึกษาผลของยาต่อการเจริญของเชื้อพัลซิปารัม โดยอ่านจากแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางบนกระจกสไลด์ที่ย้อมด้วยสียิมซาแล้ว ดังนี้

6.1 เปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุม บันทึกผลโดยการถ่ายรูป

6.2 นับจำนวนเชื้อโดยพิจารณานับเฉพาะ เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพัลซิปารัมที่มีรูปร่างลักษณะปกติ ตามวิธีในข้อ 3.2 นำมาเขียนกราฟแสดงอัตราการเจริญของเชื้อเมื่อสัมผัสกับยาที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

i 17031667



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงตำแหน่งการใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อพัลซิปารัม ไอโซเลทต่าง ๆ ในจานเพาะเลี้ยงสำหรับทดสอบยา (Microtest II tissue culture plate)

แถว A = ตำแหน่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา

" B-H = ตำแหน่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาความเข้มข้นต่าง ๆ เรียงลำดับจากความเข้มข้นต่ำไปสูง

" 1-12 = ตำแหน่งของเชื้อพัลซิปารัม ไอโซเลทต่าง ๆ