ศึกษาวิธีการควบคุมคุณภาพการผลิตสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis*

Study on quality control for mass production of Sporocysts of *S. singaporensis*

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ดาราพร รินทะรักษ์ ปราสาททอง พรหมเกิด

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

-

คำนำ

สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่ได้มาจากกระบวนการผลิตระหว่างหนูติดเชื้อโปรโตซัวและงูเหลือม ในแต่ละ passage หรือในแต่ละล็อต จะผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดหนูที่มีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงควรศึกษาวิธี ที่จะสามารถตรวจสอบคุณภาพของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของการผลิตแต่ละล็อต เพื่อให้ได้สารชีวินทรีย์กำจัดหนูมีประสิทธิภาพที่คงที่และสม่ำเสมอ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. sporocysts suspension of *S. singaporensis*
2. microtube 1.5 ml., 15 ml., 50 ml., pipette 5-10 µl. , 20-100 µl., 100-1000 µl. + tips
3. nucleic acid stains (live/dead bacLight Bacterial Viability Kit), slides + coverglass, ethyl alcohol, xylene, ether, etc.
4. feeding tube 2 sets , light microscope +fluorescent light set
5. หนูท้องขาว กรงทดสอบเดี่ยว อาหารและน้ำ
6. กระดาษทิชชูแบบอเนกประสงค์ ถุงมือยางสำหรับแพทย์ ชุดเครื่องมือผ่าตัด

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-05-01-03-51

วิธีการ

1. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ด้วยชุดสีย้อมนิวคลีอิคเอซิค(Dye Test)

ปฏิบัติตามวิธีการของยุวลักษณ์(2543) โดยนำชุดสีย้อมสำเร็จรูป live/dead bacLight Bacterial Viability Kit มาสีย้อม 2 ชนิดมาผสม แล้วแช่แข็งก่อนใช้ จากนั้นเตรียมตัวอย่าง sporocysts suspension ที่อัตรา 150,000 ซีสต์/หลอด จำนวน 2 ตัวอย่างต่อล็อต แล้วทำการย้อมสีผสมที่เตรียมไว้และทำละลายแล้ว หุ้มหลอดตัวอย่างด้วยอลูมิเนียมฟอลย์ แล้วนำอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผ่านการย้อมสีแล้วเช่นกัน แต่นำไปแช่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 3 ชั่วโมงแทน จากนั้นนำไปตรวจนับปริมาณของสปอร์โรซีสต์มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนต์กำลังขยายสูง(สปอร์โรซีสต์ที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม)

2. ทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์โรซีสต์กับหนูท้องขาว(Bioassay Test)

นำสปอร์โรซีสต์ที่อยู่ในน้ำเกลือ PBS 1% หรือน้ำกรอง และผ่านการย้อมสีทดสอบตามข้อ 3.1 มาทดสอบประสิทธิภาพของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์กับหนูท้อง โดยทำการสลบหนูด้วยอีเทอร์ก่อน จากนั้นใช้ feeding tube ให้เชื้อโดยตรงทางปากในอัตรา 200,000 สปอร์โรซีสต์ต่อหนู 1 ตัว จำนวน 4-6 ตัว ให้อาหารและน้ำตามปกติ และบันทึกอาการป่วยของหนูทุกวัน

3. ทำการเก็บเกี่ยวสปอร์โรซีสต์ในมูลงู โดยวิธี Sugar Floatting

เตรียมสารละลายน้ำตาลตามวิธีของ Stanlay(2003) นำมูลงูเหลือมที่มีสปอร์โรซีสต์ปะปนประมาณ 490 กรัม/สารละลายน้ำตาล 50 มล. จากนั้นทำการปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge เพื่อเก็บเกี่ยวสปอร์โรซีสต์ให้ลอยอยู่ในชั้นสารละลายน้ำตาล ปฏิบัติเช่นนี้สามารถเก็บเกี่ยวสปอร์โรซีสต์ที่บริสุทธิ์ได้มาก

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกปริมาณสปอร์โรซีสต์ที่ได้จากงูเหลือมแต่ละตัวและแต่ละครั้งของการให้หนูติดเชื้อ
2. บันทึกการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ที่ได้จากงูเหลือมแต่ละ passage
2. บันทึกปริมาณสปอร์โรซีสต์ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวโดยวิธี Sugar Floattation
3. บันทึกเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ในสารแขวนลอยที่ผลิตได้ในแต่ละ lot
4. บันทึกความรุนแรง/ประสิทธิภาพของโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ต่อหนูทดลอง

ระยะเวลาและสถานที่

ดำเนินการศึกษาตั้งเดือนตุลาคม 2548 ถึงเดือนกันยายน 2553 ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร และดักจับหนูศัตรูจากแหล่งทำการเกษตร เช่น สวนปาล์น้ำมัน ฯลฯ และภายในบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และตลาดเทศบาล

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาในปี 2549 พบว่า การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ของเชื้อโปรโตซัวที่ได้มาจากกระบวนการผลิตในงูเหลือมที่ยาว 1.5 ม.ในแต่ละรอบของการให้หนูติดเชื้อ จำนวน 2 ครั้งติดต่อกัน แต่ละครั้งห่างกัน 3 เดือน สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีย้อมสี nucleic acid staining dyes และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเชื้อเท่ากับ 89.62% และ 89.17 % ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบความรุนแรงของการทำให้เกิดโรคในหนู ใช้วิธีทดสอบกับหนูโดยตรง(bioassay) ในอัตราความเข้มข้น 2 x10^5 สปอร์โรซีสต์ /หนู 1 ตัว จำนวนตัวอย่างละ 6 ตัว พบว่าหนูป่วยและตายทั้งหมด(100%)

ผลการศึกษาในปี 2550 พบว่า สปอร์โรซีสต์ของเชื้อโปรโตซัวที่ได้มาจากกระบวนการผลิตในงูเหลือมที่ยาว 3.0 เมตร ในแต่ละรอบของการให้หนูติดเชื้อ จำนวน 2 ครั้งติดต่อกัน แต่ละครั้งห่างกัน 3 เดือน มีชีวิต 71.2% และ 80.7% ตามลำดับ สำหรับความรุนแรงของการทำให้เกิดโรคในหนู ทำการทดสอบกับหนูท้องขาวโดยตรงในอัตราความเข้มข้น 2 x10^5 สปอร์โรซีสต์ /หนู 1 ตัว จำนวนตัวอย่างละ 6 ตัว พบว่า สปอร์โรซีสต์ในหลอดที่ 1 ทำให้หนูป่วยและตาย 50% ส่วนสปอร์โรซีสต์ในหลอดที่ 2 ทำให้หนูป่วยและตาย 80%

การเก็บเกี่ยวสปอร์โรซีสต์จากหลอดที่ 2 โดยวิธีการตกตะกอนด้วยสารละลายน้ำตาลผสมได้สปอร์โรซีสต์เพียง 67 % การศึกษายังไม่สิ้นสุดและยังดำเนินการต่อไป

ผลการทดลองปี 2551 งูเหลือมแต่ละตัวได้หนูที่มีการติดเชื้อโปรโตซัวแต่ละระดับ(ระดับปานกลาง ระดับต่ำ และระดับสูง)อย่างละ 1 ตัวสามารถผลิตสปอร์โรซีสต์ได้ 1070 , 980, และ 1,190 ล้านซีสต์ตามลำดับ และ% การมีชีวิต = 81%, 86%, และ 82% ตามลำดับ(เก็บเกี่ยวโดยวิธีกรองและปั่นตกตะกอน) ส่วนการเก็บเกี่ยวสปอร์โรซีสต์ด้วยวิธี sugar floatation สามารถเก็บเกี่ยวได้ 810, 657, และ 943 ล้านซีสต์ตามลำดับ และ% การมีชีวิต = 87%, 87%, และ 86% ตามลำดับ

ผลการทดลองปี 2552 พบว่า การเก็บเกี่ยวสปอร์โรซีสต์ด้วยวิธี sugar floatation โดยวิธีของ Sheather ซึ่งมีสายละลาย 2 สูตร ภายหลังทำการสกัดสปอร์โรซีสต์ออกจากสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของงูเหลือมหมายเลข 6 ซึ่งมีสปอร์โรซีสต์ก่อนการทดลอง 5825 สปอร์โรซีสต์ต่อ 1ไมโครลิตร์ และทำการสกัด 2 ครั้ง พบว่า สามารถเก็บเกี่ยวสปอร์โรซีสต์ได้เพียงได้ 10 % เท่านั้น

และ % การมีชีวิตโดยวิธีการใช้ nucleic acid dye = 78% สำหรับการติดเชื้อสปอร์โรซีสต์ในหนูนอรเวสายพันธุ์สเปรดโดเร พบซาร์โคซีสต์ในกล้ามเนื้อลำตัวส่วนท้องระดับสูงจำนวน 4 ตัว ระดับต่ำ 1 ตัว ส่วนกล้ามเนื้อต้นขา พบระดับสูง 4 ตัว ระดับปานกลาง 1 ตัว

เอกสารอ้างอิง

Belosevic,M., Guy,R.A., Taghi-Kilani,R., Neumann,N.F.,Gyuerek,L.L.,Liyanage,L.R.J., Millard,P.J., Finch, G.R., 1997. Nucleic acid stains as indicators of *Cryptosporidium parvam* oocysts viability. Int. J. Parasitol. 27,787-798.