

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1. การรวบรวมตัวอ่อนระยะติดต่อ (metacercaria)

นำปลาวัวมน หรือ ปลาแก้มขี้ไก่ (Puntius orphoides) และปลากระสับจุด (Hampala dispar) จากตลาดสด อำเภอบ้านไผ่ อำเภอเมืองจัตุมิ และ อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น มาทำการผ่าเอาอวัยวะภายในออก นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าร่วมกับสารละลายเบบซินเอ [0.25% pepsin A(BDH) , 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ 1.5% กรดไฮโดรคลอริก (HCl)] ใน อัตราส่วน สารละลายเบบซินเอ 4 ลิตร ต่อปลา 1 กิโลกรัม จนละเอียด จากนั้นนำเนื้อปลาซึ่งผ่านการปั่นจนละเอียด เทลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร แล้วนำไปย่อยที่ 37 °c ในอ่างน้ำอุ่นแบบเขย่า (shaking water bath) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง นำส่วนที่ได้จากการย่อยไปกรองผ่าน ตะแกรงหยาบที่ 1 ซึ่งมีขนาดรูตะแกรงเท่ากับ 650 ไมโครเมตร แล้วนำไปล้างในน้ำเกลือ 0.85% นำไปกรองผ่านตะแกรงที่ 2 ซึ่งมีขนาด รูตะแกรงเท่ากับ 300 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปกรองผ่านตะแกรงที่ 3 ขนาดรูตะแกรงเท่ากับ 106 ไมโครเมตร นำส่วนที่ค้างอยู่บนตะแกรงที่ 3 ไปล้างในน้ำเกลือ 0.85 % กรองผ่าน ตะแกรงที่ 4 ซึ่งมีขนาดรูตะแกรงเท่ากับ 250 ไมโครเมตร นำส่วนซึ่งกรองผ่านตะแกรงที่ 4 ไปตกตะกอนใน sedimentation jar นำส่วนที่ตกตะกอน มาคัดแยกเอาตัวอ่อนระยะติดต่อ (metacercaria) ของพยาธิใบไม้ตับ Opisthorchis viverrini ภายใต้อกล้องสามมิติที่กำลังขยาย 20-40 เท่า

3.2 การป้อนตัวอ่อนระยะติดต่อ (metacercaria) ของพยาธิแก่สัตว์ทดลอง สัตว์ทดลองที่ใช้คือแฮมสเตอร์ (golden syrian hamster, *Mesocricetus auratus*) เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนักตัวระหว่าง 95 - 150 กรัม ซึ่งได้จากหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ก. การคัดเลือกสัตว์ทดลองก่อนนำมาป้อนระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ตับ การศึกษาครั้งนี้ใช้ แฮมสเตอร์ทั้งหมด 75 ตัว นำแฮมสเตอร์มาแยก เลี้ยงงานกรงเดี่ยว ก่อนจะนำแฮมสเตอร์มาทดลองจะทำการตรวจหาเชื้อปรสิตอื่นๆที่อาจจะติดเชื้ออยู่ก่อนโดยเก็บมูล (feces) ของแฮมสเตอร์มาทำการ ตรวจหาไข่พยาธิ โดยวิธี Formalin-ether concentration technique แล้วจึงนำแฮมสเตอร์ที่ปลอดจากการติดเชื้อพยาธิ มาทำการทดลอง

ข. การป้อนระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ตับ

การป้อนระยะติดต่อพยาธิใบไม้ตับ จะวางยาสลบ แฮมสเตอร์ ด้วยอีเทอร์แล้วจึงป้อน ระยะติดต่อ metacercaria ทางสายยาง จนถึง กระเพาะ (Stomach intubation) โดยใส่สายยางซึ่งต่อกับเข็มฉีดยาและ กระบอกฉีดยา ขนาด 5 มิลลิลิตรโดยป้อนระยะติดต่อ 50 metacercaria ต่อแฮมสเตอร์ 1 ตัว

3.3 การทดลองหาเส้นทางการเคลื่อนที่ของพยาธิ ใบแฮมสเตอร์

แบ่ง แฮมสเตอร์ที่ได้รับ ระยะติดต่อพยาธิใบไม้ตับทั้งหมด 40 ตัวออกเป็นกลุ่ม ๆ ละ 5 ตัวแล้ว ทำการศึกษา 1-2 นาที่หลังการติดเชื้อ , 1/2, 1, 2, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงเมื่อครบตามกำหนดเวลาข้างต้นแล้ว นำแฮมสเตอร์ด้วยการดัดคอ (cervical dislocation) ผ่าเปิดช่องท้องใส่เส้นด้ายผูก ท่อน้ำดี ด้วยเชือก 2 ส่วน คือ ส่วนที่ติดกับขั้ว (hilum) ของตับกับส่วนที่ติดกับลำไส้เล็กส่วนต้น (ส่วนนี้เรียกว่า Extra hepatic common bile duct) และ ใส่เส้นด้ายผูก ลำไส้เล็กส่วนต้นที่ติดต่อกับ กระเพาะอาหารส่วนปลาย กับ ลำไส้เล็ก ที่ติดกับท่อน้ำดี (ลำไส้เล็กส่วนนี้อยู่ระหว่าง ส่วนปลาย กระเพาะอาหารกับท่อน้ำดี) ส่วนลำไส้เล็ก ที่เหลือแบ่งเป็น 3 ส่วนเท่าๆกันตามความยาวใส่เส้นด้าย

ผูกแต่ละส่วน แล้ว ตัดแต่ละส่วน แยกไส้เล็กที่ แบ่งเป็น 3 ส่วน หลังจากนั้น แยกถุงน้ำดี ท่อน้ำดี ไส้ส่วนที่ติดกระเพาะอาหาร ตับ และ กระเพาะอาหาร แต่ละ อวัยวะแช่น้ำเกลือ 0.85 % ทำการตรวจนับ พยาธิในแต่ละ อวัยวะ ภายใตกล้องสามมิติ พร้อมทั้งดูลักษณะของพยาธิในแต่ละอวัยวะ

3.4 ศึกษาการเจริญเติบโต และ การพัฒนาการของพยาธิ

นำแฮมสเตอร์ ที่ได้รับระยะติดต่อพยาธิทั้งหมด 35 ตัว นำมาแบ่งเป็น กลุ่มละ 5 ตัวแล้ว นำมาเลี้ยงเป็นเวลา 1, 1.5, 2, 3 ,4 ,6 และ 8 สัปดาห์ เมื่อครบตามกำหนดเวลาข้างต้นแล้วฆ่าแฮมสเตอร์ด้วย การดิงคอ ผ่าเปิดช่องท้อง ชั่งน้ำหนักตับ และถุงน้ำดี แล้วนำมาตรวจแยกนับพยาธิ ส่วนตัวอ่อนระยะ NEJ ได้ จากการนำตัวอ่อนระยะติดต่อ มาทำให้ออกจาก ซีสต์ ด้วยสารละลายทริปซิน (trypsin 0.5 %) จำนวน 60 metacercaria พยาธิที่ได้จากการทำให้ออก จากซีสต์และจากแฮมสเตอร์ ทั้งหมดนำมาล้างน้ำเกลือ 0.85 % และดองใน 10 % พอสเฟตบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน หลังจากนั้นนำพยาธิครึ่งหนึ่งในแต่ละช่วงอายุข้างต้น ไปอบที่ 60° ซ เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง ของพยาธิ พยาธิอีก ครึ่งหนึ่งในแต่ละช่วงเวลาดังกล่าว นำไปย้อมด้วยสี carmine (ภาคผนวก ค) เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพยาธิใบไม้ตับ โดยทำการตรวจวัดหา พื้นที่ของอวัยวะ และรังไข่ด้วยเครื่อง Graphic Analyserวัดความกว้างยาวของ มดลูก หลอดอาหาร และลำตัว วัดความกว้างของ oral sucker, ventral sucker และ กอหอย (pharynx) วัดความยาวของ vitelline gland พร้อมนับจำนวน กลุ่ม ของ vitelline gland ของพยาธิในแต่ละช่วงเวลา ดังกล่าวข้างต้น ภายใตกล้องจุลทรรศน์ และ กล้องสามมิติ บันทึกผลการตรวจวัด (ภาคผนวก ข)

การตรวจหาไข่เพื่อ ศึกษา เวลาก่อนตรวจพบไข่ (prepatent period) แฮมสเตอร์ที่ได้รับระยะติดต่อพยาธิใบไม้ตับจำนวน 5 ตัวทำการเก็บมูลแฮมสเตอร์ ทุกวันตั้งแต่ วันที่ 21 - 28 นำมูล แฮมสเตอร์ แต่ละวันมาชั่งน้ำหนักและผ่าน

วิธี Modified formaline-ether concentration แล้ว ทำการตรวจหาไข่ ภายใตกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลการตรวจหา (egg per gram) (ภาคผนวก ง)

3.5 การศึกษาสัดส่วนไข่ที่พัฒนาจนมีตัวอ่อน miracidium (embryonated eggs) ต่อไข่ทั้งหมดตามมดลูก

โดยการนำพยาธิ อายุ 3 , 4 , 6,8 สัปดาห์ และจากคน มาทำการวัดอัตราส่วนไข่ที่พัฒนาจนมีตัวอ่อน miracidium (embryonated eggs) โดยสังเกตจากสีของไข่ (ไข่ที่มีตัวอ่อนจะสีเข้ม) ต่อไข่ทั้งหมดตามมดลูกพยาธิ ภายใตกล้องสามมิติ โดยใช้อcular micrometer บันทึกผลการตรวจวัด

3.6 ศึกษาเปรียบเทียบระยะตัวเต็มวัยพยาธิใบไม้ตับ ในคนกับในแฮมสเตอร์

นำระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับที่ได้จากการชันสูตรของคน 26 ราย ระบายไปย้อมสี carmine เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับ ระยะตัวเต็มวัยพยาธิที่ได้จากแฮมสเตอร์ โดยทำการตรวจวัดหาพื้นที่ ของ อวัยวะ และ รั้งไข่ด้วยเครื่อง Graphic Analyser วัดความกว้างยาวของมดลูก หลอดอาหารและลำตัว วัดความกว้างของ oral sucker ventral sucker และ คอหอย (pharynx) วัดความยาว ของ vitelline gland พร้อมนับจำนวนกลุ่มของ vitelline gland ภายใตกล้องจุลทรรศน์และกล้องสามมิติบันทึกผลการตรวจวัด [การวัดความกว้าง ความยาวของลำตัว โดยความกว้างลำตัววัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัวการวัดความกว้าง ความยาวหลอดอาหาร วัดความกว้างที่สุดของหลอดอาหาร และวัดความยาวจากคอหอยจนถึงลำไส้ การวัดคอหอย oral sucker ventral sucker วัดความกว้าง (diameter) การวัดความยาวลำไส้วัดจากลำไส้ส่วนที่แยกเป็น 2 ส่วน โดยวัดค่าประมาณของทั้งสองส่วน วัดความกว้างยาวของมดลูก มดลูกมีการขดตัวใบมาก การวัดความ กว้างและความยาวมดลูก โดยวัดความกว้างของมดลูกที่ขดตัวอยู่ระหว่างลำไส้ ส่วนความยาววัดจากรั้งไข่จนถึง ventral sucker ความยาวของ vitelline gland ทั้งด้านซ้ายและขวา

วัดจากส่วนบนสุดจนถึงส่วนล่างสุดทั้งสองข้าง การหาพื้นที่ของอัมพะ และรังไข่ อาศัยเครื่อง Graphic Analyser ในการ คำนวณหาค่าเฉลี่ยของแต่ละอวัยวะ]

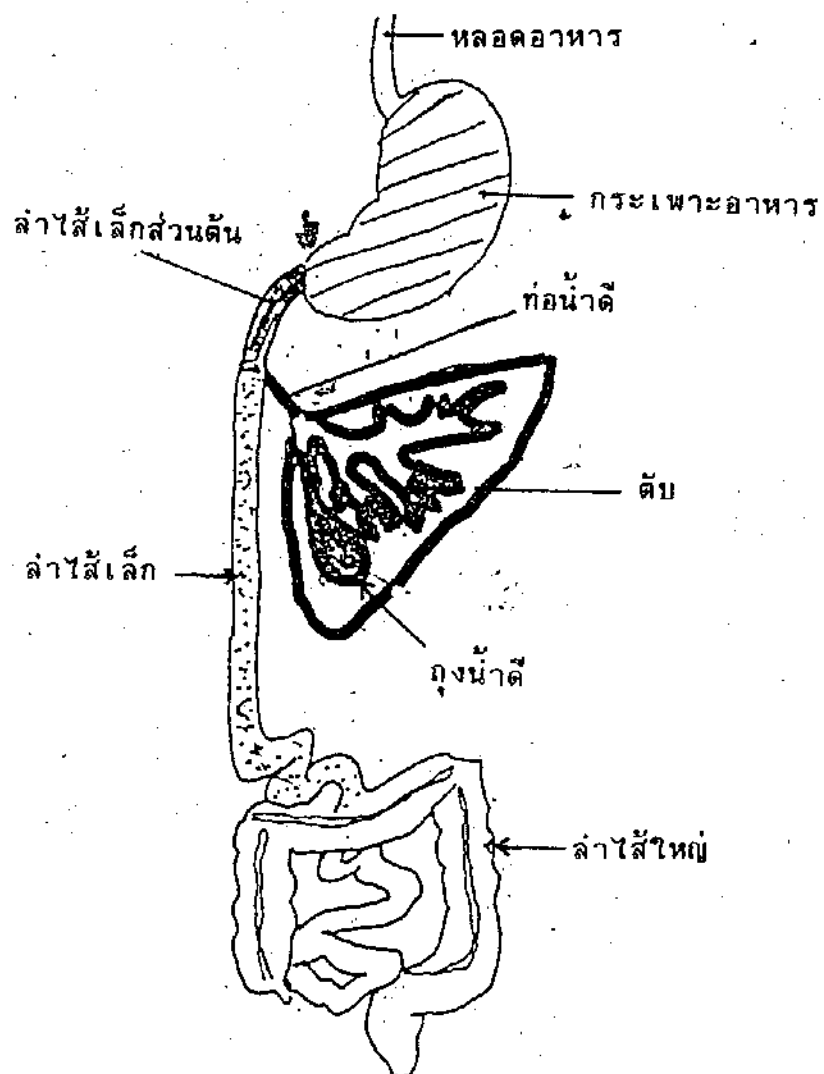
3.7 ศึกษาขนาดพยาธิที่หลังการย้อมสี

นำพยาธิใบไม้ตับอายุ 6,8 สัปดาห์ และจากคน มาทำการวัดขนาดความ กว้าง และ ความยาวลำตัว ก่อนย้อมสี เปรียบเทียบกับหลังย้อมสี carmine [โดย การดองพยาธิด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ โพสเฟตบัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน เป็นเวลาไม่น้อย กว่า 24 ชั่วโมงเปลี่ยนถ่ายพยาธิสำน แอลกอฮอล์ 70เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ข้ามคืน เปลี่ยนถ่ายพยาธิลงจานสี Carmine ที่เตรียมไว้ทิ้งไว้ข้ามคืนผ่านขบวนการปรับสี ของพยาธิ (Decolourization) ด้วย 1-2 % acid alcohol จนสีพยาธิ สวยผ่านขบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) โดยเริ่มจาก 70 % ,80 %, 90 %, 95 % และแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (Absolute alcohol) อย่างละ 1 ชั่วโมง ทำให้ตัวพยาธิใส (Clearing) ด้วย Methyl Salicylate จนตัวพยาธิจมลงในสารดังกล่าว mount ตัวพยาธิลงบน สไลด์ ด้วย permount และปิด ด้วย กระจกปิดสไลด์ (cover glass)]

3.8 ทดสอบทางสถิติ

เปรียบเทียบลักษณะภายนอก และ ขนาดของอวัยวะภายนอก โดยทำการ ตรวจวัด หาพื้นที่ ของ อัมพะ และ รังไข่ด้วยเครื่อง Graphic Analyser วัด ความกว้างยาวของมดลูก หลอดอาหาร และ ลำตัว วัดความกว้างของ oral sucker, ventral sucker และ คอหอย (pharynx) วัดความยาว ของ vitelline gland ของพยาธิใบไม้ตับที่ จากคน และ พยาธิใบไม้ตับที่ไต จากแฮมสเตอร์ โดยวิธี t-Test และ หาความสัมพันธ์การถดถอยแบบพหุ (multiple regression) ของความกว้าง และความยาวลำตัวของพยาธิใบไม้ตับในระยะ NEJ , 1 , 1.5 , 2 , 3 , 4 , 6 และ 8 สัปดาห์ในแฮมสเตอร์

แสดงการแบ่งอวัยวะภายในแฮมสเตอร์ในการทดลองนี้



ท่อน้ำดียาว (0.5-0.7 ซม.)

ลำไส้เล็กส่วนต้นยาว (0.9-1.2 ซม.)