บทที่ 4

การดำเนินการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงสายพันธุ์บริสุทธิ์

ในการเลือก T. vaginalis เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกโดยพิจารณา T. vaginalis จากผลการทดลองของสุภาภรณ์ (2522) ซึ่งได้มีการจัดแบ่ง T. vaginalis ตามรูปแบบของเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ที่แตกต่างกันออกเป็น 7 แบบ จึงเลือก T. vaginalis สายพันธุ์ที่มีรูปแบบของเอ็นซัยม์แบบที่ 5 ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบมากที่สุดถึง 29 % จากจำนวน 100 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ตัวอย่างของสายพันธุ์ที่มีรูปแบบเอ็นซัยม์แบบที่ 5 คือ สายพันธุ์ที่ 18 และ 29 นอกจากนี้ยังได้เลือกสายพันธุ์ที่มีรูปแบบของเอ็นซัยม์แบบที่ 7 ซึ่งพบมากรองลงไปคือ 25% นั่นคือ สายพันธุ์ที่ 23 ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ T. vaginalis ทั้งสามสายพันธุ์บริสุทธิ์นี้คือ สายพันธุ์ที่ 18, 23 และ 29 ในหลอดทดลองโดยใช้ CPLM-NA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ในห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดการศึกษานี้ การเพาะเลี้ยงต่อเนื่องทำโดยดูดเชื้อปรสิตที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม 0.2 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่โดยวิธีสเตอไรด์ จากนั้นนำไปพักตัวในตู้อบอุณหภูมิ 37° C และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุกๆ 48 ชั่วโมง

2. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้ สุภาภรณ์ (2522) ได้ดัดแปลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM ของ Johnson and Trussell (1943) โดยไม่ใส่วุ้น และลดปริมาณของซีรัมเหลือเพียง 0.5 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 8 มิลลิลิตร และเรียกอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ว่า CPLM-NA แต่ในการทดลองนี้ดัดแปลงจาก ของสุภาภรณ์ โดยใช้ซีรัม 0.3 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA 9.5 มิลลิลิตร เพื่อเป็นการประหยัดซีรัมซึ่งก่อนมีการทดลองเพาะเลี้ยงนั้น พบว่าแม้จะใช้จำนวน

ซีรัมลดลง T. vaginalis ก็ยังมีการเจริญได้ดี ส่วนประกอบและวิธีเตรียมเป็นดังนี้

2.1 ส่วนประกอบ

cysteiene monohydrochloride	2.4	กรัม
bacto peptone	32.0	กรัม
maltose	1.6	กรัม
bacto-liver infusion	320.0	มิลลิลิตร
Ringer's solution	960.0	มิลลิลิตร

2.2 การเตรียม bacto-liver infusion

bacto-liver infusion เตรียมจาก bacto liver 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร อุ่นที่ 50° C นาน 1 ชั่วโมงในอ่างน้ำร้อนปรับอุณหภูมิ แล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 80° C นาน 5 นาที เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 จะได้สารละลายของตับที่มีปริมาตร 320 มิลลิลิตร

2.3 การเตรียม Ringer's solution (Taylor and Baker, 1968)

ชั่งสารต่างๆตามน้ำหนักที่กำหนดไว้ ดังต่อไปนี้

NaCl	6.5	กรัม
KCl	0.14	กรัม
$CaCl_2$	0.12	กรัม
$NaHCO_3$	0.20	กรัม

นำสารทั้งหมดละลายลงในน้ำกลั่นที่กลั่น 3 ครั้ง แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

2.4 การเตรียมอินแอคติเวทซีรัม

หลังจากที่แยกเอาส่วนที่เป็นซีรัมออกจากส่วนที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาจุกเกลียวโดยวิธีสเตอไรด์แล้ว นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 56° C นาน 30 นาทีในอ่างน้ำร้อนปรับอุณหภูมิ เพื่อทำลายคอมพลีเมนท์ ก็จะได้อินแอคติเวทซีรัม

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำส่วนประกอบทั้งหมดในข้อ 2.1 ผสมเข้าด้วยกันปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 5.8 – 6 ด้วย 1N NaOH เติม 0.5% เมธทีลีนบลู

0.7 มิลลิลิตรเพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาจุกเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดละ 9.5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/นาน 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็น เติมอินแอคติเวทซีรัม หลอดละ 0.3 มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อนี้สามารถเก็บได้นาน 14 วันที่อุณหภูมิห้อง

การเพาะเลี้ยงสายพันธุ์บริสุทธิ์ของ T. vaginalis ในหลอดทดลองนั้น บางครั้งอาจเกิดมีเชื้อแบคทีเรียหรือราขึ้นได้ เมื่อมีปัญหาเช่นนี้เกิดขึ้น ต้องกำจัดแบคทีเรียหรือราโดยใช้ยาปฏิชีวนะ เพนนิซิลิน 5,000 ยูนิต สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 5,000 ไมโครกรัม และมัยโคสแตติน 300 แกมม่าต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร การใส่ยาเพื่อฆ่าแบคทีเรียจะใส่ทุกครั้งที่ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยผสมยาในซีรัม ส่วนยาฆ่าเชื้อราจะใส่เพียง 2-3 ครั้งเมื่อกำจัดได้หมดก็งดยา

3. การศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวน

3.1 การเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวน

การศึกษาหาจำนวนเซลล์ปรสิตที่เหมาะสม เพื่อที่จะใช้เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้นการเพาะเลี้ยงแต่ละครั้ง พบว่าจำนวน T. vaginalis ที่จะให้ผลของอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดใน 48 ชั่วโมงคือ 1 $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงใช้จำนวนเซลล์ T. vaginalis 1 $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในการเพาะเลี้ยงและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 48 ชั่วโมงตลอดการทดลองนี้

ในการศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวนของ T. vaginalis ได้กำหนดจำนวน T. vaginalis คือ 1 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร · เตรียมหลอดทดลองในการศึกษาโดยดูดเชื้อปรสิตจากหลอดเพาะเลี้ยงที่มีความหนาแน่น 50 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรมา 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งมี CPLM-NA อยู่หลอดละ 9.5 มิลลิลิตร จำนวน 30 หลอด เติมซีรัมและยาปฏิชีวนะดังในข้อ 2 ลงไป 0.3 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลอด เขย่าให้เข้ากัน ดังนั้นจำนวน T. vaginalis ในแต่ละหลอดที่จุดเริ่มต้นจะเป็น 1 $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรนำไปฟักตัวที่อุณหภูมิ 37 °C ติดตามการเพิ่มจำนวนของ T. vaginalis ทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วันคือ 12, 24,

36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง โดยดูดตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อจากแต่ละหลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ออกมาตรวจนับจำนวนปรสิตที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยสังเกตจากเซลล์ปรสิตที่สามารถเคลื่อนไหวได้ ในแต่ละช่วงเวลาจะนับจำนวนปรสิตที่ยังมีชีวิตอยู่จากหลอดทดลองทั้ง 5 หลอดนี้ แล้วนำมาเฉลี่ยคิดเป็นจำนวนปรสิตต่อมิลลิลิตรในแต่ละช่วงเวลา

3.2 การนับจำนวนปรสิตโดยใช้ฮีโมซัยโตมิเตอร์

เขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี T. vaginalis ในแต่ละหลอดทดลองให้เข้ากันดี ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรดูดอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ทำให้เจือจาง 3 เท่าโดยเติม normal saline 1.7 มิลลิลิตร และ 70% แอลกอฮอล์ 0.3 มิลลิลิตร เพื่อลดการเคลื่อนไหวของปรสิต จะได้ปริมาตรทั้งหมด 3 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ดูดส่วนผสมนี้โดยใช้ปิเปตขนาด 0.1 มิลลิลิตรใส่ในฮีโมซัยโตมิเตอร์ นับจำนวนปรสิตที่ยังมีชีวิตอยู่ ที่ปรากฏบนแชมเบอร์ทั้งข้างบนและล่างของฮีโมซัยโตมิเตอร์ นำมาเฉลี่ย แล้วจึงคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อไป

3.3 การคำนวณจำนวนเซลล์ปรสิต

จากภาพแสดงแชมเบอร์ของฮีโมซัยโตมิเตอร์ (รูปที่ 3)

จากสี่เหลี่ยมจัตุรัสรูปกลาง

ความยาวของแต่ละด้าน = 1 มิลลิเมตร

ความลึกของแชมเบอร์ = 0.1 มิลลิเมตร

ดังนั้น ปริมาตรสี่เหลี่ยมจัตุรัสกลาง = 1 x 1 x 1

= 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

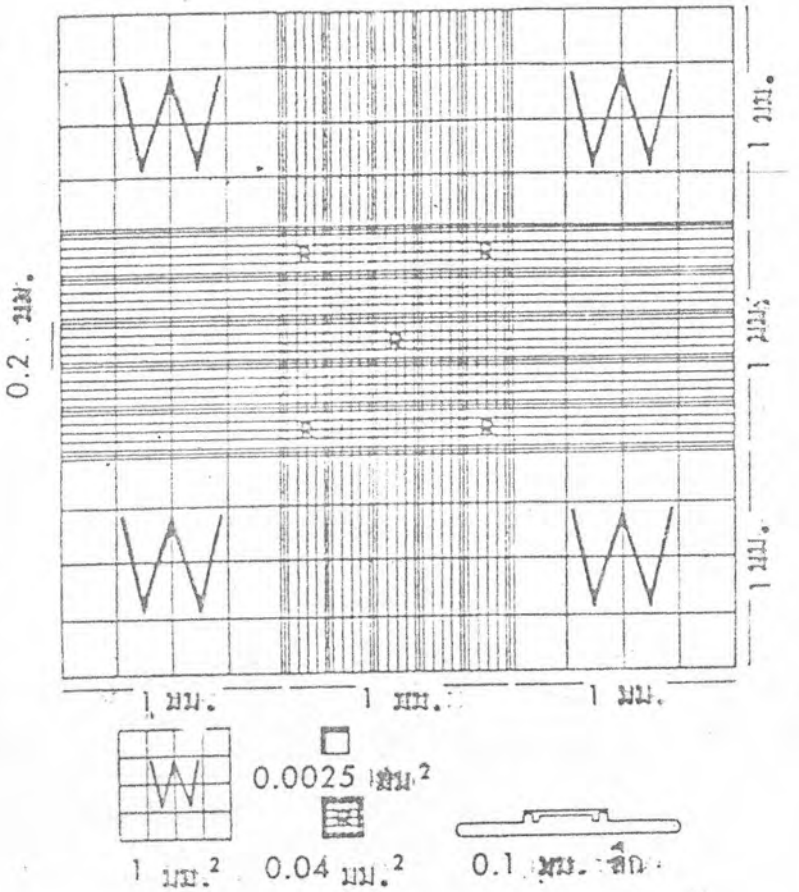
= $\frac{1}{10}$ 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ถ้านับจำนวนเซลล์ปรสิตในแชมเบอร์ทั้งบนและล่างได้ 35 และ 45 เซลล์ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ย = $\frac{35 + 45}{2}$

= 40

ซึ่งคำนวณจำนวนเซลล์ปรสิตได้ดังนี้



รูปที่ 3 แสดงแซมเบอร์ของฮีโมซัยโตมิเตอร์

(Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, Vol. I.,1980)

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีจำนวนปรสิต = 40 เซลล์

" $\frac{1}{10^4}$ " " = 40 x 3 x 10^4

= 120 x 10^4 เซลล์

นั่นคือ ในปริมาตร 1 มิลลิลิตรก่อนเจือจาง 3 เท่าก็มีจำนวนปรสิต

= 120 x 10^4 เซลล์

ในการเตรียมความหนาแน่นของเซลล์ปรสิต 50 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เตรียมได้จากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนเซลล์ปรสิต 120 x 10^4 มาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA 1.4 มิลลิลิตร ก็จะได้จำนวนปรสิตเป็น 50 x 120^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

4. การทดสอบความไวต่อยาของ T. vaginalis

4.1 การเตรียมสารละลายของยา (stock solution)

4.1.1 ทินิดาโซล (ฟาสิจิน)

ละลายฟาสิจิน 1 เม็ด ซึ่งประกอบด้วยตัวยาทินิดาโซล 150 มิลลิกรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA ที่เตรียมใหม่ ๆ 30 มิลลิลิตร จะได้สารละลายของยาที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เจือจางเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA 4 มิลลิลิตรต่อ 1 มิลลิลิตรของสารละลายยาที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางอีกครั้งโดยใช้ 1 มิลลิลิตรของสารละลายยาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อ 9 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA จะได้สารละลายยาที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.2 เมโทรไนดาโซล (อีไลโซล)

นำอีไลโซล 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วยตัวยาเมโทรไนดาโซล 250 มิลลิกรัม ละลายใน 50 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA ที่เตรียมใหม่ ๆ จะได้สารละลายของยาที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เจือจางต่อในลักษณะเดียวกันกับทินิดาโซล ซึ่งจะได้สารละลายของเมโทรไนดาโซล ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2 การเตรียมสารละลายเจือจางตามลำดับขั้น

นำสารละลายยาที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแต่ละชนิดมาเตรียมสารละลายเจือจางตามลำดับขั้น ดังในตารางที่ 1

ตัวอย่างเช่น การเตรียมสารละลายในหลอดทดลองทดสอบความไว ที่ความเข้มข้นของยา 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมได้โดย ใส่สารละลายยาที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA 0.99 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี T. vaginalis 1 มิลลิลิตร

4.3 การทดสอบความไวต่อยาเพื่อหาค่าความเข้มข้นของยาขนาดซับลีทัล

นำ T. vaginalis ทั้งสามสายพันธุ์คือ สายพันธุ์ที่ 12, 23 และ 29 มาทดสอบกับสารละลายตามลำดับขั้นของยาทั้งสองชนิดคือ เมโทรไนดาโซลและทินิดาโซล โดยเตรียมส่วนผสมในหลอดทดลองที่จะทำการทดสอบดังในข้อ 4.2 เขย่าให้เข้ากัน นำไปฟักตัวที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดูดส่วนผสมจากแต่ละหลอดทดลองตั้งแต่หลอดที่ 1-21 หยดบนแผ่นสไลด์ ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูเซลล์ปรสิตที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งจะมีรูปร่างค่อนข้างรีเป็นรูปไข่และเคลื่อนไหวได้ ส่วนเซลล์ปรสิตที่ตายแล้วจะมีรูปร่างกลมใหญ่และหยุดนิ่ง ภายในเซลล์จะไม่พบเซลล์ออร์กาเนลแต่จะมีลักษณะเป็นแกรนูล บางเซลล์ผนังเซลล์จะแตกออก ในหลอดทดลองที่ไม่พบเซลล์ปรสิตที่ยังมีชีวิตอยู่ จะบันทึกความเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของ T. vaginalis และกำหนดค่าความเข้มข้นของยาขนาดซับลีทัล ซึ่งจะต่ำกว่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของ T. vaginalis ได้

5. การทดลองชักนำให้เกิดการดื้อยาใน T. vaginalis

5.1 การเตรียมสารละลายยาเพื่อเตรียมสารละลายยาขนาดซับลีทัล

จากสารละลายยาทั้งสองชนิดที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 ทำให้เจือจางโดยใช้สารละลายยา 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนี้ 1 มิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายยาที่มีความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เจือจางอีกครั้ง โดยใช้สารละลายยา 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนี้ 1 มิลลิลิตร มาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA 9 มิลลิลิตร

ตารางที่ 1 การเตรียมสารละลายตามลำดับขั้นของยาเมโทรไนดาโซลและยาทินิดาโซล

หลอดที่	สารละลายยา (0.1มก./มล.) (มิลลิลิตร)	อาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA (มิลลิลิตร)	อาหารเลี้ยงเชื้อ T.vginalis (มิลลิลตร)**	ปริมาตรรวม (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นยาต่อหลอด(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.01	0.99	1	2	0.5
2	0.02	0.98	1	2	1.0
3	0.03	0.97	1	2	1.5
4	0.04	0.96	1	2	2.0
5	0.05	0.95	1	2	2.5
6	0.06	0.94	1	2	3.0
7	0.07	0.93	1	2	3.5
8	0.08	0.92	1	2	4.0
9	0.09	0.91	1	2	4.5
10	0.10	0.90	1	2	5.0
11	0.11	0.89	1	2	5.5
12	0.12	0.88	1	2	6.0
13	0.13	0.87	1	2	6.5
14	0.14	0.86	1	2	7.0
15	0.15	0.85	1	2	7.5
16	0.16	0.84	1	2	8.0
17	0.17	0.83	1	2	8.5
18	0.18	0.82	1	2	9.0
19	0.19	0.81	1	2	9.5
20	0.20	0.80	1	2	10.0
21*	-	1.00	1	2	-

หมายเหตุ * หลอดทดลองที่ 21 เป็นหลอดทดลองควบคุม

** จำนวนเซลล์ T. vaginalis ที่ใช้คือ 50×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก็จะได้สารละลายยาที่มีความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการเตรียมสารละลายยาขนาดซับลีทัลต่อไป

5.2 การเตรียมสารละลายยาขนาดซับลีทัล

ในการกำหนดความเข้มข้นของยาขนาดซับลีทัลจากผลการทดลองข้อ 4.3 คือ 0.75 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้มีการใช้จำนวนเซลล์ 50×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ในหลอดทดลองชักนำจะใช้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี T. vaginalis 0.2 มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนเซลล์ปรสิตเป็น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ปริมาตรทั้งหมดของส่วนผสมในหลอดทดลองชักนำจะเป็น 10 มิลลิลิตร ดังนั้นจำนวนเซลล์ปรสิตที่จุดเริ่มต้นในการชักนำจึงเป็น 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงต้องมีการคำนวณความเข้มข้นและปริมาตรของสารละลายยาต่อจำนวนเซลล์ดังนี้

5.2.1. การทดลองชักนำที่ใช้ความเข้มข้นของยา 0.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จำนวนปรสิต 50×10^4 เซลล์ต่อความเข้มข้นของยา = 0.75 ไมโครกรัม

" 1×10^4 " " $= \frac{0.75 \times 10^4}{50 \times 10^4}$

$= 0.015$ ไมโครกรัม

ดังนั้นความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการชักนำในช่วงแรกจึงเป็น 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อจำนวนเซลล์ปรสิต 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ปริมาตรของส่วนผสมในหลอดทดลองชักนำเป็น 10 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงต้องใช้ความเข้มข้นของยาเป็น

$0.015 \times 10 = 0.15$ ไมโครกรัม

สารละลายยาในข้อ 5.1 มีความเข้มข้นของยา 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในช่วงการชักนำที่ใช้ความเข้มข้นของยา 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายยาที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนี้ลงไป 0.15 มิลลิลิตรด้วย

ในการเตรียมหลอดทดลองชักนำที่ใช้ความเข้มข้นของยา 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อ 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีส่วนผสมดังนี้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA 9.35 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี T. vaginalis ที่ความหนาแน่น 50×10^4 เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร 0.2 มิลลิลิตร ซีรัมและยาปฏิชีวนะ 0.3 มิลลิลิตร เติมสารละลายยาที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงไป 0.15 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรในหลอดทดลองชักนำทั้งสิ้นเป็น 10 มิลลิลิตร

5.2.2 การทดลองชักนำที่ใช้ความเข้มข้นของยา 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จำนวนปรสิต 50×10^4 เซลล์ต่อความเข้มข้นของยา = 1 ไมโครกรัม

" 1×10^4 " " $= \frac{1 \times 10^4}{50 \times 10^4}$

$= 0.02$ ไมโครกรัม

ดังนั้นความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการชักนำข้างต่อมาจึงเป็น 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อจำนวนเซลล์ปรสิต 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และในทำนองเดียวกัน จะต้องใส่สารละลายยาที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากข้อ 5.1 ลงในหลอดทดลองชักนำ 0.2 มิลลิลิตร

ในการเตรียมหลอดทดลองชักนำที่ใช้ความเข้มข้นของยา 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อจำนวนเซลล์ 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีส่วนผสมดังนี้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA 0.3 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี T. vaginalis ที่ความหนาแน่น 50×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 0.2 มิลลิลิตร ซีรัมและยาปฏิชีวนะ 0.3 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงไป 0.2 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรในหลอดทดลองชักนำเป็น 10 มิลลิลิตร

5.3 การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดลองชักนำให้เกิดการดื้อยาใน T. vaginalis ในแต่ละการทดลอง ซึ่งได้แก่ การทดลองควบคุม การทดลองชักนำที่ใช้ยาเมโทรไนดาโซล และการทดลองชักนำที่ใช้ยาทินิดาโซล ได้ทำการเพาะเลี้ยง T. vaginalis การทดลองละ 5 หลอด ในการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดำเนินการดังนี้คือ หลังจากปล่อยให้ T. vaginalis ฟักตัวที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้ว เขย่าเชื้อปรสิตในหลอดทดลองแต่ละหลอดให้เข้ากัน ใช้ปิเปตดูดเชื้อปรสิตจากทั้ง 5 หลอดนี้หลอดละ 1 มิลลิลิตรโดยวิธีสเตอไรล์ มาใส่รวมกันในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว จากนั้น

นำปรสิตที่เหลือในหลอดทดลองทั้ง 5 หลอดนี้ มานับจำนวนเซลล์ปรสิตที่ยังมีชีวิตอยู่ ดำเนินวิธีการนับเหมือนการทดลองในข้อ 3.2 นับทึกผลการทดลองแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย นำเชื้อปรสิตที่แบ่งมาใส่ในหลอดทดลองที่ฆ่าเชื้อโรคในตอนแรกนั้นมาเจือจางให้มีจำนวนเซลล์ปรสิตเท่ากับ 50×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยดำเนินการในทำนองเดียวกันกับการทดลองข้อ 3.3 แล้วดูดเชื้อปรสิตที่ทำให้เจือจางแล้วนี้ ใส่ในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA อีก 5 หลอด ๆ ละ 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ฟักตัวอุณหภูมิ 37° C นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาก็ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้ออีก

5.4 การชักนำให้เกิดการดื้อยาใน T. vaginalis

ศึกษาโดยการเพาะเลี้ยง T. vaginalis ใน CPLM-NA ที่มียาที่ความเข้มข้นขนาดซับลีทัล ในการทดลองนี้ใช้ยา 2 ชนิดคือ เมโทรไนดาโซลและทินิดาโซล ความเข้มข้นของยาขนาดซับลีทัลที่เลือกได้จากการทดสอบความไวต่อยาในข้อ 4.3 คือ 0.75 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อจำนวนเซลล์ 50×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้มีการคำนวณความเข้มข้นของยาใหม่ต่อจำนวนเซลล์ปรสิต 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้เป็น 0.015 และ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดังการคำนวณในข้อ 5.2.1 และ 5.2.2 ดังนั้นการชักนำช่วงแรกจึงใช้ความเข้มข้นของยาที่ 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนผสมในหลอดทดลองชักนำดังในข้อ 5.2.1 นำไปฟักตัวที่อุณหภูมิ 37° C ในตู้ ครบ 48 ชั่วโมงจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 5.3 ดำเนินการทดลองเช่นนี้ติดต่อกันไป จนผ่านการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว 10 ครั้ง หรือได้ผ่านการชักนำเป็นเวลา 20 วัน นำ T. vaginalis ส่วนหนึ่งไปทำการทดสอบความไวต่อยาที่ 24 ชั่วโมง อีกส่วนหนึ่งของ T. vaginalis จะถูกนำมาเลี้ยงเพื่อการชักนำต่ออีก 10 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ทำการชักนำรวม 30 วันคือ ผ่านการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมียาขนาดซับลีทัล 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 15 ครั้ง นำ T. vaginalis ที่ได้นี้มาทดสอบความไวต่อยาอีก ก่อนที่จะนำ T. vaginalis ซึ่งผ่านการชักนำ 20 และ 30 วันมาทำการทดสอบดังกล่าว จะต้องนำเชื้อเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงใน CPLM-NA ที่ไม่มียาเป็นเวลา 1 สัปดาห์

เพื่อให้ T. vaginalis มีการปรับตัวให้มีความแข็งแรงเหมาะสมที่จะทำการทดสอบกับยาก่อน จึงจะนำไปทำการทดสอบ เมื่อได้เพาะเลี้ยง T. vaginalis ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเจือยาเมโทรไนดาโซลหรือทินิดาโซลที่ความเข้มข้น 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จนผ่านการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อครบ 15 ครั้งแล้ว จึงเพิ่มความเข้มข้นของยาในการชักนำขึ้นเป็น 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนผสมในหลอดทดลองเตรียมได้ดังในข้อ 5.2.2 ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองชักนำที่ใช้ความเข้มข้นของยา 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อสิ้นสุดระยะการชักนำจะได้ T. vaginalis ที่ผ่านการชักนำจะได้ T. vaginalis ที่ผ่านการชักนำที่ความเข้มข้น 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 30 วัน และผ่านการชักนำที่ความเข้มข้นของยา 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 20 วัน รวมเป็นระยะเวลาในการชักนำ 50 วัน และ T. vaginalis ที่ผ่านการชักนำที่ความเข้มข้นของยา 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 วัน รวมเป็นระยะเวลาในการชักนำ 60 วัน ในการทดลองชักนำนี้ได้เพาะเลี้ยง T. vaginalis ทั้งสามสายพันธุ์บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA ซึ่งปราศจากยาเป็นหลอดทดลองควบคุมควบคู่กันไปด้วย ในการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 48 ชั่วโมงจะบันทึกการเพิ่มจำนวนของ T. vaginalis ไปพร้อมกันด้วยทุกครั้ง

การพิจารณาระดับการดื้อยาของ T. vaginalis ที่ผ่านการชักนำ ทำได้โดยอาศัยการทดสอบความไวต่อยาที่ใช้ในการชักนำนั้น เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เคยผ่านการชักนำ นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้การทดสอบแบบ T ด้วย

6. การศึกษาความคงทนของการดื้อยา

เมื่อได้ T. vaginalis ที่ถูกชักนำให้เกิดการดื้อยาจนถึงระดับความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการชักนำเป็น 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA ที่ไม่มียาเป็นระยะเวลานาน 2 เดือน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทดสอบความไวต่อยาอีกครั้ง เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ในข้อนี้กับผลการทดลองในข้อ 5.4 และวิเคราะห์ผลการเปรียบเทียบทางสถิติ โดยใช้การทดสอบแบบ T เช่นกัน

การกำหนดสัญลักษณ์ของขั้นตอนการชักนำมีดังนี้คือ

C = กลุ่มควบคุม

M_1 = การทดลองชักนำที่ใช้ยาเมโทรไนดาโซลความเข้มข้น 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 20 วัน

M_2 = การทดลองชักนำที่ใช้ยาเมโทรไนดาโซลความเข้มข้น 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 วัน

M_3 = การทดลองชักนำที่ใช้ยาเมโทรไนดาโซลความเข้มข้น 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 วัน แล้วเพิ่มความเข้มข้นของยาในการชักนำเป็น 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 20 วัน รวมระยะเวลาที่ได้สัมผัสยา 50 วัน

M_4 = การทดลองชักนำที่ใช้ยาเมโทรไนดาโซลความเข้มข้น 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 วัน แล้วเพิ่มความเข้มข้นของยาในการชักนำเป็น 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 วัน รวมระยะเวลาที่ได้สัมผัสยา 60 วัน

M_3^* = การทดลองชักนำที่ใช้ยาเมโทรไนดาโซลความเข้มข้น 0.015 และ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 และ 20 วันตามลำดับ ซึ่งรวมเป็นระยะเวลาที่ได้สัมผัสยา 50 วันแล้วมีการเพาะเลี้ยงต่อมาอีก 2 เดือน

M_4^* = การทดลองชักนำที่ใช้ยาเมโทรไนดาโซลความเข้มข้น 0.015 และ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 วันทั้งสองระดับความเข้มข้น ซึ่งรวมระยะเวลาที่ได้สัมผัสยา 60 วัน แล้วมีการเพาะเลี้ยงต่อมาอีก 2 เดือน

T_1 = การทดลองชักนำที่ใช้ยาทินิดาโซลความเข้มข้น 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 20 วัน

T_2 = การทดลองชักนำที่ใช้ยาทินิดาโซลความเข้มข้น 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 วัน

T_3 = การทดลองชักนำที่ใช้ยาทินิดาโซลความเข้มข้น 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 วัน แล้วเพิ่มความเข้มข้นของยาในการชักนำเป็น 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 20 วัน รวมระยะเวลาที่ได้สัมผัสยา 50 วัน

T_4 = การทดลองชักนำที่ใช้ยาทิไนดาโซลความเข้มข้น 0.015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 วัน แล้วเพิ่มความเข้มข้นของยาในการชักนำเป็น 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 วัน รวมระยะเวลาที่ได้สัมผัสยา 60 วัน

T_3^* = การทดลองชักนำที่ใช้ยาทิไนดาโซลความเข้มข้น 0.015 และ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 20 และ 30 วันตามลำดับ ซึ่งรวมเป็นระยะที่ได้สัมผัสยา 50 วันแล้วมีการเพาะเลี้ยงต่อมาอีก 2 เดือน

T_4^* = การทดลองชักนำที่ใช้ยาทิไนดาโซลความเข้มข้น 0.015 และ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 30 วันทั้งสองระดับความเข้มข้น ซึ่งรวมระยะเวลาที่ได้สัมผัสยา 60 วัน แล้วมีการเพาะเลี้ยงต่อมาอีก 2 เดือน