

การศึกษาการปรับปรุงวิธีการย้อมสีพยาธิใบไม้ตับอ่อนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

“A Modified Stained Method for the Ruminant Pancreatic Fluke”



น.สพ.ดร.กฤษฎา ขำพูล

07/03/2559

บทนำ

พยาธิ *Eurytrema pancreaticum* มีชื่อสามัญว่า pancreatic fluke เป็นพยาธิใบไม้ชนิดหนึ่งที่มักพบในเขตอบอุ่นย่านเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีความยาว 8-16 มิลลิเมตร มี suckers 2 อัน มักตรวจพบใน pancreatic ducts, bile ducts และบางครั้งพบที่ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ของแกะ แพะ และสัตว์เคี้ยวเอื้องหลายชนิด ซึ่งก่อความเสียหายให้กับสัตว์เคี้ยวที่ได้กินสัตว์ที่เป็นกึ่งกลางตัวที่สอง เช่น Grasshoppers เผลอเข้าไป กรณีที่สัตว์เคี้ยวเอื้องติดเชื้อมารุนแรงจะทำให้ body score ของสัตว์อยู่ในระดับ poor โดยเฉพาะในแกะพบสภาวะ chronic wasting condition ทำให้อัตราการตาย (mortality) เพิ่มสูงขึ้น

Life cycle

ตัวอ่อนไชผ่านผนังลำไส้ไปยัง **ท่อตับอ่อนหรือท่อหน้าดี**ทันทีโดยไม่ผ่านอวัยวะอื่น ๆ

แล้วจึงเจริญเป็นตัวเต็มวัย



Final host กิน inter. host 2



Inter. host 2 คือพวก

Grasshoppers เช่น ตั๊กแตน

จิ้งหรีด กินเข้าไป

เจริญเป็นระยะ **Metacercaria**



Cercaria ออกจากหอยบกไป

รวมตัวกันอยู่ใน **Slime ball**



ไชไปนอกมากับอุจจาระ



Miracidium ออกจากไข่

หลังจาก Inter.host 1 คือหรือ
หอยบก (Terrestrial snails)

เช่น *Bradybaena* และ

Cathaica กิน เจริญเป็น

ระยะ Sporocyst, Cercaria

(ไม่มีระยะ **Redia**)

-Slime ball คือ สารที่ถูกขับออกมาจากรูหายใจของหอย



ตัวเต็มวัยพยาธิใบไม้ *E. pancreaticum* ที่ผ่านการเก็บรักษาไว้ใน 10% buffered formalin มาแล้วนั้น เนื้อเยื่อของตัวพยาธิจะหดตัวลงเนื้อเยื่อแข็งตัวขึ้น ความยืดหยุ่นของเนื้อเยื่อลดลง และมีสีขาวขุ่น การศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกตัวพยาธิที่สมบูรณ์ทางด้านกายภาพโดยตรวจสอบผ่านกล้อง stereoscope ตัวพยาธิไม่ควรมียอวรีนิกซาด มีอวัยวะภายในยังอยู่ครบ ซึ่งโดยทั่วไปพยาธิดังกล่าวจะมีอวัยวะภายในเป็นเส้นๆ สีดำ ลำตัวขาวขุ่น ไม่โปร่งแสงเหมือนตัวพยาธิสด

รูปที่ 1 ตัวพยาธิ *E. pancreaticum* ที่ถูกเก็บรักษาไว้ใน 10% buffered formalin (8-16 X 5-8.5 mm; non stained)

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์สำหรับบีบตัวพยาธิให้แบน (pressing)

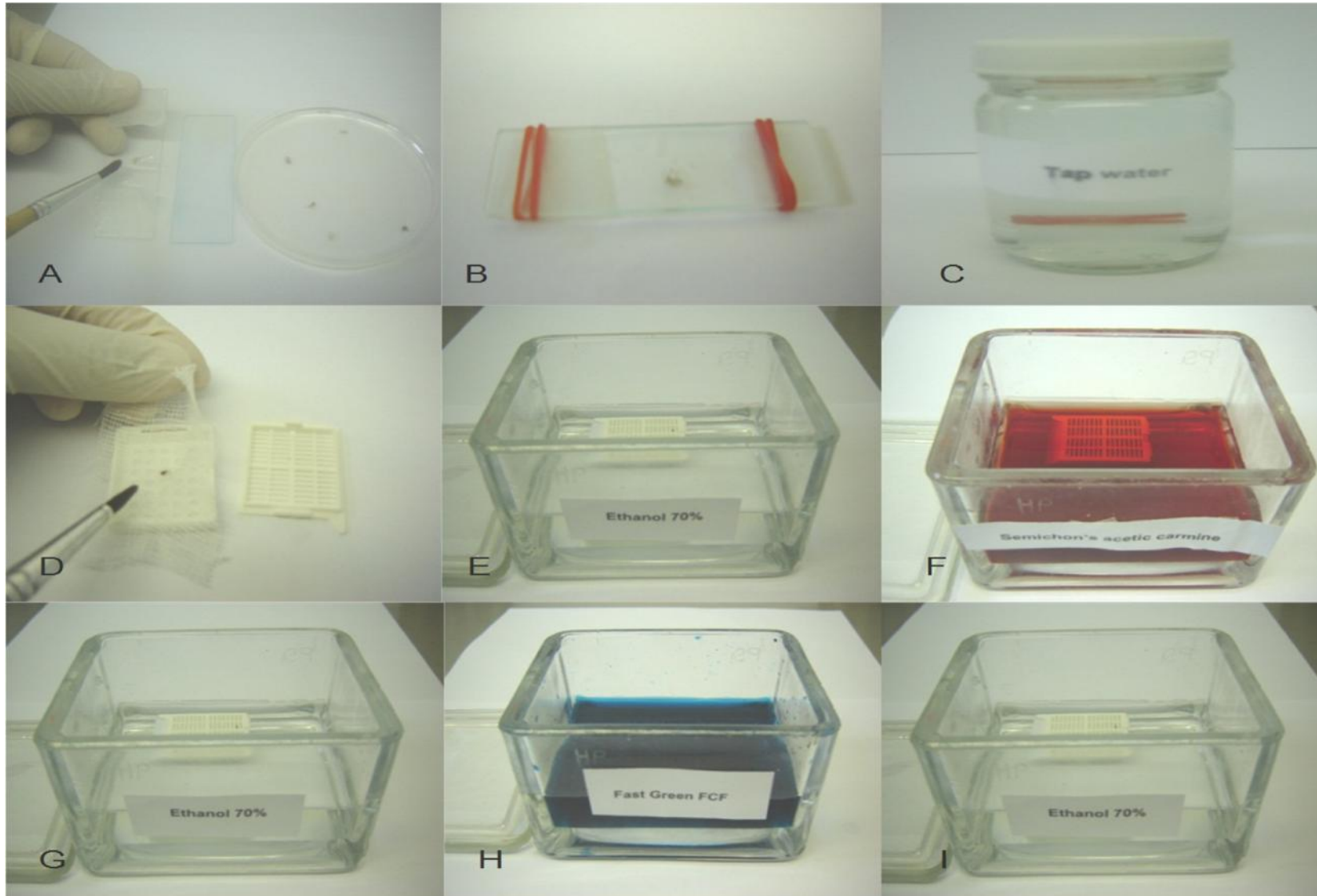
ได้แก่ กรรไกร กระดาษทิชชู กระจกสไลด์ขนาด 25.4 X 76.2 มิลลิเมตร หนึ่งยางกระดาษ ขนาด 20 X 25 มิลลิเมตร พู่กัน จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ถังมือยาง และ glass jars มีฝา ปิดขนาด 250 มิลลิลิตร

อุปกรณ์สำหรับการย้อมสี (staining) และการดึงน้ำออกจากตัวพยาธิ (dehydration)

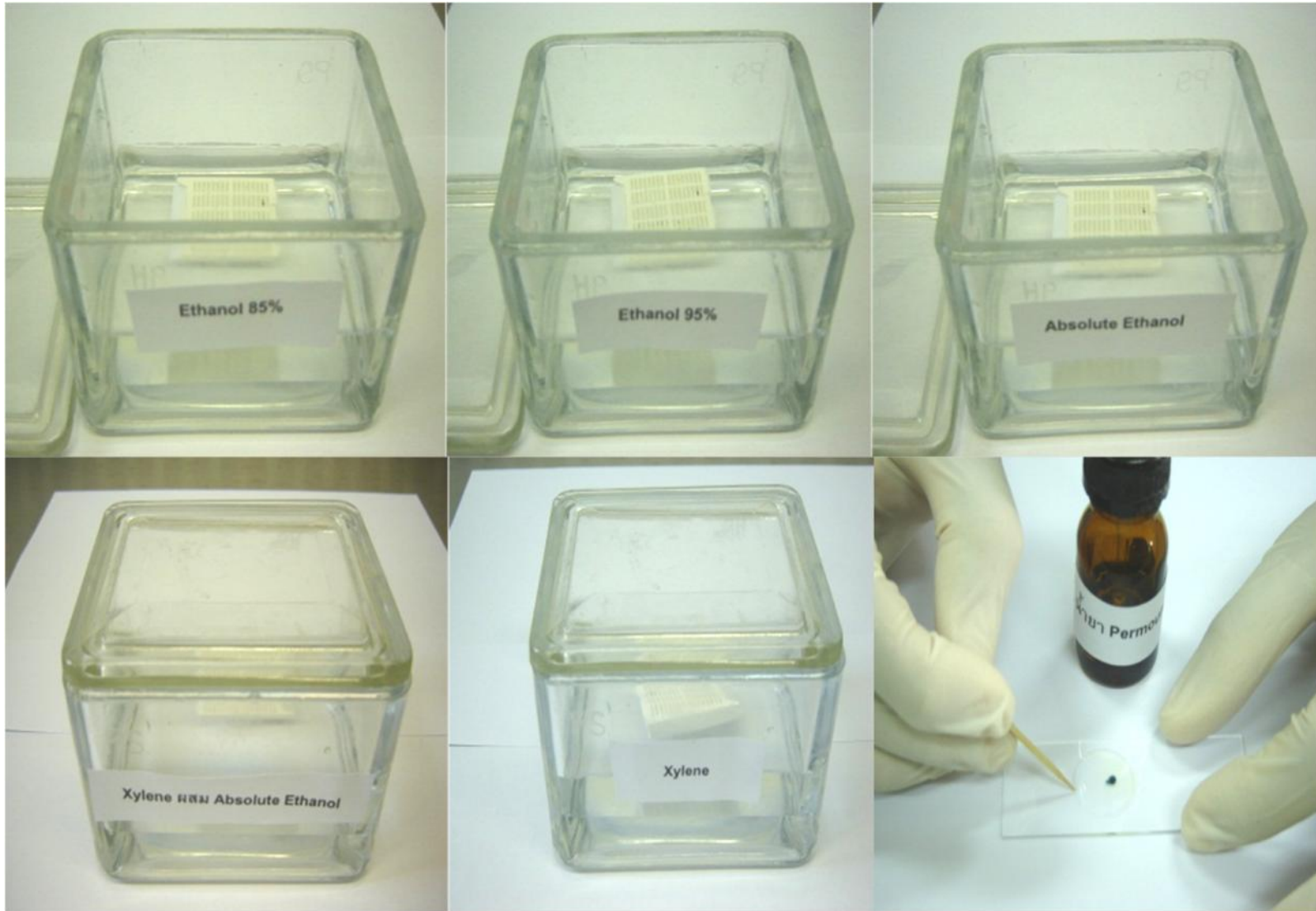
ได้แก่ large staining dishes แบบมีฝาปิด พู่กัน ปากคีบปลายแบน ฝ้าก๊อส์ ขนาด 6 X 6 เซนติเมตร tissue cassette หลอด dropper และนาฬิกาจับเวลา

อุปกรณ์สำหรับการ mount (mounting) ได้แก่ พู่กัน ไม้จิ้มฟัน กระจกสไลด์ขนาด 25.4 X 76.2 มิลลิเมตร และ cover glasses

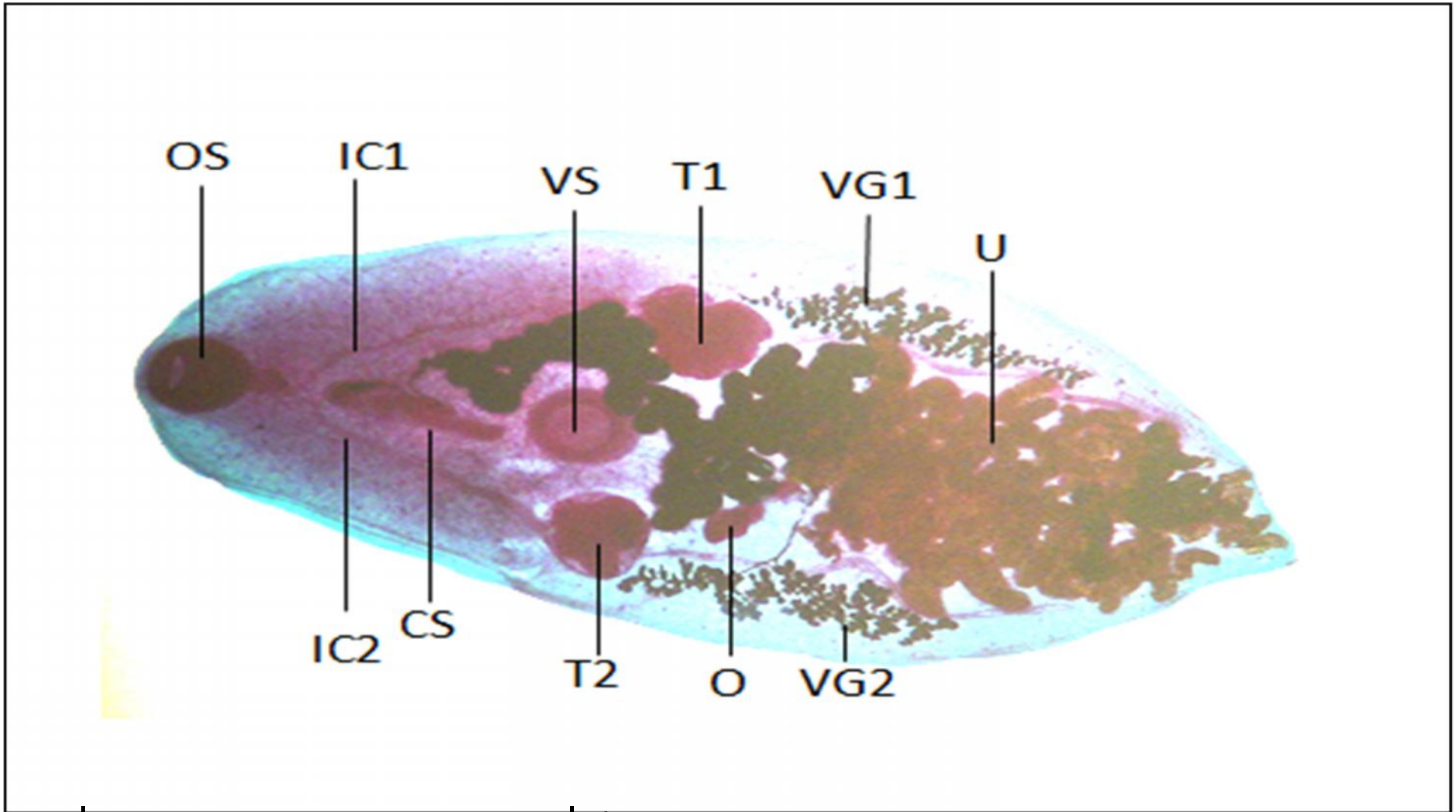
สารเคมี ได้แก่ 10% buffered formalin, 1% Semichon's acetic carmine, 0.04% Fast green FCF, 70% ethanol, 85% ethanol, 95% ethanol, absolute ethanol, xylene ผสม absolute ethanol (xylene 1 ส่วน ผสม absolute ethanol 1 ส่วน) และ น้ำยา Permout®



รูปที่ 2: วิธีการย้อมสีตัวพยาธิ A: ตัวพยาธิที่เก็บรักษาไว้ 10% buffered formalin, B: การบีบให้พยาธิแบนโดยวางตัวพยาธิบนสไลด์ใช้กระดาษคั่นหัวท้าย และวางกระจกสไลด์อีกหนึ่งแผ่นทับลงไปใช้ยางรัด, C: แช่พยาธิที่อยู่ในขั้นตอนการบีบในน้ำประปา, D: ห่อพยาธิด้วยผ้าก๊อศแล้วบรรจุใน tissue cassette, E: แช่ใน 70% ethanol, F: แช่ใน 1% Semichon's acetic carmine, G: แช่ใน 70% ethanol, H: แช่ใน 0.04% Fast green FCF, I: แช่ใน 70% ethanol



รูปที่ 3: ขั้นตอนการ dehydration ตั้วพยาธิ การ clearing และการ mounting J: แช่ใน 85 % ethanol, K: แช่ใน ethanol 95%, L: แช่ใน absolute ethanol, M: แช่ใน xylene ผสม absolute ethanol, N: แช่ใน xylene, O: mounting ด้วย น้ำยา Permount® และแผ่นกระจก cover slip



รูปที่ 4: พยาธิ *E. pancreaticum* ที่เก็บรักษาไว้ใน 10% buffered formalin (stained) oral sucker (OS), cirrus sac (CS), testes (T1-2), ovary (o) ติดสีแดงอมม่วง ส่วนที่ติดสีแดงอมน้ำตาล คือ intestinal caeca (IC1-2), vitelline glands (VG1-2) และ uterus (U) และ ผิวนอกพยาธิด้านนอกติดสีเขียว (X100)

สรุปผลการวิจัย

ผลจากการศึกษาการย่อยสียพยาธิครั้งนี้ พบว่าการติดสีของอวัยวะภายในที่เป็นอวัยวะสำคัญ ที่สามารถใช้อ้างอิงเพื่อแบ่งแยกชนิดตัวพยาธิได้ คือ testes มีลักษณะเป็นวงกลม 2 ใบ และ ovary มีลักษณะเป็น lobe เล็กๆ ทั้งสองอวัยวะติดสีแดงอมม่วง ส่วนอวัยวะ intestinal caeca มีลักษณะเป็นท่อยาวประมาณ 2 ใน 3 วางตัวอยู่ทั้งสองข้างของลำตัว ทั้งซ้ายและขวา vitelline glands ที่วางตัวอยู่ใกล้ๆ กันทั้งสองฝั่งข้างลำตัวจะติดสีแดงอมน้ำตาลอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบ sucker อีก 2 อัน อยู่บริเวณด้านหัว และอีกหนึ่งอัน อยู่บริเวณทางแยก (bifurcation) ของลำไส้ซึ่งติดสีน้ำตาลอ่อนเมื่อเทียบกับ intestinal caeca หรือ vitelline glands ส่วนไข่ที่อยู่ใน uterus ที่خذไปมาทางด้านท้ายตัวจะติดสีเหลืองเข้ม แต่อาจพบว่ามิใช่บางใบจะติดสีแดงอมน้ำตาลเหมือนกับสีที่พบบน intestinal caeca และ vitelline glands ได้เช่นกันและส่วนของผิวตัวพยาธิจะติดสีเขียวสดใสอย่างชัดเจน

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่าตัวพยาธิที่เคยผ่านการเก็บรักษาในสารละลาย formalin มาก่อนเมื่อแล้ว สามารถใช้วิธีการย้อมที่ปรับปรุงพัฒนาขึ้นมาใหม่นี้สามารถย้อมให้อวัยวะภายในติดสีและดูผ่านกล้อง LM ได้ โดยลักษณะการติดสีของอวัยวะภายในที่สำคัญที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ชนิดของพยาธิได้ เช่น testes, ovary, uterus และintestinal caeca ติดสีแดงได้อย่างชัดเจน แสดงว่าพยาธิชนิดนี้ถึงแม้จะผ่านการเก็บรักษาในสารละลาย formalin มานาน ก็ยังสามารถทำการบีบอัดให้แบนได้แต่ต้องใช้ความชำนาญและระยะเวลาที่นานขึ้น ซึ่งขั้นตอนการบีบอัดนี้เป็นขั้นตอนแรกและสำคัญมากในการย้อมพยาธิเพื่อทำสไลด์ถาวร ซึ่งโดยปกติแล้วในการย้อมพยาธิเพื่อทำสไลด์ถาวรแบบดั้งเดิมต้องใช้ตัวพยาธิสดๆ เท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

- ประยงค์ ระดมยศ. 2547. Atlas of Medical Parasitology: 465 colour illustrations. ภาควิชา
ปรสิตวิทยา.คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.กรุงเทพ.182 หน้า.
- วีระพล จันทรสวรรค์. 2536.พยาธิใบไม้และตัวืดของสัตว์เลี้ยง.สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. 210 หน้า.
- อาคม สังข์วรานนท์. 2541. ปาราสิตวิทยาทางสัตวแพทย์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.
กรุงเทพ. 412 หน้า.
- Bowman, D.D. and Lynn, R.C. 1999. Georgis' Parasitology for Veterinarians.7th ed. W.B.
Saunders Company. Philadelphia. U.S.A. 414 pp.
- Jiraungkoorskul, W., Sahaphong, S., Tansatit, T., Kangwanrangsan, N. and Pipatshukiat,
S. 2005. *Eurytrema pancreaticum*: The in vitro effect of praziquantel and
triclabendazole on the adult fluke. *Exp. Parasitol.* 111: 172-177.
- Kaufmann, J. 1996. Parsitic infections of domestic animals: A Diagnostic Manual.
Birkhaeuser Verlag. Berlin. Germany. 423 pp.
- Urquhart, G.M., Aromor, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. and Jennings, F.W. 1987. Veterinary
Parasitology. Logman scientific & technical. New yolk. U.S.A. 133 pp.
- Wannaprapo, S., Tesana, S., Arunyanat, C., Kanla, P. and Chaijaroonkhanarak, W. 2008.
Morphological features of the testes of the adult liver fluke, *Opisthorchis
viverrini*. *Srinagarind Med. J.* 23(4): 346-352.



<http://www.frontfootconsulting.com.au/business-growth/thank-you-3/>