

การคำนวณ

การเตรียมระยะตัวอ่อน NEJ (Newly Excyst Juvenile)

1. ชั่งทริปซิน (trypsin) 0.1 กรัม
2. ละลายใน 0.85เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 20
ลบ.ซม.. (ได้สารละลายทริปซิน 0.5 เปอร์เซ็นต์% ปริมาณ 20
ลบ.ซม.)
3. ใช้ Pasteur pipette ดูดตัวอ่อนระยะติดต่อ ใส่ลงในสาร-
ละลาย ทริปซิน 0.5 เปอร์เซ็นต์
4. สังเกตการ ออกจากซิสต์ ของ ตัวอ่อนระยะติดต่อ
5. หลังจากออกจากซิสต์ แล้วนำพยาธิ ที่ ได้ ย้ายมาใส่ในน้ำเกลือ
0.85เปอร์เซ็นต์
6. นำพยาธิตัวอ่อนที่เพิ่งออกจากซิสต์ ไปดองใน 10เปอร์เซ็นต์
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พอร์มาลีน (phosphate buffer formalin)

การเตรียม 10 เปอร์เซ็นต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พอร์มาลีน (phosphate buffer formalin)

สารที่ใช้เตรียม

- | | | |
|---|-----|-----------|
| 1. Na_2HPO_4 | 6.5 | กรัม |
| 2. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 4 | กรัม |
| 3. น้ำกลั่น | 900 | มิลลิลิตร |
| 4. พอร์มาลีน เข้มข้น | 100 | มิลลิลิตร |

วิธีเตรียม

1. ชั่ง Na_2HPO_4 6.5 กรัม และ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4 กรัม
ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร คนให้ละลาย
2. เติมพอร์มาลีน เข้มข้น 100 มิลลิลิตร ในสารละลายข้อ 1.
แล้ว คนให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีชา

การย้อมสีพยาธิใบไม้ตับด้วยสี Carmine

1. การเตรียมสี Carmine

สารที่เข้าเตรียม

1. Carmine	25 กรัม
2. Glacial acetic acid	25 มิลลิลิตร
3. Aluminium potassium sulfate	25 กรัม
4. น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
5. Salicylic acid	1 กรัม

วิธีเตรียม

1. บด Carmine ให้ละเอียดด้วย ครกบด
2. ละลาย Carmine ด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วเติม Glacial acetic acid 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที
3. ต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บ่อยๆ ให้เย็น
4. นำ Aluminium potassium sulfate 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายที่ได้ลงใน Carmine ที่เย็นแล้ว
5. ต้มอีกครั้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. บ่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง
7. เติม Salicylic acid 1 กรัม คนให้เข้ากัน แล้วเก็บในขวดแก้ว

2. การย้อมตัวพยาธิใบไม้ตับ Opisthorchis viverrini ด้วยสี
Carmine

- 2.1 ตองพยาธิด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ โพสเฟตบัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน
เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง
- 2.2 เปลี่ยนถ่ายพยาธิสีน้ำ แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ข้ามคืน
- 2.3 เปลี่ยนถ่ายพยาธิลงในสี Carmine ที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ข้ามคืน
- 2.4 ผ่านขบวนการปรับสีของพยาธิ (Decolourization) ด้วย
1-2 % กรดแอลกอฮอล์ (Acid alcohol) จนสีพยาธิสลาย
- 2.5 ผ่านขบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) โดยเริ่มจาก
70 % .80 % , 90 % , 95 % และ แอลกอฮอล์บริสุทธิ์
(Absolute alcohol) อย่างละ 1 ชั่วโมง
- 2.6 ทำให้ตัวพยาธิใส (Clearing) ด้วย Methyl Salicylate
จนตัว พยาธิจมลงบนสารดังกล่าว
- 2.7 mount ตัวพยาธิลงบน สไลด์ ด้วย permount และปิดด้วย
กระจกปิดสไลด์ (cover glass)

การตรวจมูลแฮมสเตอร์เพื่อหาเชื้อปรสิต

วัสดุและอุปกรณ์

- น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์
- อีเทอร์ (Ether)
- 10 เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาลีน (10 % Formalin)
- เครื่องซั่ง, หลอดปั่น และตาซั่ง
- ผ้าก๊อช กรวย ปีกเกอร์ และจุกยาง

วิธีทำ

1. ซั่งน้ำหนักมูลแฮมสเตอร์
2. ผสมมูลแฮมสเตอร์ และน้ำเกลือ 0.85 % ประมาณ 10 มิลลิลิตร
ลงในปีกเกอร์ คนให้เข้ากัน แล้วกรองผ่านผ้าก๊อช 2 ชั้น ลงในหลอด
ปั่นขนาด 15 มิลลิลิตร
3. ก่อนนำไปปั่นทุกครั้ง ให้ทำการสมตุลย์ หลอดปั่นเสียก่อน รดยซั่งบนตาซั่ง
4. นำไปปั่นที่ 1500-2000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที แล้วเทน้ำเกลือส่วน
บนทิ้งไปให้เหลือแต่ตะกอน
5. เติมน้ำเกลือลงไปอีกประมาณ 10 มิลลิลิตร ใช้ไม้กวาดตะกอนให้ผสมกับ
น้ำเกลือแล้วนำไปปั่นเช่นเดิมอีก ปั่นล้างประมาณ 3 ครั้ง หรือจนกระทั่ง
น้ำส่วนบนใสแล้วเทน้ำเกลือทิ้งไป
6. เติม 10 % ฟอร์มาลีน ลงไป 6-10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้ง
ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที
7. เติม อีเทอร์ ลงไปอีก 3 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยจุกยางให้แน่นแล้วเขย่า
แรง ๆ ประมาณ 30 วินาที จึงค่อย ๆ เปิดจุกยางออก นำไปปั่นด้วย
ความเร็วและเวลาเท่าเดิมอีกครั้ง

8. เมื่อนำหลอดแก้ว ออกจากเครื่องปั่น จะพบว่าของเหลวในหลอดแก้วแบ่งออกเป็น 4 ชั้น ให้ใช้ไม้เขี่ยอุจจาระสอดลงข้าง ๆ หลอดจนถึงชั้นพอร์มาลิน วนไม้ให้รอบขอบหลอด แล้วเทของเหลวทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนส่วนล่าง
9. นับจำนวนหยดของตะกอนที่ได้ทั้งหมด บันทึกผลกานับ
10. ดูเอาตะกอนไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลการตรวจ

วิธีการวัดอวัยวะของพยาธิภายในกล้องสามมิติและกล้องจุลทรรศน์

1. ใส่ ocular micrometer ใน ocular lens
2. วาง stage micrometer บน stage ของกล้อง
3. ปรับโฟกัสจนสังเกตเห็น scale บน stage micrometer
4. เลื่อน stage micrometer ให้พอดีกับ ocular micrometer ใน ocular lens
5. นับจำนวนช่องบน ocular lens เปรียบเทียบกับ stage micrometer
6. นำไปคำนวณว่า 1 ช่อง ocular micrometer มีค่าเท่าใด

วิธีการแบ่งอวัยวะต่างๆของแฮมสเตอร์ที่สนใจศึกษา

1. กระเพาะอาหาร เริ่มตั้งแต่ส่วนปลายบนสุด ที่ติดกับหลอดอาหาร และส่วนท้ายที่ติดกับลำไส้
2. ลำไส้เล็กส่วนต้นที่อยู่ระหว่างส่วนปลายกระเพาะอาหาร (pylorus) กับ ทางเปิดเข้าท่อน้ำดีใหญ่ (common bile duct)
3. ท่อน้ำดีใหญ่ (Extra hepatic common bile duct) เป็นท่อน้ำดีที่ติดกับลำไส้เล็กและส่วนที่จะเชื่อมต่อเข้าสู่ตับ
4. ถุงน้ำดี (Gall bladder) แยกจากเนื้อตับ
5. ตับ (Liver)
6. ลำไส้เล็กส่วนที่เหลือจากข้อ 2. ถูกแบ่งเป็น 3 ส่วนตามความยาว

วิธีชั่งน้ำหนักแก๊งพยาธิ

1. พยาธิใบไม้ตัวอ่อนระยะ NEJ ซึ่งพร้อมกัน 30 ตัว แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ย (น้ำหนักแก๊งพยาธิน้อยมาก ไม่สามารถชั่งทีละ 10 ตัวได้)
2. พยาธิใบไม้ระยะเวลา 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ชั่งทีละ 5 ตัว แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ย (สามารถชั่งทีละ 5 ตัวได้)

วิธีการวัดแต่ละอวัยวะ

1. การวัดความกว้าง ความยาวของลำตัว โดยความกว้างลำตัววัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัว
2. การวัดความกว้าง ความยาวหลอดอาหาร วัดความกว้างที่สุดของหลอดอาหาร และวัดความยาวจากคอหอยจนถึงลำไส้
3. การวัดคอหอย oral sucker ventral sucker วัดความกว้าง (diameter)
4. การวัดความยาวลำไส้วัดจากลำไส้ส่วนที่แยกเป็น 2 ส่วน โดยวัดค่าประมาณของทั้งสองส่วน

5. วัดความกว้าง ยาวของมดลูก มดลูกมีการขดตัวไปมามาก การวัดความกว้างและความยาวมดลูก โดยวัดความกว้างของมดลูกที่ขดตัวอยู่ระหว่างลำไส้ ส่วนความยาววัดจากรังไข่จนถึง ventral sucker
6. ความยาวของ vitelline gland ทั้งด้านซ้ายและขวา วัดจากส่วนบนสุดจนถึงส่วนล่างสุดทั้งสองข้าง
7. การหาพื้นที่ของอวัยวะ และรังไข่ อาศัยเครื่อง Graphic Analyser ในการคำนวณหาค่าเฉลี่ยของแต่ละอวัยวะ

การคำนวณทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ การถดถอยแบบพหุ (multiple regression) ของ การเจริญเติบโต ของพยาธิใบไม้ตับพบว่าค่าการถดถอยแบบพหุ ของ oral sucker มีค่า 0.60423 , ventral sucker มีค่า 0.61892, คอหอย มีค่า 0.55262 , ความกว้างลำตัว มีค่า 0.64336 และความยาวลำตัว มีค่า 0.80590 นั้นแสดงให้เห็นว่า ความยาวลำตัว เป็นตัวแสดงการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด