

การศึกษาระยะเวลาการปรากฏตัวของไมโครฟีลาเรีย ในสัตว์ทดลอง

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปกรณ์ สุเมธานุรักษ์กุล*

บทคัดย่อ

การศึกษาถึงระยะเวลาการปรากฏตัวของไมโครฟีลาเรียได้กระทำในสัตว์ทดลองหลายชนิด และชนิดของเชื้อที่พบได้ในคนและในสัตว์ตามธรรมชาติ ผลปรากฏว่าระยะเวลาการปรากฏตัวของไมโครฟีลาเรียในสัตว์ทดลอง ผิดไปจากที่ตรวจพบในโฮสต์ (Host) ธรรมชาติ เช่นเชื้อ Brugia malayi ชนิด nocturnal periodic ให้ผลในสัตว์ทดลองเจอร์บิล (Gerbil) เป็นแบบ diurnal subperiodic ส่วนเชื้อ B. malayi ชนิด nocturnal subperiodic ให้ผลในสัตว์ทดลองเจอร์บิล ออกมาในชนิดไม่มีรูปแบบที่แน่นอน สัตว์ทดลองแฮมสเตอร์ที่ถูกปล่อยเชื้อ Breinlia booliati แสดงรูปแบบเป็นชนิด nocturnal subperiodic คล้ายกับปรากฏการณ์ในธรรมชาติ หนูขาวให้ผลเด่นชัดเป็นสองช่วง (peak) ถึงอย่างไรก็ตามการปรากฏตัวของไมโครฟีลาเรีย ก็ยังนับว่าปริมาณสูงตลอดช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องจากอุปนิสัยของหนูชนิดนี้ที่ชอบพักผ่อนและนอนอยู่ตลอดเวลา เป็นสาเหตุให้การปรากฏตัวของเชื้อตามเส้นเลือดบริเวณผิวหนังก็ได้

บทนำ

นับแต่แมนสัน (Mansen) สังเกตพบว่าตัวอ่อนของเชื้อโรคเท้าช้าง ชนิดวูเชอโรเรีย แบงครอฟต์ (Wuchereria bancrofti) เมื่อประมาณหนึ่งร้อยปีมาแล้ว(1) ก็ได้มีผู้ทำการค้นคว้าต่อมาอีกหลายท่านเพื่อจะค้นหาขบวนการเกี่ยวกับการปรากฏตัว

* ภาควิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

เป็นช่วง ๆ ของตัวอ่อน (Microfilaria) ของพยาธิพวกนี้ เช่นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในบรรยากาศมากกว่า 38% หรือลดน้อยลงต่ำกว่า 73% ในลิงอาฟริกาผลปรากฏว่าจำนวนไมโครฟีลาเรียในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมากตอนกลางวัน ซึ่งโดยปกติแล้วจำนวนไมโครฟีลาเรียจะต่ำ (2) การผ่าตัดปอดในระหว่างเวลากลางวันและกลางคืนของลิงและสุนัขที่ติดเชื้อฟีลาเรียชนิดปรากฏตัวตอนกลางคืน ผลออกมาว่าพบเชื้อฟีลาเรียที่ปอดมาก ตอนกลางวันซึ่งส่งผลให้พบเชื้อนี้ตามเส้นเลือดบริเวณผิวหนังน้อย (3) จากการนับไมโครฟีลาเรียของคนไข้ที่ติดเชื้อ W. bancrofti ในตอนกลางคืนปรากฏว่าจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อใช้ออกซิเจนเป็นตัวกระตุ้นแต่เชื้อแล้ว Loa loa ในคนไข้ปรากฏว่าไม่มีปฏิกิริยาใด ๆ ต่อสิ่งเร้า (4) เชื้อ B. malayi ชนิดปรากฏตัวเป็นเวลา (periodic) จะมีจำนวนลดลง เมื่อเพิ่มปริมาณของออกซิเจนและการออกกำลังกายของกล้ามเนื้อ แต่ไม่มีผลเมื่อเพิ่มปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เชื้อ W. bancrofti ชนิด nocturnal subperiodic นั้นต่างจากเชื้อ W. bancrofti ชนิดปรากฏตัวเป็นเวลา (periodic) คือ เมื่อเพิ่มออกซิเจนจะทำให้จำนวนไมโครฟีลาเรียเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (5) การรวมตัวของเชื้อ W. bancrofti ที่ปอดในตอนกลางวันแล้วค่อย ๆ กระจายออกไป ตอนกลางคืนซึ่งฮอว์กิง (6) ให้เหตุผลว่าน่าจะเป็นเนื่องจากแฟลคเตอร์สองประการ หนึ่งแรงติดอยู่กับที่ซึ่งจะทำให้ตัวไมโครฟีลาเรียติดอยู่กับเส้นเลือดฝอยในปอด และสองขบวนการเปิด-ปิด หรือปุ่มเปิด-ปิดแรง ซึ่งขบวนการนี้จะทำงานเมื่อตอนกลางวันและหยุดเมื่อตอนกลางคืน แต่เชื้อ Wuchereria และ Brugia ไม่มีส่วนสัมพันธ์กับการปรากฏตัวของตัวอ่อนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของร่างกายตลอดระยะเวลา 24 ชั่วโมง (7) จากรายงานของแยบและคณะ (8) ได้พบฟีลาเรียในหนูชนิดใหม่ คือเบรียนเลีย บูเลียไต (Brelinia booliati) พร้อมทั้งศึกษาการปรากฏตัวของตัวอ่อนในหนูที่ติดเชื้อจากธรรมชาติ พบว่าเป็นชนิดปรากฏตัวตอนกลางคืน แต่ไม่เด่นชัด (nocturnal subperiodicity)

การค้นคว้าวิจัยนี้ เพื่อค้นหาระยะการปรากฏตัวของไมโครฟีลาเรีย B. malayi ชนิด nocturnal periodic และ subperiodic ในสัตว์ทดลองเจอร์บิล (Gerbil)

และเชื้อ Br. booliati ชนิด nocturnal subperiodic ในสัตว์ทดลองแฮมสเตอร์ (Hamster) และหนูขาว (Albino rat) ซึ่งสัตว์ทดลองเหล่านี้ ถูกทำให้ติดเชื้อโดยห้องปฏิบัติการ การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายที่จะดูระยะเวลาการปรากฏตัวของตัวอ่อนเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ในสัตว์ทดลองที่ถูกปล่อยเชื้อ

อุปกรณ์ และ วิธีการ

หนูเจอร์บิล หนูแฮมสเตอร์ และหนูขาวได้ถูกปล่อยเชื้อเข้าทางใต้ผิวหนัง ด้วยตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ชนิดบรูเกีย มาเล็ และเบรียนเลีย บูเลียโต เลือดถูกเจาะและดูดออกมาจาก เส้นเลือดดำที่หางของสัตว์ในปริมาณ 20 ลบ. มม. ด้วยท่อแก้วที่ดัดแปลงเรียกว่า modified sidon's pipette (9) แล้วแผ่ลงบนแผ่นแก้วขนาด 25x76 มม. อย่างสม่ำเสมอทั้งไว้ให้แห้งไม่ต่ำกว่า 12 ถึง 24 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยสีเยมซ่า (Giemsa)⁽¹⁰⁾ การเจาะเลือด กระทำทุก ๆ สองชั่วโมง ตลอดระยะเวลา 24 ชั่วโมงติดต่อกัน ตัวไมโครฟิลาเรียถูกตรวจนับทั้งหมดด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยายอันต่ำ (10 X) จำนวนไมโครฟิลาเรียทั้งหมดที่นับได้ในแต่ละช่วง แสดงออกเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยถือเอาช่วงที่มากที่สุดเป็น 100⁽⁴⁾ จำนวนไมโครฟิลาเรีย ในสัตว์แต่ละตัวจะแตกต่างกันออกไป แม้ว่าจะปล่อยเชื้อฟิลาเรียชนิดเดียวกันเข้าไป การทดลองนี้ได้กระทำซ้ำกันสองครั้งห่างกันประมาณหนึ่งเดือน เพื่อใช้เป็นการยืนยันปริมาณของตัวอ่อนไมโครฟิลาเรีย

ผลการศึกษา

โดยวิธีการดังกล่าวข้างต้น จำนวนของไมโครฟิลาเรียถูกนำมานับตลอดช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะรูปแบบของปริมาณตัวอ่อนของสัตว์ทดลอง จ. 1 ซึ่งถูกปล่อยเชื้อ B. malayi ชนิด nocturnally periodic ให้ปริมาณตัวอ่อนมากในสองช่วงคือ 14.00 และ 16.00 นาฬิกา กับช่วง 02.00 และ 04.00 นาฬิกา ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 1 ส่วนสัตว์ทดลอง จ. 2 จ. 3 และ จ. 4 ถูกปล่อยเชื้อ B. malayi ชนิด subperiodic ปรากฏว่าปริมาณของตัวอ่อนไม่แน่นอนตลอดช่วงเวลากลางวันและกลางคืน จากการทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ก็ปรากฏผลออกมาเหมือนครั้งแรก (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ปริมาณของไมโครฟีลาเรีย ต่อเลือด 20 ลบ.มม. ทุก ๆ 2 ชั่วโมงตลอดเวลา 24 ชั่วโมงของเชื้อ Brugia malayi ชนิด nocturnal periodic

จากสัตว์ทดลอง จ. 1

เวลา	21-22 พ.ค. 2520		18-19 มิ.ย. 2520	
	จำนวน MF	%	จำนวน MF	%
08.00	123	15	522	56
10.00	25	3	80	7
12.00	296	35	452	49
14.00	834	100	608	65
16.00	523	63	929	100
18.00	284	34	502	54
20.00	125	15	114	12
22.00	124	15	268	29
24.00	255	31	99	11
02.00	234	28	754	81
04.00	691	83	355	39
06.00	414	50	397	43
08.00	392	47	185	20

MF. = microfilaria

ตารางที่ 2 ปริมาณของไมโครฟีลาเรียต่อเลือด 20 ลบ. มม. ทุก ๆ ช่วง 2 ชั่วโมง ตลอดเวลา 24 ชั่วโมง ของเชื้อ Brugia malayi ชนิด nocturnal subperiodic

จากสัตว์ทดลอง จ. 2 จ. 3 และ จ. 4

เวลา	21-22 พ.ค. 2520						18-19 มิ.ย. 2520					
	จ. 2		จ. 3		จ. 4		จ. 2		จ. 3		จ. 4	
	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
08.00	338	76	141	63	175	100	10	15	138	59	169	88
10.00	56	13	32	14	38	22	4	6	64	28	127	66
12.00	61	14	91	41	98	56	21	31	98	42	192	100
14.00	422	95	213	95	61	35	9	13	58	25	137	71
16.00	303	68	195	87	74	42	27	40	27	12	107	56
18.00	444	100	151	67	40	23	36	53	45	19	128	67
20.00	92	21	224	100	23	13	15	22	43	19	54	28
22.00	197	44	147	66	59	34	7	10	123	53	112	58
24.00	259	58	169	75	73	42	28	41	159	69	51	27
02.00	187	42	108	48	147	84	24	35	194	84	177	92
04.00	342	77	54	24	92	53	68	100	232	100	164	85
06.00	81	18	59	26	105	60	24	35	130	56	153	80
08.00	100	22	78	35	72	41	21	31	100	43	150	78

ตารางที่ 3 ปริมาณของไมโครฟิลาเรียต่อเลือด 20 ลบ. มม. ทุก ๆ ช่วง 2 ชั่วโมง ตลอดเวลา 24 ชั่วโมงของเชื้อ Breintia booliati จากสัตว์ทดลองแฮมสเตอร์ เมื่อ 21-22 พฤษภาคม 2520

เวลา	ฮ. 5		ฮ. 6		ฮ. 7	
	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
08.00	132	17	182	19	107	51
10.00	135	18	352	38	62	30
12.00	—	—	—	—	106	51
14.00	69	9	—	—	—	—
16.00	399	53	—	—	—	—
18.00	107	14	—	—	23	11
20.00	—	—	—	—	66	32
22.00	757	100	939	100	82	39
24.00	364	48	216	23	209	100
02.00	426	56	445	47	104	50
04.00	—	—	800	85	115	55
06.00	415	54	344	37	81	39
08.00	176	23	306	33	35	17

ตารางที่ 4 ปริมาณไมโครฟีลาเรียต่อเลือด 20 ลบ. มม. ทุก ๆ 2 ชั่วโมง
ตลอดเวลา 24 ชั่วโมงของเชื้อ Breinfia booliati จากสัตว์ทดลองหนูขาว เมื่อ 18—
19 มิถุนายน 2520

เวลา	น. 8		น. 9		น. 10	
	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
08.00	971	15	497	15	646	22
10.00	2261	36	1171	34	2171	75
12.00	1332	21	2234	65	2778	96
14.00	1562	25	1107	32	1100	38
16.00	1653	26	776	23	1071	37
18.00	1663	27	728	21	1335	46
20.00	5336	85	2484	73	2891	100
22.00	5315	85	3424	100	2776	96
24.00	5659	90	2603	76	2210	76
02.00	6274	100	1812	53	2506	87
04.00	2018	32	2139	62	2317	80
06.00	3403	54	1264	37	2478	86
08.00	4339	69	1350	39	1321	46

ปริมาณไมโครฟีลาเรียของ Br. booliati ในสัตว์ทดลองแฮมสเตอร์มีหลาย
ช่วงที่ไม่อาจนับจำนวนตัวอ่อนได้ เนื่องจากเลือดแข็งตัวก่อนที่จะนำมาแผ่ลงบนแผ่น
แก้วสไลด์แต่จากตัวเลขที่ได้ แสดงว่าปริมาณตัวอ่อนน้อย ตอนกลางวันเมื่อเปรียบ
เทียบกับกลางคืน (ตารางที่ 3) ในสัตว์ทดลอง หนูขาวแสดงออกในรูปของ
nocturnal subperiodic โดยมีตัวอ่อนปรากฏมากในตอนกลางคืน และน้อยในเวลา
กลางวันแต่หนูขาวหมายเลข น. 10 มีปริมาณค่อนข้างสูงในตอนกลางวัน (ตารางที่ 4)

วิจารณ์และสรุป

จากการศึกษาใน พบว่าเชื้อไมโครฟีลาเรีย ที่ปรากฏตัวครั้งเดียวในตอน กลางคืนในคน เปลี่ยนเป็นปรากฏตัวสองครั้งต่อวัน ครั้งแรกตอนกลางวันระหว่าง เวลา 14.00 และ 16.00 นาฬิกาอีกครั้งหนึ่งระหว่าง 02.00 และ 04.00 นาฬิกา ใน สัตว์ทดลองเจอร์บิล ซึ่งจากการทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ก็ปรากฏผลออกมาเหมือนเดิม อย่างไรก็ตามค่าสูงสุดของตัว เหลื่อมกันสองชั่วโมงซึ่งการเจาะเลือดในช่วงเวลาสอง ชั่วโมงอาจจะนานเกินไปที่จะแสดงรายละเอียดให้เห็นเด่นชัด สัตว์ทดลอง จ.4 แสดง ถึงปริมาณไมโครฟีลาเรียเป็นแบบ nocturnal subperiodic แต่สัตว์ทดลอง จ. 2 และ จ. 3 แสดงให้เห็นไมโครฟีลาเรียถึงสามช่วง จากการทดลองซ้ำ ปรากฏผลแตกต่าง ออกไปอีกคือ จ. ให้ค่าสูงสองช่วงที่ 12.00 นาฬิกา และ 02.00 นาฬิกา ส่วน จ. 2 และ จ. 3 ให้รูปแบบชนิด nocturnal subperiodic ซึ่งพอสรุปได้ว่า เชื้อ B. malayi ในสัตว์ทดลองจะให้ผลผิดแผกแตกต่างไปจากที่พบในคน และบางชนิดการปรากฏตัว ก็เป็นไปอย่างไม่มีแบบแผน แม้ว่าเลือดจากสัตว์ทดลองแฮมสเตอร์จะเก็บไม่ได้ใน หลายช่วงเวลาก็ตาม ผลมีแนวโน้มที่จะเป็นได้ว่าเป็นรูปแบบชนิด nocturnally sudperiodic ส่วนหนูขาวที่ถูกปล่อยเชื้อด้วย Br. booliati ตัวหนึ่ง (น. 10) แสดง ถึงการปรากฏตัวของไมโครฟีลาเรียเป็นแบบ nocturnal subperiodic ซึ่งเหมือนกับ ปรากฏการณ์ในธรรมชาติที่พบในหนู Rattus sabanus⁽⁸⁾ แยกและคณะได้รายงานไว้ ในปี 1975 ส่วนอีกสองตัวให้ผลไมโครฟีลาเรียเด่นชัดสองช่วงคือเวลา 20.00 ถึง 22.00 นาฬิกา และ 12.00 นาฬิกา อีกช่วงหนึ่งซึ่งแตกต่างไปจากธรรมชาติบ้าง ทั้งนี้เนื่องจากกิจกรรมของตัวโฮสต์เอง ส่งผลถึงการปรากฏตัวของไมโครฟีลาเรีย เนื่องจากหนูขาวเป็นหนูที่ขี้เกียจและหลับนอนอยู่ตลอดเวลา จากการศึกษานี้อาจจะ สรุปได้ว่า การปรากฏตัวของไมโครฟีลาเรียในสัตว์ ทดลองที่ผิดไปจากธรรมชาติมาก ๆ ทำให้รูปแบบการปรากฏตัวของไมโครฟีลาเรียผิดไปด้วย

ภาคผนวก

ชนิดและเพศของสัตว์ทดลองที่ใช้ และเชื้อที่ปล่อยเข้าไปในสัตว์ทดลอง

ชนิดของสัตว์	เพศ	ชนิดของเชื้อ	จำนวนตัว อ่อนที่ปล่อย	วันที่ปล่อยเชื้อ
จ. 1	♂	noc. periodic <u>B. malayi</u>	98	16.7.1974
จ. 2	♂	noc. subperiodic <u>B. malayi</u>	100	28.4.1975
จ. 3	♂	” ”	200	8.3.1976
จ. 4	♂	” ”	100	6.7.1976
ช. 5	♂	<u>Breinvia booliati</u>	100	23.11.1976
ช. 6	♂	” ”	100	”
ช. 7	♂	” ”	200	”
น. 8	♂	” ”	48	21.1.1976
น. 9	♂	” ”	75	14.10.1976
น. 10	♂	” ”	100	18.11.1976

จ. = เจอร์บิล

ช. = แฮมสเตอร์

น. = หนูขาว

บรรณานุกรม

1. BHADURI, N.V. and CHOWDHURY, A.B. (1954) – Microfilarial periodicity. Ind. Med. Gaz., 89: 594 – 598
2. McFADZEAN, James A. (1952) – Investigations into the cause of microfilarial periodicity. Brit. Med. J., 55: 1106 – 1116
3. HAWKING, F. and THURSTON, June P. (1951) – The distribution of microfilariae in the body. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 45 (3): 307 – 340
4. McFADZEAN, J.A. and HAWKING, F. (1956) – Stimuli affecting the periodic migration of the microfilariae of W. bancrofti and of Loa loa in man. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 50 (6): 543 – 562
5. EDESON, J.F.B., HAWKING, F. and SYNES, C.B. (1957) – The response of microfilariae of Brugia (= Wuchereria) malayi and W. bancrofti pacific type, to various stimuli. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 51 (4): 359 – 365
6. HAWKING, Frank (1964) – Further observations on W. bancrofti. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 58 (3): 212 – 227
7. HAWKING, F., PATTANAYAK, s. and SHARMA, H.L. (1966) – The effect of body temperature and other stimuli upon the cycles of W. bancrofti, B. malayi, B. ceylonensis, and Dirofilaria repens. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 60 (4): 497 – 513
8. YAP, E.H., HO, B.C., SINGH, M., KANG, K.L. and LIM, B.L. (1975) – Studies on the Malayan forest rat filaria, Breinlia booliati. J. Helminth., 49: 263 – 269
9. SIVANANDAM, S. and DONDERO, Jr. T.J. (1971) – A simplified non-breakable sinton pipette. S.E. Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth., 11 (3): 415
10. SIVANANDAM, S. and MAK, Joon Wah (1974) – Various giemsa preparations and their use in filariasis. JMHLTM, 1 (1): 9 – 11