รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิตสไลด์ถาวรของตัวอย่างโปรโตซัว เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอน

Production of the Permanent Slides of Protozoa for Teaching Materials

โดย

นางสาววาสนา เมืองวงค์

นางสาวซ่อผกา พวงศรี

ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยพะเยา

การพัฒนางานประจำสู่งานวิจัย : Routine to Research (R2R)

ประจำปีงบประมาณ 2564

มหาวิทยาลัยพะเยา

การพิจารณาโดยอาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาได้พิจารณาผลการศึกษางานวิจัยเพื่อการพิจารณางารประจำ เรื่อง **การผลิตสไลด์ถาวรของตัวอย่างโปรโตซัว เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอน** (Production of the Permanent Slides of Protozoa for Teaching Materials) ฉบับนี้เป็นที่เรียบร้อยแล้ว และเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยเพื่อการพัฒนางานประจำของมหาวิทยาลัยพะเยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธงชัย จำปา)

อาจารย์ที่ปรึกษา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เพราะความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร.อรอำไพ จ่าภา อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่ได้ให้คำเสนอแนะ แนวคิด ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ มาโดยตลอด จนงานวิจัยเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้ทำวิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอบพระคุณคณบดีคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุริศักดิ์ ประสานพันธ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆอย่างดี

ขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธิดา ไชยวังศรี หัวหน้าหลักสูตรสาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้ความกรุณาให้คำแนะนำ และให้คำปรึกษาในเรื่องการทำวิจัยด้านต่างๆอย่างดี

ขอกราบของพระคุณพ่อ แม่ และครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำแนะนำ และให้คำปรึกษาในทุกเรื่องอย่างดี

ขอบคุณนักวิทยาศาสตร์สาขาจุลชีววิทยา และเพื่อนร่วมงานทุกท่านที่คอยให้คำแนะนำ เป็นที่ปรึกษา และคอยช่วยเหลือทุกเรื่อง

สุดท้ายนี้ผู้ทำวิจัยขอบคุณห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา (CE02209) ซึ่งเป็นสถานที่ที่ใช้ทำงานวิจัยตลอดโครงการ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

วาสนา เมืองวงค์

นักวิทยาศาสตร์

ผู้ทำวิจัย

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	การผลิตสไลด์ถาวรของตัวอย่างโปรโตซัว เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอน
(ภาษาอังกฤษ)	Production of the Permanent Slides of Protozoa for Teaching Materials

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ-สกุล	นางสาววาสนา เมืองวงค์
หน่วยงาน	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ สาขาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา
ที่อยู่	19 หมู่ 2 ต.แม่กา อ.เมือง จ.พะเยา 56000
โทรศัพท์/โทรสาร	054-466666 ต่อ 3887
E-mail address	wasana_koi139@hotmail.com

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวช่อผกา พวงศรี
หน่วยงาน	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ สาขาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา
ที่อยู่	19 หมู่ 2 ต.แม่กา อ.เมือง จ.พะเยา 56000
โทรศัพท์/โทรสาร	054-466666 ต่อ 3887
E-mail address	chorpaka.phuangsri.9039@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำสไลด์ถาวรของตัวอย่างเชื้อโปรโตซัว *Giardia lamblia* ระยะ cyst ที่ได้จากโครงการออกตรวจพยาธิ เก็บรักษาสภาพเชื้อไว้ในน้ำยา 10% formalin นำมาปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^5 cell/ml ในการหาสภาวะที่เหมาะสมการทำสไลด์ถาวร

จากผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการทำสไลด์ถาวร คือ การใช้เจลาตินต่อกลีเซอรอล ในอัตราส่วน 90:10 ในการช่วยให้เชื้อเกาะติดสไลด์ และทำการ fixation ด้วย 70% Alcohol จากนั้นทำการย้อมด้วยสี Trichrome ที่มีการปรับปรุงจากสูตร Wheatley 's modification โดยปรับความเข้มข้นของสี light green เป็นร้อยละ 0.45 ระยะเวลาในการย้อม 15 นาที และล้างสีออกจากเซลล์ด้วย 70% alcohol ที่ผสม acetic เป็นเวลา 1 นาที และดึงน้ำด้วย 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol และ absolute alcohol ตามลำดับ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้กล่าวมาข้างต้นจะทำให้สามารถผลิตสื่อสไลด์ถาวรเพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการในรายวิชาที่เกี่ยวข้องกับปรสิตวิทยาต่อไป ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีประโยชน์ในแง่ของการนำเชื้อที่เหลือใช้จากโครงการบริการวิชาการมาใช้ในการเตรียมสไลด์ถาวรซึ่งเป็นสื่อการเรียนการสอนชนิดหนึ่ง ส่งผลให้ลดรายจ่ายในการซื้อสไลด์ถาวรและเป็นการใช้สิ่งเหลือใช้ให้เกิดประโยชน์

Abstract

The aim of study to was prepare the permanent slide of *Giardia lamblia* cyst for using as study materials in Parasitology course. The *G. lamblia* cyst were maintained in 10% formalin before using for permanent slide preparation approximately 184 cell/slide

The results indicated that optimal reagents for cell attachment were gelatin: glycerol (90:10). The slides were subsequently fixed with 70% alcohol before straining with modified Trichrome (Wheatley 's modification) for 15 minutes. After that, the slides were washed with 70% alcohol for 1 minute, and dehydrated with 80%, 90% and absolute alcohol, respectively.

From the study of the optimization mentioned above, The permanent slide will enable to be online media production for use in parasitology and related courses. Therefore, this research was used from the academic service project for prepare permanent slides, which is a kind of teaching aim. As a result, the cost of the purchase of permanent slides is reduced and the use of leftovers to be the benefit.

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 นิยามศัพท์ที่ใช้ในการศึกษา	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 แนวความคิดหรือทฤษฎีที่เกี่ยวข้องที่ใช้ในงานวิจัย	4
2.1.1 พยาธิโปรโตซัว	4
2.2.2 *Giardia lamblia*	5
1. ลักษณะสัณฐานของตัวเชื้อ	5
2. วงจรชีวิต และระยะติดต่อของเชื้อ	6
3. ระบาดวิทยาของ *G. lamblia*	7
4. การติดต่อ	7
5. อาการแสดงของโรค Girdiasis	8
6. วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *G. lamblia*	8
7. การรักษาโรค Giardiasis	9
8. การป้องกันและควบคุม	9
2.1.3 การทำสไลด์ถาวร	10
1. สารเคมีที่ช่วยรักษาสภาพเซลล์	10
2. สารเคมีที่ยึดเนื้อเยื่อให้ติดแผ่นสไลด์	10
3. สีย้อม	11
4. สารเคมีที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเซลล์	11
5. สารเคมีที่ทำให้ตัวอย่างใสสะอาด	11

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
6. สารเคมีที่เป็นตัวอย่างสำหรับปิดแผ่นสไลด์	11
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
2.3 กรอบแนวคิดในการวิจัย	13
3 วิธีดำเนินการวิจัย	14
3.1 กลุ่มตัวอย่าง	14
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	14
3.3.1 ครุภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย	14
3.3.2 วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	14
3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	15
3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล	16
3.3.1 การหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นของการทำสไลด์	16
3.3.2 ขั้นตอนการย้อมสี Trichrome	16
3.3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการติดเชื้อบนแผ่นสไลด์	16
3.3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมขั้นตอน fixation	17
3.3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นสี และระยะเวลาในการย้อมสี Trichrome	17
3.3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์	18
3.3.7 การ mounting	18
3.3.8 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst	18
3.4 ระยะเวลาการดำเนินงาน	18
3.5 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	18
4 ผลการทดลอง	19
4.1 การปรับปริมาณเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst สำหรับการทำสไลด์ถาวร	19
4.2 การปรับสภาวะที่เหมาะสมในการติดเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst บนแผ่นสไลด์	19

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4.3 การปรับสภาวะที่เหมาะสมขั้นตอน fixation	20
4.4 การปรับสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นสี และระยะเวลาในการย้อมสี Trichrome	21
4.5 การปรับสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการล้างสีและการดึงน้ำออกจากเซลล์	22
4.6 ผลการทดลองการ mounting	23
4.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst	24
5 การสรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	25
5.1 สรุปผลการวิจัย	25
5.2 การอภิปรายผล	26
5.3 ข้อเสนอแนะ	27
บรรณานุกรม	28
ภาคผนวก	33

สารบัญรูปภาพ

ตาราง หน้า

1 รูปวาดแสดงระยะ Trophozoite และระยะ cyst ของเชื้อ *G. lamblia* 6

2 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อ *G. lamblia* 7

3 แสดงขั้นตอนการปฏิบัติงานวิจัย 13

4 ลักษณะของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ย้อมสี Trichrome สูตร B 22

5 ลักษณะของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ขั้นตอนการล้างสีและการดึงน้ำออกจากเซลล์ 23

6 แสดงตัวอย่างการ mounting 26

7 ตัวอย่างภาพองค์ประกอบของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst 27

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 แสดงการติดเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst บนแผ่นสไลด์ 17

2 การเกาะติดสไลด์ของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst 19

3 จำนวนเชื้อที่ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่คงเหลือบนแผ่นสไลด์ที่ fixation ด้วย 10% formalin, Methanol และ 70% Alcohol 20

4 ลักษณะการติดสีของเชื้อเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst 21

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา (Research rationale)

เชื้อปรสิตโปรโตซัวมีความสำคัญทางการแพทย์ ซึ่งส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยสามารถก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ทั้งในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันปกติ และก่อให้เกิดอาการรุนแรงมากขึ้นในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะกลุ่ม เชื้อโปรโตซัวในลำไส้ เช่น *Entamoeba histolytica, Blastocystis hominis, Giardia lamblia* เป็นต้น

เชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst เป็นเชื้อโปรโตซัวในลำไส้ที่หายาก อีกทั้งไม่มีจำหน่ายทั่วไป ปัจจุบันรายวิชาที่เกี่ยวข้องทางด้านปรสิตวิทยา เช่น รายวิชาปรสิตวิทยา เทคนิคปรสิต และรายวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา ที่จัดการเรียนการสอนโดยการตั้งแสดงตัวอย่างเชื้อโปรโตซัวในลำไส้ เพื่อแสดงให้นิสิตศึกษาโครงสร้างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการทำสไลด์ถาวรสามารถเก็บรักษาไว้ได้ยาวนานหลายปี นอกจากนี้ยังสามารถศึกษารายละเอียดโครงสร้างของเชื้อตัวอย่างได้ชัดเจน อีกทั้งสไลด์ถาวรโปรโตซัวทางการแพทย์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการชำรุด มีจำนวนจำกัด และไม่เพียงพอต่อการเรียนการสอน โดยเฉพาะเมื่อมีการเรียนการสอนรายวิชาที่เกี่ยวข้องกับหัวข้อปรสิตวิทยาหลายห้องพร้อมกัน ทำให้นิสิตบางห้องไม่สามารถศึกษาสไลด์จากตัวอย่างจริงและศึกษาลักษณะรูปร่างจากแผ่นภาพที่ติดสาธิตเท่านั้น

ผู้ทำวิจัยเล็งเห็นความสำคัญในการผลิตสื่อสไลด์ถาวรเพื่อพัฒนาเทคนิคการทำสไลด์ถาวรเชื้อโปรโตซัว *G. lamblia* ระยะ cyst โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต/เตรียมการทำสไลด์ถาวร เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอนในห้องปฏิบัติการ และนำมาประยุกต์ใช้ในการทำงานต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

เพื่อพัฒนาเทคนิคการทำสไลด์ถาวรปรสิตโปรโตซัว เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอนในรายวิชาที่เกี่ยวข้องกับปรสิตวิทยา

1.3 ขอบเขตของการวิจัย (Scope of the study)

ตัวอย่างโปรโตซัวที่นำมาใช้ในงานวิจัยเป็นตัวอย่างโปรโตซัวจากโครงการบริการวิชาการออกตรวจพยาธิ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่ได้เตรียมจากการตรวจโดยวิธี concentration technique แล้วเก็บรักษาสภาพในน้ำยา 10% formalin

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำสไลด์ถาวรได้แก่

1. สภาวะการเกาะติดเชื้อบนแผ่นไลด์
2. สภาวะการ fixation
3. สภาวะความเข้มข้นของสี และระยะเวลาการย้อมสี
4. สภาวะการดึงน้ำออกจากเซลล์

1.4 นิยามศัพท์ที่ใช้ในการศึกษา (Terms or Definitions)

คำศัพท์	นิยาม
Axoneme	โครงสร้างของเชื้อ เป็นเส้นพาดกลางตามแนวยาวของลำตัวเชื้อ
Cell Wall	เป็นผนังเซลล์ของตัวเชื้อ
Concentration technique	วิธีการตรวจหาเชื้อพยาธิ โดยมี Formalin ช่วยตรึงสภาพของเชื้อ และสาร Ether หรือ Ethyl acetate เป็นตัวละลายไขมันในอุจจาระ ทาให้เชื้อปรสิตแยกตัวออกจาก อุจจาระ เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยง เชื้อจะตกตะกอนที่ก้นหลอด จึงมีโอกาสพบเชื้อปรสิตได้ทุกกลุ่ม
Cyst	เป็นระยะติดต่อ มีนิวเคลียส 2–4 อัน
Cytoplasm	ขอหลวภายในเซลล์ที่อยู่รอบนิวเคลียส มีสารอินทรีย์พวกโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ
Intestinal protozoa	เชื้อโปรโตซัวในลำไส้
Median Bodies	โครงสร้างภายในตัวเชื้อ เป็นเส้นแนวยาวตรงกลางเชื้อ
Nucleus	เป็นออแกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ภายในบรรจุสารพันธุกรรมไว้ มักพบอยู่บริเวณกลางเซลล์ และพบได้ในเซลล์ของพวกยูคาริโอต
Stool examination	การตรวจตัวอย่างอุจจาระ เพื่อวินิจฉัยหาเชื้อปรสิต
Trophozoite	เป็นระยะของเชื้อ *G. lamblia* ที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็ก

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลิตสไลด์ถาวรเชื้อ *G. lamblia* ย้อมสี Trichrome stain เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอนในห้องปฏิบัติการ

2. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสไลด์ถาวร สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเรียนการสอนในภาคปฏิบัติการได้

3. เรียนรู้เทคนิคการย้อมสีแต่ละขั้นตอน สามารถนำมาปรับประยุกต์ใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการได้

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 แนวความคิดหรือทฤษฎีที่เกี่ยวข้องที่ใช้ในงานวิจัย (Concepts and Theories)

2.1.1 พยาธิโปรโตซัว

โปรโตซัว (Protozoa) เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวขนาดเล็ก ที่ภายในหนึ่งเซลล์ประกอบด้วยองค์ประกอบที่สามารถทำหน้าที่หลายๆ อย่างเพื่อการดำรงชีวิต เช่น การขับถ่าย การหายใจ และการแพร่จำนวน เป็นต้น และมีโครงสร้างเซลล์เป็นแบบยูคาริโอต (Eukaryote) แต่ละเซลล์มีองค์ประกอบที่สามารถทำหน้าที่ทุกอย่างที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตได้สมบูรณ์ด้วยตัวเองและสามารถอยู่อย่างเป็นอิสระได้ โดยมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ นิวเคลียส ซึ่งมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear membrane) อยู่ในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ซึ่งห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบอื่นๆ รวมเรียกว่า ออร์แกเนลล์ (organelle) ซึ่งทำหน้าที่ต่างๆที่จำเป็นในการดำรงชีวิต เช่น ไมโตคอนเดรีย (Mitochondria) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) กอลไจบอดี (Golgi body) ไลโซโซม (Lysosome) เป็นต้น (Conboy G., 1997)

ปัจจุบันมีโปรโตซัวมากถึง 50,000 ชนิด แต่มีโปรโตซัวเพียง 1/5 เท่านั้นที่เป็นปรสิตที่ต้องการโฮสต์ และมีประมาณ 20 ชนิดที่ก่อโรคในคนและสัตว์ จึงเรียกโปรโตซัวที่ก่อโรคว่า "พยาธิโปรโตซัว" หรือ Pathogenic protozoa ซึ่งมีแหล่งที่อยู่ของพยาธิเต็มวัย (Habitat) หลายแห่งในร่างกายของโฮสต์ เช่น ที่ระบบทางเดินอาหาร จึงเรียกพยาธิโปรโตซัวกลุ่มนี้ว่า พยาธิโปรโตซัวในลำไส้ และระบบสืบพันธุ์ เรียกว่า Uro-gential pathogenic protozoa หรือพยาธิที่อยู่ที่ระบบไหลเวียนโลหิตเรียกว่า Hemato-pathogenic protozoa (เยาวลักษณ์ สุขธนะ และองอาจ มหิทธิกร, 2557)

พยาธิโปรโตซัวในลำไส้ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ Amoebae, Flagellate และ Ciliate โดยมีเชื้อกลุ่มต่างๆ ดังนี้

กลุ่ม Entamoeba เช่น *E. histolytica, E. coli,* และ *E. nana* เป็นต้น

กลุ่ม Ciliate เช่น *Balantidium coli*

กลุ่ม Flagellates เช่น *G. lamblia, G. duodenalis, Trichomonas hominis* เป็นต้น

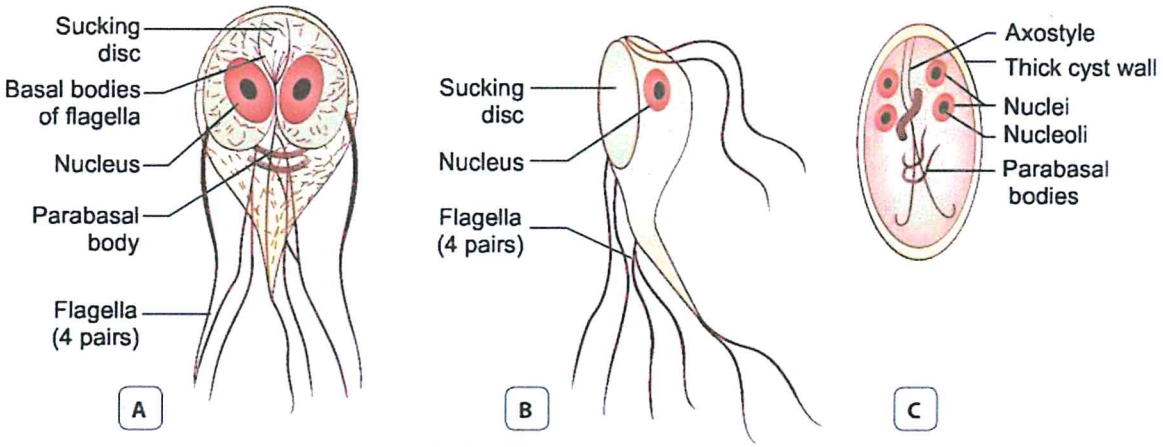
2.1.2 *Giardia lamblia*

1. ลักษณะสัณฐานของตัวเชื้อ

G. lamblia เป็นเชื้อโปรโตซัวในกลุ่มแฟลกเจลเลต ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำและอาหาร เป็นสาเหตุทำให้ก่อโรค วงจรชีวิตของเชื้อมี 2 ระยะ คือระยะ cyst และระยะ trophozoite

1.1 ระยะ cyst มีลักษณะเป็นรูปไข่ (ovoidal) ขนาดกว้าง 5–10 ไมโครเมตร และยาว 8–14 ไมโครเมตร ขอบของระยะ cyst เรียบหนา มี 2–4 นิวเคลียสอยู่ค่อนมาทาด้านหน้าของ cyst ตรงกึ่งกลาง cyst จะเห็น axostyle หรือ axoneme หรือ median axoeme หรือ axial filament เป็นเส้นแบ่งครึ่งยาวเกือบตลอด cyst ไม่มีแฟลกเจลลัมอิสระ cyst อ่อนมีนิวเคลียส 2 นิวเคลียส แต่ cyst แก่ซึ่งเป็นระยะติดต่อจะมีนิวเคลียส 4 นิวเคลียส เป็นระยะที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้ดีมาก ในน้ำจะมีชีวิตอยู่มากกว่า 3 เดือน (Rajurkar, 2012) ระยะ cyst เป็นระยะที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำและอาหาร เมื่อสิ่งมีชีวิตกินเข้าไปจะอาศัยอยู่ในโฮสต์ หลังจากนั้นจะปนออกมากับอุจจาระ และปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม เชื้อชนิดนี้มีความทนทานต่อสภาวะต่างๆในสิ่งแวดล้อมได้ดี หลังจากที่สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นรับประทานน้ำหรืออาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ *G. lamblia* จะถูกย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร และเข้าสู่ระยะโทรโฟซอยต์ (Adam, 2001) รูปเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ดังแสดงรูปภาพที่ 1 (ภาพ C)

1.2 ระยะ trophozoite อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กส่วนต้นโดยเฉพาะบริเวณ duodenum และ jejunum ซึ่งรูปร่างจะมีลักษณะคล้ายลูกแพร์ กลมทางด้านหน้า และเรียวแหลมลงมาด้านท้ายของเซลล์ (pear–shape) ด้านหน้าของเซลล์จะแบนส่วนด้านหลังจะโค้งนูน มีขนาดกว้าง 5–15 ไมโครเมตร และยาว 9.5–21 ไมโครเมตร หนา 2–4 ไมครอน มี 2 nuclei นิวเคลียสรูปร่างกลมหรือวีมี karyosome ขนาดใหญ่อยู่ตรงกลาง ประกอบด้วย chromatin หนาเข้ม 1 ก้อน nucleoplasm ไม่มี chromatin ที่ nuclear membrane (Harba, 2012) มีแฟลกเจลลาทั้งหมด 4 คู่ อยู่ทางด้านล่างของลำตัว เนื่องจากนิวเคลียสที่อยู่เป็นคู่กันประกอบกับการมีแผ่นดูดทำให้ปรสิตชนิดนี้เมื่อถูกย้อมสีแล้วศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะดูคล้ายคนใส่แว่นตาจ้องตอบมา ดังแสดงรูปภาพที่ 1 (ภาพ A)



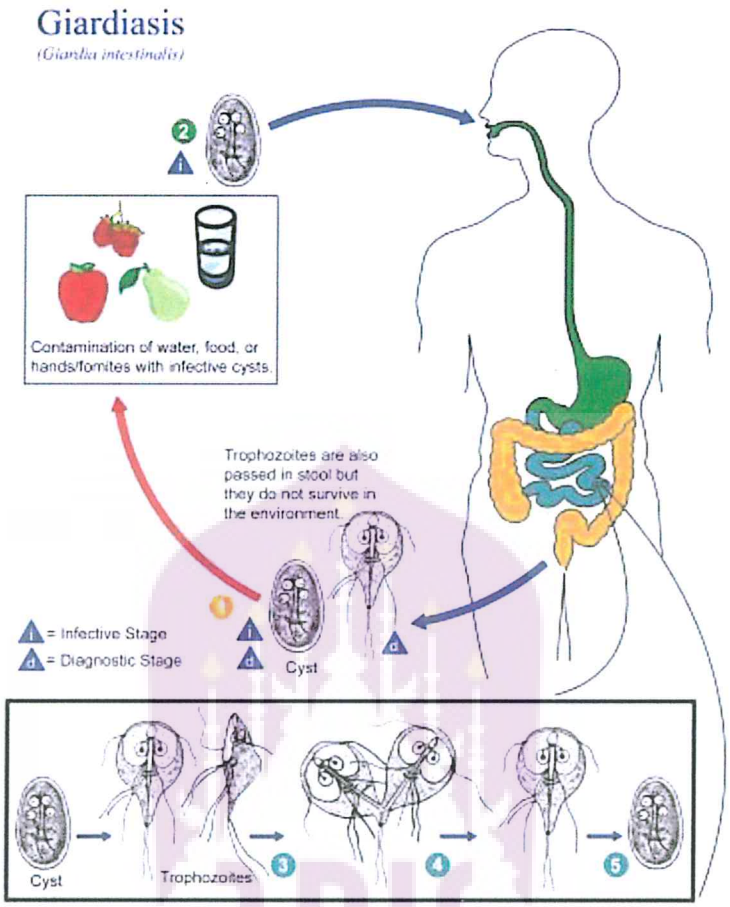
Trophozoite. **A.** Ventral view; **B.** Lateral view; **C.** Quadrinucleate Cyst

ภาพ 1 รูปวาดแสดงระยะ Trophozoite และระยะ cyst ของเชื้อ *G. lamblia*

ที่มาของรูป www.clinicalsci.info/giardia-lamblia

2. วงจรชีวิต และระยะติดต่อของเชื้อ

G. lamblia เป็นโปรโตซัว (protozoa) ที่พบได้ทั่วไปในประเทศที่อยู่ในเขตอบอุ่น เป็นปรสิต (parasite) ที่พบได้บ่อยที่สุดในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ สามารถติดต่อสู่คนโดยการรับประทานอาหารอาหารหรือดื่มน้ำที่มีระยะ cyst ผ่านกระเพาะอาหารเข้าไปในลำไส้เล็กจะกลายเป็นระยะ trophozoite เกาะติดกับเซลล์บุผิวของลำไส้เล็ก หรือเซลล์บุผิวหลุดลอกออก ระยะ trophozoite ก็จะกลับเป็นระยะ cyst อีกครั้ง ก่อนที่จะถูกขับออกมากับอุจจาระ (Rajurkar et al., 2012) จึงจัดเป็นเชื้ออันตรายทางอาหาร (food hazard) ประเภทอันตรายทางชีวภาพ (biological hazard) ทำให้เกิดโรค Giardiasis หรือ Lambliasis วงจรชีวิตของเชื้อ *G. lamblia* แสดงตามรูปภาพที่ 2



ภาพ 2 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อ *G. lamblia*

ที่มาของรูป www.mbl.edu/.../2007/2007_09_27.html

3. ระบาดวิทยาของ *G. lamblia*

การติดเชื้อของ *G. lamblia* สามารถพบได้ทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศในเขตร้อน โดยพบผู้ป่วย Giardiasis 2–7% ในประเทศพัฒนาแล้ว และ 20–30% ในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่ง CDC (enter for disease control and prevention) ได้ประมาณการไว้ว่าจะมีผู้ป่วยโรคนี้มากกว่า 2.5 ล้านคนทั่วโลกในทุกๆปี ซึ่งประเทศไทยก็เช่นเดียวกัน (Yoder.J.S.,2012)

4. การติดต่อ

4.1 Waterborne transmission : การบริโภคน้ำที่ไม่สะอาด ปนเปื้อนระยะ cyst ของเชื้อ หรือจากการเล่นน้ำในสระว่ายน้ำหรือทะเลสาบ

4.2 Contaminated food : การปนเปื้อนในอาหารเช่น ผู้เตรียมอาหารไม่ล้างมือก่อนเตรียม หรือปนเปื้อนจากโรงงานบรรจุอาหาร ซึ่งจะพบน้อยกว่าในเปื้อนในแหล่งน้ำ

4.3 Fecal–oral transmission : เป็นหนทางการติดต่อที่มีนัยสำคัญ มีในรายงานการวิจัยหลายเรื่องเกี่ยวกับความเสี่ยงของการแพร่ระบาดในสถานรับเลี้ยงเด็ก และโรงเรียนอนุบาล ซึ่งแสดงถึงการสัมผัสระหว่างเด็กเล็กที่มีแนวโน้มว่าจะได้รับเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ได้ง่ายขึ้น

4.4 Sexual transmission : ในผู้ที่มีการรักร่วมเพศ มีความเสี่ยงในการได้รับเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ได้

5. อาการแสดงของโรค Girdiasis

พยาธิสภาพ : ระยะ trophozoite จับกับ villi ของเยื่อบุผิวลำไส้เล็ก ทำให้ villi สั้นลง ส่งผลทำให้การดูดซึมอาหารและไขมันผ่านเยื่อบุผนังลำไส้ลดลง

อาการแสดง : ในคนส่วนใหญ่ติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ แต่ในผู้ป่วยบางรายอาจแสดงอาการของระบบทางเดินอาหารได้ตั้งแต่อย่างอ่อนจนถึงอาการรุนแรง ซึ่งอาการที่พบมักเริ่มต้นจากการท้องเสียอย่างฉับพลัน โดยอุจจาระมีกลิ่นเหม็นมาก อาจพบอุจจาระมีลักษณะเป็นมัน มักไม่พบมีเลือดปน อาการท้องร่วงอาจเกิดร่วมกับอาการเป็นตะคริว ท้องอืด คลื่นไส้ อ่อนเพลีย อาจพบน้ำหนักลดร่วมด้วย แต่มักไม่พบอาการอาเจียนหรือมีไข้ อาการป่วยมักมีระยะเวลา 1 ถึง 2 สัปดาห์ แต่ในรายที่เป็นโรคเรื้อรังมีรายงานว่าอาจนานเป็นเดือนหรือเป็นปี ติดเชื้อแบบเรื้อรัง พบได้ทั้งในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติและบกพร่อง โดยมีการแสดงอาการแบบเป็นๆ หายๆ และอาจนำไปสู่กลุ่มอาการการดูดซึมอาหารผิดปกติ การขาดวิตามิน น้ำหนักลดอย่างรุนแรง และทุพพลภาพได้ มีรายงานการเกิดลมพิษในผู้ป่วยบางรายด้วย (กวินา สกุลวานิชเจริญ และวลัยลักษณ์ สินภูธรณ์. 2557)

6. วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *G. lamblia*

การตรวจอุจจาระพบเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst หรือระยะ trophozoite ซึ่งจะใช้วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการคือ (กวินา สกุลวานิชเจริญ และวลัยลักษณ์ สินภูธรณ์. 2557)

6.1 การตรวจอุจจาระสด (Direct smear examination)

6.2. Concentration technique

6.3 การย้อมสี (stain)

6.4 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาในซีรั่ม

6.4.1 Direct immunofluorescence assay

6.4.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

6.4.3 Immunochromatography test

6.5 Duodenal aspirates or biopsy

6.6 Molecular technique

6.6.1 Polymerase chain reaction (PCR)

6.6.2 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

7. การรักษาโรค Giardiasis

ตัวยาที่ใช้ในการรักษาปัจจุบันคือ

- Metronidazole 2 กรัม วันละ 3 ครั้ง นาน 3 วัน หรือ 400 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง นาน 5 วัน (เด็ก : 15 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม ต่อวัน (ไม่เกิน 750 มิลลิกรัม) นาน 10 วัน
- Tinidazole 2 กรัม รับประทานครั้งเดียว (เด็ก : 50-75 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม รับประทานครั้งเดียว)
- Mepacring (Quinacrine) 100 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง นานา 5-7 วัน (เด็ก : 2 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม วันละ 3 ครั้ง นาน 5-7 วัน)
- Furazolidone 100 มิลลิกรัม วันละ 4 ครั้ง นาน 7-10 วัน (เด็ก : 2 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม วันละ 3 ครั้ง นาน 7-10 วัน)
- (Nitazoxanide 500 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง นาน 3 วัน (เด็ก : 100-200 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง นาน 3 วัน) (ประยงค์ ระดมยศ และคณะ. 2556)

8. การป้องกันและควบคุม

ในปัจจุบันยังไม่มียาหรือวัคซีนสำหรับป้องการติดเชื้อโรค Giardiasis โดยเฉพาะ แต่อาจลดความเสี่ยงในการติดเชื้อหรือการแพร่กระจายเชื้อไปสู่ผู้อื่นได้ โดยปฏิบัติตามคำแนะนำดังนี้

1. ล้างมือให้สะอาดก่อนและหลังรับประทานอาหารหรือสัมผัสอาหาร รวมทั้งหลังเข้าห้องน้ำและเปลี่ยนผ้าอ้อมให้เด็ก หากล้างมือไม่ได้ ควรใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์เพื่อช่วยในการฆ่าเชื้อโรค

2. เลือกดื่มน้ำที่สะอาด ถูกหลักอนามัย

3. หลีกเลี่ยงการกลืนน้ำขณะว่ายน้ำ และไม่ดื่มน้ำจากแม่น้ำ ลำธาร และแหล่งน้ำธรรมชาติที่ยังไม่ได้ผ่านการต้มหรือกรองมาก่อน

4. หากต้องเดินทางไปบริเวณที่มีความเสี่ยงในการติดเชื้อ ควรพกขวดน้ำติดตัวไปด้วย ห้ามดื่มน้ำหรือแปรงฟันด้วยน้ำประปา เลือกรับประทานอาหารและเครื่องดื่มอย่างระมัดระวัง โดยหลีกเลี่ยงน้ำแข็งที่อาจทำมาจากน้ำประปา ผักผลไม้สด และอาหารที่ไม่ได้ปรุงสุกหรืออาหารแบบกึ่งสุกกึ่งดิบ

5. ระมัดระวังในการมีเพศสัมพันธ์ทางทวารหนัก และควรสวมถุงยางอนามัยทุกครั้งก่อนมีเพศสัมพันธ์ เพื่อลดความเสี่ยงในการติดเชื้อ

ส่วนผู้ป่วยที่ติดเชื้อ Giardia ควรหยุดงานหรือหยุดเรียน และหลีกเลี่ยงการไปสระว่ายน้ำจนกว่าอาการจะหายดี นอกจากนี้ ควรล้างมืออย่างสม่ำเสมอ ไม่ปรุงอาหารหรือใช้มือสัมผัสอาหารหากต้องรับประทานร่วมกับสมาชิกในครอบครัว และหลีกเลี่ยงการใช้ผ้าเช็ดตัวหรือเครื่องใช้ในครัวร่วมกับผู้อื่น เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ (Painter et al., 2015)

2.1.3 การทำสไลด์ถาวร

การทำสไลด์ถาวรเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเพื่อเก็บไว้ศึกษา สารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรแบ่งออกเป็น 6 ประเภท คือ

1. สารเคมีที่ช่วยรักษาสภาพเซลล์ (Fixative)

เป็นสารเคมีที่ช่วยรักษาสภาพเซลล์ เป็นสารเคมีที่ทำให้โพรโท พลาสซึมภายในเซลล์หยุดกระบวนกาต่างๆ และให้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ซึ่งสารเคมีดังกล่าวจะช่วยคงสภาพตัวอย่างให้ใกล้เคียงกับสภาพปกติมากที่สุด อาทิเช่น เอทิลแอลกอฮลล์บริสุทธิ์ (absolute ethyl alcohol), ฟอร์มาลิน (formalin), กรดกลาเซียลแอซิติก (glacial acetic acid) สารละลายเชาดิ้นส์ (Schaudinn's fluid), น้ำยาเอฟ.เอ.เอ. (Formalin–acetic acid–alcohol, FAA) เป็นต้น (ภูวดล บุตรรัตน์, 2528)

2. สารเคมีที่ยึดเนื้อเยื่อให้ติดแผ่นสไลด์ (Adhensive)

เป็นสารเคมีที่ทำให้ตัวอย่างยึดติดกับแผ่นสไลด์ในการทำสไลด์ถาวร เป็นน้ำยาที่ใช้ในการทำให้ตัวอย่างติดบนแผ่นสไลด์ก่อนนำไปย้อมสี สูตรน้ำยายึดที่สำคัญ ยกตัวอย่างเช่น เมเยอร์แอดฮีซีฟ (Mayer's adhesive) ประกอบด้วยส่วยผสมของไข่ขาว 20 มิลลิลิตร กลีเซอรีน 20 มิลลิลิตร ไธมอล 1 กรัม เตรียมโดยผสมไข่ขาวและกลีเซอรีน คนให้เข้ากันเติมไธมอลลงไปเพื่อป้องกันไม่ให้ไข่ขาวเสีย เมื่อละลายเข้ากันได้ดีแล้วนำไปกรองด้วยสำลี หรือผ้าขาวบาง เก็บใส่ขวดที่มิดชิด ซึ่งสารนี้จะใช้ได้ดีเพียงระยะเวลา 1 เดือน (ภูวดล บุตรรัตน์, 2528)

3. สีย้อม (Staining)

ในการทำสไลด์ถาวร สีย้อม (staining) จะช่วยทำให้เห็นความแตกต่างของรายละเอียดภายในได้ชัดเจน ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้การศึกษาได้ผลดี สีที่ใช้ย้อมจะมีคุณสมบัติในการติดตัวอย่างที่แตกต่างกันไป การเลือกใช้สีย้อมจึงต้องพิจารณาหลายๆด้าน รวมทั้งคุณสมบัติของสีนั้นๆด้วย ซึ่งสีย้อมที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน ได้แก่ คาร์มีน (carmine), ฮีมาท็อกซิลิน (Hematoxylin), คริสตัลไวโอเลต (crystal violet), อีโอซิน วาย (eosin Y. (Yellow)), ฟาสกรีน (fast green FCF), ไลท์กรีน (light green SF), เมทิลีนบลู (methylene blue), ซาฟานิน (safranin O.), ฟาสเรด (fast red) เป็นต้น (ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์ม 2545)

4. สารเคมีที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydrating)

เป็นสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการที่ผ่านการย้อมสไลด์มาแล้ว ซึ่งสารเคมีที่นิยมใช้ในขั้นตอนนี้ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95 (95% alcohol), เอทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolube alcohol), ไดออกเซน (dioxane) เป็นต้น (ภูวดล บุตรรัตน์, 2528)

5. สารเคมีที่ทำให้ตัวอย่างใสสะอาด (Clearing reaents)

สารเคมีเหล่านี้จะทำให้ตัวอย่างโปร่งใส สะอาด แต่สารเคมีชนิดนี้ส่วนใหญ่จะเข้ากับน้ำไม่ได้ ที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน ได้แก่ ไซรอล หรือ ไซลีน (xylol or xylene), คลอฟอออยล์ (clove oil) เป็นต้น

6. สารเคมีที่เป็นตัวอย่างสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (Mounting media)

สารเคมีประเภทนี้ใช้เป็นตัวเชื่อมหรือทำหน้าที่คล้ายกาว เพื่อยึดกระจกปิดสไลด์ (cover grass) ให้ปิดทับกับตัวอย่างหลังจากผ่านการย้อมสีมาแล้ว ให้ยึดติดแน่นบนแผ่นสไลด์ สำหรับใช้เป็นสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทำให้สไลด์ประเภทนี้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานหลายปี ตัวอย่างสารที่นำมาใช้ เช่น เปอร์เมาต์ (permount), แคนาดา บาลซัม (Canada balsam) เป็นต้น

2.2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Related Research Works)

Estevez E.G. (1985) ได้ศึกษาทดลองการทำสไลด์สด (wet mounting) แล้วหยดด้วยน้ำเกลือ และไอโอดีน ซึ่งทดลองในตัวอย่างอุจาระทั้งหมด 2,206 ตัวอย่าง โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 วิธี คือ 1. นำตัวอย่างอุจจาระสดมาทำการย้อมด้วยไอโอดีน และน้ำเกลือ 2. นำตัวอย่างที่เก็บไว้ใน formalin–ethyl acetate แล้วนำมาย้อมด้วยไอโอดีน และน้ำเกลือ 3. นำตัวอย่างอุจจาระย้อมด้วย Wheatley's modified trichrome method ซึ่งจากการศึกษาพบว่าวิธีการ วิธีการนำตัวอย่างอุจจาระสดมาย้อมด้วยไอโอดีน และน้ำเกลือ โดยตรง และวิธีนำ

ตัวอย่างที่เก็บไว้ใน formalin–ethyl acetate แล้วนำมาย้อมด้วยไอโอดีน และน้ำเกลือ มาตรวจวิเคราะห์โดยตรง จะทำให้ไม่พบเชื้อ แต่ว่าถ้านำไปตรวจด้วยวิธีการย้อมสี Wheatley's modified trichrome method จะทำให้พบเชื้อได้ดีกว่า

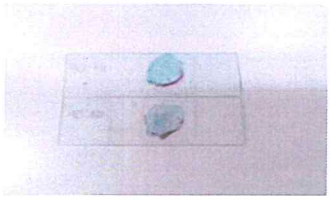
Shoaib.S (2002) ได้ศึกษาหาเชื้อปรสิตในลำไส้ จากตัวอย่างอุจจาระที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรงทั้งหมด 400 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างที่ได้เก็บไว้ในขวดปากกว้าง แห้ง และสะอาด จากนั้นเอาตัวอย่างอุจจาระมาเล็กน้อย หยดลงบนตรงกลางของสไลด์ แล้วนำมาเกลี่ยเชื้อให้บางๆ (smear) ถ้าตัวอย่างอุจจาระแห้ง ให้หยดน้ำเกลือเพื่อให้ตัวอย่างอ่อนตัว หลังจากนั้นหยดสาร Schaudinn's fixative ให้ท่วม แล้วนำไปผ่านความร้อนที่ 60°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยดด้วยสารทดสอบ iodine alcohol solution 1 นาที แล้วล้างด้วย 70% ethanol 1 นาที นำไปแช่ใน trichrome stain 5 นาที แล้วล้างด้วย acid–alcohol 2–3 วินาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน 95% ethanol, absolute alcohol และ xylene อย่างละ 1 นาที ผลการทดลองพบว่า การย้อมด้วย trichrome technique สามารถตรวจพบเชื้อได้ 215 ตัวอย่าง ในขณะที่การตรวจตัวอย่างสด (wet mounting) ย้อมด้วยน้ำเกลือ และไอโอดีน สามารถตรวจพบเชื้อได้เพียง 134 ตัวอย่าง เพราะฉะนั้นการย้อมด้วยสี trichrome เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ในการตรวจหาเชื้อปรสิตโดยเฉพาะโปรโตซัว (protozoa) ในระยะ vegetative forms และระยะ cystic forms

Kellogg and Elder (1998) ศึกษาตัวอย่างอุจจาระมาในระยะเวลา 6 ปี ทั้งหมด 12,321 ตัวอย่าง พบปรสิตจำนวน 1019 ตัว จากตัวอย่าง 870 ตัวอย่าง โดยพบว่าวิธีการย้อมด้วย trichrome–stained สามารถตรวจเจอเชื้อได้ถึง 1011 ตัว (99.2%) และการย้อมด้วย iodine 479 ตัว (47%) นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการย้อมโดยใช้ trichrome จากตัวอย่างที่ทำให้เข้มข้นขึ้น (concentrated specimens) และตัวอย่างที่ไม่ผ่านการทำให้เข้มข้นขึ้น (unconcentraed specimens) โดยตัวอย่างทั้งหมด 2198 ตัวอย่าง พบเชื้อ 192 ตัว (92.3%) จากตัวอย่าง unconcentrated และพบเชื้อ 204 ตัว (98.1%) จากตัวอย่าง concentrated เพราะฉะนั้น trichtrome stain สามารถวัดได้ทั้งแบบ concentrated และ unconcentrated ในการทดลองหาเชื้อปรสิตทุกกลุ่ม แต่ที่พบมากที่สุดส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มโปรโตซัว

Neimeister R. et al. (1990) ได้ศึกษาหาหาเชื้อปรสิตในลำไส้จากตัวอย่างอุจจาระมาเป็นระยะเวลา 12 ปี โดยในการศึกษาได้ทำการทดลองทั้งหมด 3 วิธี คือ การย้อมเชื้อสด (direct wet mount) การทำให้เชื้อเข้มข้นขึ้น (concentration) และวิธีการย้อมสี Trichrome พบว่าทั้ง 3 วิธีสามารถตรวจพบเชื้อปรสิตในลำไส้ได้ทุกวิธี แต่วิธีการย้อมสี Trichrome จะไม่ค่อยเจอเชื้อปรสิตหนอนพยาธิในลำไส้ แต่จะพบเฉพาะเชื้อกลุ่มโปรโตซัวในลำไส้มากกว่า

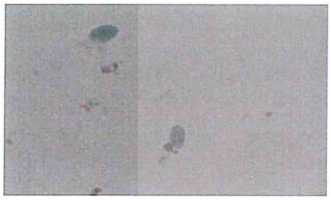
2.3 กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)

เชื้อที่เก็บรักษาไว้ใน 10% formalin



นำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำสไลด์ถาวร ดังนี้

1. สภาวะการเกาะติดเชื้อบนแผ่นไลด์
2. สภาวะการ fixation
3. สภาวะความเข้มข้นของสี และระยะเวลาการย้อมสี
4. สภาวะการดึงน้ำออกจากเซลล์



บันทึกผลแต่ละขั้นตอน และถ่ายรูปเพื่อนำมาใช้ในการ

ภาพ 3 แสดงขั้นตอนการปฏิบัติงานวิจัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยที่ใช้เป็นเชื้อโปรโตซัว *G. lamblia* ระยะ cyst ที่ได้จากการออกพื้นที่บริการวิชาการออกตรวจพยาธิ ซึ่งผ่านการตรวจโดยวิธี concentration technique แล้วเก็บรักษาสภาพไว้ในน้ำยา 10% formalin นำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำสไลด์ถาวร

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 ครุภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องดูดควันสารเคมี
2. เครื่อง Hot plate stirrer
3. Auto pipette ขนาด 2-20 ไมโครลิตร
4. Auto pipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร
5. Auto pipette ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร
6. กล้องจุลทรรศน์ Light microscope
7. เครื่องชั่งสารเคมี ทศนิยม 2 ตำแหน่ง
8. เครื่องชั่งสารเคมี ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.2.2 วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ถุงมือทางการแพทย์
2. ทิปสำหรับดูดสารขนาด 1-10 ไมโครลิตร
3. ทิปสำหรับดูดสารขนาด 2-200 ไมโครลิตร
4. ทิปสำหรับดูดสารขนาด 100-1000 ไมโครลิตร
5. ปากคีบ (Forceps)
6. กระดาษกรองเบอร์ 1
7. แผ่นสไลด์แบบฝ้า
8. กระจกปิดสไลด์ (cover grass)

9. dropper พร้อมจุกยาง
10. ขวดแก้วสำหรับเก็บสารเคมีสีชา (Duran bottle amber) ขนาด 250 มิลลิลิตร
11. ขวดแก้วสำหรับเก็บสารเคมีสีชา (Duran bottle amber) ขนาด 500 มิลลิลิตร
12. ขวดแก้วสำหรับเก็บสารเคมี (Duran bottle) ขนาด 500 มิลลิลิตร
13. ขวดแก้วสำหรับเก็บสารเคมี (Duran bottle) ขนาด 250 มิลลิลิตร
14. Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร
15. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
16. บีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
17. บีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร
18. กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
19. กระบอกตวงขนาด 500 มิลลิลิตร
20. ช้อนตักสาร
21. กระดาษทิชชู
22. ตะแกรงสำหรับใส่หลอด centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร
23. ตะแกรงสำหรับใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. Chromotrope 2R
2. Light green SF
3. Phosphotungstic acid
4. Acetic acid (glacial)
5. Distilled water
6. 70% Alcohol
7. 95% Alcohol
8. Absolute alcohol
9. 70% acid alcohol
10. 80% acid alcohol
11. 90% acid alcohol

12. Xylene
13. gelatin
14. sodium chloride
15. permount
16. mounting media

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.3.1 การหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการทำสไลด์

ทำการเจือจางเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่เก็บรักษาสภาพในน้ำยา 10% formalin เป็นเชื้อเริ่มต้นมาทำการเจือจาง โดยชั่งตัวอย่าง 0.25 กรัม ละลายในน้ำยา 10% formalin ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการเจือจาง 1:10 แล้วเจือจางต่อเป็น 1:5 เพื่อให้เชื้ออยู่ในช่วง 10^5 cell/ml

3.3.2 ขั้นตอนการย้อมสี Trichrome

นำเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่เก็บรักษาสภาพไว้ในน้ำยา 10% formalin นำมาหาสภาวะการเกาะติดเชื้อบนแผ่นสไลด์ fixation ความเข้มข้นของสี ระยะเวลาในการย้อมสีและสภาวะการดึงน้ำ จากนั้นนำไปทำการเก็บถาวร (mounting)

3.3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการติดเชื้อบนแผ่นสไลด์

หยดสารทดสอบแต่ละชนิดบนแผ่นสไลด์ที่ปราศจากไขมันปริมาตร 10 µl จากนั้นเกลี่ยสารทดสอบเป็นวงกลมบางๆ แล้วหยดเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ปริมาตร 10 µl เกลี่ยให้ทั่วรอยของสารทดสอบ พร้อม label ชื่อสารทดสอบแต่ละชนิด หลังจากนั้นนำไปย้อมสี Trichome stain ตรวจนับจำนวนเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x จากนั้นบันทึกผลจำนวน cyst ของ *G. lamblia* ที่เหลือติดบนแผ่นสไลด์ ผลการทดลองแสดงตามตารางที่ 1

ตาราง 1 แสดงการติดเชื้อ *G.lamblia* ระยะ cyst บนแผ่นสไลด์

สารทดสอบ	ร้อยละของกลีเซอรอล					
(ร้อยละ)	0	10	20	30	40	50
ไข่ขาว	100	90	80	70	60	50
อัลบลูมิน	100	90	80	70	60	50
เจลาติน	100	90	80	70	60	50

3.3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมขั้นตอน fixation

การหาสภาวะที่เหมาะสมขั้นตอน fixation ของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ใช้สารเคมี 3 ชนิด คือ 10% formalin, Methanol และ 70% alcohol โดยหยดเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 µl บนสารทดสอบที่เหมาะสมจากการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมในการติดเชื้อบนแผ่นสไลด์ (ข้อ 3.5) เกลี่ยเชื้อให้เป็นวงกลมบางๆ หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารเคมีแต่ละชนิด (fixation) ระยะเวลา 3 นาที พร้อม label ชื่อสารเคมีแต่ละชนิด หลังจากนั้นย้อมด้วยสี Trichrome stain เพื่อตรวจนับจำนวนเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x บันทึกผลการทดลองการเกาะติดสไลด์ของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst

3.3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นสี และระยะเวลาในการย้อมสี Trichrome

นำตัวอย่างสไลด์ที่ได้จากขั้นตอนการ fixation มาหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นสี Trichrome และระยะเวลาในการย้อมสี คือ 10 นาที และ15 นาที ดังนี้

1. สูตร A สีย้อมมาตรฐาน (Wheatley's Modification)
2. สูตร B สีย้อมมาตรฐาน (Wheatley's Modification) ปรับความเข้มข้นของสาร Light green เป็นร้อยละ 0.45

หลังจากนั้นนำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสีทั้ง 2 สูตร และระยะเวลาที่แตกต่างกัน มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 100X เพื่อดูการติดสีของตัวเชื้อและโครงสร้างองค์ประกอบภายในเชื้อ บันทึกผลการทดลองการติดสีของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst

3.3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration)

เมื่อได้ผลการทดลองจากการหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นสี และระยะเวลาในการย้อมสี นำสไลด์มาล้างสีออกด้วย 70% alcohol ที่ผสม acetic acid เป็นระยะเวลานาน 1 นาที แล้วดึงน้ำออกด้วย 95% alcohol และ absolute alcohol เปรียบเทียบกับ การล้างสีด้วย 70% alcohol ที่ผสม acetic acid ระยะเวลา 1 นาที แล้วดึงน้ำออกด้วย 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol และ absolute alcohol ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 100Xเพื่อดูลักษณะโครงสร้างของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst

3.3.7 การ mounting

นำสไลด์ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่ผ่านการย้อมสี Trichrome ในสภาวะที่เหมาะสม หยดด้วยน้ำยา Permount ปิดทับด้วย cover glass แล้วนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 100x

3.3.8 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst

นำสไลด์ถาวรเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 100x

3.4 ระยะเวลาการดำเนินงาน

ตั้งแต่วันที่ 1 พฤศจิกายน 2563 ถึง 31 กรกฎาคม 2564

3.5 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา (CE 02209) คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การปรับปริมาณเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่เหมาะสมสำหรับการทำสไลด์ถาวร

จากการทดลองการปรับปริมาณเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst พบว่าเชื้อปริมาตร 10 µl มีเชื้ออยู่ในช่วง 10^5 cell/ml ที่มีจำนวนเฉลี่ยของเชื้อเท่ากับ 184 ตัวต่อสไลด์ เป็นจำนวนที่เหมาะสม ในการทำสไลด์ถาวรต่อไป

4.2 การปรับสภาวะที่เหมาะสมในการติดเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst บนแผ่นสไลด์

ผลการทดสอบการติดเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ด้วยการใช้ ไข่ขาว อัลบลูมิน และเจลาติน พบว่า ร้อยละของเชื้อที่เกาะติดสไลด์มากที่สุดคือ เจลาติน รองลงมาคือไข่ขาว และอัลบลูมิน ตามลำดับ

นอกจากนั้นผู้วิจัยได้นำสารทดสอบทั้ง 3 ชนิดมาเติมกลีเซอรอลในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เพื่อดูปริมาณเชื้อที่เกาะติดสไลด์ พบว่าการเพิ่มสัดส่วนของกลีเซอรอลในปริมาณที่มากขึ้น ส่งผลทำให้ร้อยละของเชื้อที่เกาะติดสไลด์ลดลง ซึ่งผู้ทำวิจัยได้เลือกนำการเกาะติดสไลด์โดยใช้เจลาติน และเจลาตินต่อกลีเซอรอล (90:10) มาทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะต่อ เนื่องจากมีการเกาะติดของเชื้อที่ปริมาณเยอะที่สุด แสดงดังตารางที่ 1

ตาราง 2 การเกาะติดสไลด์ของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst

สารที่ใช้ทดสอบ	ค่าเฉลี่ยเชื้อที่เหลือ (ตัว)	ร้อยละของเชื้อที่เกาะติดสไลด์
ไข่ขาว	173	66
ไข่ขาว:กลีเซอรอล (90:10)	174	64
ไข่ขาว:กลีเซอรอล (80:20)	169	57
ไข่ขาว:กลีเซอรอล (70:30)	123	44
ไข่ขาว:กลีเซอรอล (60:40)	119	41
ไข่ขาว:กลีเซอรอล (50:50)	112	44

ตาราง 1 (ต่อ)

สารที่ใช้ทดสอบ	ค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ (ตัว)	ร้อยละของเชื้อที่เกาะติดสไลด์
อัลบลูมิน	173	64
อัลบลูมิน:กลีเซอรอล (90:10)	163	66
อัลบลูมิน:กลีเซอรอล (80:20)	161	59
อัลบลูมิน:กลีเซอรอล (60:40)	135	45
อัลบลูมิน:กลีเซอรอล (50:50)	128	45
เจลาติน	182	69
เจลาติน:กลีเซอรอล (90:10)	173	71
เจลาติน:กลีเซอรอล (80:20)	166	58
เจลาติน:กลีเซอรอล (70:30)	125	52
เจลาติน:กลีเซอรอล (60:40)	121	52
เจลาติน:กลีเซอรอล (50:50)	119	48

4.3 การปรับสภาวะที่เหมาะสมขั้นตอน fixation

นำสไลด์ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่ใช้เจลาติน และเจลาตินต่อกลีเซอรอล (90:10) มาทำการศึกษาขั้นตอน fixation พบว่า 70% Alcohol สามารถทำให้เชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ติดสไลด์ได้มากกว่า Methanol และ 10% formalin ดังแสดงตารางที่ 3

ตาราง 3 จำนวนเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่คงเหลือบนแผ่นสไลด์ที่ fixation ด้วย 10% formalin, Methanol และ 70% Alcohol

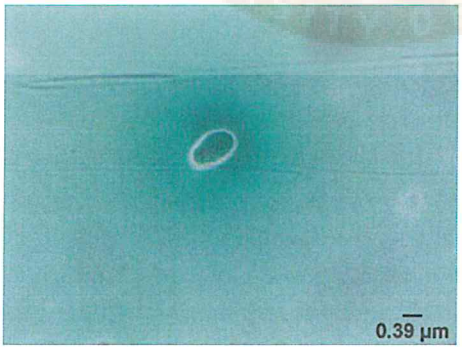
สารเคมีที่ใช้ fixation	เจลาติน		เจลาตินต่อกลีเซอรอล (90:10)	
	ค่าฉลี่ยเชื้อที่เหลือ (ตัว)	ร้อยละเชื้อที่เหลือ	ค่าฉลี่ยเชื้อที่เหลือ (ตัว)	ร้อยละเชื้อที่เหลือ
10% formalin	74	40	68	37
Methanol	112	61	56	30
70% Alcohol	174	95	176	96

4.4 การปรับสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นสี และระยะเวลาในการย้อมสี

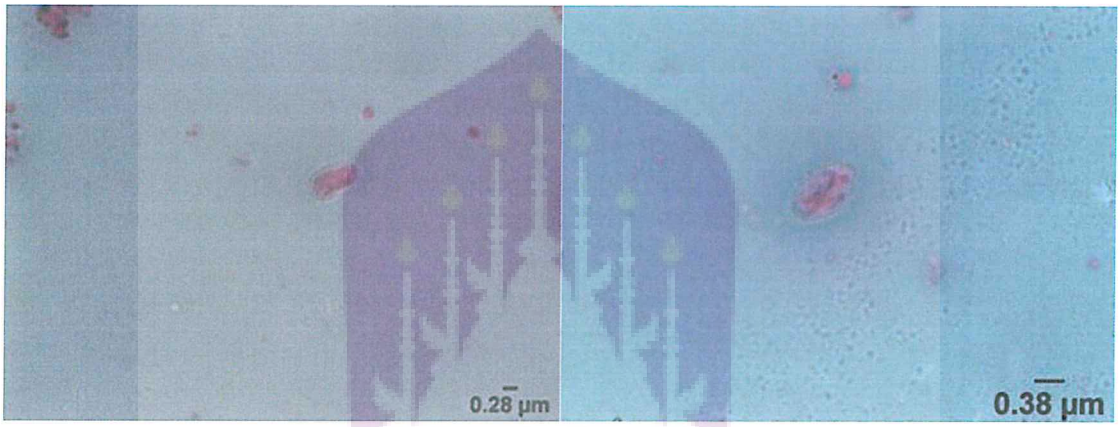
Trichrome

นำสไลด์ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่ผ่านการ fixation ด้วยสาร 70% Alcohol มาย้อมด้วยสี Trichrome ทั้ง 2 สูตร เมื่อนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x พบว่าสภาวะที่ใช้เจลาตินต่อกลีเซอรอล (90:10) ในการติดเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ของสูตร B (สีย้อมมาตรฐาน ปรับความเข้มข้นของสาร Light green เป็นร้อยละ 0.45) สามารถย้อมสีสไลด์ได้ดีกว่าสูตร A (สีย้อมมาตรฐาน) โดยพบว่าตัวเชื้อมีนิวเคลียสติดสีม่วง axoneme เป็นเส้นสีม่วงแดงผ่านตามยาวของ cyst และ median body เป็นเส้นโค้งติดสีม่วงแดง ไม่พบวงสีแดงหรือสีเขียวรอบ ๆ ตัวเชื้อ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

ตาราง 4 ลักษณะการติดสีของเชื้อเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst

สารที่ใช้	การทดสอบการติดสี	
	สูตร A	สูตร B
เจลาติน		
เจลาติน ต่อกลีเซอรอล (90:10)		

นำสไลด์ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่ผ่านการหาสภาวะของความเข้มสี Trichrome โดยเลือกสูตรที่มีการปรับความเข้มข้นของสาร มาหาสภาวะของระยะเวลาในการย้อมสี คือ 10 นาที และ 15 นาที ผลการศึกษาพบว่าเวลาที่เหมาะสมในการย้อมสีคือ 15 นาที เนื่องจากเมื่อนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x ทำให้การติดสีของตัวเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst สามารถเห็นโครงสร้างและองค์ประกอบของ nucleus, axoneme และ median body ได้ชัดเจนกว่าระยะเวลา 10 นาที กล่าวคือ ระยะเวลาการย้อมที่มากขึ้นทำให้สีติดโครงสร้างองค์ประกอบของเชื้อได้ดีขึ้น ดังภาพ B



A B

ภาพ 4 ลักษณะของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ย้อมสี Trichrome สูตร B

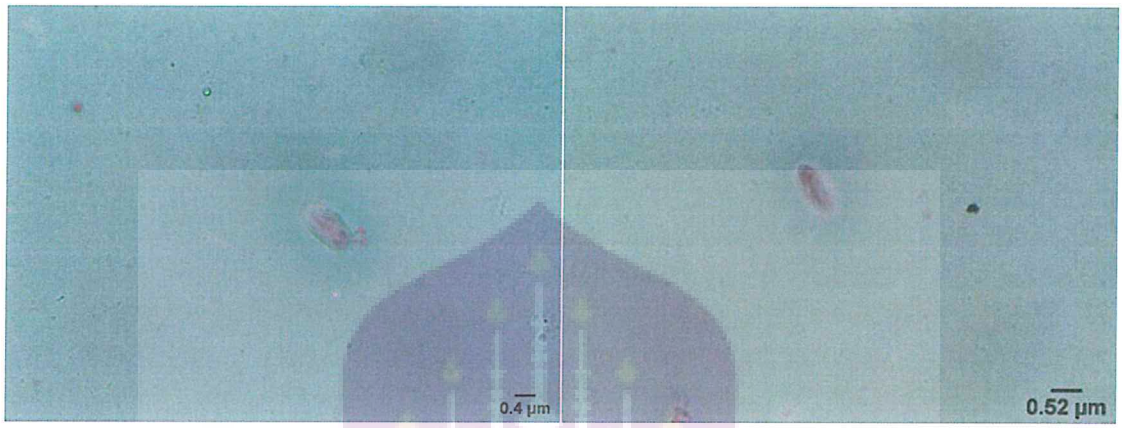
A. ภาพเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่ติดสไลด์ด้วยเจลาตินต่อกลีเซอรอล (90:10) ย้อมสี Trichrome stain ระยะเวลา 10 นาที

B. ภาพเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่ติดสไลด์ด้วยเจลาตินต่อกลีเซอรอล (90:10) ย้อมสี Trichrome stain ระยะเวลา 15 นาที

4.5 การปรับสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการล้างสีและการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration)

นำสไลด์ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่ผ่านการหาสภาวะของระยะเวลาในการย้อมสี Trichrome 15 นาที มาล้างสีออกด้วย 70% alcohol ที่ผสม acetic acid แล้วดึงน้ำออกด้วย 95% alcohol และ absolute alcohol เปรียบเทียบกับ การล้างสีด้วย 70% alcohol ที่ผสม acetic acid แล้วดึงน้ำออกด้วย 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol และ absolute alcohol

ผลการทดลอง เมื่อนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x พบว่าการล้างสีด้วย 70% alcohol ที่ผสม acetic acid แล้วดึงน้ำออกด้วย 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol และ absolute alcohol ทำให้พื้นหลังและตัวเชื้อสะอาดขึ้น ไม่มีเศษสีมาเกาะหรืออยู่บริเวณรอบๆตัวเชื้อ ดังแสดงตามรูปภาพ B



A B

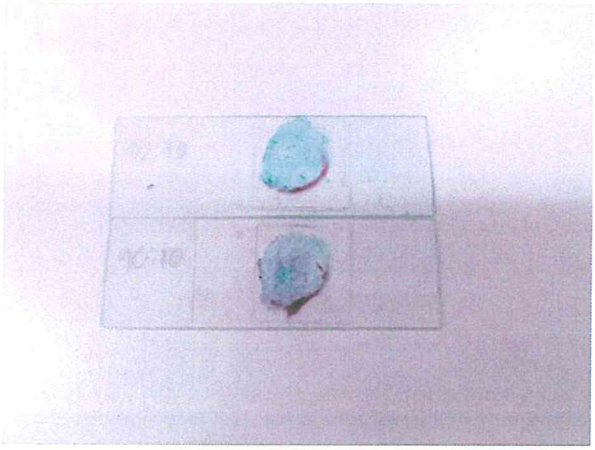
ภาพ 5 ลักษณะของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ขั้นตอนการล้างสีและดึงน้ำออกจากเซลล์

A. ภาพเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่ล้างสีออกด้วย 90% alcohol ที่ผสม acetic acid ดึงน้ำออกด้วย 95% alcohol และ absolute alcohol

B. ภาพเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่ล้างสีด้วย 90% alcohol ที่ผสม acetic acid ดึงน้ำออกด้วย 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol และ absolute alcohol

4.6 ผลการทดลองการ mounting

การทดลองที่ได้เมื่อได้สไลด์ที่ผ่านการย้อมสี Trichrome stain ทุกขั้นตอนแล้ว ก่อนนำไปใช้จะต้องผ่านวิธีการ mounting คือการปิดทับสไลด์ด้วย cover glass เพื่อเคลือบสไลด์ให้ติดแน่น สามารถใช้งานได้ระยะเวลานานขึ้น และคงตัวเชื้อที่ติดสีได้อย่างสวยงาม ผลการทดลองแสดงตามรูปภาพ

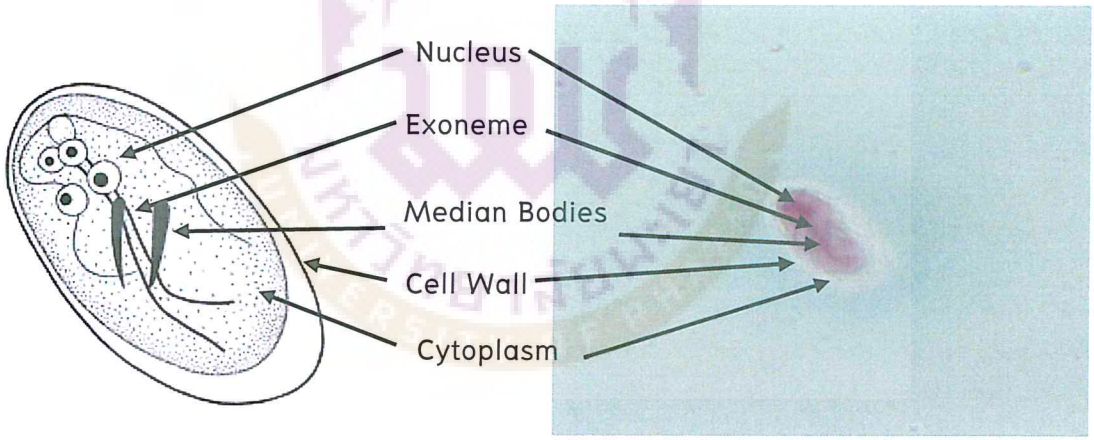


ภาพ 6 แสดงตัวอย่างการ mounting

4.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst

ลักษณะของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst มีรูปร่างรี มีนิวเคลียส 2 ก้อน แต่ cyst แก่ซึ่งเป็นระยะติดต่อ จะมีนิวเคลียส 4 ก้อน

ขนาดของระยะ cyst6–8 μm × 1.2–1.5 μm



A B

รูปภาพที่ 7 ตัวอย่างภาพองค์ประกอบของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ Cyst

A. ภาพวาดเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst

B. เชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่ย้อมด้วยสี Trichrome stain ในสภาวะที่เหมาะสม

บทที่ 5

การสรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. ปริมาณของเชื้อเริ่มต้นจากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ใน 10% formalin ซึ่งได้ทำการเจือจางเชื้อ และให้อยู่ในช่วง 10^5 cell/ml ที่มีจำนวนเฉลี่ยของเชื้อเท่ากับ 184 ตัวต่อสไลด์

2. สภาวะที่เหมาะสมในการติดเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst บนแผ่นสไลด์ พบว่าสภาวะที่สามารถทำให้เชื้อติดบนแผ่นสไลด์ได้มากที่สุดมีทั้งหมด 2 สภาวะ คือ เจลาตินและเจลาตินต่อกลีเซอรอลในอัตราส่วน 90:10

3. สภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการ fixation ซึ่งใช้สารเคมีทั้งหมด 3 ชนิด คือ 70% Alcohol, Methanol และ 10% formalin พบว่าสารที่สามารถทำให้เชื้อติดสไลด์ได้มากที่สุดคือ 70% Alcohol

4. สภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของสาร Light green ในสี Trichrome ใช้สี 2 สูตร คือสูตร A (สีย้อมสูตรมาตรฐาน มีความเข้มข้นของสาร Light green เท่ากับร้อยละ 0.3) และสูตร B (สีย้อมมาตรฐาน ปรับความเข้มข้นของสาร Light green เป็นร้อยละ 0.45) พบว่าสูตร B สามารถทำให้เชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ติดสีโครงสร้างของเชื้อได้ชัดเจนกว่าสีสูตร A โดยพบว่า nucleus ของเชื้อติดสีม่วง axoneme เป็นเส้นสีม่วงแดงผ่านตามยาวของ cyst และ median body เป็นเส้นโค้งติดสีม่วงแดง ไม่พบวงแดงหรือเขียวรอบ ๆ ตัวเชื้อ

5. สภาวะที่เหมาะสมของเวลาในการย้อมสี และ Trichrome ซึ่งใช้ระยะเวลา 10 นาที และ 15 นาที พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการย้อมสีคือ 15 นาที ทำให้ตัวเชื้อเห็นโครงสร้างภายในได้ชัดเจน

6. สภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการล้างสีและการดึงน้ำออกจากเซลล์ของตัวเชื้อ พบว่า การล้างสีด้วย 70% alcohol ที่ผสม acetic acid แล้วดึงน้ำออกด้วย 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol และ absolute alcohol ทำให้ตัวเชื้อไม่เสียสภาพ และสะอาดขึ้น ไม่มีเศษสีมาเกาะหรืออยู่บริเวณรอบๆตัวเชื้อ

8. สภาวะที่เหมาะสมในการทำสไลด์ถาวรเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst คือ การใช้เจลาติน:กลีเซอรอล ในอัตราส่วน 90:10 ในการติดสไลด์ fixation ด้วย 70% alcohol ย้อมด้วยสี Trichrome สูตร B (สีย้อมมาตรฐาน ปรับความเข้มข้นของสาร Light green เป็นร้อยละ 0.45)

เป็นระยะเวลา 15 นาที ขั้นตอนการล้างสีและการดึงน้ำออกจากเซลล์ใช้ 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol และ absolute alcohol ตามลำดับ

5.2 การอภิปรายผล

การศึกษานี้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ การติดสไลด์ของเชื้อ การ fixation ความเข้มข้นของสีย้อม trichrome ระยะเวลในการย้อมสี การล้างสีออกจากเซลล์ และการดึงน้ำ เป็นต้น โดยผู้วิจัยปรับเชื้อเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 10^5 cell/ml

จากการศึกษาการหาสภาวะการติดสไลด์ของเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst พบว่าเจลาตินต่อกลีเซอรอล ในอัตราส่วน 90:10 สามารถทำให้เชื้อเกาะติดสไลด์ได้มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Roberts และ Causton. (1988) ที่ใช้เจลาตินในการติดสไลด์ของเชื้อโปรโตซัวกลุ่มซิลิเอต (Ciliated Protozoa) และผู้วิจัยได้เติมกลีเซอรอลเป็นส่วนผสม เนื่องจากกลีเซอรอลมีคุณสมบัติช่วยในเรื่องการรักษาสภาพเซลล์ให้คงสภาพ และเป็นสารป้องกันการเสื่อมสภาพ (protective agent) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Holanda et al., (2018) ที่ใช้กลีเซอรอล เจลาติน ในการเตรียมสไลด์ของ Phlebotomine sandflies และ ใช้ 70% alcohol ในขั้นตอนการ fixation เป็นเวลา 3 นาที พบว่าสามารถทำให้เชื้อเกาะติดสไลด์ได้มากกว่า Methanol และ 10% formalin เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Shoaib. (2002) ที่ใช้ 70% ในการ fixation

การหาสภาวะความเข้มข้นของสี พบว่า สูตรมาตรฐานของ Wheatley (สูตร A) ตัวเชื้อและพื้นหลังติดสีแดงของสาร Chromotrope 2R ทำให้เห็นโครงสร้างไม่ชัดเจน จึงปรับความเข้มข้นในส่วนของสาร Light green เป็น 1.5 เท่า (สูตร B) ได้ผลการทดลองคือ เชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ไม่มีสีแดงของ Chromotrope 2R ล้อมรอบตัวเชื้อ หลังจากนั้นผู้ทำวิจัยได้ปรับระยะเวลาในการย้อมสี Trichorome จากเดิม 10 นาที เพิ่มขึ้นเป็นระยะเวลา 15 นาที ขั้นตอนการชะล้างสีด้วย 70% acid alcohol เป็นระยะเวลา 1 นาที พบว่าไม่มีตะกอนล้อมรอบตัวเชื้อ

จากการศึกษาหาสภาวะขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์พบว่าการใช้ 70% alcohol, และ 80% alcohol, 90% alcohol และ absolute alcohol ตามลำดับ ทำให้เซลล์ไม่เหี่ยว ตัวเชื้อติดสีสวยงามสม่ำเสมอ และเห็นองค์ประกอบโครงสร้างได้ชัดเจน nucleus ติดสีม่วง axoneme เป็นเส้นสีม่วงแดงผ่านตามยาวของ cyst และ median body เป็นเส้นโค้งติดสีม่วงแดง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ กฤษฎา ขำพลู (2557) ที่ใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก คือ 70% alcohol, 85% alcohol, 95% alcohol และ absolube alcohol ตามลำดับ

สไดล์ถาวรเชื้อ *G. lamblia* ระยะ cyst ที่มีในห้องปฏิบัติการ มีสภาพชำรุด มีจำนวนจำกัด และไม่เพียงพอต่อการเรียนการสอน งานวิจัยนี้สามารถผลิตสื่อสไลด์ถาวรเพื่อนำมาเพิ่มเติมในการเรียนการสอนในภาคปฏิบัติการ รายวิชาที่เกี่ยวข้องกับด้านปรสิตวิทยา อีกทั้งยังให้นิสิตสามารถศึกษาโครงสร้างเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

ปัจจุบัน เชื้อ *G. lamblia* เป็นเชื้อโปรโตซัวที่หายาก และไม่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไป การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำสไลด์ถาวร เพื่อผลิตสื่อสไลด์ถาวรเอง สามารถทำได้ในปริมาณที่เพียงพอต่อการเรียนการสอนในภาคปฏิบัติการ และต้องมีการเก็บรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสม เพื่อให้อายุการใช้งานมีระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กวินา สกุลวานิชเจริญ และ วลัยลักษณ์ สินภูธรณ์. (2557). การพัฒนาวิธี Loop mediated isothermal amplification เพื่อตรวจหา *Giardia lamblia* ในสิ่งส่งตรวจ. **โครงการวิจัยทางเทคนิคการแพทย์ ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.**

กฤษฎา ขำพูล. (2557). ศึกษาการปรับปรุงวิธีการย้อมสีพยาธิใบไม้ตับอ่อนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง. **สัตวแพทย์มหานครสาร**. เล่มที่ 9 ฉบับที่ 2. หน้า 103-111

ชูมณี ละม่อม และ รัชฎา เกียรติเฟื่องฟู. (2548). เทคนิคพื้นฐานทางปรสิตวิทยา (พิมพ์ครั้งที่ 4). **ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล**. หน้า 4-10

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. (2548). **วิธีตรวจทางห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยาทางการแพทย์**. ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล. (2557). **โครงการอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การตรวจวินิจฉัยพยาธิลำไส้ที่ก่อให้เกิดโรคและฉวยโอกาส**. ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล.

ประยงค์ ระดมยศ. (2556). Atlas of Medical Parasitology. (พิมพ์ครั้งที่ 10).กรุงเทพฯ: ศิลปกรรมรูปเล่ม.

มหาวิทยาลัยมหิดล คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล. (2560). เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การเพิ่มพูนความรู้และทักษะการวินิจฉัยทางปรสิตวิทยา. **ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแทพยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.**

Painter, J.E., Gargano, J.W., Collier, S.A., and Yoder, J.S. (2015). Giardiasis Surveillance-United States, 2011-2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, 64(3), 15-25.

Kumagai, M., Kobayashi, S., Okita, T., and Ohtome, H. (2001). Modifications of Kohn's Chlorazol Black E Staining and Wheatley's Trichrome Staining for Temporary Wet Mount and Permanent Preparation of *Entamoeba histolytica*. **Journal of Parasiology**, 87(3), 701-704

Roberts, D.M., and Caustion, H., (1988). Silver Nitrate Impregnation of Ciliated Protozoa. **Archiv für Protistenkunde**. 135(1998), 299-318.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Kirkpatrick, C.E., and D,V.M., (1987). Giardiasis, **Vterinary Clinics of North America: Small animal Practice**. 17(6), 1377–1387.

Hale, D.C., Carroll, K., Kucera, J.R., and Aldeen, W.E., (1996). Use of a Single Slide Trichrome–Stained Concentrate for the Detection of Intestinal Parasites. **Clinical microbiology and infectious disease**. 106(2), 175–179.

Estevex, E.G., and Levinet, J.A., (1985). Examination of Preserved Stool Specimens for Parasies: Lack of Value of the Direct Wet Mount. **Journal of Clinical Microbiology**. 22(4), 666–668.

Kellogg, J.A., and Elder, C.J., (1999). Justification for Use of a Single Trichrome Stain as the Sole Means for Routine Detection of Intestinal Parasites in Concentrated Stool Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. 37(3), 835–837.

Wood, J.C., Friedly, G., and Delamaza, L.M., (1982). Detection of Helminth Ova and Larvae in Trichrome–Stained Stool Smears. **Journal of Clinical Microbiology**. 16(6), 1137–1144.

Yoder, J.S., Gargano, J.W., Wallace, R.M., and Beach, M.J., (2012). Giardiasis Surveillance–United States, 2009– 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**. 61(5), 13–23.

Rajurkar, M.N., Lall. N., Basak, S., and Mallick S.K., (2012). A simple Method for Demonstrating the *Giardia Lamblia* Trophozoite. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. 6(9), 1492–1494.

Neimeister, R., Logan, A.L., Egleton, J.H., and Kleger, B., (1990). Evaluation of Direct Wet Mount Parasitological Examination of Preserved Fecal Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. 28(5),1082–1084.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Shoaib, S., Hafiz, A., and Tauheed, S., (2002). Role of Trichrome Staining Techniques in the diagnosis of Intestinal Parasitic Infections. **Journal of Pakistan Medical Association.** 52(4), 152–155.

Harba, N. M., Rady, A. A., and Khalefa, K. A., (2012). Evaluation of Flow Cytometry as a Diagnostic Method of Detection of Giardia lamblia in Comparison to IFAT and Other Conventional Staining Techniques in Fecal Sample. **PUJ–Parasitologists United Journal.** 5(2), 165–174.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมสี Trichrome สูตรมาตรฐาน (Wheatley's Modification) สูตร A

ส่วนประกอบของสีย้อม

1. Chromotrope 2R	0.6 กรัม
2. Light green SF	0.3 กรัม
3. Phosphotungstic acid	0.7 กรัม
4. Acteic acid (glacial)	1.0 มิลลิกรัม
5. Distilled water	100 มิลลิกรัม

ชั่งสารในปริมาณตามสูตร แล้วเติมกรด Acetic acid 1 มิลลิกรัมลงไป ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที เติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 100 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Hot plate stirrer สังเกตุจนกว่าสารจะผสมเข้ากันได้ดี นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 หลังจากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชา บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 7-14 วัน ก่อนนำมาใช้

2. การเตรียมสี Trichrome สูตร B

ส่วนประกอบของสีย้อม

1. Chromotrope 2R	0.6 กรัม
2. Light green SF	0.45 กรัม
3. Phosphotungstic acid	0.7 กรัม
4. Acteic acid (glacial)	1.0 มิลลิกรัม
5. Distilled water	100 มิลลิกรัม

ชั่งสารในปริมาณตามสูตร แล้วเติมกรด Acetic acid 1 มิลลิกรัมลงไป ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที เติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 100 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Hot plate stirrer สังเกตุจนกว่าสารจะผสมเข้ากันได้ดี นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 หลังจากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชา บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 7-14 วัน ก่อนนำมาใช้

3. การเตรียม 70% Alcohol

โดยเตรียมจากแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% คำนวณโดยใช้สูตร

$$C1V1 = C2V2$$

ความเข้มข้นเริ่มต้น × ปริมาตรเริ่มต้น = ความเข้มข้นที่ต้องการ × ปริมาตรที่ต้องการ

จากสูตร เช่น ถ้าต้องการเตรียม 70% Alcohol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้สูตร

$$C1V1 = C2V2$$

$$95 \times V1 = 70 \times 100$$

$$V1 = \frac{70 \times 100}{95}$$

$$V1 = 73.68 \text{ มิลลิกรัม}$$

จากการคำนวณการเตรียม 70% Alcohol โดยใช้แอลกอฮอร์เข้มข้น 95% ปริมาตร 100 มิลลิกรัม จะต้องใช้ 95% ปริมาตร 73.68 มิลลิกรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 26.32 มิลลิกรัม จะได้ 70% Alcohol ปริมาตร 100 มิลลิกรัม

5. การเตรียม 80% Alcohol

โดยเตรียมจากแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% คำนวณโดยใช้สูตร

$$C1V1 = C2V2$$

ความเข้มข้นเริ่มต้น × ปริมาตรเริ่มต้น = ความเข้มข้นที่ต้องการ × ปริมาตรที่ต้องการ

จากสูตร เช่น ถ้าต้องการเตรียม 80% Alcohol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้สูตร

$$C1V1 = C2V2$$

$$95 \times V1 = 80 \times 100$$

$$V1 = \frac{80 \times 100}{95}$$

$$V1 = 84.21 \text{ มิลลิกรัม}$$

จากการคำนวณการเตรียม 80% Alcohol โดยใช้แอลกอฮอร์เข้มข้น 95% ปริมาตร 100 มิลลิกรัม จะต้องใช้ 95% ปริมาตร 84.21 มิลลิกรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 15.79 มิลลิกรัม จะได้ 80% Alcohol ปริมาตร 100 มิลลิกรัม

4. การเตรียม 90% Alcohol

โดยเตรียมจากแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% คำนวณโดยใช้สูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

ความเข้มข้นเริ่มต้น × ปริมาตรเริ่มต้น = ความเข้มข้นที่ต้องการ × ปริมาตรที่ต้องการ

จากสูตร เช่น ถ้าต้องการเตรียม 90% Alcohol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้สูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$95 \times V_1 = 90 \times 100$$

$$V_1 = \frac{90 \times 100}{95}$$

$$V_1 = 94.73 \text{ มิลลิกรัม}$$

จากการคำนวณการเตรียม 90% Alcohol โดยใช้แอลกอฮอร์เข้มข้น 95% ปริมาตร 100 มิลลิกรัม จะต้องใช้ 95% ปริมาตร 94.73 มิลลิกรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 5.27 มิลลิกรัม จะได้ 90% Alcohol ปริมาตร 100 มิลลิกรัม

5. การเตรียม 90% Acid Alcohol (100 ml)

ส่วนประกอบของสาร

1. 90% Alcohol 99.5 มิลลิกรัม
2. Acetic acid (glacial) 0.5 มิลลิกรัม

เตรียม 90% Alcohol 99.5 มิลลิกรัม จากนั้นเติม Acetic acid ปริมาตร 0.5 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากัน

6. การเตรียมสารเจลาติน

ส่วนประกอบ

1. เจลาตินผง 10 กรัม
2. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.05 กรัม
3. น้ำกลั่น 100 มิลลิกรัม

ชั่งสารเจลาตินและโซเดียมคลอไรด์รวมกัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปผ่านความร้อน เพื่อให้เจลาตินละลาย เก็บรักษาไว้อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ข

ประวัติผู้วิจัย (Biography)

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ นามสกุล นางสาววาสนา เมืองวงค์

วัน เดือน ปีเกิด วันที่ 2 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2558

ที่อยู่ปัจจุบัน 107/1 หมู่ 6 ต.บ้านต๋อม อ.เมือง จ.พะเยา 56000

ที่ทำงานปัจจุบัน สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์

โทรศัพท์/โทรสาร 054-466666 ต่อ 3887

Email address wasana_koi139@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2552 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วทบ.)
สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลงานตีพิมพ์

1. Suwancharoen, J., Jaloen-ngam, T., Muangwong, W. (2018). Prevalence of Intestinal Parasitic Diseases among HIV Positive Patients using Antiretroviral Treatment in Phayao Province, Northern Thailand. Thai **Journal of Public Health**. 48(2)

ประวัติคณะผู้วิจัย (Biography) (ต่อ)

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ นามสกุล นางสาวช่อผกา พวงศรี

วัน เดือน ปีเกิด วันที่ 14 เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2533

ที่อยู่ปัจจุบัน 87/1 ม.7 ต.ยกกระบัตร อ.สามเงา จ.ตาก 63130

ที่ทำงานปัจจุบัน สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์

โทรศัพท์/โทรสาร 054-466666 ต่อ 3886

Email address chorpaka.phuangsri.9039@gmail.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2558	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วมบ.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พ.ศ. 2554	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วทบ.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ผลงานตีพิมพ์

1. Sirikarn Sanpa, S., Komsak Pintha, K., Suttajit, M., Sanpa, S., Auputinan, P. and Phuangsri, C. (2019). Screening of antioxidant and antibacterial activities of perilla seed meal extract. **Phayao Resherch Conference**. 82-91
2. Phuangsri, C., Nuntawong, N., Niamsup, H. (2017). Investigation of the Essential Oil from *Zanthoxylum piperitum* Seeds for Its Potential Use as Antifungal Agent against *Aspergillus flavus*. **Chiang Mai J. Sci.**. 44(2). 584-594
3. Phuangsri, C., Nuntawong, N., Niamsup, H. (2014). Antifungal Activity of Essential oils from Some Spices Against *Aspergillus flavus*. **Burapha University International Conference**