

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาความสามารถในการติดเชื้อ การกระจายและความสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์และปรสิตของ *H. taichui* ในแฮมสเตอร์ทำได้โดยการบ้อนตัวอ่อนระยะติดตัวของพยาธิให้แก่แฮมสเตอร์แล้วสำรวจพยาธิในลำไส้ของสัตว์แต่ละตัว ศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นที่ผนังลำไส้ของสัตว์พร้อมทั้งเก็บชิ้นเป็นระยะ ๆ เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีที่สัตว์สร้างขึ้นโดยทดสอบกับแอนติเจนที่เตรียมจากตัวอ่อนระยะติดต่อและพยาธิตัวแก่ นอกจากนี้ยังหาส่วนประกอบของแอนติเจนและหาปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการที่ใช้ในการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. ตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิ

ตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิได้จากปลาน้ำจืดจำพวกปลาขาว (Cyprinoid fish) ที่ได้จาก อ.เมือง จ.ขอนแก่น

2. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ แฮมสเตอร์ (golden hamster) เพศผู้ อายุระหว่าง 6-8 สัปดาห์ จากหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สัตว์แต่ละตัวจะได้รับการตรวจหาพยาธิในมูลสัตว์ก่อนโดย formalin ether concentration technique (ดูภาคผนวก ก.) เฉพาะสัตว์ที่ได้รับการตรวจแล้วว่าไม่มีการติดเชื้อพยาธิใด ๆ เท่านั้น ที่นำมาใช้ในการทดลอง

3. การเตรียมตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิ

นำปลามาผ่าเอาอวัยวะภายในออก นำไปปั่นในเครื่องปั่นที่มีสารละลาย 0.25 % เบบซิน อยู่ด้วยเล็กน้อยผสมปลา ที่ปั่นแล้วด้วยสารละลายเบบซิน (ในสัดส่วน ปลา:เบบซิน ประมาณ 1:10) ในบีกเกอร์ บดย่อยให้เกิดการย่อยที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงใน shaking water bath จากนั้นนำส่วนผสมนี้กรองผ่านตะแกรงความถี่ขนาด 850 และ 300 ไมโครเมตร เพื่อแยกกากออกแล้วนำส่วนของเหลวที่กรองได้มากรองผ่านตะแกรงซึ่งมีความถี่

ขนาด 106 ไมโครเมตร เพื่อแยกเอาตะกอน น้ำตะกอนลงผสมกับน้ำเกลือ (0.85% NaCl) จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยน้ำเกลือในกรวยตกตะกอน น้ำตะกอนมาแยกตัวอ่อนระยะติดต่อดังใช้ dissecting microscope รวบรวมตัวอ่อนระยะติดต่ได้ที่ได้ไว้ใน petridish ขนาดเล็กที่มีน้ำเกลืออยู่พอสมควร แบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ ละ 200 ตัว เพื่อป้อนให้สัตว์ทดลองต่อไป

4. การป้อนสัตว์ทดลอง

แฮมสเตอร์จะได้รับตัวอ่อนระยะติดต่อดังของ *H.taichui* จำนวน 200 ตัว/สัตว์ทดลอง 1 ตัวในขณะที่สัตว์ถูกทำให้สลบด้วยอีเธอร์ โดยการป้อนตัวอ่อนระยะติดต่อดังผ่านทางสายยางขนาดเล็กที่สวมติดกับเข็มฉีดยาขนาด 18 G และกระบอกฉีดยาขนาด 1 มล. หลังจากนั้นนำสัตว์มาเลี้ยงดูละเลียงโดยแบ่งเลี้ยงกรงละ 5-10 ตัว ตามขนาดของกรง ให้อาหารและน้ำตลอดเวลา สัตว์เหล่านี้จะถูกนำมาศึกษาเป็นกลุ่ม ๆ ที่เวลาต่าง ๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แผนการทดลองและจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาแต่ละกลุ่ม

เวลาที่ทำการศึกษา	จำนวนแฮมสเตอร์ที่ศึกษา (ตัว)			รวม (ตัว)
	ศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่ผนังลำไส้	ศึกษาการติดเชื้อการกระจาย	กลุ่มควบคุม	
1 วัน	3	0	2	5
2 วัน	3	0	2	5
3 วัน	3	0	2	5
4 วัน	3	0	2	5
5 วัน	3	0	2	5
6 วัน	3	0	2	5
1 สัปดาห์	3	5	2	10
2 สัปดาห์	3	5	2	10
3 สัปดาห์	3	5	2	10
4 สัปดาห์	3	5	2	10
5 สัปดาห์	3	5	2	10
6 สัปดาห์	3	5	2	10
7 สัปดาห์	3	5	2	10
8 สัปดาห์	3	5	2	10
9 สัปดาห์	3	5	2	10
10 สัปดาห์	3	5	2	10
11 สัปดาห์	3	5	2	10
12 สัปดาห์	3	5	2	10
13 สัปดาห์	3	5	2	10
14 สัปดาห์	3	5	2	10
15 สัปดาห์	3	5	2	10
16 สัปดาห์	3	5	2	10
รวม	66	80	44	190

5. การศึกษาความสามารถในการติดเชื้อ และการกระจายของพยาธิ

ได้ทำการศึกษาความสามารถในการติดเชื้อ และการกระจายของพยาธิ ควบคู่กันไป โดยการตรวจนับจำนวนพยาธิที่พบในลำไส้เล็กส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลายของสัตว์ทดลองแต่ละตัวดังนี้ นำแฮมสเตอร์กลุ่มที่จะศึกษามาทำให้สลบด้วยอีเธอร์ ทำความสะอาดหน้าท้องด้วย 70% แอลกอฮอล์ แล้วเปิดช่องท้องนำลำไส้เล็กออกมาตัดออกเป็น 3 ส่วนเท่ากัน แยกใส่ใน petridish ที่มีน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ผ่านลำไส้ตามยาวตรวจนับพยาธิที่พบในลำไส้แต่ละส่วนภายใต้ dissecting microscope เพื่อดูการกระจายของพยาธิจำนวนพยาธิที่ได้จากลำไส้เล็กทั้ง 3 ส่วนของสัตว์ทดลองแต่ละตัวคิดเป็นความสามารถในการติดเชื้อของพยาธิ

6. การศึกษาการตอบสนองของแฮมสเตอร์ต่อพยาธิ

6.1 การตอบสนองที่เกิดขึ้นบริเวณผนังลำไส้

การศึกษาพยาธิสภาพที่คาดว่าจะเกิดขึ้นบริเวณผนังลำไส้เล็กของแฮมสเตอร์จะทำการศึกษาจากสัตว์ในกลุ่มทดลอง 3 ตัว เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 2 ตัวและศึกษาที่ลำไส้ทั้ง 3 ส่วน โดยนำลำไส้แต่ละส่วนล้างในน้ำเกลือแล้วตรึงสภาพ (Fix) ด้วย 10% buffered formalin (ดูภาคผนวก ก.) เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชม. นำมาดึ่งน้ำออก (dehydrate) ทำให้ใส (clearing) แล้วแช่ในพาราฟินตามวิธีทำของ Sheehan และ Hrapchak (1980) กับ Lillie และ Pullmor (1976) ตัดตัวอย่างลำไส้ที่ฝัง (embed) ในพาราฟินแล้วให้บาง 5 ไมโครเมตร โดยใช้เครื่อง microtome (leitz No.418 Germany) แล้วนำไปทำเป็นสไลด์ถาวร ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin ตามวิธีของ Luna (1986)

6.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันวิทยาของแฮมสเตอร์ต่อพยาธิ

ประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของแฮมสเตอร์ต่อพยาธิ โดยการตรวจหาระดับของแอนติบอดีในซีรัมต่อแอนติเจนชนิดหยาบ (crude antigen) ที่เตรียมจากตัวอ่อนระยะติดต่อ และพยาธิตัวแก่ โดยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) นอกจากนี้ยังได้หาส่วนประกอบของแอนติเจน ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และทดสอบหาปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และ แอนติบอดี โดยวิธี semi-dry immunoblotting

วิธีการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันวิทยาของแฮมสเตอร์มี ขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

6.2.1 การรวบรวมซีรัม

ซีรัมของสัตว์แต่ละตัวได้จากเลือดที่เจาะจากหัวใจ ทุกสัปดาห์จาก 1-16 สัปดาห์ โดยเก็บเลือดใส่หลอดแก้ว ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานานประมาณ 3-5 ชม. นำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 10 นาที นำซีรัมของสัตว์แต่ละตัวมารวมกันแล้วแบ่งเก็บใน microtube ที่ -20 °ซ เพื่อการทดลองต่อไป

6.2.2 การเตรียมแอนติเจน

แอนติเจนที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นแอนติเจนที่เตรียมจาก ตัวอ่อนระยะ คีดต่อ และพยาธิตัวแก่ที่รวบรวมจากลาไส้เล็กของแฮมสเตอร์ ในการเตรียมแอนติเจนแต่ละชนิดใช้วิธีเดียวกันดังนี้

i. นำพยาธิมาล้างด้วยน้ำเกลือเย็น (0.85% NaCl) 3 ครั้ง วัด ปริมาตรพยาธิทั้งหมด เป็นมิลลิลิตร

ii. เติม 0.1 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF) และ 0.1 mM 1-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone (TPCK) อย่างละ 1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร

iii. บดพยาธิให้แตกละเอียดด้วย glass tissue grinder ที่แช่ ในน้ำแข็ง

iv. นำส่วนผสมที่ได้ไปทำให้เซลล์แตกด้วย ultrasonic disintegrator (Sonics & Materials Inc. Vibra cell, Tapered microtip 5 มม.) ที่ amplitude 40 เว้นช่วงห่างกันครั้งละ 10 วินาที จนเซลล์แตกละเอียด

v. เก็บส่วนผสมที่ได้ไว้ในตู้เย็น (4 °ซ) ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วนำมาปั่นที่ ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที (Beckman centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลานาน 30 นาที

vi. เก็บส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) ไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ สำหรับเป็นแอนติเจนในการทดลองต่อไป

vii. ตรวจวัดปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่เตรียมไว้ โดยวิธีของ Lowry (Lowry, Rosenbrough and Randall, 1951)

6.2.3 การหาแอนติบอดี โดยวิธี ELISA

ทำตามวิธีที่คล้ายกับวิธีของ Wongratanacheewin (1988) ซึ่งสรุปได้ดังนี้

i. ใส่แอนติเจนที่เตรียมจากตัวอ่อนระยะติดต่อ หรือพยาธิตัวแก่ที่ปรับความเข้มข้นด้วย carbonate buffer (ดูภาคผนวก ข.) เป็น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วลงไปใน plastic microtiter plate (NUNC-Immuno Plate Maxi Sorp) ที่มีจำนวน 96 หลุม จำนวน 100 ไมโครลิตร/หลุม แล้วทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C

ii. เทแอนติเจนออกแล้วล้าง microtiter plate ด้วย washing buffer (ดูภาคผนวก ข.) 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

iii. เติม 5 % skim milk (ใน carbonate buffer ดูภาคผนวก ข.) 200 ไมโครลิตร/หลุม ทิ้งไว้ 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 37 °C

iv. ล้างเหมือนข้อ ii

v. เติมซีรัมที่ปรับอัตราส่วนเป็น 1:400 ด้วย 2% skim milk (ใน incubation buffer ดูภาคผนวก ข.) จำนวน 100 ไมโครลิตร/หลุม ทิ้งไว้ 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 37 °C

vi. ล้างเหมือนข้อ ii

vii. เติม anti hamster IgG conjugate (medac GmbH) ที่ปรับอัตราส่วนเป็น 1:4,000 ด้วย 2 % skim milk จำนวน 100 ไมโครลิตร/หลุม ทิ้งไว้ 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 37 °C

viii. ล้างเหมือนข้อ ii

ix. เติม substrate (ดูภาคผนวก ข.) 100 ไมโครลิตร/หลุม ในที่มีดเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C

x. หยุดปฏิกิริยาด้วย 4 N H₂SO₄ จำนวน 100 ไมโครลิตร/หลุม

xi. นำไปวัดค่า optical density (OD.) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

6.3 การวิเคราะห์ส่วนประกอบของแอนติเจนด้วยวิธี SDS-PAGE

6.3.1 การเตรียมตัวอย่างแอนติเจน

นำแอนติเจนชนิดหยาบ (crude somatic antigen) ที่เตรียมจากตัวอ่อนระยะติดต่อหรือพยาธิตัวแก่ผสมกับ sample buffer (ดูภาคผนวก ค.) ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีน 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (สำหรับตัวอ่อนระยะติดต่อ) และ 0.83 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (สำหรับพยาธิตัวแก่) เติม 2-mercaptoethanol ในปริมาณ 5% ของปริมาณของแอนติเจน นำแอนติเจนและโปรตีนมาตรฐาน (ดูภาคผนวก ค.) ที่เตรียมไว้ลงในน้ำเดือดจัด 3 นาที ก่อนนำไปแยกทางองค์ประกอบของโปรตีน โดยใช้ Mini-protean II cell (Bio-Rad)

6.3.2 การทำ SDS-PAGE

ในการแยกโปรตีนครั้งนี้ใช้อุปกรณ์ของ Mini-protean II cell (Bio-Rad) และ 11 % separating gel (ดูภาคผนวก ค.) หลังจากประกอบอุปกรณ์เรียบร้อยแล้วใส่เจลข้างละ 4 มล. หล่อหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 2.5 ชม. ใช้กระดาษกรองดูดซับน้ำกลั่นที่ผิวเจลออกให้หมดใส่ 4% stacking gel (ดูภาคผนวก ค.) ลงไปเกือบเต็มช่องว่างของกระจกพร้อมทั้งเสียบหัวตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที-1 ชม. แล้วถอดหัวออก ใส่โปรตีนมาตรฐาน (standard molecular weight marker) หรือแอนติเจนแต่ละชนิด จำนวน 5 ไมโครลิตร/ช่อง ลงสู่เจลปล่อยให้โปรตีนแยกออกจากกันที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ไฟฟ้า 130 โวลต์ ผ่านตัวกลางซึ่งเป็น electrode buffer (ดูภาคผนวก ค.) เป็นเวลาประมาณ 1 ชม. นำแผ่นเจลที่ได้มาย้อมด้วย silver nitrate (Bio-Rad Catalog No. 161-0449) หรือนำไปถ่ายภาพลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเพื่อการศึกษาต่อไป

6.3.3 การทำ Immunoblotting

6.3.3.1 การถ่ายโปรตีนลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส

กระทำตามวิธีของ Towbin (1979) ดังนี้

i. เตรียมกระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman) และแผ่นไนโตรเซลลูโลส ให้มีขนาดเท่าแผ่นเจลที่มีโปรตีนที่แยกแล้ว แช่กระดาษกรองใน towbin buffer (ดูภาคผนวก ค.) จนอิ่มตัวและแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในน้ำกลั่น

ii. วางกระดาษกรองที่ละแผ่น (ทั้งหมด 6 แผ่น) ลงบนขั้วบวกของเครื่อง semi-dry transfer cell (Bio-Rad) และใช้หลอดแก้วค่อยๆ รีดฟองอากาศออกให้หมด

iii. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสวางทับแผ่นเจลพร้อมทั้งไล่ฟองอากาศออก แล้วยกแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีเจลดติดวางซ้อนบนชั้นของกระดาษกรอง โดยให้แผ่นเจลอยู่ด้านบน

iv. วางกระดาษกรองที่ละแผ่นอีก 4 แผ่น ซ้อนบนแผ่นเจลแล้วปล่อยให้เกิดการถ่ายโปรตีนที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้กระแสไฟฟ้า 38.7 มิลลิแอมป์/เจล เป็นเวลา 30 นาที

6.3.3.2 การตรวจหาปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้รับการถ่ายโปรตีนแล้วมาทดสอบกับซีรัมที่ต้องการซึ่งมีวิธีการทำดังนี้

i. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลส มาตัดออกเป็นแผ่นเล็ก ๆ ตามความยาว แล้วแช่ลงใน blocking solution (ดูภาคผนวก ค.) ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C

ii. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสจากข้อ i. มาใส่ในซีรัมที่เจือจางด้วย blocking solution ในอัตราส่วน 1:25 ทิ้งไว้ 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง

iii. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลส มาล้างด้วย TBST (ดูภาคผนวก ค.) 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วแช่ใน peroxidase-conjugated protein A (zymed) ที่เจือจางด้วย blocking solution ในอัตราส่วน 1 : 2,000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม.

iv. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาล้างด้วย TBST และ TBS อย่างละ 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ตามลำดับและล้างซ้ำด้วย substrate buffer (ดูภาคผนวก ค.) อีก 2 ครั้ง ๆ ละ 0.5 นาที

v. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลส มาแช่ใน 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) และ Nitro blue tetrazolium salt (NBT) substrate (Zymed) ที่ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที หรือจนเห็นแถบสีขึ้นชัดเจน

vi. หยุดปฏิกิริยาโดยการล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

7. การสังเกตและการบันทึกผล

1. จำนวนพยาธิที่ตรวจพบในแฮมสเตอร์ (worm recovery) ได้จากการตรวจนับโดยตรงภายใต้ dissecting microscope

2. การศึกษาการตอบสนองของแฮมสเตอร์ที่ผนังลำไส้ทำได้ โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดที่ผนังลำไส้เล็ก หลังจากตัดให้บาง 5 ไมโครเมตร และย้อมสี แล้วบันทึกผลการศึกษาโดยการถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การตรวจหา แอนติบอดี วิธี ELISA โดยวัด optical density ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์ ส่วนประกอบของแอนติเจนแต่ละชนิดโดยการสังเกตแถบสีที่เกิดขึ้นหลังจากการแยกโดยใช้วิธี SDS-PAGE และย้อมด้วยสี silver nitrate เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (standard molecular weight marker)

5. หาปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยการสังเกตแถบสีที่เกิดขึ้นหลังจากการทำ immunoblotting แล้ว