ศึกษาวิธีการควบคุมคุณภาพการผลิตสปอร์โรซีสต์ ของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis*

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

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ดาราพร รินทะรักษ์ ปราสาททอง พรหมเกิด
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการควบคุมคุณภาพการผลิตสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ได้ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2549 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2553 นั้น มีวัตถุประสงค์ เพื่อต้องการควบคุมคุณภาพของสปอร์โรซีสต์ที่เป็นผลผลิตที่ออกมาจากงูเหลือมแต่ครั้ง และต่ละล๊อตที่จะนำมาผลิตเป็นสารชีวินทรีย์กำจัดหนู โดยได้ทำการทดลองดังนี้ คือ วิธีแรก ทำการตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ โดยใช้ nucleic acid stains และวิธีที่สองทำการทดสอบความรุนแรงของเชื้อโปรโตซัวโดยวิธี bioassay กับหนูท้องขาวบ้าน

ผลการศึกษา สรุปได้ว่า วิธีการตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์โดยใช้ nucleic acid stains นั้น ไม่สามารถบ่งบอกถึงความรุนแรงในการก่อเกิดโรคของโปรโตซัวในหนูได้ แต่การทดสอบกับหนูท้องขาวโดยตรง(bioassay) นั้นเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อโปรโตซัวของแต่ละครั้งของผลิต แต่การใช้วิธีการย้อมสีนั้น จะช่วยในการตัดสินในการใช้ปริมาณสปอร์โรซีสต์อัตราตาย ทีเหมาะสมได้

คำนำ

สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่ได้มาจากกระบวนการผลิตระหว่างหนูติดเชื้อโปรโตซัวและงูเหลือม ในแต่ละ passage หรือในแต่ละล็อต จะผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดหนูที่มีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงควรศึกษาวิธี ที่จะสามารถตรวจสอบคุณภาพของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของการผลิตแต่ละล็อต เพื่อให้ได้สารชีวินทรีย์กำจัดหนูมีประสิทธิภาพที่คงที่และสม่ำเสมอ Belosevic *et al*.(1997) ได้พัฒนาวิธีการใช้สีย้อมกลุ่ม nucleic acid ชี้วัดการมีชีวิตของโอโอซีสต์ของ *Crytosporidium parvum* ที่เก็บไว้ในหลอดทดลองห้องปฏิบัติการ และสรุปว่า

สีย้อมที่ชี้วัดการมีชีวิตของโอโอซีสต์ได้ดีที่สุด คือสี Hexidium and Syto-9 และการมีชีวิตของโอโอซีสต์ลดลงถ้าเก็บไว้นาน สำหรับความรุนแรงของเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ การทดสอบกับหนูโดยตรงในอัตราที่ทำให้ตาย ทำให้สามารถบอกถึงประสิทธิภาพของสารชีวินทรีย์กำจัดหนูแต่ละล็อตได้เป็นอย่างดี แม่นยำ และถูกต้องมากขึ้น

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-05-01-03-51

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, sugar, formalin 37%, etc.
4. feeding tube 2 sets , light microscope +fluorescent light set, electronic stove, etc
5. หนูท้องขาว กรงทดสอบเดี่ยว อาหารหนูและน้ำ
6. กระดาษทิชชูแบบอเนกประสงค์ ถุงมือยางสำหรับแพทย์ ชุดเครื่องมือผ่าตัด

วิธีการ

1. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ด้วยชุดสีย้อมนิวคลีอิคแอซิค(Dye Test)

ปฏิบัติตามวิธีการของยุวลักษณ์(2543) ดังนี้

1. นำสี Syto-9 และ propidium iodine จากชุดสีย้อมสำเร็จรูป live/dead bacLight Bacterial Viability Kit ออกจากช่องแช่แข็ง ทิ้งไว้ให้ละลาย แล้วปั่นเพียง 2 – 3 นาทีที่ความเร็วต่ำ ทำการผสมสีทั้งสอง โดยไปเป็ตแต่ละสีออกมา 1.5 µl.ใส่ลงใน microtube แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 47 µl. ผสมให้เข้ากัน หุ้มหลอดปั่นดังกล่าวด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วนำไปเก็บในช่องแช่แข็ง
2. เตรียมตัวอย่าง sporocysts suspension ที่อัตรา 150,000 ซีสต์/หลอด จำนวน 2 ตัวอย่าง ต่อล็อต แต่ละตัวอย่างผสมด้วยน้ำกลั่น 100 µl.
3. นำหลอดสีย้อมที่ทำไว้ออกจากช่องแช่แข็ง ทิ้งให้ละลาย แล้วไปเป็ตสีผสม 5 µl. ใส่ในหลอดผสมกับสารแขวนลอยตัวอย่าง 95 µl. ต่อ 1 ตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับตัวอย่างเปรียบเทียบใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเช่นกัน หลอดตัวอย่างทั้งสองห่อหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอลย์ตลอดการทดลอง หลังจากนั้นพักหลอดตัวอย่างในตู้เย็นอุณหภูมิปกติ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้สีย้อมทำปฏิกิริยากันก่อน ก่อนนำตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามข้อ 4
4. ทำการตรวจผลด้วยกล้องแบบจุลทรรศน์ใช้แสงฟลูออเรสเซนต์กำลังขยายสูง โดยเขย่าหลอดตัวอย่างทั้งสองที่ผ่านการอบหรือแช่น้ำร้อน เพื่อให้สปอร์โรซีสต์กระจายอย่างสม่ำเสมอ แล้วไปเป็ตมา 10 µl. หยดลงแผ่นสไลด์ ปิดด้วย cover glass นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สปอร์โรซีสต์ที่ตายแล้วหรือไม่ active นิวเคลียสจะถูกย้อมเป็นสีแดงหรือสีเขียว ในขณะที่สปอร์โรซีสต์ที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสี ใดเลย ทำการตรวจนับปริมาณสปอร์โรซีสต์ที่ยังมีชีว

2. ศึกษาความรุนแรงของการก่อเกิดโรคของสปอร์โรซีสต์กับหนูท้องขาวโดยวิธี Bioassay

นำสปอร์โรซีสต์ที่อยู่ในน้ำเกลือ PBS 1% หรือน้ำกรอง และผ่านการย้อมสีทดสอบตามขั้นตอนแรก และสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ไม่ผ่านการย้อมสีนิวคลีอิคแอซิค มาทดสอบประสิทธิภาพของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์กับหนูท้อง โดยทำการสลบหนูด้วยอีเทอร์ก่อน จากนั้นใช้ feeding tube ให้เชื้อโดยตรงทางปากในอัตรา 200,000 สปอร์โรซีสต์ต่อหนู 1 ตัว จำนวน 10 ตัว/การทดลอบ อีกวิธีหนึ่งให้เหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปแก่หนูโดยตรงในอัตรา 200,000 สปอร์โรซีสต์/1 ก้อนเหยื่อ จำนวน 1-2 ก้อนต่อหนู 1 ตัว จำนวน 10 ตัว ให้อาหารและน้ำตามปกติ และบันทึกอาการป่วยของหนูทุกวัน

3. **การเก็บเกี่ยวสปอร์โรซีสต์จากสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ โดยวิธี Sugar Floatation**

วิธีการนี้ ต้องการให้ได้สปอร์โรซีสต์ที่สะอาดและมีการปนปื้อนของ normal flora ที่พบในลำไส้งูเหลือมและสิ่งสกปรกอื่นๆ มีน้อยที่สุดหรือไม่มีเลย โดยเตรียมสารละลายน้ำตาลตามวิธีของ Kourenti, etal (2003) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล 500 กรัม น้ำกรองหรือน้ำประปาสะอาดที่ดื่มได้ จำนวน 320 กรัม ใส่ลงในแก้วบีเกอร์ขนาด 1 ลิตร ตั้งบนเตาไฟฟ้า คนละลายด้วยแท่งแก้ว ขณะคนสารละลายให้ใส่ phenol 6.5 กรัม หรือฟอร์มาลิน(37%) 6 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการเกิดเชื้อราในสารละลายน้ำตาลที่เตรียมไว้ จากนั้นให้นำสารละลายน้ำตาลมาแบ่งทำสารละลายพิเศษ 2 สูตร คือ สารละลาย A และสารละลาย B โดยสารละลาย A = สารละลายน้ำตาลผสมกับสารละลาย PBS(Phosphate Buffered Saline+1%Tween80) ในอัตรา 1 : 4 ส่วนสารละลาย B = สารละลายน้ำตาลผสมกับสารละลาย PBS(Phosphate Buffered Saline+1%Tween80) ในอัตรา 1 : 2 แล้วปฏิบัติการกรองสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ได้จากการทำความสะอาดแบบปกติ ดังนี้

1. ในหลอดปั่นตกตะกอนขนาด 50 ml. ใส่สารละลาย A 5 มล. + PBS 10 มล. เป็นชั้นที่ 1 จากนั้นตามด้วยชั้นของสารละลาย B 3 มล. + PBS 12 มล.

2.ใส่สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่เตรียมไว้จำนวน 10 มล. (ที่ได้ทราบปริมาณสปอร์โรซีสต์แล้ว) เหนือสารละลายทั้งสอง แล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งจะพบสปอร์โรซีสต์รวมตัวอยู่เหนือชั้นสารละลาย ขณะที่สิ่งสกปรกอื่นๆ รวมทั้งสปอร์โรซีสต์บางส่วนตกตะกอนอยู่ข้างล่าง

3. ถ่ายรินส่วนชั้นของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์เหนือตะกอน ลงในหลอดปั่นตกตะกอนใหม่ขนาดปริมาตรเดียวกันจำนวน 2 หลอดในปริมาณที่เท่ากัน เติมน้ำกลั่นให้ได้เท่าปริมาตรของหลอดปั่น เพื่อทำความสะอาดสปอร์โรซีสต์ โดยการปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบที่ 1200 ต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นรินสารละลายที่อยู่ตะกอนออกช้าๆ ให้แต่ละหลอดคงเหลือสารละลายประมาณ 12.5 มล. พร้อมตะกอน แล้วเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำสารแขวนลอยของทั้งสอง มาผสมลงในหลอดเดียวกัน

4. จากนั้นทำการตรวจนับปริมาณสปอร์โรซีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยายสูง แล้วใส่น้ำกรองหรือ PBS(Phosphate Buffered Saline) เต็มปริมาตรและเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่ 4°C

การตกตะกอนกรองสปอร์โรซีสต์ในสารละลายน้ำตาลผสมในครั้งแรก อาจกรองสปอร์โรซีสต์ได้เพียง 50% จึงควรทำการคัดกรองสปอร์โรซีสต์ที่ยังคงเหลือในส่วนตกตะกอนในข้อ 2 มา

ตกตะกอนใหม่อีกครั้งในสารละลายน้ำตาลผสมใหม่ตามข้อ 1 – 4 แล้วจึงนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์สปอร์โรซีสต์ บริสุทธิ์ที่เก็บเกี่ยวได้ทั้งหมด

ผลการทดลองและวิจารณ์

การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ของเชื้อโปรโตซัว ที่ได้มาจากกระบวนการผลิตในงูเหลือมที่ยาว 1.5 - 1.7 เมตร จำนวน 2 ตัว ขนาด 2.0-2.5 เมตร 2 ตัว และ 3.0 เมตร จำนวน 2 ตัว ในแต่ละรอบของการให้หนูติดเชื้อ จำนวน 2 ครั้งติดต่อกัน แต่ละครั้งห่างกัน 4 เดือน รวม 2 ครั้งต่อปี เป็นเวลา 3 ปี(2550-2552) ติดต่อกันนั้นพบว่า งูขนาดเล็กสามารถผลิตสปอร์โรซีสต์เฉลี่ย 856.7 ซีสต์/ไมโครลิตร/3ปี ส่วนงูเหลือมขนาดกลาง 2 เมตร ผลิตซีสต์เฉลี่ย 4161.7 ซีสต์/ไมโครลิตร/ 3ปี ส่วนงูขนาดใหญ่ตั้งแต่ 3 เมตร เป็นต้นไป ผลิตซีสต์ได้เฉลี่ย 10640 ซีสต์ /ไมโครลิตร/ 3ปี และตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์โดยวิธีย้อมสี nucleic acid staining dyes ในปีแรก เฉลี่ย 80.6%, 81.9% และ 82.3% ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบความรุนแรงของการทำให้เกิดโรคในหนู ใช้วิธีทดสอบกับหนูท้องขาวบ้านโดยตรง(bioassay) ในอัตราความเข้มข้น 2 x10^5 สปอร์โรซีสต์ /หนู 1 ตัว จำนวนตัวอย่างละ 10 ตัว พบว่าหนูป่วยและตายทั้งหมด 100% จากสปอร์โรซีสต์ของงูทุกขนาด สำหรับปีที่ 2 งูเหลือมแต่ละขนาด ผลิตสปอร์โรซีสต์ ได้เฉลี่ย 801.6 , 2000.9, 4215.0 ซีสต์/ไมโครลิตร/ครั้ง และ มีชีวิตเท่ากับ 78.1%, 80.3% และ 76.4% ตามลำดับ ส่วนความรุนแรงของเชื้อโปรโตซัวจากงูเหลือมทุกขนาดที่ทำให้หนูท้องขาวป่วยตายทั้งหมด(100%) ส่วนในปีที่สาม การผลิตสปอร์โรซีสต์ของงูทั้ง 3 ขนาด ยังคงผลิตสปอร์โรซีสต์ได้เฉลี่ย 995.6 , 4040.1 และ 9190.7 ซีสต์/ไมโครลิตร/ครั้ง แต่การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ของงูเหลือมทั้ง 3 ขนาด เฉลี่ยเท่ากับ 80.9%, 77.7% และ 70.3% ตามลำดับ แต่ความรุนแรงในการก่อเกิดโรคของงูขนาดใหญ่และกลางกลับลดลงเหลือเพียง 60% และ 69% ตามลำดับ ในขณะสปอร์โรซีสต์จากงูขนาดเล็ก ยังคงทำให้หนูทดลองตายมากกว่าเฉลี่ย 80% ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้ อาจเกิดจากความอ่อนแอของเชื้อโปรโตซัว อันเนื่องจากกระบวนการถ่ายเชื้อเดียวกันตลอด 3 ปี หรือมีการปนเปื้อนของเชื้อโปรโตซัวชนิดอื่นๆ จากหนูติดเชื้อที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แต่ปรากฏการณ์นี้ สามารถแก้ไขได้ด้วยการนำหนูจากธรรมชาติที่มีซีตส์ของ *S..singaporensis* เป็นอาหารงูเหลือมแทน เพื่อเพิ่มความรุนแรงของเชื้อโปรโตซัวได้ นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบสารแขนลอยสปอร์โรซีสต์ที่เก็บเกี่ยวโดยวิธี sugar flotation กับสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่เก็บเกี่ยวแบบปกติ แสดงไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ไม่สามารถบ่งบอกถึงความรุนแรงของเชื้อโปรโตซัวได้ แต่เป็นค่าที่อาจช่วยกำหนดปริมาณสปอร์-โรซีสต์อัตราที่ต้องการใช้ผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. การตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ด้วยชุดสีย้อมนิวคลีอิคแอซิค(Dye Test) นั้นสามารถบอกได้ว่าสปอร์โรโรซีสต์ที่ได้จากงูเหลือมแต่ละครั้ง หรือสปอร์โรซีสต์ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือ

(PBS) เป็นระยะเวลานานนั้น ยังคงมีชีวิตเป็นจำนวนมากหรือน้อย แต่ไม่สามารถบ่งบอกถึงความรุนแรงของเชื้อโรคได้ แต่วิธีการใช้สีย้อมนิวคลิอิกเอซิค ต้องซื้อชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่มีราคาแพง
2. ส่วนวิธีการทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์โรซีสต์กับหนูท้องขาวโดยตรง (Bioassay Test) นั้น สามารถบ่งบอกการก่อเกิดโรคที่รุนแรงต่อหนูท้องขาวแต่ละตัวได้ โดยต้องทำการทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์โรซีสต์ที่ผลิตได้แต่ละล๊อต กับหนูท้องขาวอย่างน้อยครั้งละ 6 ตัว(เพศผู้ 3 เพศเมีย 3)
3. วิธีการเก็บเกี่ยวสปอร์โรซีสต์โดยวิธี Sugar Floatation นั้น สามารถให้สปอร์โรซีสต์ที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ น้อยมาก หรือไม่มีเลย แต่จะสูญเสียสปอร์โรซีสต์พอควรและเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่าย ซึ่งวิธีการนี้อาจเหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์ในงานตรวจสอบชนิดและความบริสุทธิ์ของโปรโตซัว

คำขอบคุณ

ขอบคุณคุณปิยรัตน์ จิตระวัง และคุณชุติมา นักวิชาการของโครงการ CBP+GTZ ที่ช่วยในการเก็บข้อมูลการผลิตสปอร์โรซีสต์และการทดสอบการมีชีวิตและความรุนแรงของการก่อเกิดโรคในหนูท้องขาว รวมถึงการติดเชื้อในหนูท้องขาว

เอกสารอ้างอิง

Kourenti,Chritine; Anja Heckeroth ; Astrid tTenter and Panagiots Karanis, 2003. Development and
Application of Different Methods for the Detection of *Toxoplasma gondii* in Water. Appl. Entviron. Microbio. 69 : 102 - 106.

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเก็บเกี่ยวสปอร์โรซีสต์ การมีชีวิตของโปรโตซัว และการตายของหนู

ทดสอบในห้องปฏิบัติการปี 2552-2553

%สปอร์โรซีสต์ที่เก็บเกี่ยวได้		%การมีชีวิต	%การตายหนู
Sugar floatation	กรอง+ปั่นตกตะกอนปกติ		
34	72	67	100
45	87	78	100
42	83	80	90
55	79	80	80
64	85	79	100
38	69	67	70
35	75	81	100
44	74	79	80
68	81	77	100
57	83	75	100
Average = 48.1	78.8		