บทที่ 3

วิธีการศึกษา

1. **วัสดุ**

- ปลาสลิดที่จับได้จากบ่อเลี้ยงใน ตำบลบางแก้ว อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ

2. **อุปกรณ์**

- ถังสำหรับใช้บรรจุตัวอย่างปลาสลิดในระหว่างการเดินทาง และตู้เลี้ยงปลา
- เครื่องชั่งน้ำหนัก และไม้บรรทัด
- เครื่องมือผ่าตัดเช่น กรรไกร เข็มเขี่ย มีดผ่าตัด ปากคีบ และถาดยางมะตอย เป็นต้น
- กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope)
- กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (compound light microscope)
- อุปกรณ์ต่างๆเช่นขวดสำหรับเก็บตัวอย่างหนอนพยาธิพร้อมป้าย, แผ่นสไลด์, กระจกปิดสไลด์ (cover glass), จานแก้ว (pertri-dish), Vial ขนาด 3 มิลลิลิตร, กระดาษลงรายการ, เครื่องเขียน และพู่กัน เป็นต้น
- ocular micrometer และ stage micrometer
- กล้องถ่ายภาพ พร้อมฟิล์ม และอุปกรณ์การวาดภาพ
- Incubator
- Rectangular jar จำนวน 15 ชุด
- เครื่อง Microtome รุ่น 820 Rotary ของ American optical
- กระจกสไลด์
- ใบมีดตัดเนื้อเยื่อรุ่น C-35 และ S-35
- แบบพิมพ์ (Block)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สารเคมี

- 0.5% HCl ใน 70% Ethyl alcohol
- 0.85 % Normal saline
- 1% HCl ใน 70% Ethyl alcohol
- 1% KOH ใน 70% Ethyl alcohol
- 10 % Formalin
- 10% cold buffer formalin
- Absolute butanol
- Ammonium picratum glycerine
- Berland' s fluid
- Butanol
- Decalcification solution
- Ehrilich's Acid Haematoxylin and Eosin
- Ethyl alcohol
- Grenacher's Alcoholic Borax carmine
- lactophenol
- lactophenol Cotton Blue
- Mayer's glycerol egg albumen
- Paraffin wax (paraplast)
- permount
- Xylene
- น้ำกลั่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการ

1. ทำการเก็บปลาสลิดจากบ่อเลี้ยงใน ต. บางแก้ว อ. บางพลี จังหวัดสมุทรปราการ เดือนละ 1 ครั้ง ครั้งละ 40 ตัว (2 บ่อ) เป็นเวลา 1 ปี โดยทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มต่างๆดังแสดงในภาคผนวก
2. นำปลาสลิดมา ชั่งน้ำหนัก และวัดความยาวจากปลายจมูกถึงโคนหางของปลา จากนั้นทำการตรวจหาชนิด และจำนวนของพยาธิทั้งภายนอกและภายใน

   2.1 ตรวจหาพยาธิภายนอก บริเวณตา ปาก ช่องปาก ช่องจมูก ครีบต่างๆ ซอกเกล็ดและเกล็ด ด้วยตาเปล่าอย่างคร่าวๆก่อน ขูดเมือกบริเวณลำตัวปลา แล้วเขี่ยลงบนสไลด์ที่มีหยดน้ำอยู่ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อหาหนอนพยาธิที่อาศัยอยู่ตามผิวตัว ครีบ เกล็ด เมือก ตัดซี่เหงือกใส่จานแก้วที่มีน้ำสะอาดแล้วขูดเบาๆ นำไปตรวจหาหนอนพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

   2.2 ตรวจหาพยาธิภายในด้วยการผ่าตัดตรงรอยต่อระหว่างหัว และกระดูกสันข้อแรก (หลังครีบอก) แล้วใช้มีดหรือกรรไกรผ่าเปิดช่องท้องโดยตลอด (จากคอถึงทวารหนัก) แล้วนำอวัยวะภายในแต่ละส่วนออกมาตรวจหาหนอนพยาธิอย่างละเอียด รวมทั้งตรวจดูช่องท้องบริเวณเยื่อบุช่องท้อง สำหรับทางเดินอาหารใช้กรรไกรตัดตามความยาวของทางเดินอาหารให้แผ่ออก แล้วตรวจดูหนอนพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์จุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ตัดเนื้อปลาตามความยาวของลำตัวออกเป็นแผ่นบางๆ เพื่อตรวจหาหนอนพยาธิบางชนิดที่อยู่ในกล้ามเนื้อ
3. แยกชนิดและนับจำนวนพยาธิที่สามารถนับได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ
4. เมื่อได้ตัวอย่างหนอนพยาธิแต่ละชนิดเก็บแยกกันดังนี้

   4.1 หนอนพยาธิพวกปลิงใสมีขนาดเล็กมากจึงควรทำการย้อมสีและทำสไลด์ถาวรทันที

   4.2 หนอนพยาธิหัวหนาม และตัวตืด แช่ในน้ำสะอาด เก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 คืน หรือ จนกว่าส่วนหัวจะยืดออกมาเต็มที่ จากนั้นจึงเก็บใน 70 % ethyl alcohol ก่อนทำการย้อมสีต่อไป

   4.3 หนอนพยาธิตัวกลม แช่ในน้ำยา Berland's fluid ประมาณ 1-2 นาที จากนั้นจึงเก็บใน 70 % ethyl alcohol ก่อนทำการย้อมสีต่อไป

   4.4 หนอนพยาธิใบไม้ แช่ในน้ำยา Berland's fluid 1-2 นาที ถ้าหนอนพยาธิมีขนาดใหญ่ นำมาประกบด้วยสไลด์ 2 แผ่น แล้วใช้ยางรัด เพื่อให้ตัวพยาธิแบนเก็บตัวอย่างใน 70 % ethyl alcohol ก่อนทำการย้อมสีต่อไป (หนอนพยาธิใบไม้ที่มีขนาดเล็กมากควรทำการย้อมสีทันที)

5. นำพยาธิที่ได้ไปทำสไลด์ถาวรตามวิธีของ สุวนีย์ คุณาไทย (2512) ส่วนหนึ่ง อีกส่วนหนึ่งนำไปถ่ายรูปเก็บไว้เป็นหลักฐาน

5.1. การทำสไลด์ถาวรของ หนอนพยาธิใบไม้ พยาธิหัวหนาม และพยาธิตัวตืด

5.1.1 นำหนอนพยาธิที่เก็บไว้ใน 70 % ethyl alcohol มาย้อมด้วยสี Borax carmine นาน 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าหนอนพยาธิจะติดสีย้อม

5.1.2 ล้างสีที่มากเกินไปด้วย 10, 20, 30, 50 % และ 1 % HCl ใน 70 % ethyl alcohol จนเป็นสีชมพูอ่อน

5.1.3 หยุดการล้างสีด้วย 1% KOH ใน 70 % ethyl alcohol นาน 20 นาที

5.1.4 ล้างด้วย 85 % ethyl alcohol 3 ครั้ง ครั้งละ 6 ชั่วโมง

5.1.5 นำน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยผ่านขบวนการดังนี้

95% Ethyl alcohol : Butanol ในอัตราส่วน 3:1 นาน	3	ชั่วโมง
95% Ethyl alcohol : Butanol ในอัตราส่วน 2:1 นาน	3	ชั่วโมง
95% Ethyl alcohol : Butanol ในอัตราส่วน 1:1 นาน	3	ชั่วโมง
95% Ethyl alcohol : Butanol ในอัตราส่วน 1:2 นาน	3	ชั่วโมง
95% Ethyl alcohol : Butanol ในอัตราส่วน 1:3 นาน	3	ชั่วโมง
Butanol นาน	6 -18	ชั่วโมง

5.1.6 ทำให้ใส (clearing) โดยผ่านขบวนการดังนี้

Butanol : xylene ในอัตราส่วน 3:1 นาน	6	ชั่วโมง
Butanol : xylene ในอัตราส่วน 2:1 นาน	6	ชั่วโมง
Butanol : xylene ในอัตราส่วน 1:1 นาน	6	ชั่วโมง
Butanol : xylene ในอัตราส่วน 1:2 นาน	6	ชั่วโมง
Butanol : xylene ในอัตราส่วน 1:3 นาน	6	ชั่วโมง
xylene นาน	1	วัน

5.1.7 mouting โดยนำหนอนพยาธิวางลงบนสไลด์ที่มี xylene หยดอยู่ จัดให้ตรงแล้วหยดด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover glass) นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือวางไว้บน slide warmer อุณหภูมิประมาณ 50 องศา-เซลเซียส

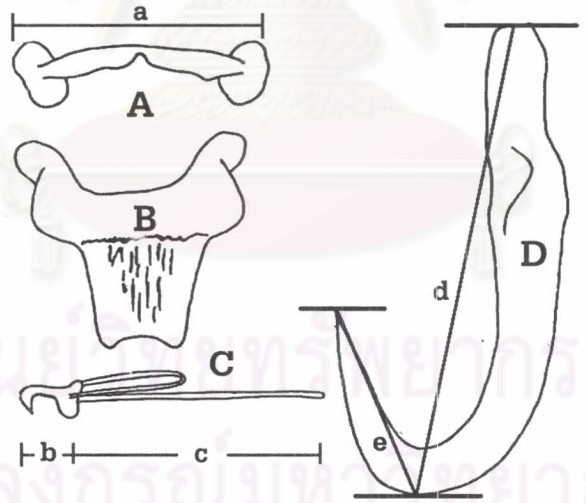
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 การทำสไลด์ถาวรของหนอนพยาธิตัวกลม ปลิงใส และหนอนพยาธิใบไม้บางชนิดที่มีขนาดเล็กมาก

5.2.1 นำหนอนพยาธิวางลงบนสไลด์ที่มี coloured lactophenol นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส จนพยาธิติดสี

5.2.2 ดูดสี mounting coloured lactophenol ที่เหลือออกแล้วหยด lactophenol บนหนอนพยาธิ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วจึงทาขอบทั้งสี่ของกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ

6. บันทึกผลด้วยการ ถ่ายรูป และวาดรูป แล้วทำการจัดจำพวกและตรวจหาชื่อทางวิทยาศาสตร์โดยใช้หลักเกณฑ์ของ Anderson (2000), Byksovskaya – Pavloskaya (1964), Fernando and Fertado (1963a), Pearse (1933), Schell (1970), Yamaguti (1933, 1958, 1959, 1961, 1963) และ York and Marpleston (1962) สำหรับหนอนพยาธิพวกโมโนจีน หรือปลิงใส จะมีขนาดและลักษณะที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด ลักษณะที่นำมาใช้ในการจำแนกชนิดของปลิงใส (key characteristic) ได้อ้างอิงตาม Roger and Wellborn (1965); Wellborn and Roger (1967); Mizelle, Kritsky and Bury (1968); Roger (1967); Rogers (1968); Ikezaki and Hoffman (1957)



ภาพที่ 5 แสดงการวัดขนาดโครงสร้างที่ใช้ในการยึดเกาะของปลิงใส (ดัดแปลงจาก Byksovskaya - Pavloskaya,1964; Wellborn and Roger, 1967)

A=dorsal bar; B= ventral bar และ shield; C= marginal hook; D= anchor; a= ความกว้างของ dorsal bar และventral bar ; b=ความยาว hooklet ; b+c= ความยาว marginal hook ; d= ความยาวของ anchor ; e= ความยาวของปลาย anchor

7. นำพยาธิที่แยกแล้วไปศึกษาถึงชนิด และรายละเอียดต่างๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงนำข้อมูลมาสรุปรวบรวมชนิดของพยาธิ และจำนวนพยาธิที่พบในปลาสลิด ข้อมูลที่ได้นำมาหาค่าร้อยละของปลาสลิดที่เป็นโรคหนอนพยาธิโดยคำนวณจาก

จำนวนร้อยละของปลาที่พบพยาธิ (% infection) = $\frac{\text{จำนวนปลาสลิดที่พบพยาธิ}}{\text{จำนวนปลาสลิดที่นำมาศึกษาทั้งหมด}} \times 100$

8. ศึกษาผลของพยาธิต่อพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆของปลาสลิด

นำอวัยวะต่างๆของปลาสลิดที่ตรวจพบพยาธิมาผ่านขั้นตอนต่างๆดังต่อไปนี้

8.1 รักษาสภาพใน 10% cold buffer formalin นานประมาณ 24-48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำชิ้นเนื้อไปล้างผ่านน้ำไหลนานประมาณ 10 นาที ก่อนจะผ่านขั้นตอนต่างๆ ในข้อ 8.2 สำหรับเนื้อเยื่อที่มีกระดูกเป็นโครงสร้างเช่น เหงือก หรือครีบให้นำเนื้อเยื่อแช่ใน 5% Na_2So_4 นาน 10-30 นาที แล้วจึงนำเนื้อเยื่อแช่ใน Decalcification solution นาน 1-3 ชม.ก่อนผ่านขั้นตอนในข้อ 8.2

8.2 การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยผ่านกระบวนการดังต่อไปนี้

70% Ethyl alcohol	นาน	24	ชั่วโมง
80% Ethyl alcohol	นาน	1	ชั่วโมง
90% Ethyl alcohol	นาน	12	ชั่วโมง
95% Ethyl alcohol	นาน	6	ชั่วโมง
95% Ethyl alcohol	นาน	6	ชั่วโมง
Butanol	นาน	1	ชั่วโมง

8.3 การทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) ทำได้โดยนำชิ้นเนื้อที่ได้จากข้อ 8.2 มาแช่ใน xylene นานประมาณ 1 ชั่วโมง

8.4 การตรึงเนื้อเยื่อในพาราฟิน(embedding) โดยผ่านกระบวนการดังต่อไปนี้

xylene : paraffin wax ในอัตราส่วน 1:1	นาน	30	นาที
paraffin wax1	นาน	30	นาที
paraffin wax2	นาน	1	ชั่วโมง

นำเนื้อเยื่อใส่ในแบบพิมพ์ (block) ที่เตรียมไว้ เติมพาราฟินรอให้เย็น แล้วค่อยๆเคาะแบบพิมพ์ตัวอย่างออกมาแต่งให้มีขนาดเหมาะสมกับการตัดเนื้อเยื่อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8.5 การตัดเนื้อเยื่อ (section)

นำแบบพิมพ์ตัวอย่างที่แช่เย็นแล้วประมาณ 1 คืนมาตัดด้วยเครื่อง Microtome ให้มีความหนาประมาณ 4-6 ไมโครเมตร ติดบนสไลด์ด้วย Mayer's glycerol egg albumen ทิ้งไว้ 1 คืน รอให้แห้ง

8.6 การทำสไลด์ถาวร และย้อมสี Hematoxylin & Eosin

xylene	นาน	5	นาที
n-butanol	นาน	3	นาที
95% Ethyl alcohol	นาน	3	นาที
90% Ethyl alcohol	นาน	3	นาที
70% Ethyl alcohol	นาน	3	นาที
dH_2O	นาน	3	นาที
Hematoxylin	นาน	1	ชั่วโมง
dH_2O	นาน	3	นาที
diff (o.5% HCl ใน 70% Ethyl alcohol)	นาน	30	วินาที
tap water	นาน	15	นาที
90% Ethyl alcohol	นาน	3	นาที
70% Ethyl alcohol	นาน	3	นาที
Eosin	นาน	45	วินาที
95% Ethyl alcohol	นาน	3	นาที
n-butanol	นาน	3	นาที
xylene	นาน	3	นาที

8.7 การปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (mounting)

หยด permount บนสไลด์ที่ย้อมสีแล้ว ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง

8.8 นำสไลด์ถาวรมาตรวจสอบพยาธิสภาพของอวัยวะในส่วนต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วถ่ายภาพเก็บไว้เป็นหลักฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย