

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

ที่จับยุง Aedes aegypti ที่เลี้ยงเพื่อใช้ในการทดลองเป็นฝูงที่จับมาจากบ้านใน บริเวณวิทยา จังหวัดพระนคร โดยใช้หลอดทดลองขนาดยาว ๒ นิ้ว กว้าง ๕ นิ้ว ครอบยุงขณะที่ เกาะหรือกัดคน เมื่อยุงตกใจจะบินขึ้นจึงตกอยู่ในหลอด แต่ละหลอดที่ใช้จับยุงได้ยุงอย่างน้อย ๒ ตัว โดยเอียงลำตัวที่ปากหลอดให้ยุงตรงกลาง แล้วจึงจับตัวที่สอง นำยุงที่จับได้มาเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลง(Insectarium) ของคณะอาจารย์เขตรอย ตั้งแต่วันที่ ๒ มีนาคม ๒๕๐๔

ห้องเลี้ยงแมลงนี้เป็นห้องที่กว้าง ๔ เมตร ยาว ๒ เมตร และสูง ๒ เมตร ผนังห้องบุด้วยฉนวนความร้อนเพื่อช่วยรักษาระดับความร้อน ภายในห้องติดตั้งเครื่องปรับอากาศและเครื่องทำความชื้นแบบอัตโนมัติ โดยปรับให้อุณหภูมิอยู่ระหว่าง ๒๕ - ๒๘° ซ. และความชื้นอยู่ระหว่าง ๕๐ - ๕๕% ภายในห้องติดตั้งไฟที่อุณหภูมิให้ความเข้มของแสงใกล้เคียงกับเวลากลางวัน และไฟจะเปิดเวลา ๖.๐๐ น. ปิดเวลา ๑๘.๐๐ น. เพื่อให้มีช่วงเวลากลางวันและกลางคืนเช่นเดียวกับในธรรมชาติ

กรงที่ใช้เลี้ยงยุงเป็นกรงอูมิเป็นรูปความสูงของผนังแต่ละเขียง ๔ ด้านมีขนาด ๓๐" x ๓๐" x ๓๐" พื้นกรงและประตูกรงด้านหน้าเป็นอูมิเรียบ ตรงกลางของประตูนี้เจาะเป็นช่องกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๒ นิ้ว รอย ๆ ของนี้มีความสูงเป็นรูปทรงกระบอกยาวประมาณ ๕๐ ซม. ที่ปากของรูนี้จะอุดรวมปิดไว้ ใส่ยุงในกรง ๆ ละประมาณ ๕๐๐ ตัว ให้อาหาร คือ น้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น ๑๐% โดยเอาลำตัวยุงน้ำตาลนี้ให้ยุงพอประมาณวางไว้ในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๒ นิ้ว เปลี่ยนน้ำตาลทุก ๆ ๒ วัน ส่วนอาหารเล็กใช้ลูกไก่เล็ก ๆ อายุประมาณ ๑ อาทิตย์ มีรา และปลอกไก่คั้นกับไมควายเพป (Scotch Brand tape) เพื่อป้องกันไม่ให้ไก่กิน ปีกปากลูกไก่ไว้ด้วย เพปเช่นกันเพื่อมิให้กินยุง ใส่ยุงกินเชื้อทุก ๆ ๓ วัน นานครั้งละประมาณ ๑ ชั่วโมง หรือตามความมากน้อยของจำนวนยุง เมื่อยุงได้รับอาหารเต็มที่แล้วจะวางไข่ ไข่กระดาษทรงกลมที่กว้างเท่ากับ ความสูงของตัวและยาวกว่าเส้นรอบวงของตัวเล็กน้อย ฤดูภายในของตัวโดยรอบ ใส่น้ำองในถ้วย ประมาณ ๕ ซม. น้ำจะซึมเปียกกระดาษทรงตัวและมีเชื้อที่คอบูที่กันด้วยเล็กน้อยเพื่อไม่ให้กระดาษทรงแห้ง มีด้ายยุงจะไม่วางไข่ น้ำกระดาษทรงที่มีไข่ยุงที่คอบูที่ไปแช่น้ำในจาน เมื่อถูกน้ำก็สกปรก

จากใจแล้ว ไซ้หลอดดูดน้ำ (Collecting pipet) ซึ่งเป็นหลอดแก้วขนาด ๑ นิ้ว เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ  $\frac{1}{4}$  นิ้ว ปลายข้างหนึ่งของหลอดสอดเข้าเล็กน้อย ส่วนอีกปลายหนึ่งสอดเข้ากับหลอดข้างที่เป็นกะเปาะเล็ก ๆ ไซ้หลอดที่ดูดน้ำที่เก็บไปใส่ในฉากรับเลี้ยงดูน้ำ ซึ่งเป็นฉากรัดล้อมสี่มุมรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีขนาดกว้าง ๘ นิ้ว ยาว ๑๕ นิ้ว และสูง ๒ นิ้ว ปริมาณของน้ำในฉากรัดล้อม ๒๐๐๐ ซม.ซม. ซึ่งใช้เลี้ยงดูน้ำได้มากประมาณ ๕๐๐ ตัว น้ำที่ใช้เป็นน้ำประปาที่กรองจากท่อ และทิ้งทิ้งไว้ ๒๔ ชั่วโมง เพื่อในหลอดวันที่เกิดออกบู๊ระเหยออกให้หมด จากการทดลองวัดปริมาณคลอรีน พบว่า ค่าของคลอรีนที่พบในน้ำสูงสุด = ๐.๘ และจากการตรวจดู ๆ ๑๕ นาที ปรากฏว่าในเวลา ๒ ชั่วโมง คลอรีนจะลดลงเหลือเพียง ๐.๑ และจะหายไปหมดในเวลา ๕ ชั่วโมง ดังนั้นน้ำที่ไซ้เลี้ยงจึงไม่มีอันตรายต่อลูกน้ำ อาหารลูกน้ำใช้ขนมปังสำหรับเลี้ยงสุนัข (dog biscuit) ในลูกน้ำได้รับอาหารเต็มที่ อาหารและน้ำในฉากรัดล้อมเปลี่ยนทุก ๆ ๑ วัน เมื่อลูกน้ำเจริญเป็นตัวกักักแล้ว ไซ้หลอดดูด ๆ เราทักักใส่ในถ้วยแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๔ นิ้ว สูง ๕ นิ้ว น้ำอาบใส่กักักไปไว้ในทรง เพื่อลดการระเหยออกเป็นบุงต่อไป

การศึกษาทางชีววิทยาของ Ledes aegypti ไคแมงเป็นการทดลองข้อ ๆ ก็จะใกล้เคียงต่อไป ลูกน้ำ กักัก และบุงที่ใช้ในการทดลองไคมาจากบุงที่เลี้ยงไว้ในห้องทดลองทั้งสิ้น อุปกรณ์และวิธีการเลี้ยงคำนึงความวิหคความนานกว้างกัน การให้อาหารชนิดอื่น เช่น ลูกเทศ ต้องระวังมิให้ราขึ้น

สำหรับไมโครฟิลาเรียที่ใช้ในการทดลองเป็น Brugia malayi ชนิด periodic form นี้ได้จากเลือดของเด็กชายอายุ ๑๒ ปี จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่จักให้พักอยู่ในโรงพยาบาลของคณะสาธารณสุขศาสตร์เขตรอน ตั้งแต่วันที่ ๒ มีนาคม ๒๕๐๕ เป็นต้นมา

การทำ slide เพื่อนับจำนวนตัวไมโครฟิลาเรียในเลือดของหนูใช้วิธีของ Wilson (1956) โดยเจาะเลือดจากปลายนิ้วหนูใส่ ทาบ capillary tube ที่มีขีดบอกปริมาตร ให้ได้ปริมาณ ๕๐ ซม.มม. แบ่งจะเลงบน slide ๒ แผ่น ๆ ละ ๒๐ ซม.มม. ผึ่งไว้ให้แห้งเก็บไว้นานประมาณ ๕ - ๑๒ ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มใส่ ไคบนผสม giemsa ๑๕ หยด กับน้ำยาเกล็ดข้อสเฟท pH ๗.๒ ๑๐๐ ซม.ซม. แล slide ไว้ในน้ำสีนํ้านานประมาณ ๑ ชั่วโมง จึงนำ

ไปล้างน้ำและล้างให้แห้ง นับจำนวนไมโครฟิลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยวิธีนับ slide ถ้ามีอ่าง  
ออกเป็นช่อง ๆ เพื่อสะดวกแก่การนับจำนวนและป้องกันการผิดพลาด

ในการศึกษากฎการเจริญเติบโตของไมโครฟิลาเรียในยุง โดยการชำนหละยุงนั้น  
แบ่งการชำนหละเป็น ๒ แบบ คือ ชำนหละทุก ๆ ครึ่งชั่วโมง กับชำนหละทุกวัน ในการชำนหละ  
ทุกครึ่งชั่วโมงนี้ใช้ยุงตัวเมียที่ยังไม่เคยได้รับอาหารเลือกมาก่อนกับเลือกคนใช้ ตรวจหาปริมาณของ  
ไมโครฟิลาเรียในคนใช้ก่อนให้ยุงกินเลือก นำยุงที่กินเลือกเต็มท้องไปชำนหละครึ่งตัวทุก ๆ ครึ่ง  
ชั่วโมงในระยะแรก ๆ และทุกหนึ่งชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ครึ่งชั่วโมงที่ ๑๒ เป็นต้นไป ทิ้งไว้ชำนหละแล้ว  
ไม่พบไมโครฟิลาเรียที่ไร้วินมแทน การชำนหละไร้วินมของ Wharton (1957) คือ ชำนหละ  
เป็น ๓ ส่วน มี ส่วนนอก ส่วนหลัง และส่วนกะเพาะ โดยทำให้ยุงผสมด้วยโครโรฟอร์ม ๕๕% ซา  
และหัวของยุงทิ้งไป นำหัวยุงไปวางบนแผ่นแก้วในหยกน้ำยา normal saline ใสเข็มในมือที่ไม่  
ดัดคกรวงออกไว้โดยให้หัวเข็มทิ่มทะลุคกรวงออก ส่วนเข็มในมือที่ดัดคกรวงบริเวณช่องท้อง  
ปล้องสุดท้ายแล้วจึงออกโดยเร็ว จะโคส่วนของกะเพาะที่อยู่ในบริเวณคกรวงออกและส่วนท้อง พร้อมหัว  
รังไข่ แยกออกมาจากคกรวงท้อง เข็มส่วนท้องและส่วนกะเพาะ<sup>on</sup> ไปชำนหละแยกกันในหยกน้ำยา normal  
saline ตรวจจำนวนไมโครฟิลาเรียที่พบในทั้งสามส่วนแล้วบันทึกไว้ จำนวนละเช่นเดียวกันนี้เรื่อยไป  
จนถึงครึ่งชั่วโมงที่ ๔๕

ในการชำนหละยุงทุกวันนั้น เกริบยุงและให้กินเลือกคนใช้เช่นเดียวกับที่กล่าว  
มาแล้วข้างต้น แยกยุงที่กินเลือกเต็มท้องไปเลี้ยงในถ้วยกระดาษ (cold cup) ซึ่งมีเส้นน้ำอุ่น  
กลาง ๓ นิ้ว สูง ๔ นิ้ว ถ้วยละ ๕ - ๑๐ ตัวปกติควรมีคกรวงน้ำยุง เพื่อกันยุงเลือกน้อยเจาะเป็น  
ช่องสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ทำเป็นฝาเปิดปิดได้ แล้วใช้เข็มเปิดไว้สักชั้นหนึ่ง ช่องดังกล่าวนี้เป็นทางสำหรับ  
ใส่ยุงเข้าไปและถูกเขาออกในเวลาที่ต้องการชำนหละ ศักสาสี่เป็นชั้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ขุดทำหลุมมาก ๆ  
วางไว้บนถ้วยที่มีฝาปิดด้วย เพื่อให้ยุงไถ่กับความชื้นเพียงพอ ให้ถูกเขาค้นหาเป็นอาหาร เบียดกันสาสี่  
และถูกเขาค้นหา

ให้ยุงกินเลือดในคอนกลางคืน เวลาประมาณ ๒๐.๐๐ น. และเริ่มชำแหละยุงที่  
 เลี้ยงไว้ในด้วยกระดาษนี้ในตอนเช้าของวันรุ่งขึ้น โดยใช้นอกถูกยุงออกมาทีละตัว ทำให้ยุงผสม  
 ความแก่สลายจนได้ออกโรค นำยุงที่ผสมแล้วนี้ไปวางบนแผ่น slide ตักน้ำและซาฟต์ออกให้หมด  
 หยดน้ำยา normal saline ลงไปแฉวแบ่งยุงออกเป็น ๓ ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง  
 ทั้ง ๓ ส่วนนี้เอาวางเรียงในหยดน้ำยา normal saline แล้วชำแหละแต่ละส่วน เอาส่วนผนัง  
 ทั้งเสียบ้าง เพื่อให้มองเห็นตัวไมโครพิดาเรียบโคชต์ชัดเจน ตรวจดูว่ามีไมโครพิดาเรียบในแต่ละตัว  
 เท่าไร บันทึกจำนวนและตำแหน่งที่พบตัวอ่อนในแต่ละเยื่อเอาใจ ระวังความยาวและความกว้างของ  
 ตัวอ่อนทุกตัวที่พบ โดยใช้ไมโครมิเตอร์ และเทียบ scale กับ stage micrometer จะได้อะไร  
 ความยาวและความกว้างออกมาเป็นไมครอน การวัดความกว้างวัดที่กึ่งกลางของความยาวของตัว  
 หัวเช่นเดียวกันนี้เรื่อยไปทุกตัว โดยชำแหละยุงวันละ ๕ ตัว จนครบ ๑๕.๕ วัน ในการวัดความยาว  
 ของตัวอ่อนระยะที่ ๓ คงทำให้คายเสียก่อนด้วยน้ำยา Bles's fluid (formalin ๑ ส่วน,  
 glacial acetic ๑ ส่วน, ๙๐% alcohol ๙๐ ส่วน) มิฉะนั้นจะไม่ได้อะไรที่ถูกต้อง  
 เพราะตัวอ่อนระยะที่ ๓ นี้ เกิดอเนกไว้วางเร็วมาก และตัวจะของอากว การวัดใช้ camera lucida  
 lucida ระวังด้วย เพราะบางตัวมันจะใช้น้ำยา Bles's fluid แล้วก็ยังมียังไม่เห็นครบ

ในการหาชนิดการรับเชื้อในท้องทดลอง และสมรรถภาพการนำเชื้อของยุงตามลำดับ  
 generation นั้น เลี้ยงยุงที่กินเลือดไว้ในด้วยกระดาษเช่นเดียวกันกับที่กล่าวมาแล้ว พอครบ  
 ๑๕.๕ วัน ก็นำยุงไปชำแหละเป็น ๓ ส่วน เช่นเดียวกันด้วย.