

จะถูกเก็บไว้ในขวดพลาสติกเบอร์ 4 ขนาด 3-5 ตัว ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี แล้วนำขวดเหล่านี้ไปเก็บไว้ใน cooled incubator รอใหวางไขต่อไป

จำนวน larvae ในขวดพลาสติกจะเท่ากับจำนวนของ larvae ที่ฟักออกจากไขซึ่งเกิดจากแม่เห็บจำนวน 3-5 ตัวนั่นเอง larvae เหล่านี้จะมีประมาณ 5,000 ตัวขึ้นไปในแต่ละขวด

สำหรับ engorged larvae และ engorged nymphs จะถูกเก็บไว้ในขวดพลาสติกเบอร์ 4 จำนวน 200-300 ตัวต่อขวด เพื่อรอให้ลอกคราบเป็น nymphs และ adults ต่อไป

2.2 การเลี้ยงเห็บสุนัขในระยะคัดเลือก

ใช้กรรไกรตัดและใช้มีดโกน โกนขนบนใบหูและที่โคนหูของกระต่ายจนเกลี้ยง ใช้พลาสติกเบอร์ Hartmannplast ตัดให้มีความกว้างประมาณ 1.5 ซม. ยาวประมาณ 15 ซม. พื้นที่โคนหูของกระต่ายให้แนบพอควร ใช้ ethyl alcohol 70 % เช็ดบริเวณใบหูทั้งภายนอกและภายในให้สะอาด นำถุงมาวางซึ่งได้ตัดเย็บเป็นรูปคล้ายกับใบหูของกระต่าย ขนาดยาวประมาณ 15 ซม. ปลายเปิดทั้งสองข้าง ปลายลงข้างหนึ่งกว้างประมาณ 4-5 ซม. ส่วนอีกข้างหนึ่งกว้างประมาณ 7 ซม. (รูปที่ 1) ใช้ถุงนี้ครอบหูกระต่ายข้างละถุง โหนทางควนปลายแคบอยู่ที่โคนหู ใช้พินเบอร์ 6 เขี่ยเห็บจากขวดพลาสติก ใส่เขาทางปากลงที่เปิดอยู่ จำนวนเห็บที่ใส่ลงไป ขึ้นกับระยะของเห็บ กล่าวคือ ถ้าเป็น larvae หนึ่งอาจใส่ได้ 500-800 ตัว nymphs ใส่ได้ 100-200 ตัว และ adults ประมาณไม่เกิน 50 ตัว เมื่อใส่เห็บแล้ว รีบพับปิดปากถุง 2 พับ

แล้วทำการ เข็มควยลวดเย็บกระต่าย เป็นแถวเรียงกันไปตามความกว้างของปากถุง แล้วปิดปากปากถุงด้วยพลาสติกเบอร์อีกทีหนึ่ง ใช้เทปสำหรับพันสายไฟฟ้า พันที่โคนลงทั้งสองเพื่อรวบไว้ด้วยกัน (รูปที่ 2) ใช้กรรไกรตัดเล็บ เล็มเล็บเท้าของกระต่ายทุกเล็บทั้งเท้าหน้าและเท้าหลัง ให้หมดความแหลมคม ทั้งนี้เป็นการป้องกันไม่ให้กระต่ายใช้เท้าเกาหูจนกระทั่งถุงที่ครอบหูขาด ซึ่งเห็บจะหนีออกไปได้ ทั้งไว้เช่นนี้จนกระทั่งเห็บคัดเลือกอิม

ระยะคัดเลือกของตัวอ่อน ใช้เวลาประมาณ 2-5 วัน

ระยะคัดเลือกของตัวกลางวัยใช้เวลาประมาณ 3-8 วัน

ระยะคัดเลือกของตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 8-14 วัน

ปกติเวลาเห็บกัดเลือกกินบน host ของมัน เห็บจะฝังส่วนของ hypostome ลงในผิวหนังของ host ซึ่งทำให้ตัวเห็บติดกับ host แน่นและไม่ยอมปล่อยจนกว่าจะอิ่ม ซึ่งจะสังเกตได้จากขนาดของตัวที่เปลี่ยนโตขึ้นกว่าตอนที่ยังไม่ไถ่กิน เลือดหลายเท่า และสีน้ำตาลตัวจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลแดงมาเป็นสีเทาหรือสีดำ ต่อจากนั้นเห็บจะปล่อยตัวหลุดจาก host คลานไปหาที่ซ่อนตัวเพื่อพักอยู่ระยะหนึ่ง แล้วทำการลอกคราบหรือวางไข่ต่อไป โดยธรรมชาติแล้วเห็บสุนัขที่กัดกินเลือดค่อมแล้ว เมื่อหลุดจาก host มักจะคลานขึ้นหาที่ซ่อนตัวในช่อง ในซอก รอยแตกตามกำแพง ฝ้าบานหรือแม่แค้นบนซอกของหลังคาบานเรือน เห็บที่กินเลือดค่อมแล้ว ให้นำไปเก็บใน cooled incubator ตามที่โคกลาวแล้วข้างตน

3. การเตรียมสารละลายยาฆ่าเห็บ

สำหรับ Asuntol 50 และ Sevin 85 ซึ่งมาจำนวนหนึ่ง เพื่อทำเป็น stock solution ความเข้มข้น 1,000ppm. จำนวน 500 ขบ. เก็บไว้ในขวดแก้ว ปิดฝาให้แน่น สำหรับ Nankor 24 E ใช้ pipette คุมาจำนวนหนึ่ง ผสมน้ำกลั่น ทำเป็น stock solution ความเข้มข้น 1,000 ppm. สารละลายยาฆ่าเห็บทุกชนิดที่จะใช้ทดลอง ต้องเตรียมใหม่จาก stock solution ทุกครั้งที่ใช้ (รูปที่ 3)

3.1 สารละลายสำหรับที่จะทดลองกับตัวอ่อนของเห็บสุนัข

3.1.1 Asuntol จาก stock solution เตรียมให้ไคความเข้มข้นต่างๆ ดังต่อไปนี้ ปริมาณความเข้มข้นจะไม่เกิน 100 ขบ.

สารละลายที่ 1	ความเข้มข้น	0.00001 %	หรือ	0.1 ppm.
สารละลายที่ 2	ความเข้มข้น	0.0001 %	หรือ	1 ppm.
สารละลายที่ 3	ความเข้มข้น	0.001 %	หรือ	10 ppm.
สารละลายที่ 4	ความเข้มข้น	0.0025 %	หรือ	25 ppm.
สารละลายที่ 5	ความเข้มข้น	0.0050 %	หรือ	50 ppm.

3.1.2 Nankor 24 E จาก stock solution เตรียมให้ไคความเข้มข้นต่างๆ ดังต่อไปนี้ ปริมาณความเข้มข้นจะไม่เกิน 100 ขบ.

สารละลายที่ 1	ความเข้มข้น	0.0001 %	หรือ	1 ppm.
สารละลายที่ 2	ความเข้มข้น	0.0005 %	หรือ	5 ppm.
สารละลายที่ 3	ความเข้มข้น	0.0010 %	หรือ	10 ppm.
สารละลายที่ 4	ความเข้มข้น	0.0015 %	หรือ	15 ppm.
สารละลายที่ 5	ความเข้มข้น	0.0020 %	หรือ	20 ppm.
สารละลายที่ 6	ความเข้มข้น	0.0025 %	หรือ	25 ppm.
สารละลายที่ 7	ความเข้มข้น	0.0030 %	หรือ	30 ppm.

3.1.3 Sevin 85 จาก stock solution เตรียมให้ไ้ความเข้มข้น
ต่างๆ ดังต่อไปนี้ ปริมาณความเข้มข้นละไม่เกิน 100 ขพ.

สารละลายที่ 1	ความเข้มข้น	0.001 %	หรือ	10 ppm.
สารละลายที่ 2	ความเข้มข้น	0.002 %	หรือ	20 ppm.
สารละลายที่ 3	ความเข้มข้น	0.003 %	หรือ	30 ppm.
สารละลายที่ 4	ความเข้มข้น	0.004 %	หรือ	40 ppm.
สารละลายที่ 5	ความเข้มข้น	0.005 %	หรือ	50 ppm.

3.2 สารละลายสำหรับที่จะทดลองกับตัวกลางวัยของเห็บสุนัข

3.2.1 Asunto1 50 จาก stock solution เตรียมให้ไ้ความเข้มข้น
ต่างๆ ดังต่อไปนี้ ปริมาณความเข้มข้นละไม่เกิน 100 ขพ.

สารละลายที่ 1	ความเข้มข้น	0.0001 %	หรือ	1 ppm.
สารละลายที่ 2	ความเข้มข้น	0.0005 %	หรือ	5 ppm.
สารละลายที่ 3	ความเข้มข้น	0.0025 %	หรือ	25 ppm.
สารละลายที่ 4	ความเข้มข้น	0.0050 %	หรือ	50 ppm.
สารละลายที่ 5	ความเข้มข้น	0.0100 %	หรือ	100 ppm.
สารละลายที่ 6	ความเข้มข้น	0.0150 %	หรือ	150 ppm.

3.2.2 Nankor 24E จาก stock solution เตรียมให้ไคความเข้มข้น
ต่างๆ ดังต่อไปนี้ ปริมาณความเข้มข้นจะไม่เกิน 100 ขพ.

สารละลายที่ 1	ความเข้มข้น	0.0005 %	หรือ	5 ppm.
สารละลายที่ 2	ความเข้มข้น	0.0010 %	หรือ	10 ppm.
สารละลายที่ 3	ความเข้มข้น	0.0020 %	หรือ	20 ppm.
สารละลายที่ 4	ความเข้มข้น	0.0030 %	หรือ	30 ppm.

3.2.3 Sevin85 จาก stock solution เตรียมให้ไคความเข้มข้น
ต่างๆ ดังต่อไปนี้ ปริมาณความเข้มข้นจะไม่เกิน 100 ขพ.

สารละลายที่ 1	ความเข้มข้น	0.0025 %	หรือ	25 ppm.
สารละลายที่ 2	ความเข้มข้น	0.0050 %	หรือ	50 ppm.
สารละลายที่ 3	ความเข้มข้น	0.0075 %	หรือ	75 ppm.
สารละลายที่ 4	ความเข้มข้น	0.0100 %	หรือ	100 ppm.
สารละลายที่ 5	ความเข้มข้น	0.0150 %	หรือ	150 ppm.

3.3 สารละลายสำหรับฉีดทดลองกับตัวเต็มวัยของ เ็บสนัข

3.3.1 Asuntol 50 จาก stock solution เตรียมให้ไคความเข้มข้น
ต่างๆ ดังต่อไปนี้ ปริมาณความเข้มข้นจะไม่เกิน 100 ขพ.

สารละลายที่ 1	ความเข้มข้น	0.0450 %	หรือ	450 ppm.
สารละลายที่ 2	ความเข้มข้น	0.0500 %	หรือ	500 ppm.
สารละลายที่ 3	ความเข้มข้น	0.0550 %	หรือ	550 ppm.
สารละลายที่ 4	ความเข้มข้น	0.0600 %	หรือ	600 ppm.
สารละลายที่ 5	ความเข้มข้น	0.0650 %	หรือ	650 ppm.
สารละลายที่ 6	ความเข้มข้น	0.0700 %	หรือ	700 ppm.
สารละลายที่ 7	ความเข้มข้น	0.0750 %	หรือ	750 ppm.

3.3.2 Nankor 24 E จาก stock solution เตรียมให้ไคความเข้มข้น
ต่างๆ ดังต่อไปนี้ ปริมาณความเข้มข้นจะไม่เกิน 100 ซีซี.

สารละลายที่ 1	ความเข้มข้น	0.0005 %	หรือ	5 ppm.
สารละลายที่ 2	ความเข้มข้น	0.0010 %	หรือ	10 ppm.
สารละลายที่ 3	ความเข้มข้น	0.0050 %	หรือ	50 ppm.
สารละลายที่ 4	ความเข้มข้น	0.0075 %	หรือ	75 ppm.

3.3.3 Sevin 85 จาก stock solution เตรียมให้ไคความเข้มข้น
ต่างๆ ดังต่อไปนี้ ปริมาณความเข้มข้นจะไม่เกิน 100 ซีซี.

สารละลายที่ 1	ความเข้มข้น	0.0050 %	หรือ	50 ppm.
สารละลายที่ 2	ความเข้มข้น	0.0100 %	หรือ	100 ppm.
สารละลายที่ 3	ความเข้มข้น	0.0150 %	หรือ	150 ppm.
สารละลายที่ 4	ความเข้มข้น	0.0200 %	หรือ	200 ppm.
สารละลายที่ 5	ความเข้มข้น	0.0250 %	หรือ	250 ppm.
สารละลายที่ 6	ความเข้มข้น	0.0350 %	หรือ	350 ppm.

4. การบรรจุเห็บสุนัขลงในถุงผ้าโปร่ง

นำเห็บที่มีอายุระหว่าง 7-14 วัน หลังการลอกคราบหรือหลังจากพักออกจากไข่ใน
กรณีที่เป็นตัวอ่อน ใส่ลงในถุงผ้าโปร่งในลอนขนาด 7 x 8 ซม. (รูปที่ 4) โดยไขพุกันเบอร์
4 เขี่ยตัวอ่อนของเห็บสุนัขจากขวดพลาสติกลงไปในถุงให้ไคถุงละประมาณ 200-500 ตัว
สำหรับตัวกลางวัยและตัวเต็มวัยของเห็บสุนัข จะใช้ปากคีบสำหรับแมลง (entomological
forceps) จับใส่ถุงทีละตัว ตัวกลางวัยใส่ถุงละประมาณ 50 ตัว ส่วนตัวเต็มวัยใส่ถุงละ
25 ตัว เมื่อบรรจุเสร็จแล้วรีบพับปิดปากถุง 2-3 ทบ แล้วเขี่ยควยลวดเขี่ยกระดาษ
อย่าให้เห็บหนีรอกออกไปจากถุงไค (รูปที่ 5)

การบรรจุเห็บสุนัขลงในถุงผ้าโปร่งนี้ กระทำในถาดอะลูมิเนียม ขนาด 20 x 30 x
5 ซม. ซึ่งวางขนอนอยู่ในถาดอะลูมิเนียมขนาด 25 x 35 x 7.5 ซม. ที่บรรจุน้ำปริมาณ
เล็กน้อย ทั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันมิให้เห็บสุนัขหนีออกไปจากถาดอันไค

5. การจุ่มเห็บสุนัขลงในสารละลายยาฆ่าเห็บ

นำถังที่บรรจุเห็บมาจุ่มลงในสารละลายยาฆ่าเห็บที่ต้องการทดลอง ปริมาณ 50-70 ซีซี. ซึ่งบรรจุในบีคเกอร์ ขนาด 150 ซีซี. สารละลายนี้ได้รับการคนให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 15-20 นาที ก่อนทำการจุ่ม ทำการจุ่มเห็บลงในน้ำยาฆ่าเห็บที่ละอง โดยที่ตัวอ่อนและตัวกลางวัย ใช้เวลาในการจุ่ม 15 วินาที สำหรับตัวเต็มวัย ใช้เวลาจุ่ม 1 นาที เมื่อจุ่มแล้ว นำถังขึ้นมาซับน้ำยาส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชู วางลงเห็บลงในกระดาษทิชชูที่แห้งซึ่งปูอยู่ใน petri dish เปิดฝาทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง (รูปที่ 6) แล้วจึงนำมาทำการหาอัตราการตายของเห็บต่อไป สำหรับพวก control ก็ทำการทดลองเช่นเดียวกับพวกที่ทดลองยาทุกอย่าง เพียงแต่จุ่มเห็บลงในน้ำกลั่นแทนเท่านั้น

6. การหาอัตราการตายของเห็บสุนัข

หลังจากการทดลองจุ่มเห็บลงในสารละลายยาฆ่าเห็บแล้วประมาณ 24 ชั่วโมง จึงนำมาหาอัตราการตาย โดยใช้กรรไกร ตัดทางคานปากงูให้เปิดออก แล้วเทเห็บลงในวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 8 ซม. ซึ่งเขียนลงบนกระดาษขาว เห็บที่ยังมีชีวิตอยู่จะคลานย้วยเยื้อไปมา และเมื่อเห็บพวกนี้คลานออกจากวงกลม ก็จะใช้แท่งโลหะกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มม. ยาวประมาณ 10 ซม. กดบีบให้ตายและนับไปที่ละตัว ส่วนเห็บที่ตายเพราะฤทธิ์ยา ก็จะคงอยู่ภายในวงกลม เมื่อทราบจำนวนเห็บที่มีชีวิตและเห็บที่ตายแล้ว นำมาคำนวณหาอัตราการตายเนื่องจากผลของยาฆ่าเห็บต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย