รายงานผลการวิจัย
เงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การศึกษาการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์เชื้อไข้มาลาเรีย ชนิดฟัลซิปารัมในหลอดทดลอง

สพ
616.9
M27n
2530

โดย

มาลินี ฉัตรมงคลคุณ
อารีย์ เฉิดฉ้อน

2530

ห้องสมุดคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ
FACULTY OF SCIENCE LIBRARY
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์เชื้อไข้มาลาเรียชนิด พัลซิปารัมในหลอดทดลอง

โดย

มาลินี ฉัตรมงคลกุล
อารีย์ เสือก้อน

ตุลาคม 2530

สก
ส169
ม325ก
ส536

ลขหมู่.....

ลขทะเบียน.....1370

วันที่.....เดือน.....17 มี.ค. 2532.....พ.ศ.....

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยศึกษาการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์เชื้อไข้มาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมนี้ ได้รับทุนสนับสนุนโดย เงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง การทดลองวิจัยได้ดำเนินการตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2529 บัดนี้ได้สำเร็จลุล่วงเป็นที่เรียบร้อย ทั้งนี้โดยความร่วมมือ และการให้ความช่วยเหลือของบุคคลหลายฝ่ายโดยเฉพาะ รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง หัวหน้าศูนย์วิจัยมาลาเรีย ที่กรุณาให้ใช้สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่าง ๆ ของศูนย์ รวมทั้งให้คำแนะนำ ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูงเช่นกัน ขอขอบคุณ Dr. V. Rosorio ที่กรุณาให้เชื้อตัวอย่างเพื่อใช้ในที่นี้ที่ได้ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 2531

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์เชื้อไข้มาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมในหลอดทดลอง

ชื่อผู้วิจัย มาลินี ฉัตรมงคลกุล
อารีย์ เสือก้อน

เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ ตุลาคม 2530

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ศึกษาการเกิดเชื้อระยะมีเพศในหลอดทดลองของเชื้อฟัลซิปารัม จำนวน 9 สายพันธุ์ ซึ่งถูกแยกมาจาก 3 ไอโซเลท พบว่าสายพันธุ์ต่าง ๆ มีความแตกต่างกันในการเกิดเชื้อระยะมีเพศ และจากการศึกษาความสม่ำเสมอต่อเนื่องในการเกิดเชื้อระยะมีเพศโดยละเอียดของ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ CH_{150-4}, CH_{150-5}, CH_{150-6} และ TM_{52-10} ในช่วงเวลาที่ศึกษาเป็นเวลาหลายเดือน สรุปได้ว่าทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ดีสามารถนำไปเพาะเลี้ยงให้เกิดเชื้อระยะมีเพศ เพื่อการทดลองวิจัยต่อไปได้

Project Title	Studies on Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* clones In Vitro
Name of the Investigators	Miss Malinee Chutmongkonkul Mrs. Aree Suagon
Year	October, 1987

Abstract

Gametocyte production was observed in 9 clones derived from 9 isolates of Plasmodium falciparum in continuous culture. These clones were found to differ in their ability to produce gametocyte. The stability of gametocyte production of 4 clones, CH_{150-4}, CH_{150-5}, CH_{150-6} and TM_{52-10}, were studied in detail over periods of several months. These clones provide a reliabled source of gametocyte producing clones.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
รายการตารางประกอบ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	3
ผลการวิจัย	6
อภิปรายผล และสรุปผล	30
เอกสารอ้างอิง	33

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบจำนวนเชื้อระยะมีเพศในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการต่างกัน 3 วิธี ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดของเชื้อฟัลซิปารัม 5 สายพันธุ์.....	7
2.	เปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ และไม่ใส่ไฮโปแซนทีนของไอโซเลท NF_{54}.....	10
3.	แสดงการเกิดเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 2,3,4 และ 5 ของเชื้อฟัลซิปารัมสายพันธุ์ CH_{150-5}.....	15
4.	เปรียบเทียบการเกิดเชื้อระยะมีเพศของเชื้อฟัลซิปารัม 9 สายพันธุ์	19
5.	แสดงระยะเวลาเริ่มทำการทดลองของสายพันธุ์ CH_{150-4}.....	21
6.	แสดงการเพาะเลี้ยง และการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์ CH_{150-4} ในช่วงเวลาต่าง ๆ	22
7.	แสดงระยะเวลาเริ่มทำการทดลองของสายพันธุ์ CH_{150-5}.....	23
8.	แสดงการเพาะเลี้ยง และการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์ CH_{150-5} ในช่วงเวลาต่าง ๆ	24
9.	แสดงระยะเวลาเริ่มทำการทดลองของสายพันธุ์ CH_{150-6}.....	25
10.	แสดงการเพาะเลี้ยง และการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์ CH_{150-6} ในช่วงเวลาต่าง ๆ	26
11.	แสดงการเพาะเลี้ยง และการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์ CH_{150-10} ในช่วงเวลาต่าง ๆ	27
12.	แสดงระยะเวลาเริ่มการทดลองของสายพันธุ์ TM_{52-10}.....	28
13.	แสดงการเพาะเลี้ยง และการทดลองการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์ CH_{150-1}, CH_{150-3}, CH_{150-4}, CH_{150R-5} และ TM_{52-9} ในช่วงเวลาต่าง ๆ	29

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	เปรียบเทียบวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศ 3 วิธี ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ และไม่ใส่ไฮโปแซนทีน.....	8
2	เปรียบเทียบการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 RPMI 1640+ไฮโปแซนทีน ในการเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศของไอโซเลท NF_{54}.....	11
3	แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 2.....	12
4	แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 3.....	13
5	แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 4.....	13
6	แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 5.....	14
7	แสดงลักษณะรูปร่างของการเกิดเอ็กซแฟลวิลล่าของไมโครแกมมิโตไซต์.....	14
8	แสดงการเกิดเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 2,3,4 และ 5 ของเชื้อฟัลซิปารัมสายพันธุ์ CH_{150-5}.....	16

บทนำ

แต่เดิมการศึกษาถึงการเจริญระยะมีเพศ (gametocytogenesis) ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม (Plasmodium falciparum) ทำได้ยาก เพราะเป็นระยะที่เชื้อเจริญอยู่ภายในระบบเลือดที่อยู่ลึกในร่างกายคน โดยเฉพาะภายในไขกระดูก และม้าม ดังนั้นการศึกษาทางด้านนี้จึงยังไม่แน่นอน และยังไม่ทราบสาเหตุของการเกิด และการเจริญของเชื้อระยะมีเพศ ต่อมาภายหลังที่ Trager และ Jensen (1976) ได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อฟัลซิปารัมในหลอดทดลองได้สำเร็จ วิธีการเพาะเลี้ยงนี้ทำได้ง่าย อีกทั้งสามารถเพิ่มจำนวนเชื้อให้เพียงพอกับการทดลองด้านต่าง ๆ จึงมีผู้ดัดแปลงวิธีการดังกล่าวเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศ และศึกษาถึงปัจจัยสำคัญของการเจริญของเชื้อระยะมีเพศ โดยคาดหวังว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่พัฒนาขึ้นจะใช้ได้ดี และสามารถผลิตเชื้อระยะมีเพศได้เป็นจำนวนมาก เช่น Carter and Beach, 1977; Carter and Miller, 1973 และ Ponnudurai et al, 1982 พบว่าการไม่เติมเลือดใหม่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จะกระตุ้นให้เกิดเชื้อระยะมีเพศจำนวนมากได้ Kaushal et al, 1980 สามารถกระตุ้นการเกิดเชื้อระยะมีเพศได้โดยการเติม cyclic AMP ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ifediba และ Vanderberg, 1981 พบว่าถ้าเติมไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 สามารถใช้เลี้ยงเชื้อระยะมีเพศให้เจริญเต็มที่ ซึ่งเมื่อนำไปให้ยุงดูด จะทำให้ยุงติดเชื้อไข้มาลาเรียได้ Brockelman, 1982 พบว่าการเติมคาเฟอีน (caffeine) ในปริมาณ 20 mM ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถกระตุ้นให้เกิดเชื้อระยะมีเพศในจานเพาะเลี้ยงได้ แต่ cyclic AMP และไฮโปแซนทีน ไม่มีผลต่อการเกิดเชื้อระยะมีเพศ นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Ponnudurai et al 1982 และ Graves et al 1984 ยังพบว่าอัตราการเกิดเชื้อระยะมีเพศของไอโซเลทต่าง ๆ ยังแตกต่างกัน (และช่วงเวลาที่เชื้อสามารถเกิดระยะมีเพศในจานเพาะเลี้ยง) บางไอโซเลทสามารถเกิดเชื้อระยะมีเพศได้เฉพาะในช่วงเดือนแรกที่เริ่มเพาะเลี้ยง หรือบางไอโซเลทอาจจะสามารถเกิดได้นานกว่า 1 ปี

จากการศึกษาทางด้านพันธุกรรมของเชื้อไข้มาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม พบว่าเชื้อไข้มาลาเรีย ไอโซเลทหนึ่ง ๆ อาจจะประกอบด้วยเชื้อหลายสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติทางชีววิทยาต่าง ๆ เช่น รูปแบบของไอโซไซม์ ความไวต่อยาที่ใช้รักษามาลาเรีย รูปแบบของโปรตีน (Thaithong et al 1984) และความแตกต่างในการเกิดเชื้อระยะมีเพศ (Graves et al, 1984) ดังนั้น การศึกษาถึงสายพันธุ์จึงสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการวิจัยมาลาเรียหลาย ๆ ด้าน เช่น การศึกษาด้านพันธุกรรม ชีวเคมี และการผลิตวัคซีนที่ต้องการเชื้อเป็นจำนวนมากที่มีคุณสมบัติทางพันธุกรรมเหมือนกัน

อนึ่ง แนวทางวิจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งทางด้านมาลาเรียคือ การผลิตวัคซีนป้องกันไข้มาลาเรียขึ้น แต่เนื่องจากวงจรชีวิตของไข้มาลาเรียมีลักษณะซับซ้อน มีทั้งช่วงชีวิตที่อยู่ในยุงและในคน เชื้อระยะต่าง ๆ เหล่านี้ยังมีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนแตกต่างกันด้วย (stage-specsific antigen) การผลิตวัคซีนจึงไม่อาจจะผลิตจากเชื้อไข้มาลาเรียทุกระยะได้ ทางองค์การอนามัยโลกได้สรุปว่า สามารถผลิตจากเชื้อระยะสปอโรซอยต์ที่ต่อมน้ำลายยุง ระยะเมอโรซอยต์ และเชื้อระยะมีเพศ ดังนั้น แนวทางการศึกษาเพื่อบรรลุจุดประสงค์ดังกล่าว จึงจำเป็นต้องอาศัยเชื้อฟัลซิปารัมสายพันธุ์ที่มีอัตราการเกิดเชื้อระยะมีเพศค่อนข้างสูง เมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และมีความสม่ำเสมอต่อเนื่องเพื่อให้ได้จำนวนเชื้อระยะมีเพศจำนวนเพียงพอในการศึกษาวิจัยต่อไป

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเกิดเชื้อระยะมีเพศของเชื้อฟัลซิปารัมสายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งถูกแยก และศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาบางประการแล้ว เช่น รูปแบบของไอโซไซม์ ความไวต่อยารักษามาลาเรีย และรูปแบบของโปรตีน เป็นต้น พร้อมทั้งศึกษาถึงความสม่ำเสมอ และต่อเนื่องของการเกิดเชื้อระยะมีเพศนั้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีอัตราการเกิดเชื้อระยะมีเพศสูง และมีความสม่ำเสมอต่อเนื่องเมื่อเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลานาน หรือเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวนี้ สามารถจะนำไปใช้ศึกษาวิจัยต่อไปได้อีกมาก อาทิเช่น เพื่อการศึกษาถึงความไวต่อยาของเชื้อระยะมีเพศศึกษาถึงการผลิตวัคซีน ซึ่งอาจผลิตได้จากเชื้อระยะมีเพศ หรือเชื้อระยะสปอโรซอยต์ที่ต่อมน้ำลายยุง และศึกษาเกี่ยวกับพาหะนำโรค เพื่อการป้องกัน และกำจัดต่อไป

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

เชื้อพลาซิปารัม

เชื้อพลาซิปารัมสายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ CH_{150-1}, CH_{150-3}, CH_{150-4}, CH_{150-5} และ CH_{150-6} แยกจากไอโซเลท CH_{150} ในปี ค.ศ. 1984 CH_{150R-4} และ CH_{150R-5} แยกจากไอโซเลท CH_{150R} ในปี ค.ศ. 1984 TM_{52-9} และ TM_{52-10} แยกจากไอโซเลท TM_{52} ในปี ค.ศ. 1986 เชื้อพลาซิปารัมเหล่านี้ถูกแยกโดย รศ. สดศรี ไทยทอง และได้ศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาคือ (Thaithong, et al, 1985) เก็บรักษาอยู่ที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยร่วมองค์การอนามัยโลก เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อไข้มาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เชื้อพลาซิปารัมไอโซเลท NF_{54} (Amsterdam airport strain) ซึ่งมีอัตราการเกิดระยะมีเพศค่อนข้างสูง และพบการเกิดเอ็กซแฟลจิลล่า (exflagellation) ของไมโครแกมีโตไซต์ เมื่อเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยความอนุเคราะห์ของ Dr. V. Rosario

การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เชื้อพลาซิปารัมถูกเพาะเลี้ยงไว้ด้วยวิธีของ Trager & Jensen (1976) โดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งประกอบด้วย RPMI 1640, Hepes buffer 25 mM, gentamycin 40 mg/lit 0.2% $NaHCO_3$ และ 10% ซีรัมของคน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง และเติมเม็ดเลือดแดงที่ปราศจากเชื้อทุก 4 วัน

การเก็บรักษาเชื้อพลาซิปารัมไว้ในไนโตรเจนเหลว นำเชื้อพลาซิปารัมที่ต้องการเก็บรักษามาปั่นแยกเฉพาะส่วนเม็ดเลือดแดง แล้วผสมลงในสารละลายสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (cryopreservative solution) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วใส่ในหลอดพลาสติคขนาดบรรจุ 3 มล. จำนวน 0.3 มล. แล้วเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิ -176 องศา ซ.

สารละลายสำหรับเก็บรักษาเชื้อประกอบด้วย สารละลายของ 4.2% sorbitol ที่ละลายด้วย 0.9% NaCI จำนวน 180 มล. และ glycerol จำนวน 70 มล.

การนำเชื้อฟัลซิปารัมที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมาเพาะเลี้ยง นำหลอดที่ใส่เชื้อฟัลซิปารัมจากถังไนโตรเจนเหลว แช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 40-45 องศา ซ. อย่างรวดเร็วประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงละลายเป็นของเหลว แล้วใส่ในสารละลาย 3.5% NaCI ปริมาณ 1.5 เท่าของปริมาตรเม็ดเลือดแดงผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นแยกเม็ดเลือดแดง และล้างเม็ดเลือดแดงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่ใส่ $NaHCO_3$ และซีรั่มอีก 2.3 ครั้ง หรือจนกระทั่งไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง นำส่วนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อฟัลซิปารัมนี้ผสมด้วยเม็ดเลือดที่ไม่มีเชื้อในอัตราส่วน 1:1 แล้วเพาะเลี้ยงไว้ในจานเพาะเลี้ยงต่อไป

การเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศ

เชื้อฟัลซิปารัมที่นำมาศึกษานี้ได้จากการเพาะเลี้ยง ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในระยะรูปวงแหวน ลักษณะรูปร่างดี มีจำนวนเชื้อประมาณ 5% นำมาปั่นแยกเม็ดเลือดแดงด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมเม็ดเลือดแดงที่ปราศจากเชื้อที่มีอายุไม่เกิน 4 วัน ประมาณ 10 เท่า เพื่อให้ได้จำนวนเชื้อลดลงเหลือประมาณ 0.5-2% (0.5-2% parasitaemia) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีจำนวนเม็ดเลือดแดงต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 5-6% โดยปริมาตร (5-6% haematocrit) เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 14-16 วัน การเพาะเลี้ยงนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคือ RPMI 1640 และ RPMI 1640 + Hypoxanthine ด้วยวิธีการต่างกัน 3 วิธี คือ

วิธีที่ 1 เพราะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 35 มม. ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 มล./จาน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง

วิธีที่ 2 เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเหมือนวิธีที่ 1 แต่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อวันละ 2 ครั้งในช่วงวันที่ 3 ถึง 6

วิธีที่ 3 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างจากวิธีที่ 1 และ 2 คือ ไม่ใส่แอนตี้ไบโอติค และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณอาหารดังนี้ ในช่วงวันที่ 1 ถึง 3 ใช้ 1.5 มล./จาน วันที่ 4 ถึง 14 เพิ่มปริมาณเป็น 2.5 มล./จาน

ศึกษาการเกิดเอ็กซแฟลวิลล่าของไมโครแกมมีโตไซต์

นำเชื้อระยะมีเพศต้องการศึกษามาปั่นด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วเติมซีรั่มปริมาณที่จะทำให้อัตราส่วนของเม็ดเลือดแดง : ซีรั่ม = 4 : 10 ผสมให้เข้ากันหยดบนกระจกสไลด์ 25 ml ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ขนาน 22x22 มม. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ในกล่องเก็บความชื้น แล้วนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x40 เท่า

วิธีการนับจำนวนการเกิดเอ็กซแฟลจิลล่าทำ 2 วิธี คือ

วิธีที่ 1 ในกรณีที่เกิดเอ็กซแฟลจิลล่าน้อย (1-20 ตัว/เลือด 25) นับจำนวนต่อเลือด 25 (โดยตรวจดูทั่วแผ่นสไลด์) ใช้สัญญาลักษณ์ในการบันทึกผล ดังนี้

\+ หมายถึง เกิดเอ็กซแฟลวิลล่า

\- หมายถึง ไม่เกิดเอ็กซแฟลจิลล่า

วิธีที่ 2 ในกรณีที่เกิดเอ็กซแฟลจิลล่ามาก นับจำนวนเอ็กซแฟลจิลล่าต่อ 100 วงกล้อง (1 วงกล้อง เท่ากับ 2,000 เม็ดเลือดแดง)

ผลการวิจัย

1. เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศ 3 วิธี

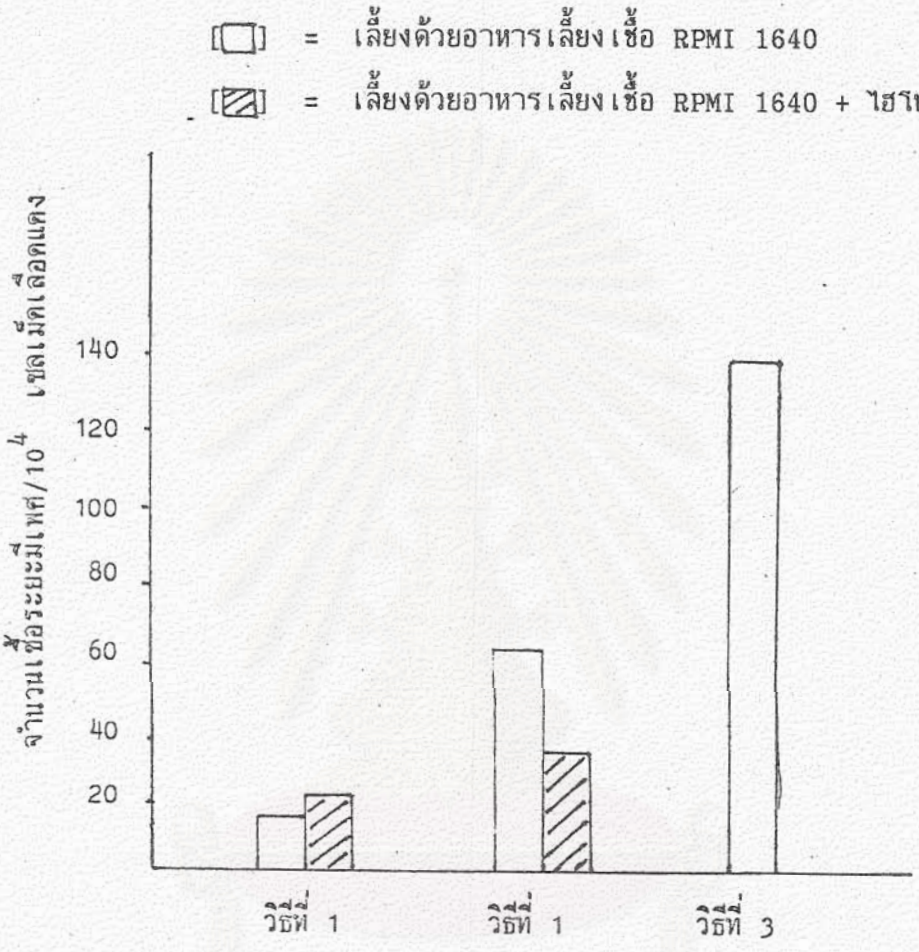
ผลการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศของสายพันธุ์ CH_{150-3}, CH_{150-4}, CH_{150-6}, TM_{52-9} และ TM_{52-10} ในช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง 8-53 สัปดาห์ (ตารางที่ 1) พบว่า วิธีที่ 1 ได้จำนวนเชื้อระยะมีเพศน้อย

เนื่องจาก ภายหลังการเพาะเลี้ยง 4-5 วัน จำนวนเชื้อระยะไม่มีเพศจะเพิ่มจำนวนสูงมาก อาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเลี้ยงจะเปลี่ยนสภาพเป็นกรดมาก การเปลี่ยนอาหารเพียงวันละครั้ง และไม่มีการเติมเลือดใหม่ลงไป ทำให้เชื้อเจริญเติบโตไม่ดี และตายไป แต่ในวิธีที่ 2 ผู้วิจัยได้ดัดแปลงแก้ไขมาจากวิธีที่ 1 โดยการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ครั้ง/วัน ในช่วงที่จำนวนเชื้อเพิ่มสูงสุดด้วยจำนวนอาหารเลี้ยงเชื้อเท่าเดิม ปรากฏว่าจำนวนเชื้อระยะมีเพศเพิ่มขึ้นสูงกว่าวิธีที่ 1 แต่การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่อยขึ้น อาจทำให้อุณหภูมิซึ่งต้องคงที่ตลอดเวลาเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ดังนั้น ผู้วิจัย จึงทำการทดลองเปรียบเทียบด้วยวิธีการที่ 3 โดยการเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 เท่า พบว่าเชื้อระยะมีเพศเจริญดี และการไม่เพิ่มแอนตี้ไบโอติคลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ และสามารถทดสอบได้โดยการทดสอบการเกิดเอ็กซแฟลจิลล่าของไมโครแกมมีโตไซต์ จากการเปรียบเทียบการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม และไม่ผสมไฮโปแซนทีนในวิธีที่ 1 และ 2 ปรากฏว่าได้ผลใกล้เคียงกัน แสดงผลในภาพที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อระยะมีเพศในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการต่างกัน 3 วิธีด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ 5 สายพันธุ์ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

สายพันธุ์	ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง (สัปดาห์)	จำนวนเชื้อระยะมีเพศ/10,000 เซลเม็ดเลือดแดง					
		วิธีที่ 1		วิธีที่ 2		วิธีที่ 3	
		RPMI 1640	RPMI 1640 + Hypoxanthine	RPMI 1640	RPMI 1640 + Hypoxanthine	RPMI 1640	RPMI 1640 + Hypoxanthine
CMiso-3	16	6.5	6.5	-+	-	-	-
	23	-	-	44.0	0	-	-
	26	-	-	15.5	25.5	-	-
	32	-	-	100.0	9.5	-	-
	50	-	-	-	-	87.5	-
	53	-	-	-	-	60.0	-
CMiso-4	8	6.5	-	-	-	-	-
	16	13.0	-	-	-	-	-
	23	-	-	23.0	-	-	-
	26	-	-	15.5	25.5	-	-
	50	-	-	-	-	178.5	-
	53	-	-	-	-	131.0	-
CMiso-6	8	15.5	2.5	-	-	-	-
	16	26.0	11.5	-	-	-	-
	22	-	-	84.5	-	-	-
	26	-	-	9/5	1.0	-	-
	32	-	-	324.0	181.5	-	-
	50	-	-	-	-	108.0	-
	53	-	-	-	-	33.5	-
TMs2 C8	8	3.0	0	-	-	-	-
	15	-	-	24.5	-	-	-
	18	-	-	9.5	22.0	-	-
	24	-	-	4.0	7.0	-	-
	42	-	-	-	-	392.5	-
	45	-	-	-	-	39.5	-
TMs2 C10	8	21.0	71.0	-	-	-	-
	15	-	-	311.0	-	-	-
	18	-	-	32.5	36.5	-	-
	24	-	-	11.0	36.5	-	-
	42	-	-	-	-	228.0	-

+ หมายเหตุ หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศ 3 วิธี ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ และไม่ใส่ไฮโปแซนทีน ผลการทดลองได้สรุปจากเชื้อพลาซิปารัม 5 สายพันธุ์ จำนวนเชื้อระยะมีเพศในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง (วิธีที่ 3 ได้ทดสอบเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่ไฮโปแซนทีน)

2. เปรียบเทียบการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ และไม่ใส่ไฮโปแซนทีน

ในการทดลองนี้ได้ใช้ไฮโซเลท NF_{54} ซึ่งได้ถูกเพาะเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 3, 10 และ 12 สัปดาห์ นับจากที่ได้รับจาก Dr. V. Rosario ทดสอบด้วยวิธีที่ 3 ศึกษาผลการทดลองในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง แสดงผลในตารางที่ 2 และภาพที่ 2 ผลการทดลองสรุปได้ว่า การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดนี้ได้ผลไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ และไม่ใส่ไฮโปแซนทีนของไปโซเลท NPS_4 ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ 4-6 ครั้ง

ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง (สัปดาห์)	RPMI 1640 จำนวนเชื้อระยะมีเพศ/10^4 เม็ดเลือดแดง				การเกิด * เอ็กซ์แฟลาเจลล่า	RPMI 1640 + ไฮโปแซนทีน จำนวนเชื้อระยะมีเพศ/10^4 เม็ดเลือดแดง				การเกิด เอ็กซ์แฟลาเจลล่า
	ระยะที่ 1 - 4	ระยะที่ 5 ไมโครแกม มีโดไซต์	ระยะที่ 5 แมคโคร แกมมีโดไซต์	รวม	a(+), b(-)	ระยะที่ 1 - 4	ระยะที่ 5 ไมโครแกม มีโดไซต์	ระยะที่ 5 แมคโคร แกมมีโดไซต์	รวม	a(+), b(-)
3	245.83	15.83	50.5	312.17	6(+),0(-)	271.00	3.67	36.67	311.33	2(+), 4(-)
10	97.33	5.67	31.33	314.33	2(+),4(-)	88.33	15.83	42.17	146.33	3(+), 3(-)
12	108.50	13.50	64.50	186.50	3(+),1(-)	91.00	13.50	59.75	164.25	3(+), 1(-)

หมายเหตุ * การบันทึกผลการเกิดเอ็กซ์แฟลาเจลล่าใช้สัญญาลักษณ์

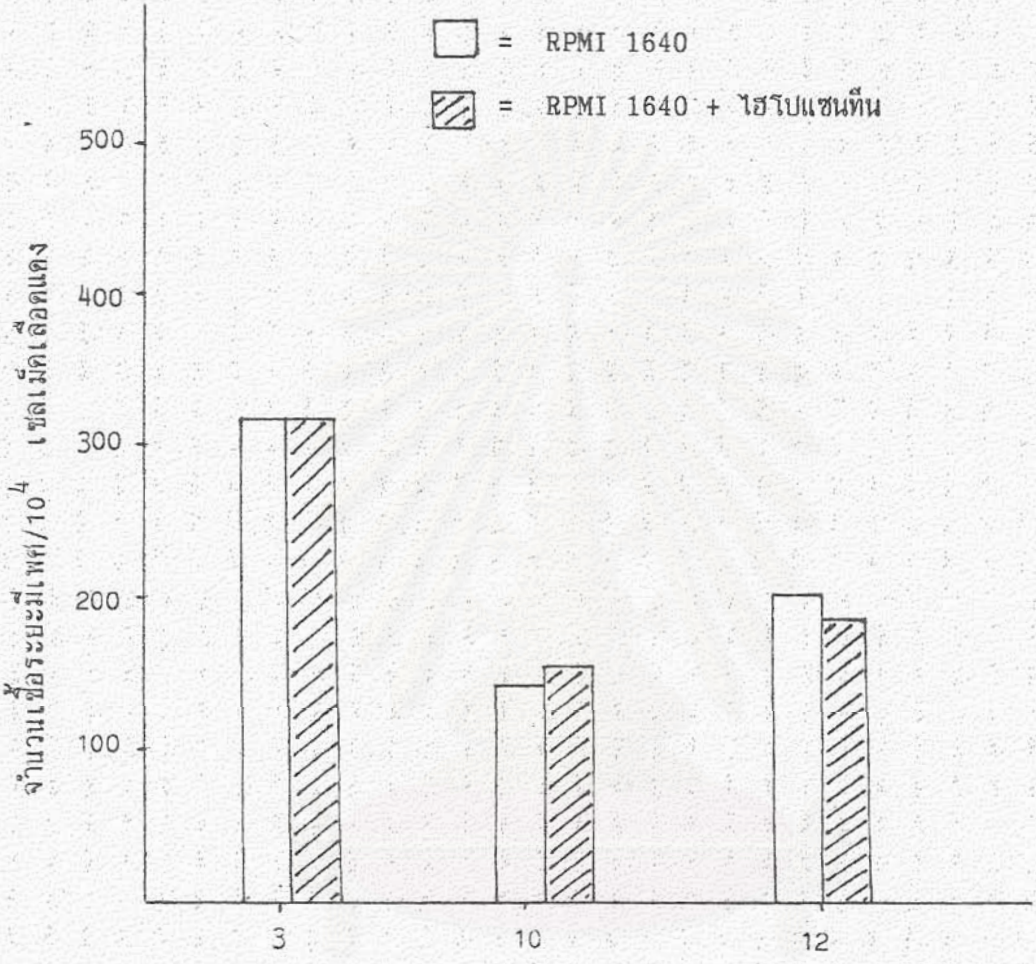
\+ หมายถึง พบการเกิดเอ็กซ์แฟลาเจลล่าน้อยกว่า 20 ตัวในเลือก 20

\- หมายถึง ไม่พบการเกิดเอ็กซ์แฟลาเจลล่า

a จำนวนซ้ำของการทดลองที่พบการเกิดเอ็กซ์แฟลาเจลล่า

b จำนวนซ้ำของการทดลองที่ไม่พบการเกิดเอ็กซ์แฟลาเจลล่า

a+b จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง



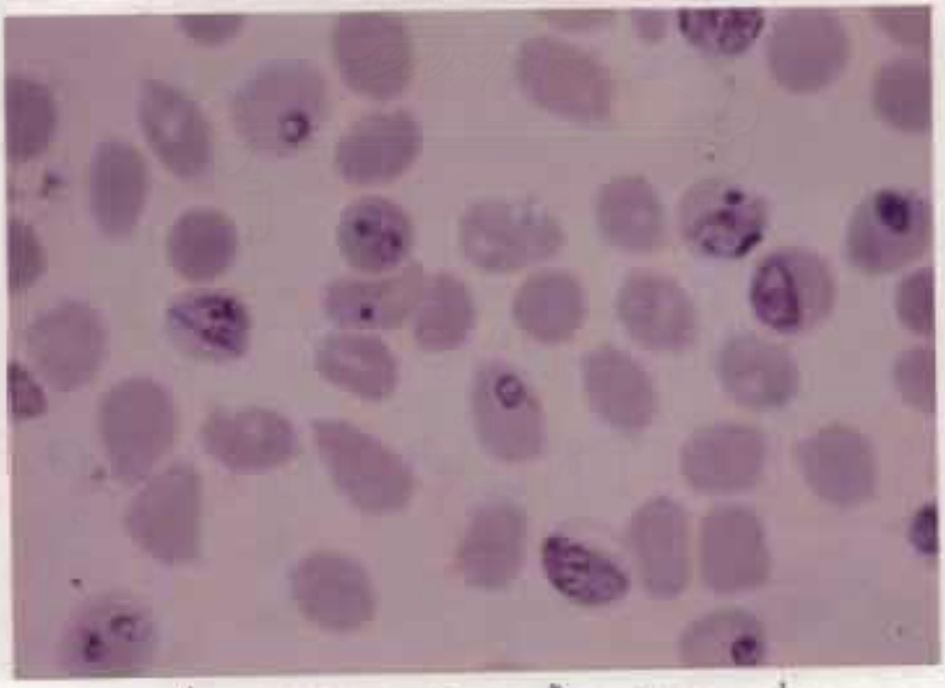
ภาพที่ 2 เปรียบเทียบการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 และ RPMI 1640 + ไฮโปแซนทีน ในการเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศของไอโซเลท NF_{54}

3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อระยะมีเพศ

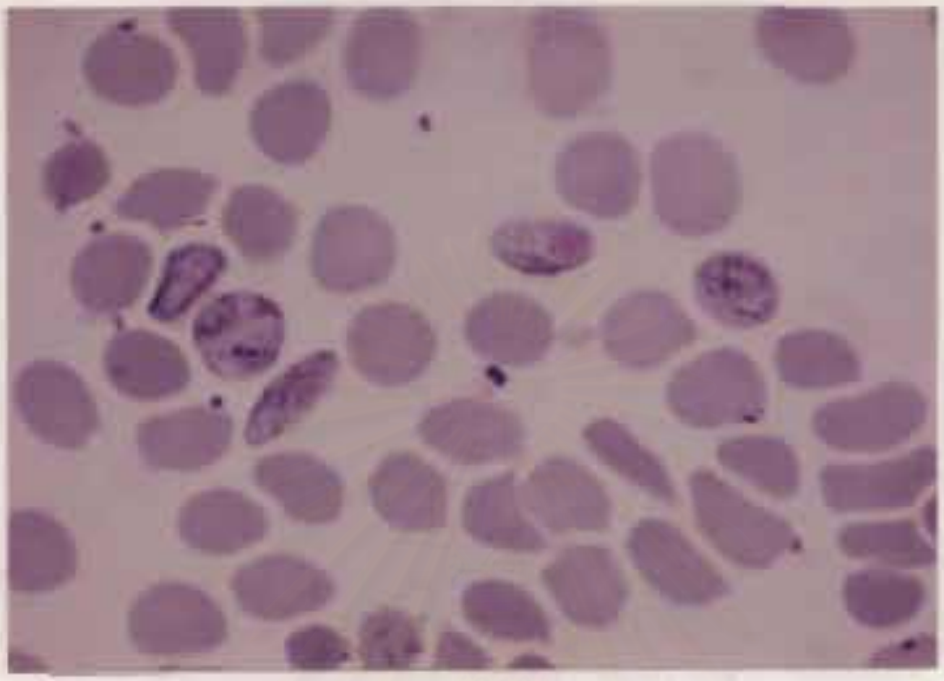
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อระยะมีเพศ โดยนับจำนวนเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 2,3,4 และ 5 (Carter & Miller, 1979) ของวันที่ 3,5,7,9,11,13,15,16, 17 ของการเพาะเลี้ยง โดยใช้สายพันธุ์ CR1se-s ดังแสดงผลในตารางที่ 3 และ ภาพที่ 8 ซึ่งผลการนับจำนวนเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง

ตารางที่ 3 และภาพที่ 8 พบว่า เชื้อระยะมีเพศระยะ 2 เกิดจำนวนมากที่สุด ในช่วงวันที่ 7-11 ของการเพาะเลี้ยงแล้วเชื้อระยะ 2 นี้จะเจริญเป็นระยะ 3,4 และ 5 ตามลำดับ โดยจะพบว่าในวันที่ 15 จะมีจำนวนเชื้อระยะมีเพศสูงสุด คือ 395.75/10,000 เซลเม็ดเลือดแดง และในวันที่ 16 พบจำนวนเชื้อระยะ 5 สูงสุดคือ 162/10,000 เซลเม็ดเลือดแดง หรือ 46.45% ของจำนวนเชื้อระยะมีเพศทุกระยะ

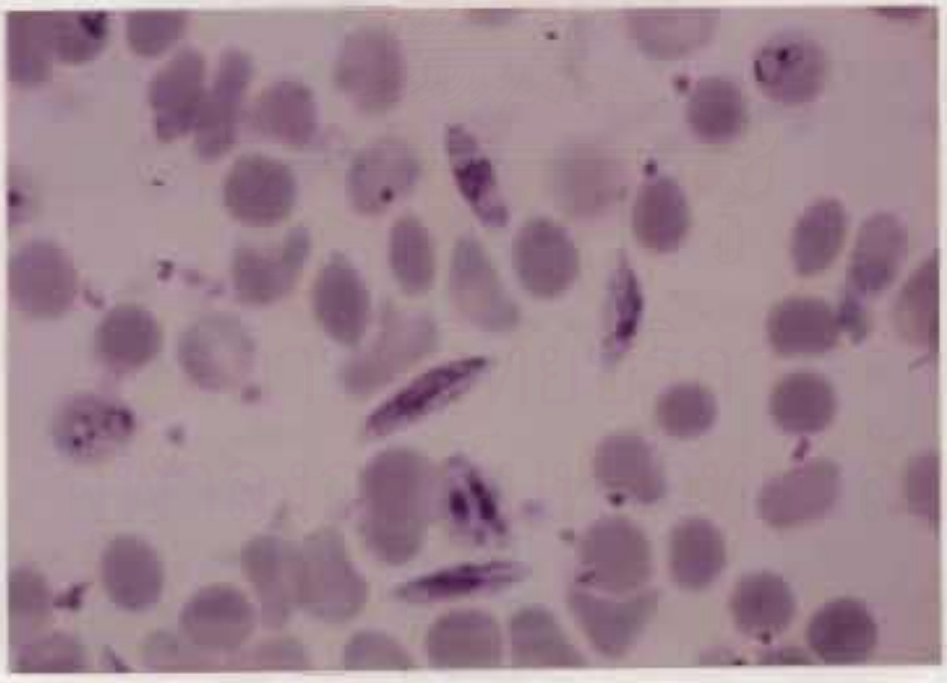
ลักษณะรูปร่างของเชื้อระยะมีเพศ ระยะที่ 2,3,4,5 และการเกิดเม็กซแฟคจิลล่าของไมโครแกมีโตไซต์ ภาพที่ 3,4,5,6,7 ตามลำดับ



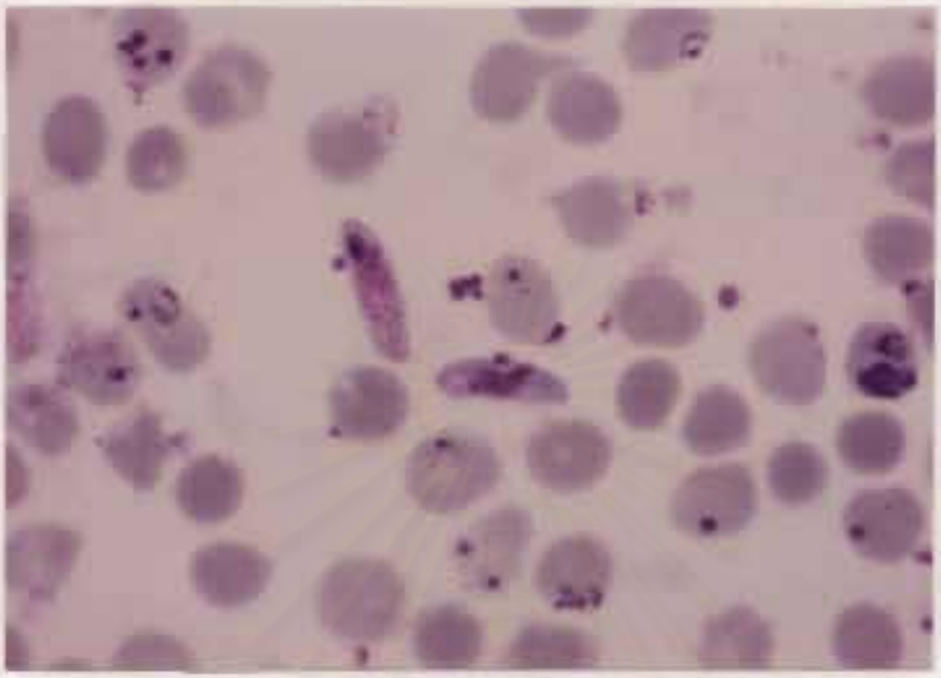
รูปที่ 3 แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 2



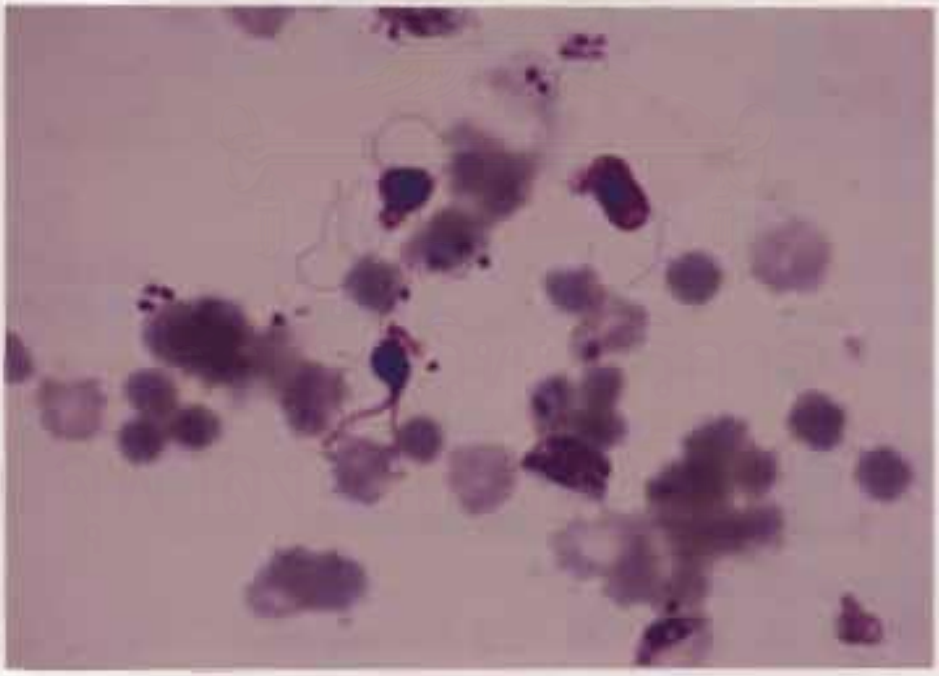
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 3



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 4



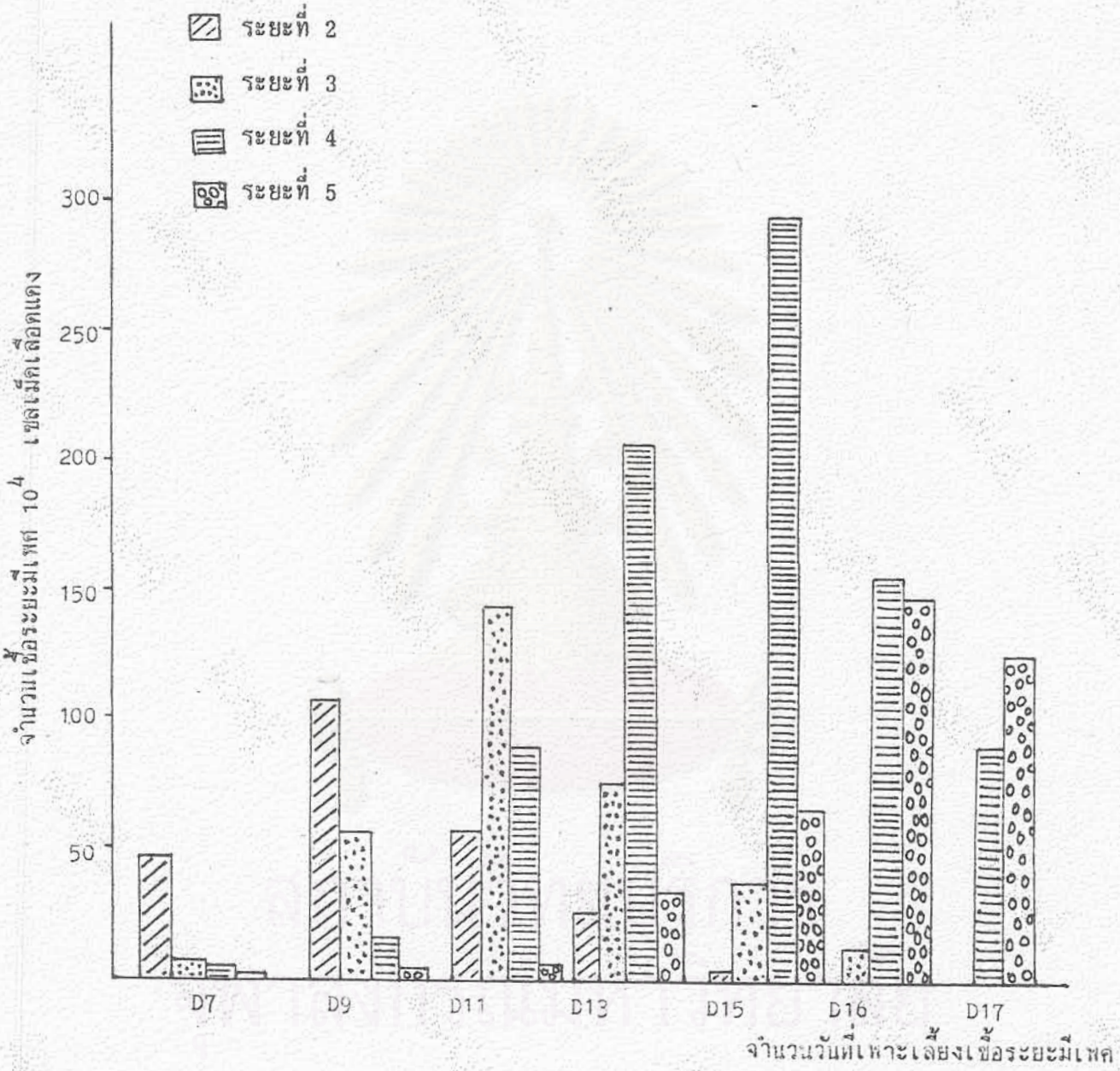
ภาพที่ 6 แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 5



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะรูปร่างของการเกิดเอ็กซแฟลเจลล่าของไมโครแกมีโตไซต์

ตารางที่ 3 แสดงการเกิดเชื้อระยะที่มีเพศระยะที่ 2,3,4 และ 5 ของเชื้อพลัซิบารัม สายพันธุ์ CH_{150-5} ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง

จำนวนวันที่เพาะเชื้อระยะมีเพศ	จำนวนเชื้อระยะมีเพศ/10^4 เซลเม็ดเลือดแดง				
	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3	ระยะที่ 4	ระยะที่ 5	รวม
3	1.0	0.50	1.75	0	3.25
5	2.0	0.75	0.5	1.25	4.5
7	43.0	5.75	4.75	0.25	53.75
9	116.0	56.0	8.75	0.5	181.25
11	56.0	144.75	76.5	3.25	280.5
13	19.5	83.0	216.50	31.5	350.5
15	1.25	28.25	297.5	68.75	395.75
16	0	13.0	173.75	162.0	348.75
17	1.0	0	81.75	119.25	202.0



ภาพที่ 8 แสดงการเกิดเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 2,3,4 และ 5 ของเชื้อ
- ฟัลซิปารัม สายพันธุ์ CHP150-5 ในวันที่ 7,9,11,13,15,16,17
ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งแต่ละค่าเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง

4. ความแตกต่างของการเกิดเชื้อระยะมีเพศระหว่างสายพันธุ์

จากผลการทดลองในข้อที่ 1,2 และ 3 ผู้วิจัยได้เลือกใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศ วิธีที่ 3 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่ไม่ใส่ไฮโปแซนทีน และแอนตี้ไบโอติค ทดสอบ และเปรียบเทียบการเกิดเชื้อระยะมีเพศของสายพันธุ์ต่าง ๆ แสดงผลในตารางที่ 4

สายพันธุ์ CH_{150-1}, CH_{150-3}, CH_{150-4}, CH_{150-5} และ CH_{150-6} ซึ่งได้ถูกแยกจากไอโซเลท CH_{150} ในปี ค.ศ. 1984 แล้วเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวได้ถูกนำมาเพาะเลี้ยง และทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยมีรายละเอียดดังนี้ สายพันธุ์ CH_{150-3}, CH_{150-4} และ CH_{150-6} ได้ถูกเก็บไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ปี 7 เดือน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงใหม่อย่างต่อเนื่อง และทดสอบการเกิดระยะมีเพศในช่วงสัปดาห์ที่ 50 และ 53 ต่อมา CH_{150-1}, CH_{150-4} และ CH_{150-6} ซึ่งถูกเก็บในไนโตรเจนเหลวรวมเวลา 2 ปี 7 เดือน (เก็บในไนโตรเจนเหลวในช่วงเวลาเดียวกัน) ได้ถูกนำมาเพาะเลี้ยงใหม่ และทดสอบในช่วงสัปดาห์ที่ 2,5 และ 13 อีกครั้งหนึ่ง ส่วนสายพันธุ์ CH150-5 ได้ถูกนำมาเพาะเลี้ยงและทดสอบในช่วงสัปดาห์ที่ 10-27 รวมเวลาที่ถูกเก็บในไนโตรเจนเหลว 2 ปี 5 เดือน

ผลการเปรียบเทียบการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์เหล่านี้ ซึ่งแยกจากไอโซเลทเดียวกัน พบว่า CH_{150-4}, CH_{150-5} และ CH_{150-6} มีอัตราการเกิดเชื้อระยะมีเพศสูง และเจริญไปเป็นเชื้อระยะมีเพศระยะที่ 5 ได้โดยมีอัตราส่วนของไมโครแกมมีโตไซต์ต่อแมคโครแกมมีโตไซต์เฉลี่ย 1 ต่อ 3 ถึง 1 ต่อ 5 ดังนั้น จึงเลือกสายพันธุ์ทั้ง 3 นี้เพื่อศึกษาถึงความสม่ำเสมอต่อเนื่อง

สายพันธุ์ CH_{150R-4} และ CH_{150R-5} ซึ่งถูกแยกจากไอโซเลท CH_{150R} ในปี ค.ศ. 1984 เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 2 ปี 6 เดือนแล้วถูกนำมาเพาะเลี้ยงและศึกษาการเก็บระยะมีเพศในช่วงสัปดาห์ที่ 16 และ 19 พบว่า มีอัตราการเกิดระยะมีเพศใกล้เคียงกันทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่ไม่พบการเกิดเอ็กซแฟลจิลล่า

สายพันธุ์ TM_{52-5} และ TM_{52-10} ซึ่งถูกแยกจากไอโซเลท TM_{52} ในปี ค.ศ. 1986 แล้วเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 2 เดือน แล้วถูกนำมาเพาะเลี้ยง และ

ทดสอบการเกิดระยะมีเพศในช่วงสัปดาห์ที่ 42 และ 45 พบว่า อัตราการเกิดระยะมีเพศของทั้ง 2 สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน และสามารถพบเอ็กซ์แฟลจิลล่าในสายพันธุ์ TM_{52-10} ส่วน TM_{52-9} ไม่พบ ซึ่ง TM_{52-10} ได้ถูกนำศึกษาถึงความสม่ำเสมอต่อเนื่องของการเกิดระยะมีเพศ

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการเกิดเชื้อระยะมีเพศของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ 9 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลา 2-53 สัปดาห์ ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ครั้ง

ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง (สัปดาห์)	จำนวนเชื้อระยะมีเพศ/10^4 เซลเม็ดเลือดแดง								
	CH_{150}-1	CH_{150}-3	CH_{150}-4	CH_{150}-5	CH_{150}-6	CH_{150R}-4	CH_{150R}-5	TH_{52}-9	TH_{52}-10
2	70.0	-	876.0	-	720.0	-	-	-	-
5	14.0	-	369.0	-	445.0	-	-	-	-
10	-	-	-	365.0	-	-	-	-	-
13	-	-	232.5	283.0	861.5	-	-	-	-
16	-	-	-	721.0	-	306.5	329.0	-	-
19	-	-	-	453.5	-	175.0	148.5	-	-
27	-	-	-	394.5	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	392.5	228.0
45	-	-	-	-	-	-	-	39.5	-
50	-	87.5	178.5	-	108.0	-	-	-	-
53	-	60.0	131.0	-	33.5	-	-	-	-
ค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อระยะมีเพศต่อ 10^4 เม็ดเลือดแดง	42.0	73.75	357.4	443.4	433.6	240.75	238.75	216.0	228.0
โมโนไซท : แมคโครนกผนึกไซต์	1:7	1:80	1:3	1:3	1:5	1:8	1:6	1:22	1:36
การเกิดเอ็กซ์แฟลจิลล่า	-	+	+	+	+	-	-	-	+

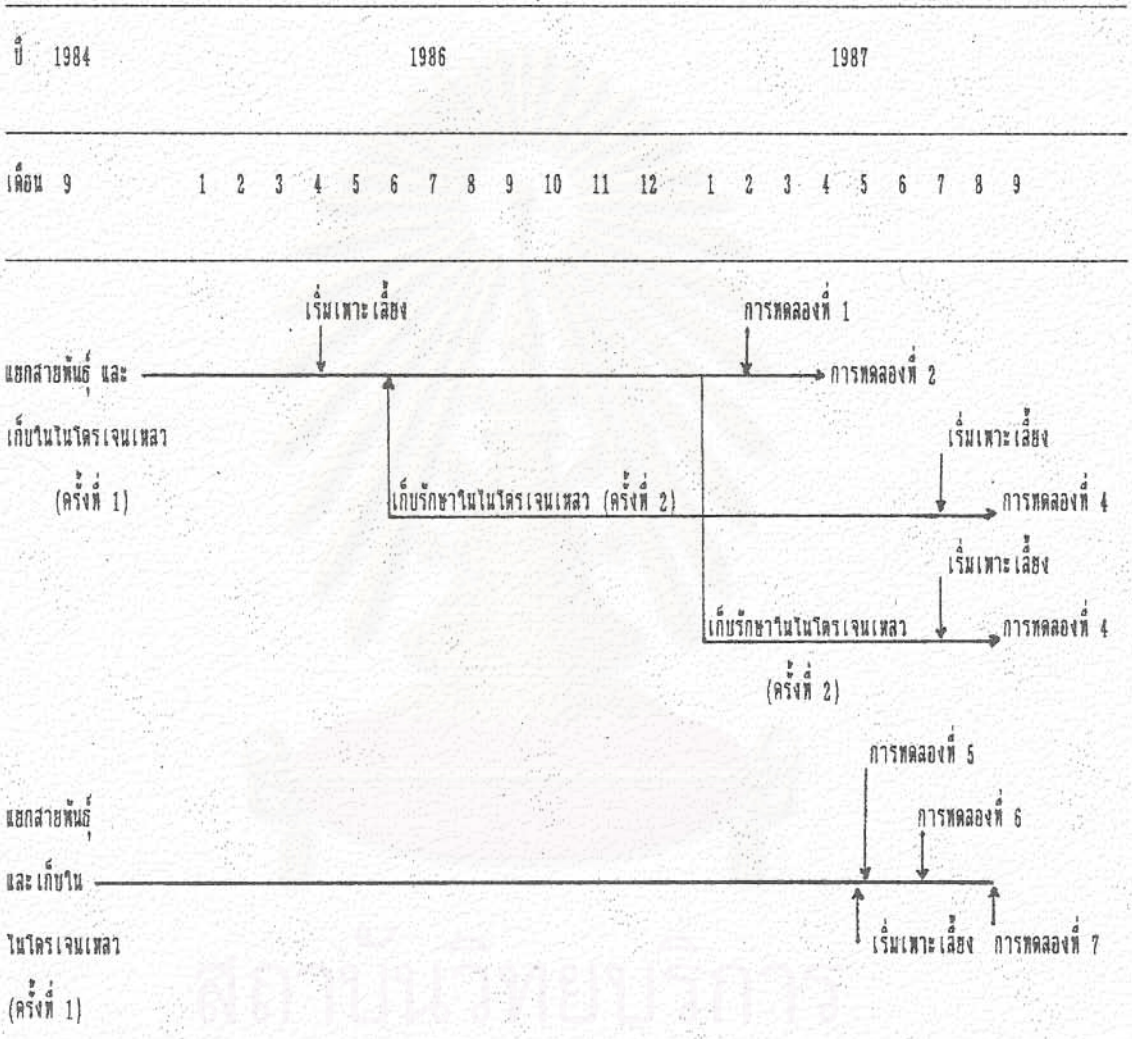
5. ศึกษาความสม่ำเสมอต่อเนื่องของการเกิดระยะมีเพศ

เชื้อพัลซิปารัมสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ถูกแยกจากไอโซเลทเก็บในไนโตรเจนเหลวครั้งที่ 1 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงใหม่เพื่อทดสอบ โดยเปรียบเทียบการเกิดระยะมีเพศของเชื้อที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องกับเชื้อที่ถูกเก็บในไนโตรเจนเหลวครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 รวมเวลาที่ศึกษาทั้งหมด 1 ปี 6 เดือน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5-9

จากการศึกษาการเกิดเชื้อระยะมีเพศโดยละเอียดของสายพันธุ์ CH150-4, CH150-5, CH150-6 และ TM52-10 (ตารางที่ 5-8) สามารถสรุปได้ว่า ในช่วงแรก ๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเกิดระยะมีเพศสูง และมีอัตราส่วนของไมโครแกมมีโตไซต์ต่อแมคโครแกมมีโตไซต์สูง (1 ต่อ 2 ถึง 1 ต่อ 12) และสามารถทดสอบการเกิดเอ็กซ์แฟลจิลล่าได้ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องไปเป็นเวลานาน อัตราส่วนของไมโครและแมคโคแกมมีโตไซต์จะลดลง (ไมโครแกมมีโตไซต์ต่อแมคโครแกมมีโตไซต์ของ CH150-4 เมื่อเพาะเลี้ยงไป 50 สัปดาห์ เท่ากับ 1 ต่อ 47, CH150-5 เมื่อเพาะเลี้ยงไป 27 สัปดาห์ เท่ากับ 1 ต่อ 40, CH150-6 เมื่อเพาะเลี้ยงไป 50 สัปดาห์ เท่ากับ 1 ต่อ 14 TM52-10 เมื่อเพาะเลี้ยงไป 42 สัปดาห์ เท่ากับ 1 ต่อ 36) และไม่พบการเกิดเอ็กซแฟลจิลล่า

สำหรับการเก็บเข้าในไนโตรเจนเหลวครั้งที่ 2 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงใหม่ พบว่าสายพันธุ์ CH150-4, CH150-5 และ CH150-6 มีอัตราการเกิดระยะมีเพศลดน้อยลงกว่าเชื้อที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ส่วนสายพันธุ์ TM52-10 (ตารางที่ 8) มีความแตกต่างของอัตราการเกิดระยะมีเพศในแต่ละครั้งที่นำออกมาเพาะเลี้ยงใหม่ โดยจะพบว่า การทดลองที่ 2 อัตราการเกิดระยะมีเพศต่ำกว่าการทดลองที่ 4 และ 7 และการทดลองที่ 8 ซึ่งเชื้อถูกเก็บในไนโตรเจนในช่วงที่พบมีอัตราการเกิดระยะมีเพศสูงในจานทดลอง (ดูตารางที่ 12) แต่เมื่อนำมาทดสอบใหม่ พบว่ามีอัตราการเกิดระยะมีเพศลดลงกว่าเดิม (การทดลองที่ 4)

ตารางที่ 5 แสดงระยะเวลาเริ่มทำการทดลองของสายพันธุ์ CH150-4

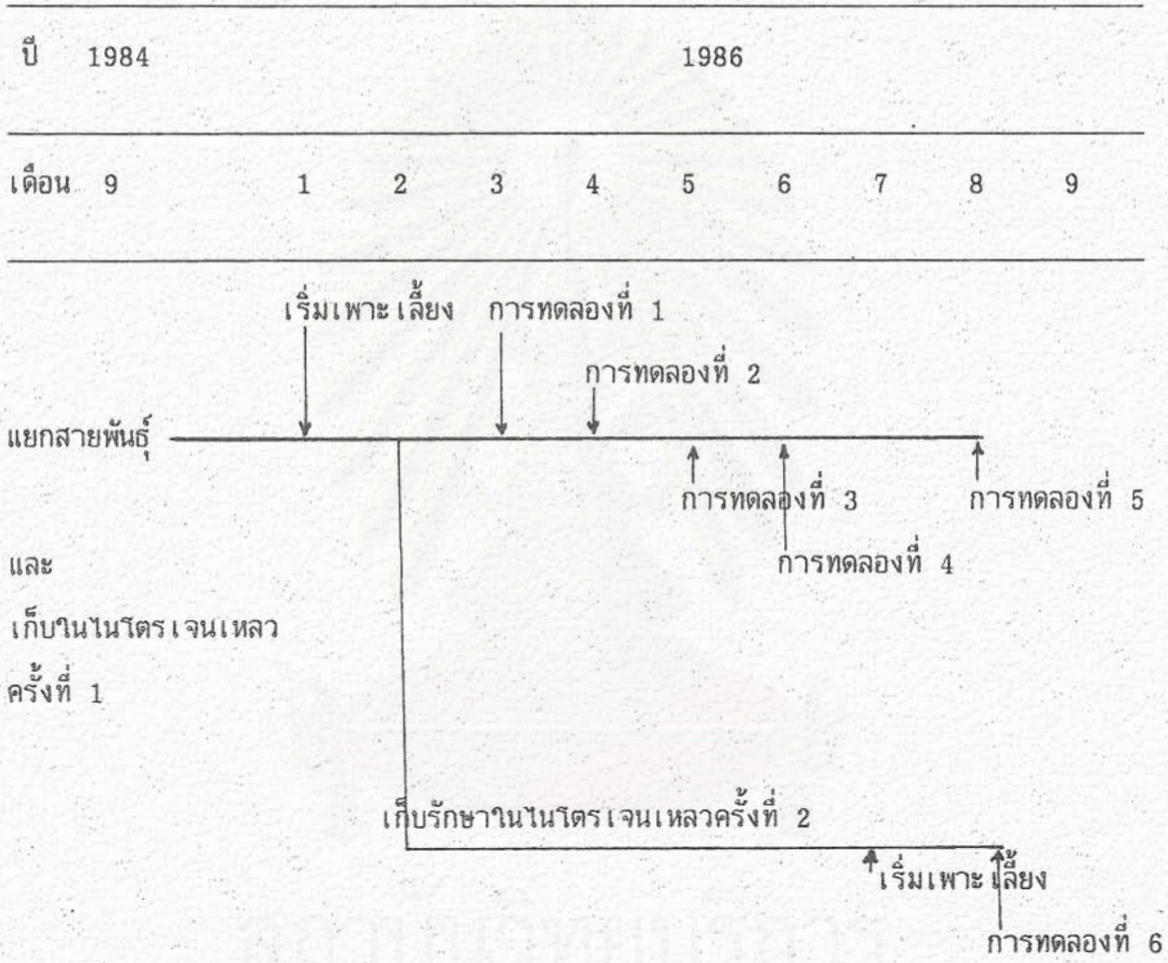


ตารางที่ 6 แสดงการเพาะเลี้ยงและการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์ CH_{150-4} ในช่วงเวลาต่าง ๆ

การทดลองที่	ระยะเวลาที่เก็บในไนโตรเจนเหลว ครั้งที่ 1	ระยะที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ครั้งที่ 1 (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เก็บในไนโตรเจน ครั้งที่ 1 (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ครั้งที่ 1 (สัปดาห์)	จำนวนเซื้อระยะมีเพศ/10^4 เม็ดเลือดแดง รวม	ระยะที่	ไมโคร:แมคโครแกมมีโตไซต์	การเกิดเอ็กซแพลจิลล่า
5	2 ปี 9 เดือน	2	0	0	876.0	681.0	1:3	45
6	"	5	0	0	369.0	215.0	1:2	19
7	"	13	0	0	232.5	65.0	1:15	-
1	1 ปี 7 เดือน	50	0	0	178.5	72.5	1:47	-
2	"	53	0	0	131.0	35.5	1:5	-
3	"	9	56	4	42.0	2.5	0	-
4	"	42	23	4	279.0	30.0	1:15	-

- = ไม่เกิดเอ็กซแพลจิลล่า

ตารางที่ 7 แสดงระยะเวลาเริ่มทำการทดลองของสายพันธุ์ CH_{150-5}

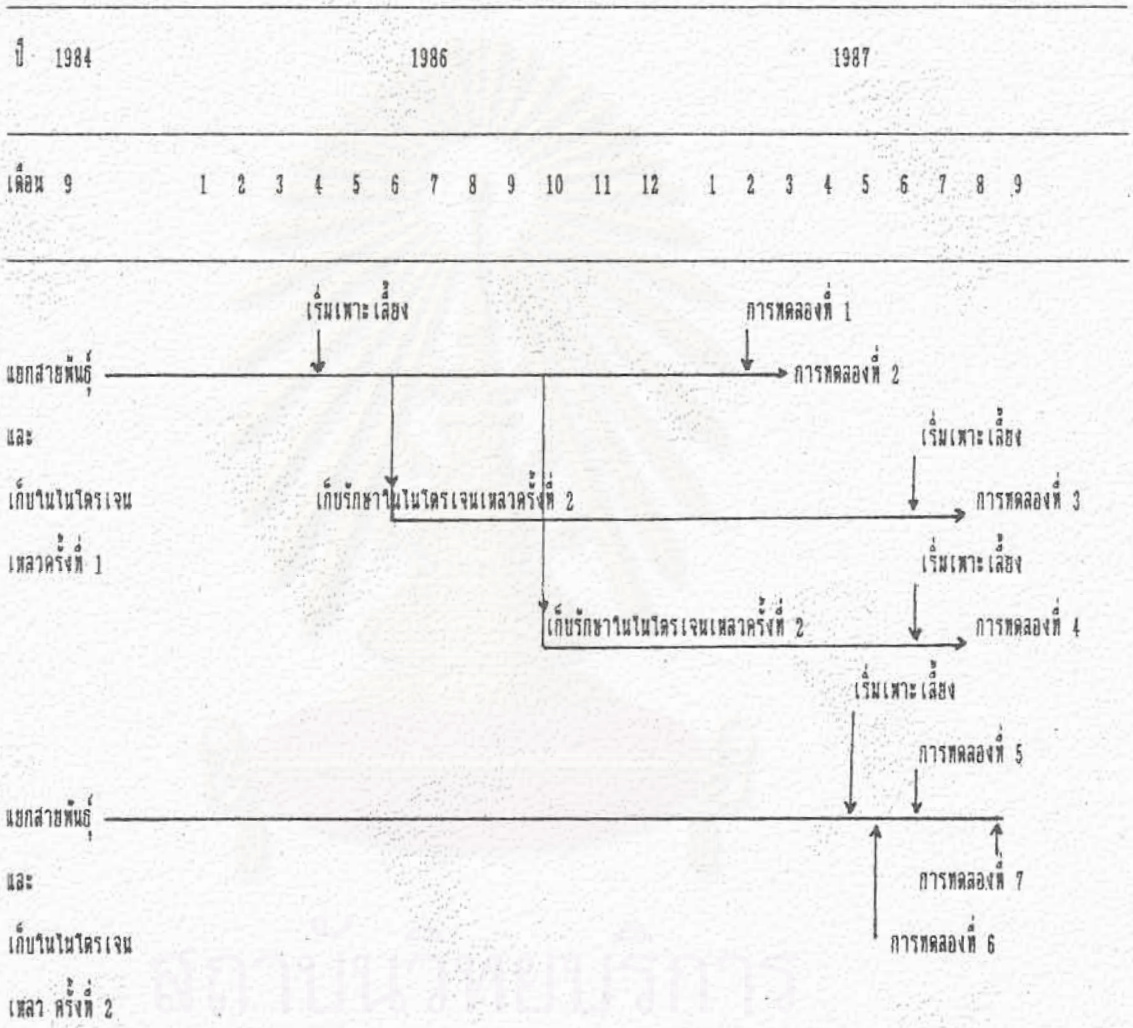


ตารางที่ 8 แสดงการเพาะเลี้ยงและการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์ CH_{150-5} ในช่วงเวลาต่าง ๆ

การทดลองที่	ระยะเวลาที่เก็บในไนโตรเจนเหลว ครั้งที่ 1	ระยะที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ครั้งที่ 1 (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เก็บในไนโตรเจน ครั้งที่ 1 (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ครั้งที่ 1 (สัปดาห์)	จำนวนเชื้อระยะมีเพศ/10^4 รวม	ระยะที่	เม็ดเลือดแดง ไมโคร:แมคโคร แกมมีโตไซต์	การเกิดเอ็กซแฟลจิลล่า
1	2 ปี 5 เดือน	10	0	0	365.0	252.0	1:2	30
2	"	13	0	0	283.0	146.0	1:4	25
3	"	16	0	0	721.0	565.5	1:4	15
4	"	19	0	0	453.5	66.5	1:2	18
5	"	27	0	0	394.5	61.5	1:40	-
6	"	4	20	4	17.0	1.5	0	-

- = ไม่เกิดเอ็กซแฟลจิลล่า

ตารางที่ 9 แสดงระยะเวลาเริ่มทำการทดลองของสายพันธุ์ CH1so-6



ตารางที่ 10 แสดงการเพาะเลี้ยงและการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์ CH_{150-6} ในช่วงเวลาต่าง ๆ

การทดลองที่	ระยะเวลาที่เก็บในไนโตรเจนเหลว ครั้งที่ 1	ระยะที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ครั้งที่ 1 (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เก็บในไนโตรเจน ครั้งที่ 2 (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ครั้งที่ 2 (สัปดาห์)	จำนวนเชื้อระยะมีเพศ/10^4 เม็ดเลือดแดง รวม	ระยะที่ 5	ไมโคร:แมคโครแกมีโตไซต์	การเกิดเอ็กซแฟลจิลล่า
5	2 ปี 9 เดือน	2	0	0	720.0	414.0	1:5	9
6	"	5	0	0	445.0	290.0	1:3	-
7	"	13	0	0	861.5	375.0	1:12	40.5
1	1 ปี 7 เดือน	50	0	0	108.0	47.5	1:14	-
2	"	53	0	0	33.5	7.5	0	-
3	"	9	56	4	7.0	0	0	-
4	"	25	40	4	28.0	0	0	-

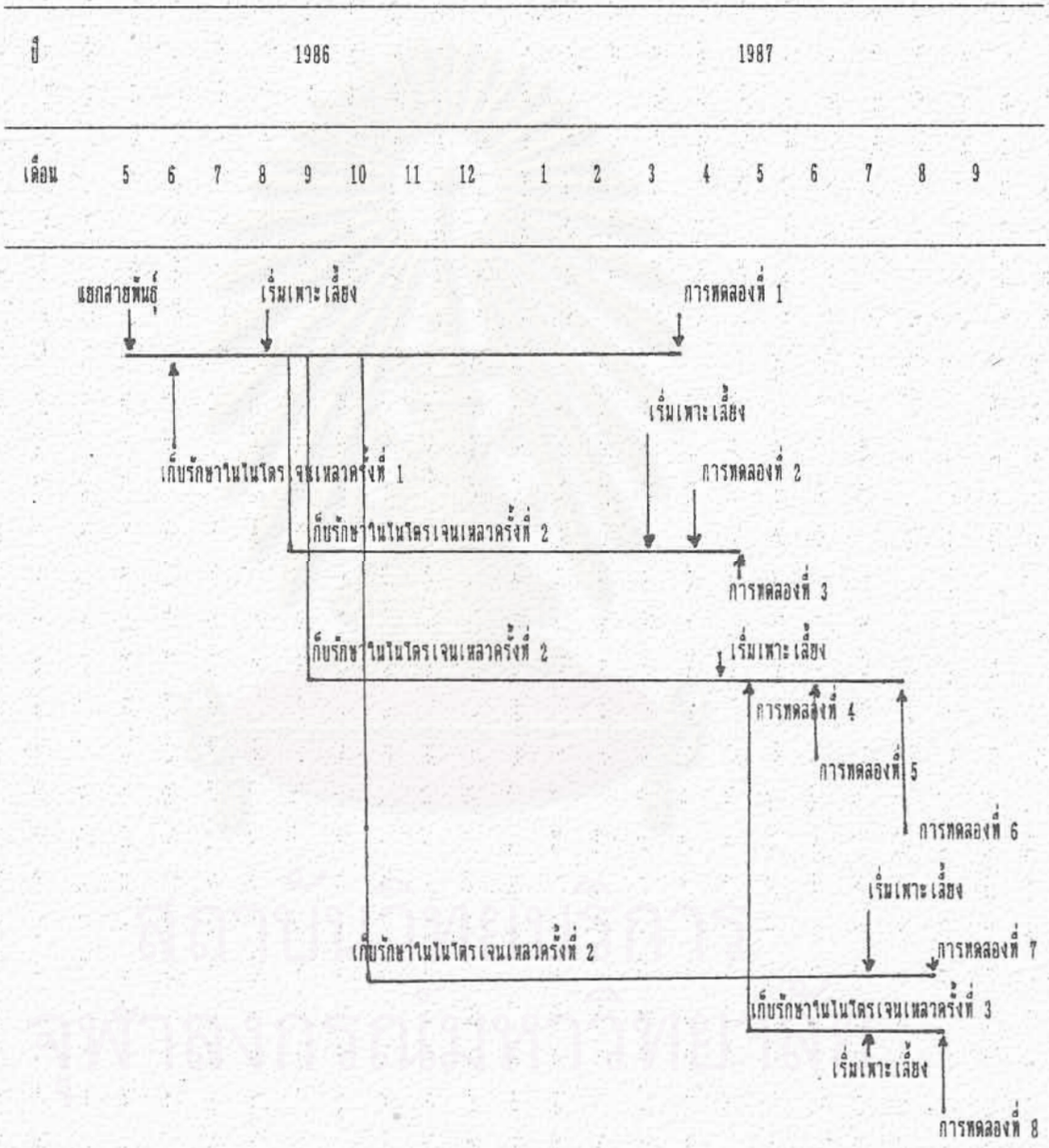
- = ไม่เกิดเอ็กซแฟลจิล่า

ตารางที่ 11 แสดงการเพาะเลี้ยงและการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์ TH$_{520-10}$ ในช่วงเวลาต่าง ๆ

การทดลองที่	ระยะเวลาที่เก็บในไนโตรเจนเหลว ครั้งที่ 1 (สัปดาห์)	ระยะที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องครั้งที่ 1 (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เก็บในไนโตรเจนเหลว ครั้งที่ 2 (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ครั้งที่ 2 (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เก็บในไนโตรเจนเหลว ครั้งที่ 3 (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ครั้งที่ 3 (สัปดาห์)	จำนวนเชื้อระยะมีเพศ/10^4 เม็ดเลือดแดง รวม	ระยะที่ 5	ไมโคร:แมคโคร แกมมีโตไซต์	การเกิดเอ็กซแฟลจิลล่า
1	8	42	0	0	0	0	228.0	169.5	1:36	+
2	8	2	29	3	0	0	56.0	26.5	1:52	-
3	8	2	29	6	0	0	21.0	2.0	0	-
4	8	3	36	2	0	0	790.5	660.5	1:11	2
5	8	3	36	5	0	0	323.0	149.5	1:9	-
6	8	3	36	14	0	0	661.0	671.0	1:10	-
7	8	10	37	4	0	0	600.0	53.0	1:20	-
8	8	3	36	1	7	4	197.0	22.0	1:8	-

- = ไม่เกิดเอ็กซแฟลจิลล่า

ตารางที่ 12 แสดงระยะเวลาเริ่มทำการทดลองของสายพันธุ์ TMs2-10



ลัก
ว16.9
ม270
ส530
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....1370
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ตารางที่ 13 แสดงการเพาะเลี้ยงและการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์ CH_{150}-1, CH_{150}-3, CH_{150R}-4, CH_{150R}-5,

สายพันธุ์	ระยะเวลาที่เก็บในไนโตรเจนเหลว ครั้งที่ 1	ระยะที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ครั้งที่ 1 (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เก็บในไนโตรเจนเหลว ครั้งที่ 2 (สัปดาห์)	ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ครั้งที่ 2 (สัปดาห์)	จำนวนเชื้อระยะมีเพศ/10^4 เม็ดเลือดแดง รวม	ระยะที่	ไมโคร:แมคโครแกมมีโตไซต์	การเกิดเอ็กซแฟลจิลล่า
CH_{150}-1	2 ปี 9 เดือน	2	-	-	70.0	28.0	1:3	-
	"	5	-	-	14.0	0	0	-
CH_{150}-3	1 ปี 7 เดือน	50	-	-	87.5	73.0	1:145	+
	"	53	-	-	60.0	48.5	1:50	+
	"	17	36	2	95.0	50.0	0	-
	"	17	36	5	24.5	8.5	1:16	-
CH_{150R}-4	2 ปี 6 เดือน	16	-	-	306.5	59.5	1:5	-
	"	19	-	-	175.0	1.0	0	-
CH_{150R}-5	2 ปี 6 เดือน	16	-	-	329.0	111.0	1:10	-
	"	19	-	-	148.5	17.5	1:1	-
TM_{52}-3	8 สัปดาห์	42	-	-	392.5	142.0	1:22	-
	"	45	-	-	39.5	22.0	1:21	-
	"	3	36	2	181.0	125.0	1:15	-
	"	3	36	5	90.0	49.0	0	-

อภิปรายผล

การวิจัยนี้ได้เพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศในจานเพาะเลี้ยงในเดสซิเคเตอร์ (petridish-candle jar method) โดยควบคุมอุณหภูมิขณะเพาะเลี้ยง และขณะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ ที่ 37 องศา ซ. พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศได้ผลดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Brockelnan, 1982 วิธีการเพาะเลี้ยงแบบนี้เป็นวิธีที่ง่าย และประหยัด ใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ และซีรั่มน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดทดลอง หรือการเพาะเลี้ยงแบบโฟล Fflow method) ของ Trager, 1979.)

เนื่องจากการเกิดเชื้อระยะมีเพศในจานเพาะเลี้ยง จะเกิดหลังจากที่เชื้อระยะไม่มีเพศเจริญดี และมีจำนวนเพิ่มขึ้นสูงสุดจนค่อนข้างคงที่แล้ว เชื้อระยะรูปวงแหวนบางตัวก็จะเจริญไปเป็นเชื้อระยะมีเพศ โดยจะเห็นได้จากการศึกษาการเกิดระยะมีเพศในตารางที่ 3 เชื้อมีเพศระยะที่ 2 จะมีปริมาณสูงสุดในช่วงวันที่ 7 ถึง 11 วัน Carter และ Miller, 1979 ได้ใช้ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อระยะรูปวงแหวน และระยะมีเพศระยะที่ 2 คำนวณหาอัตราการเกิดเชื้อระยะมีเพศ แต่จากการวิจัยนี้ ผู้วิจัยพบว่า การนับจำนวนเชื้อในช่วงการทดลองดังกล่าวมีค่าแปรปรวนมาก เนื่องจากจำนวนเชื้อในจานเพาะเลี้ยงสูงมาก (มากกว่า 20%) และมีเชื้อที่มีรูปร่างลักษณะไม่ดีปนอยู่มาก และจากการศึกษาการเกิดระยะมีเพศของเชื้อหลาย ๆ สายพันธุ์ผู้วิจัยพบว่า บางสายพันธุ์เชื้อสามารถเจริญเป็นระยะมีเพศระยะที่ 2,3,4 ได้ แต่ไม่สามารถเจริญต่อไปเป็นระยะที่ 5 ได้ ดังนั้นการคำนวณหาอัตราการเกิดระยะมีเพศดังกล่าว จึงไม่เหมาะสมสำหรับการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อระยะมีเพศที่เจริญเต็มที่ในแต่ละสายพันธุ์ ผู้วิจัยจึงใช้วิธีนับจำนวนเชื้อระยะมีเพศระยะต่าง ๆ ในช่วงวันที่ 14 ถึง 16 ของการทดลองซึ่งในช่วงดังกล่าวพบว่ามีจำนวนเชื้อระยะมีเพศที่เจริญเต็มที่สูงที่สุด

จากการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อระยะมีเพศโดยเปรียบเทียบวิธีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ, อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ และไม่ใส่ไฮโปแซนทีน สามารถสรุปได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดให้ผลไม่แตกต่างกัน และการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงวันละครั้ง โดยเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นประมาณ 2 เท่า ภายหลังที่เชื้อระยะไม่มีเพศเจริญดีมาก และ

มีจำนวนค่อนข้างคงที่ หรือประมาณวันที่ 4 หรือ 5 ของการเพาะเลี้ยงจะให้ผลดีที่สุด ทั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Ponnudurai et al 1982, Carter และ Miller, 1979 ซึ่งได้พบว่าการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่อยครั้งเป็นการเพิ่มอัตราการเจริญของเชื้อระยะไม่มีเพศและทำให้การเกิดเชื้อระยะมีเพศล่าช้าไป

การศึกษาเปรียบเทียบการเกิดระยะมีเพศระหว่างสายพันธุ์ครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลอง Graves, et al, 1984 และ Burkot et al 1984 ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ที่แยกจากไอโซเลทเดียวกัน และความสามารถในการเกิดเชื้อระยะมีเพศจะลดลง เมื่อถูกเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลานาน หรือเกิดจากการเก็บเข้าในไนโตรเจนเหลวแล้วนำออกมาหลอมเพื่อเพาะเลี้ยงใหม่ ซึ่งผลจากการลดลงนี้ สามารถสรุปได้ 3 ข้อ คือ

1. เนื่องจากพันธุกรรมของสายพันธุ์ (Graves, et al 1984)

2. เนื่องจากวิธีการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการเติมเลือดใหม่ทุก ๆ 4 วัน เป็นการชักนำให้เชื้อระยะไม่มีเพศเจริญดี และเพิ่มจำนวนขึ้นมาก ขณะเดียวกันเชื้อระยะไม่มีเพศที่มีแนวโน้มจะเจริญเป็นระยะมีเพศ ซึ่งมีอัตราการเพิ่มจำนวนน้อยกว่าจะลดน้อยลงไปเรื่อย ๆ จากการทดลองของ Inselburg 1983 พบว่า เชื้อระยะไซซอนต์ ส่วนมากเมื่อเจริญต่อไป และเพิ่มจำนวนเป็นระยะเมอโรซอยต์จะไม่เจริญไปเป็นระยะมีเพศ มีเพียงบางไซซอนต์เท่านั้นที่ให้ระยะเมอโรซอยต์ที่อาจเจริญต่อไปเป็นระยะมีเพศได้ หรือสาเหตุที่ทำให้การเกิดระยะมีเพศลดต่ำลง

3. เนื่องจากขั้นตอนของการเก็บรักษาเชื้อในไนโตรเจนเหลว และการหลอมเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงใหม่ มีผลทำให้เชื้อฟัลซิปารัมบางส่วนถูกทำลายไป ทำให้จำนวนเชื้อที่มีแนวโน้มจะเป็นระยะมีเพศ ซึ่งมีอัตรการเจริญต่ำกว่าลดลงไปเมื่อถูกเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในช่วงแรกก่อนที่จะทำการทดสอบ

Ponnudurai et al 1982 ได้ศึกษาถึงการนำเชื้อระยะมีเพศที่ได้จากเพาะเลี้ยงไปเลี้ยงยุง และได้พบว่า จำนวนเชื้อระยะมีเพศเพียง 4 $x10^4$ เม็ดเลือดแดง ก็เพียงพอที่จะทำให้ยุงติดเชื้อไข้มาลาเรียได้สูงถึง 88% และ Burkot et al 1984 พบว่า การเกิดเอ็กซแฟลจิลล่าของไมโครแกมมีโดไซต์ของเชื้อฟัลซิปารัม ก่อนนำไปเลี้ยงยุงไม่สามารถจะ

คาดผลการติดเชื้อของยุงได้ บางการทดลองยุงติดเชื้อได้ถึง 100% แต่ไม่พบการเกิดเอ็กซแฟลจิลล่าเลย ดังนั้น จากการทดลองครั้งนี้ ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 9 สายพันธุ์ สรุปได้ว่าทุกสายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการเกิดระยะมีเพศสูง และจากการศึกษาความสม่ำเสมอต่อเนื่องในการเกิดระยะมีเพศของสายพันธุ์เหล่านี้ รวมเวลาที่ศึกษาทั้งหมด 1 ปี 6 เดือน พบว่าเชื้อพัลซิปารัมสายพันธุ์ CH_{150-4}, CH_{150-5}, CH_{150-6} และ TM_{52-10} เป็นสายพันธุ์ที่ดีสามารถนำไปศึกษาวิจัยต่อไปได้ เพราะทั้ง 4 สายพันธุ์นี้สามารถเพาะเลี้ยงให้เกิดเชื้อระยะมีเพศได้ในปริมาณที่สูง และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลานาน ก็ยังคงให้เชื้อระยะมีเพศสูงโดยมีอัตราส่วนของไมโคร:แมคโครแกมมีโตไซต์สูง และมีการเกิดเอ็กซ์แฟลจิลล่าด้วย ส่วนอีก 5 สายพันธุ์นั้น ให้เชื้อระยะมีเพศต่ำ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานจะทำให้ปริมาณของการเกิดระยะมีเพศลดลง และไม่เกิดเอ็กซแฟลจิลล่าอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

Brockelman, C.R. 1982. Conditions favouring gametocytogenesis in the continuous culture of Plasmodium falciparum. J. Protozool., 29 : 454-458

Burkot, T.R., J.C. Williams and I. Schneider. 1984. Infectivity to mosquitoes of Plasmodium falciparum clones grown in vitro from the same isolate. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hgg., 78 : 339-341.

Carter, R. and R.F. Beach. 1977. Gametogenesis of culture by gametocytes of Plasmodium falciparum. Nature, 270:240-241.

Carter, R. and L.H. Miller. 1979. Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in Plasmodium falciparum in continuous culture. Bull. W.H.O., 57(Suppl.1) : 37-52.

Graves, P.M., R. Caster and K.M. McNeill. 1984. Gametocyte production in cloned lines of Plasmodium falciparu. Am. J. Trop. Med. Hyg., 33(6) : 1045-1050.

Ifediba, T. and J.P. Vanderberg, 1981. Complete in vitro muturation of Plasmodium falciparum gametocytes. Nature, 294:364-366.

Inselburg, J. 1983. Gametocyte formation by the progeny of single Plasmodium falciparum schizonts. J. Parasitology. 69(3) : 584-591.

Kaushal, D.C., R. Carter, L.H. Miller and G. Kriskna. 1980. Gametocytogenesis by malaria parasites in Continuous culture. Nature, 286 : 490-492.

Ponnudurai, T., J.H.E.Th. Mcuwissen, Anna D. E.M. Leeuwenberg, J.P. Verhave and A.H.W. Lensen. 1982. The production of mature gametocytes of Plasmodium falciparum in continuous cultures of different isolares infective to mosquitoes. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 76 : 242-250.

Thaithong, S., G.H. Beale, B.Fenton, J. McBride, V. Rosario, A Walker & D. Walliker. 1984. Clonal diversity in a single isolate of the malaria parasite Plasmodium falciparum. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 78 : 242-245.

Trager, W. and J.B. Jensen. 1976. Human malaria parasitesin continuous culture. Science, 193 : 674-675.