รายงานวิจัย

ชนิดและการแพร่กระจายของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียในปลาเศรษฐกิจของจังหวัดตรัง

Diversity and Distribution of Myxosporidian from Economic Fishes in Trang Province

โดย

นรสิงห์ เพ็ญประไพ

ธีรวุฒิ เลิศสุทธิชวาล

มาโนช ขำเจริญ

กิตติชนม์ อุเทนะพันธุ์

กิจการ ศุภมาตย์

ห้องสมุด
มทร.ศรีวิชัย วข.ตรัง

เลขทะเบียน 50.111
เลขหมู่ SH 171
เล่มที่ 1
วันที่ 1 ก.ค. 52

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี

งบประมาณ ปี 2549 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

วิทยาเขตตรัง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ที่ได้สนับสนุนงบประมาณปี 2549 ขอขอบคุณคณบดี นักศึกษา ได้แก่ นายนำพล บัวหอม, นางสาวมัณฑนา ใจเย็น, นางสาวอนีทรา เพ็ชรขัน, นางสาวอรอุมา ทวีศรี, นางสาววรรณา ทิ้งน้ำรอบ, และนางสาวศาล์ธนี ศรีศาสนวงศ์ ขอขอบคุณนักศึกษาอาจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ที่ช่วยแยกชนิดปลาให้ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ รวมทั้งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้การศึกษาทางด้านจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ตลอดจนผู้ร่วมวิจัยทุกคนที่ได้ช่วยเหลือแก้ไขงานวิจัยจนจบการทดลอง จนได้ข้อมูลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น ควรค่าแก่การศึกษาทางวิชาการต่อไป

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2550

ชนิดและการแพร่กระจายของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียในปลาเศรษฐกิจของจังหวัดตรัง

Diversity and Distribution of Myxosporidian from Economic Fishes in Trang Province

นรสิงห์ เพ็ญประไพ[1] ธีรวุฒิ เลิศสุทธิชวาล[2] มาโนช ขำเจริญ[1]

Norasing Penprapai Theerawoot Lertsutthichawal Manoch Khumcharoan

กิตติชนม์ อุเทนะพันธุ์[3] กิจการ ศุภมาตย์[3]

Kittichon U - taynapun Kidchakarn Supamattaya

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างปลาน้ำจืด น้ำกร่อย และปลาน้ำเค็ม ในจังหวัดตรัง ระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือน กันยายน 2549 เก็บปลาทั้งหมด 647 ตัว จาก 16 วงศ์ 21 ชนิด พบปลาติดเชื้อปรสิต 1.08 เปอร์เซ็นต์ของปลาทั้งหมด พบปรสิตในปลาหมอไทย 7.1 เปอร์เซ็นต์, ปลากดเหลือง 5.5 เปอร์เซ็นต์, ปลากะพงขาว 10 เปอร์เซ็นต์, ปลากระบอก 12.5 เปอร์เซ็นต์, ปลาซึกเดียว 3.2 เปอร์เซ็นต์, ปลากะเบน 1.4 เปอร์เซ็นต์, ปลากะรังจุดแดง 3.3 เปอร์เซ็นต์, และปลาดุกทะเล 3.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตรวจพบปรสิตสกุล *Myxobolus, Henneguya* และ *Zschokkella,* ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลา ได้แก่ ผิวหนัง, เกล็ด, เหงือก, กระเพาะอาหาร และถุงน้ำดี

ในการศึกษาทางพยาธิสภาพไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แต่มีการศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของปรสิตในตัวเต็มวัยทั้งโครงสร้างภายนอกและภายใน สำหรับ *Zschokkella* พบโครงสร้างที่สามารถเห็นชัดได้แก่ Volvogenic cell, Sporoplasm, Polar capsule และ Polar filament ส่วนการศึกษาทาง PCR (Polymerase chain Reaction) ยังไม่ปรากฏชัดว่าเป็นชนิดใหม่ (New species)

คำสำคัญ : มิกโซสปอร์ริเดีย, ปลาเศรษฐกิจ, จังหวัดตรัง

Abstract

Some Fresh water, Brackish and Sea water fishes were collected in the area of Trang Province during January and September, 2006 of 647 collected fish samples were classified to be 16 Family and 21 Genus. We found that 1.08 Percent of all specimens were infected by Myxosporidia parasites composted of *Anabas testudineus* (7.1 Percents), *Hemibagrus nemurus* (5.5 Percents), *Lates calcarifer* (10 Percents), *Moolgarda seheli* (12.5 Percents), *Psettodes erumei* (3.2 Percents), *Himantura imbricatus* (1.4 Percents), *Epinephelus coioides* (3.3 Percents) and *Plotosus canius* (3.1 Percents), respectively Infections parasite in the genus Myxobolus, Henneguya and Zschokkella found in various organ such as skin, scale, stomach and gall bladder.

From histopathological study, no evidence for histopathological lesion. Furthermore, interier and exterier structure of adult parasites were observed Volvogenic cell, Sporoplasm, Polar capsule and Polar filament by electron microscope Following PCR (Polymerase chain reaction) result also no confirm for new species of parasites were found.

Keyword : Myxosporidian, Economic fish, Trang Province.

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

Faculty of Science and Fisheries Technology. Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang Campus.

[2]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

Faculty of Science and Technology. Rajamangala University of Technology Srivijaya Nakhonsrithammarat Campus.

[3]คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

Faculty of Natural Resource, Prince of Songkhla University, Hatyai Campus.

สารบาญ

เรื่อง	หน้า
สารบาญ	(1)
สารบาญตาราง	(2)
สารบาญภาพ	(3)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ตรวจเอกสาร	3
ระเบียบและวิธีวิจัย	19
ผลการทดลอง	22
วิจารณ์ผลการทดลอง	38
สรุปผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	48

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชนิด Myxosporea ที่พบในเจ้าบ้านชนิดอื่นนอกเหนือจากปลา	11
2	แสดงปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียที่สำคัญก่อให้เกิดโรคร้ายแรงในต่างประเทศ	16
3	แสดงปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียที่พบในประเทศไทย	16
4	แสดงน้ำหนักและความยาวของปลาน้ำจืด	23
5	แสดงน้ำหนักและความยาวของปลาน้ำกร่อย	23
6	แสดงน้ำหนักและความยาวของปลาน้ำเค็ม	24
7	แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลรูปร่างสปอร์ของ *Myxobolus* sp. กับ *Myxobolus* สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีขนาดสปอร์และอวัยวะในการติดเชื้อใกล้เคียงกัน	39

ตารางผนวกที่		
1	ตัวอย่างปลาเก็บรวบรวมได้จากแม่น้ำในปลาน้ำจืด	49
2	ตัวอย่างปลาเก็บรวบรวมได้จากแม่น้ำและทะเลในปลาน้ำกร่อย	49
3	ตัวอย่างปลาเก็บรวบรวมได้จากแม่น้ำและทะเลในปลาน้ำเค็ม	49
4	ตัวอย่างเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการตามขั้นตอนในเครื่อง Automatic tissue Processor	60
5	ขั้นตอนการย้อมสี ฮีมาท้อกไซลีน และอิโอซิน	62
6	ขั้นตอนแทนที่น้ำ (dehydration)	64
7	การใช้สารแทรกในเนื้อเยื่อ (infiltration)	65

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงวงจรชีวิตของ *Myxobolus cerebralis*	8
2	แสดงตัวเต็มวัยของปรสิต *Myxobolus* sp. Type A	25
3	แสดงปรสิต *Myxobolus* sp. Type B	26
4	แสดงปรสิต *Myxobolus* sp. Type C	27
5	แสดงปรสิต *Myxobolus* sp. Type D	28
6	แสดงปรสิต *Henneguya* sp. Type A ชนิด 2 หาง	29
7	แสดงปรสิต *Henneguya* sp. Type B ตัวเต็มวัย	30
8	แสดงปรสิต *Henneguya* sp. Type C ตัวเต็มวัย	31
9	แสดงปรสิต *Zschokkella* sp. ระยะตัวเต็มวัย	32
10	แสดงสปอร์ของ *Myxobolus* sp. ที่แตกออกจาก cyst	33
11	แสดง *Myxobolus* sp. Type A ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	34
12	แสดงปรสิต *Myxobolus* sp. ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	35
13	แสดงปรสิต *Zschokkella* sp. มีโครงสร้างภายนอกลักษณะรีคล้ายรูปไข่	35
14	แสดงปรสิต *Zschokkella* sp. ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน	36
15	แสดงผลการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของ *Myxobolus* sp. ด้วย MX3 - MX5 primer	37
16	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณชนิดของปลาที่ติดเชื้อต่อชนิดปลาที่ทำการศึกษา	38

ภาพผนวกที่		
1	รูปร่างและลักษณะของปลานิล, SL : 10.75 cm.	51
2	รูปร่างและลักษณะของปลาตะเพียนขาว, SL : 16.5 cm.	51
3	รูปร่างและลักษณะของปลาหมอไทย, SL : 14.75 cm.	51
4	รูปร่างและลักษณะของปลายี่สกเทศ, SL : 13.0 cm.	51
5	รูปร่างและลักษณะของปลาบ้า, SL : 9.0 cm.	53
6	รูปร่างและลักษณะของปลาดุกบิ๊กอุย, SL : 20.4 cm.	53
7	รูปร่างและลักษณะของปลาดุกยักษ์, SL : 19.7 cm.	53
8	รูปร่างและลักษณะของปลาขี้ขม, SL : 14.0 cm.	53
9	รูปร่างและลักษณะของปลาชะโอน, SL : 16.25 cm.	55
10	รูปร่างและลักษณะของปลาซิวควาย, SL : 9.75 cm.	55

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่

11	รูปร่างและลักษณะของปลากดเหลือง, SL : 25.75 cm.	55
12	รูปร่างและลักษณะของปลาช่อน, SL : 24.7 cm.	55
13	รูปร่างและลักษณะของปลากระบอก, SL : 19.75 cm.	57
14	รูปร่างและลักษณะของปลากระพงขาว, SL : 17.5 cm.	57
15	รูปร่างและลักษณะของปลากะรังจุดแดง, SL : 12.0 cm.	57
16	รูปร่างและลักษณะของปลาดุกทะเล, SL : 34.8 cm.	57
17	รูปร่างและลักษณะของปลาลิ้นหมา, SL : 21.45 cm.	59
18	รูปร่างและลักษณะของปลากระเบน, SL : 15.5 cm.	59
19	รูปร่างและลักษณะของปลาตาหวาน, SL : 16.8 cm.	59
20	รูปร่างและลักษณะของปลาซีกเดียว, SL : 23.0 cm.	59
21	รูปร่างและลักษณะของปลาสีกุน, SL : 24.5 cm.	59

บทนำ

ปัจจุบันประชากรโลกได้ทวีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆดังนั้นความต้องการปัจจัยสี่เพื่อการดำรงชีวิตก็ย่อมมีมากขึ้นตามลำดับ อาหารเป็นส่วนหนึ่งที่ประชากรโลกต้องการในปริมาณสูง อดีตซึ่งเคยจับปลาจากธรรมชาติก็มีวันที่ต้องจับลดน้อยลงเมื่อ 100 ปีที่ผ่านมาสำหรับประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยอาหารธรรมชาติ ประชากรยังไม่รู้จักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำน้อยรายนักที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจนมาถึงปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำย่อมมีความสำคัญมากจนทำให้เกิดรูปแบบที่เลี้ยงสัตว์น้ำแบบ ด้อยพัฒนา กึ่งพัฒนา และพัฒนาแล้วยิ่งเทคโนโลยีได้เจริญไปมากการเลี้ยงก็ปรับเปลี่ยนแบบพัฒนาเป็นส่วนใหญ่ในแวดวงการประมงมีการศึกษาในปี 2547 พบว่าประเทศไทยสามารถผลิตปลาได้ทั้งหมด 4,099.6 ตันโดยเป็นปลาที่จับจากธรรมชาติปลาน้ำเค็ม 8,635.9 ตันปลาน้ำจืด 203.7 ตัน(กรมประมง,2549)ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาตัวเบียนที่บั่นทอนผลผลิตปลาโดยเป็นการศึกษาปรสิตที่พบในปลาน้ำจืด น้ำเค็ม น้ำกร่อยในจังหวัดตรังซึ่งอยู่ทางภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งปรสิตบางชนิดมีผลต่อผลผลิตของปลาหรืออาจเป็นโทษที่รุนแรงขณะที่เรารับประทานอาหารเข้าไปอาหารเป็นปัจจัยส่วนหนึ่งของประชากรโลกโดยเฉพาะอาหารโปรตีนพวกปลาที่สำคัญผู้บริโภคเมื่อบริโภคเข้าไปแล้วมีความเจริญเติบโตได้สูงอาหารสะอาด ปลอดภัยและไม่มีการปนเปื้อนจากโรค ดังนั้นการศึกษาปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียในปลาน้ำจืด ปลาน้ำกร่อย ปลาน้ำเค็ม ของแหล่งน้ำต่าง ๆ ที่อยู่ในจังหวัดตรัง ทำให้ทราบโครงสร้างและการแพร่กระจายของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียได้เป็นอย่างดี ปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียเป็นปรสิตที่มีบทบาทในส่วนที่เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทางการประมงของประเทศไทย โดยเฉพาะพบในปลาทำให้ก่อให้เกิดโรคสัตว์น้ำโดยปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดโรคสัตว์น้ำได้แก่ สิ่งแวดล้อม ที่อยู่อาศัย และตัวเชื้อโรค ปัจจุบันเริ่มมีการตระหนักมากถึงภัยที่เกิดจากปรสิตชนิดนี้ โดยเฉพาะในต่างประเทศที่ระบาดมาก โดยเฉพาะเกิดกับปลาในเขตหนาวสร้างความเสียหายอย่างมากในกลุ่มปลาเศรษฐกิจ เช่น ปลา Trout, Salmol มูลเหตุที่มีการศึกษาครั้งนี้ เพื่อต้องการศึกษาสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นพื้นฐานของการศึกษาในระดับสูงต่อไป รวมทั้งศึกษาด้าน ความชุกชุมของปรสิต ตลอดจนการศึกษาข้อมูล การเกิดพยาธิสภาพ ข้อมูลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scaning electron microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope) รวมถึงกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา เพื่อเป็นแนวทางศึกษาขั้นสูง เพื่อแยก species ของปรสิต โดยศึกษาทางโมเลกุลโดยเทคนิค PCR ด้วย เพื่อเป็นข้อมูลการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่ก้าวล้ำหน้าต่อไป ซึ่งสภาพภูมิศาสตร์ที่เลือกศึกษาครั้งนี้ โดยเลือกที่จะศึกษาในจังหวัดตรังซึ่งอยู่ทางภาคใต้ฝั่งอันดามันของประเทศไทย และจากการศึกษาประวัติความเป็นมาโดยนักวิชาการที่อยู่ในประเทศไทย มีการรายงานไม่บ่อยนักเกี่ยวกับปรสิตชนิดนี้ ที่เด่น ๆ ในการศึกษาภาคกลาง ภาคใต้ ของประเทศไทยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางด้านปรสิตมิกโซสปอร์ริเดีย จะเป็นแนวทางในการจัดการ และการป้องกันรักษา เพื่อให้

เกิดประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาทางด้านปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียอย่างแพร่หลายต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดและสัณฐานวิทยาของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียที่พบในปลาน้ำจืด น้ำกร่อย ปลาน้ำเค็ม

2. เพื่อศึกษาความชุกชุม และการแพร่กระจายของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดีย

3. เพื่อศึกษาผลกระทบของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลา

4. เพื่อศึกษา เทคนิคการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของปรสิตที่สนใจในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ตรวจเอกสาร

ปัจจุบันพบว่าในภาวะเศษฐกิจมีการบริโภคปลามากขึ้นเนื้อปลาเป็นอาหารโปรตีนที่มีความสำคัญสูงทำให้ผู้บริโภคตั้งแต่เด็กๆเจริญเติบโตเร็วในวัยผู้ใหญ่ทำให้ปลอดภัยจากโรคต่างๆซึ่งผู้ที่นิยมบริโภคปลามากๆทำให้ได้รับประโยชน์สูงแต่ส่วนหนึ่งปลาในปัจจุบันได้ลดน้อยลงเพราะปัจจุบันมีการจับปลากันมากโดยไม่มีกฎหมายกำหนดข้อลงโทษที่รุนแรงทำให้การจับจากธรรมชาติได้ปลาเล็ก ปลาใหญ่มากมายจวบจนมาถึงปัจจุบันต้องมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเข้ามาช่วยเหลือเพื่อเพิ่มปริมาณปลาให้มากขึ้นกับกลุ่มผู้บริโภค

ปัจจุบันสัตว์น้ำที่มีผู้นิยมบริโภค มากได้แก่ ปลาน้ำจืด ปลาน้ำกร่อย และปลาน้ำเค็ม จากอดีตที่ผ่านมา มีทรัพยากรปลาจำนวนมาก ปัจจุบันได้ลดน้อยลง เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของประชากรภายในประเทศที่ต้องการบริโภคปลาจำนวนมาก โดยการจับปลาจากธรรมชาติจากทะเล มีแนวโน้มลดลง ดังนั้นเกษตรกรจึงมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจำนวนมากในรูปแบบเลี้ยงในบ่อและกระชัง เมื่อมีการเลี้ยงย่อมเกิดอุปสรรคทางด้านปัญหาโรคระบาดที่พบในปลา สาเหตุจากโรคระบาดที่สำคัญได้แก่ ปรสิตกลุ่มมิกโซสปอร์ริเดียที่เกิดขึ้นในปลาน้ำจืด น้ำกร่อย น้ำเค็ม แม้ว่าจะไม่รุนแรงเหมือนแบคทีเรีย ไวรัส แต่พบว่าในต่างประเทศพบระบาดรุนแรงมาก ในประเทศไทยมีการศึกษาข้อมูลดังกล่าวเช่นเดียวกัน แต่ข้อมูลการระบาดยังไม่มีรายงานว่ารุนแรงมากนัก กรณีการศึกษาครั้งนี้อาจนำมาซึ่งแนวทางการเรียนรู้ การป้องกันในปัจจุบันและอนาคต เกี่ยวกับปรสิตมิกโซสปอร์ริเดีย ที่เกิดกับปลาที่พบในประเทศไทย รวมทั้งการค้นพบสิ่งใหม่ ๆ ทางด้านปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียต่อไป

ปรสิตในกลุ่มมิกโซสปอร์ริเดีย (Parasitic of Myxosporidia)

ปรสิตในกลุ่มนี้จัดอยู่ใน Phylum Myxozoa ซึ่งได้มีการบันทึกการค้นพบของปรสิตดังกล่าวตั้งแต่ต้นศตวรรณที่ 19 เป็นปรสิตที่มีขนาดเล็ก ประกอบไปด้วยเซลล์หลายเซลล์ (multicellular organism)เป็นปรสิตที่อยู่ ในเนื้อเยื่อในเซลล์หรือช่องว่างภายในลำตัว เช่น ถุงน้ำดี (gall bladder)หรือท่อไตปรสิตในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ เช่น ปลา สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ในสัตว์ไม่มีประดูกสันหลังบางชนิดและยังมีรายงานพบปรสิตชนิดนี้ในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การศึกษาปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียส่วนใหญ่มีรายงานจากปลา ทั้งปลาน้ำจืดและปลาทะเล (กิจการ และคณะ, 2539)

ลักษณะทางอนุกรมวิธานของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดีย (Taxonomy of Myxosporidia)

การศึกษาเกี่ยวกับปรสิตมิกโซสปอร์ริเดีย พบว่าจากการศึกษาโดย Lom และ Dykova (2006) ได้ทำการจัดลำดับชั้น ลักษณะรายละเอียดทางอนุกรมวิธานของปรสิตไว้ดังนี้

Phylum: Myxozoa

Class: Malacosporea

Order: Malacovalvulida

Family: Saccosporidae

Genus: *Buddenbrockia*

Genus: *Tetracapsuloides*

Class: Myxosporea

Order: Bivalvulida

Suborder: Sphaeromyxina

Family: Sphaeromyxidae

Genus: *Sphaeromyxa*

Suborder: Variisporina

Family: Myxidiidae

Genus: *Myxidium*

Genus: *Enteromyxum*

Genus: *Zschokkella*

Genus: *Coccomyxa*

Family: Ortholineidae

Genus: *Ortholinea*

Genus: *Neomyxobolus*

Genus: *Cardimyxobolus*

Genus: *Triangula*

Genus: *Kentmoseria*

Family: Sinuolineidae

Genus: *Sinuolinea*

Genus: *Davisia*

Genus: *Myxoproteus*

Genus: *Bipteria*

Genus: *Paramyxoproteus*

Genus: *Neobipteria*

Genus: *Schulmania*

Genus: *Noblea*

Family: Fabesporiae

Genus: *Fabespora*

Family: Ceratomyxidae

Genus: *Caratomyxa*

Genus: *Leptotheca*

Genus: *Meglitschia*

Genus: *Ellipsomyxa*

Family: Sphaerosporidae

Genus: *Sphaerospora*

Genus: *Polysporoplama*

Genus: *Hoferellus*

Genus: *Wardia*

Genus: *Palliatus*

Genus: *Myxobilatus*

Family: Chloromyxidae

Genus: *Chloromyxum*

Genus: *Caudomyxum*

Genus: *Agarella*

Family: Auerbachiidae

Genus: *Auerbachia*

Genus: *Globospora*

Family: Alatosporidae

Genus: *Alatospora*

Genus: *Pseudoalatospora*

Genus: *Renispora*

Family: Parvicapsulidae

Genus: *Parvicapsula*

Genus: *Neoparvicapsula*

Suborder: Platysporina

Family: Myxobolidae

Genus: *Myxobolus*

Genus: *Spirosuturia*

Genus: *Unicauda*

Genus: *Dicauda*

Genus: *Phlogospora*

Genus: *Laterocaudata*

Genus: *Henneguya*

Genus: *Hennegoides*

Genus: *Tetrauronema*

Genus: *Thelohanellus*

Genus: *Neothelohanellus*

Genus: *Neohenneguya*

Genus: *Trigonosporus*

Order: Multivalvulida

Family: Trilosporidae

Genus: *Trilospora*

Genus: *Unicapsula*

Family: Kudoidae

Genus: *Kudoa*

Genus: *Pentacapsula*

Genus: *Hexacapsula*

Genus: *Septemcapsula*

Genus: *Trilosporides*

Family: Spinavaculidae

Genus: *Octospina*

สัณฐานวิทยาองค์ประกอบและโครงสร้างของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดีย (Morphology and Structure of Myxosporidia)

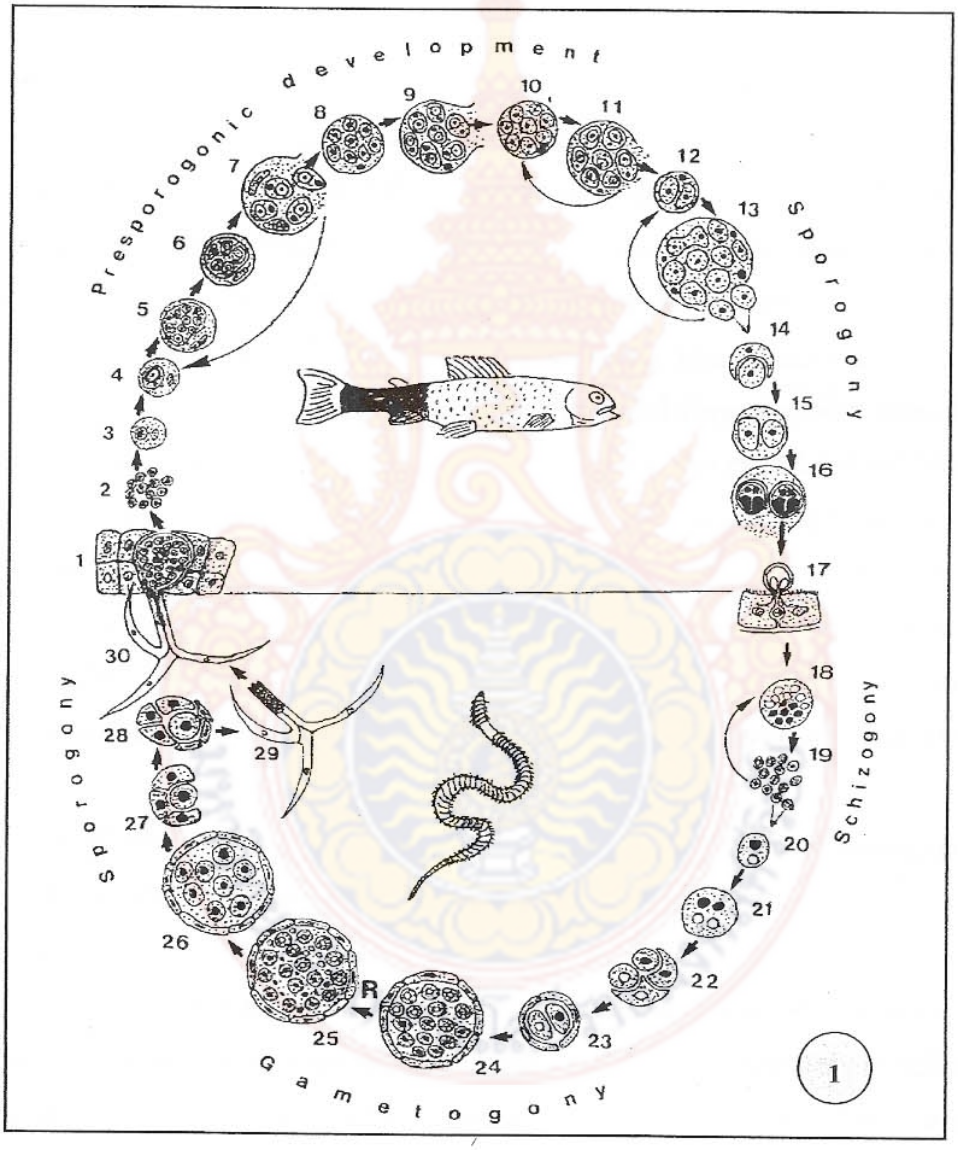
ปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียมีจำนวนสมาชิกทั้งหมด 16 ครอบครัว โดยแต่ละครอบครัวจะประกอบด้วยสมาชิกหลายชนิดที่มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันคือ ปรสิตที่มีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ได้แก่ สกุล (genus) *Sphaerospora*, *Myxobolus* และ *Zschokkella* ปรสิตที่มีรูปร่างแบบดาว ได้แก่ *Kudoa* และ *Pentacapsula* ขณะที่บางสกุลคล้ายพระจันทร์เสี้ยวได้แก่ *Ceratomyxa* นอกจากนี้ยังมีบางสกุลที่มีเปลือกหุ้มสปอร์ (shell valve) มีการดัดแปลงยื่นยาวไปทางด้านข้างหรือด้านท้ายของสปอร์ ได้แก่ สกุล *Leptotheca, Henneguya*และ *Hoferellus* เป็นต้น (Lom and Arthur, 1989)

ลักษณะโครงสร้างของปรสิตระยะสปอร์เต็มวัย (mature spore)ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ เปลือกหุ้มสปอร์ โพลาร์แคปซูลและสปอร์โรพลาสซึม โดยเปลือกหุ้มสปอร์มีจำนวน 2 – 7 ฝา แต่ละฝาประกบชนกันทำให้เกิดเป็นสันหรือแนวแกนสปอร์ (suture line) บริเวณผิวเปลือกหุ้มสปอร์โดยส่วนใหญ่มีลักษณะเรียบ เช่น ปรสิต *Sphaerospora molanari* และ *Myxobolus* ลักษณะเป็นสันนูนเรียงตามความยาวสปอร์ (Noble, 1966)จากการศึกษาส่วนประกอบของเปลือกหุ้มสปอร์พบว่าส่วนใหญ่เป็นสารพวกเซลลูโลส (cellulose) ไคติน (chitin) และสารคล้ายวุ้นที่มีลักษณะเป็นผิวเมือกอยู่บริเวณชั้นนอกสุด โพลาร์แคปซูลจัดเป็นโครงสร้างที่อยู่ภายในบริเวณตำแหน่งด้านหน้าสปอร์โดยมีลักษณะกลม รูปไข่หรือรียาว ภายในมีช่องว่างสำหรับบรรจุโพลาร์ฟิลาร์เมนท์ (polarfilament) ประกอบด้วยสารพวกโปรตีนเรียงตัวเป็นชั้นโดยมีเซลล์ออสโมฟิลิคเมเบรนห่อหุ้มทำให้มีความทนทานต่อสารที่เป็นด่าง สำหรับสปอร์โรพลาสซึมจัดเป็นโครงสร้างหรือออร์กาเนลล์ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสืบพันธุ์ของปรสิตกลุ่มนี้ โดยมีบางชนิดขนาดใหญ่และอยู่ในบริเวณตอนกลางของสปอร์ บางชนิดอยู่ตอนท้ายของสปอร์ ได้แก่ ปรสิตกลุ่ม *Caratomyxa, Myxoproteus* และสมาชิกบางสกุลของ *Leptotheca* ภายในสปอร์โรพลาสซึมประกอบด้วยนิวเคลียสจำนวน 1-2 อันขึ้นอยู่กับแต่ละชนิด บริเวณตอนกลางมีลักษณะเป็นช่องว่างที่เรียกว่าไอโอดิโนฟีลัสหรือไกลโคเจนแวคคิวโอลที่มีคาร์โบไฮเดรตพวกเบตา-ไกลโคเจน (β-glycogen) แพร่กระจายอยู่อย่างหนาแน่น (กิจการ และคณะ, 2539)

วัฏจักรชีวิตและการติดต่อของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดีย (Life cycle and Transmission of Myxosporidia)

Taylor และ Lott (1978) ทำการศึกษาโดยใช้ข้อมูลเป็ดมัลลาร์ดและมูลนกเฮอรอนที่มีสปอร์ของปรสิต *Myxobolus cerebralis* ปะปนอยู่ผสมอาหารให้ปลากินพบว่าปลาทดลองที่ได้รับมูลเป็ด มูลนกร่วมกับโคลนซึ่งนำมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติเกิดการติดเชื้อทั้งหมด ขณะที่กลุ่มปลาทดลองที่ได้รับมูลเป็ด มูลนกหรือโคลนเพียงอย่างเดียวไม่พบการติดเชื้อหลังจากการเลี้ยงนาน 7 เดือน จากการทดลองดังกล่าวทำให้นักปรสิตเข้าใจวัฏจักรชีวิตที่แท้จริงของปรสิตชนิดนี้ซึ่งเป็น

เจ้าบ้านตัวกลางเพื่อให้ปรสิตเข้าไปพัฒนาระยะและเจริญเติบโตก่อนที่จะเข้าไปอาศัยในเจ้าบ้านตัวสุดท้ายซึ่งประสบความสำเร็จ และได้มีผู้ทำการศึกษาวัฏจักรชีวิตของปรสิต *Myxobolus cerebralis* พบว่าปรสิตต้องการเจ้าบ้านถึง 2 ชนิด โดยที่เจ้าบ้านตัวกลาง ได้แก่ หนอนแดง *(Tubifex tubifex)* ระยะปรสิตที่พบ คือ แอคติโนสปอร์เรีย ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Actinomyxon gyrosalmo* (รังสัญ, 2544)



ภาพที่ 1 แสดงวงจรชีวิตของ *Myxobolus cerebralis*

ที่มา : Kent และคณะ, 2001

จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าหลังจากปลาเทราท์ติดเชื้อโรคตัวหมุนตายก็ปลดปล่อยสปอร์ของปรสิตลงสู่สภาพแวดล้อมโดยเฉพาะพื้นโคลนใต้น้ำ และถูกกินโดยหนอนแดงเมื่อปรสิตเจริญเติบโตเป็นสปอร์เต็มวัยมีผลทำให้ปลาเจ้าบ้านแสดงอาการออกมา คือ เกิดการสะสมของเม็ดสีบริเวณคอดหางลักษณะเป็นสีดำ เกิดการคดงอและบิดเบี้ยวของกระดูกสันหลัง ขากรรไกรและกระดูกปิดเหงือกระยะสุดท้ายเป็นช่วงติดเชื้ออย่างรุนแรงพบว่าปรสิตทำลายกระดูกอ่อนบริเวณสมองมีผลทำให้ปลาสูญเสียการทรงตัว ควงสว่านและตายในที่สุดรวมระยะเวลาประมาณ 8 เดือน

การแพร่กระจาย (Transmission)

การแพร่กระจายในแง่สภาพทางภูมิศาสตร์พบว่าปรสิตกลุ่มนี้แพร่กระจายได้ทั่วโลกได้แก่ ทวีปอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ยุโรป อัฟริกา ออสเตรีย เอเชีย และเขตขั้วโลก พบได้ทั้งน้ำจืด เค็ม กร่อย ตัวอย่างปรสิตที่พบบ่อยในแหล่งน้ำจืด ได้แก่ *Platyspora, Myxobolus, Hoferellus, Henneguya, Thelohanellus,* และ *Agarella* ในแหล่งน้ำกร่อย ได้แก่ สกุล *Zschokkella* และ *Ceratomyxa* ในแหล่งน้ำเค็ม ได้แก่ สกุล *Sinuolinea, Ortholinea, Myxoproteus, Coccomyxa* และปรสิต *Unicapsula* (รังสัญ, 2544) นอกจากนี้ยังมีสกุลที่พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำทั้ง 3 แหล่ง ได้แก่ สกุล *Myxidium, Sphaeromyxa* และปรสิต *Chloromyxum* เป็นต้น สาเหตุหรือปัจจัยที่ทำให้ปรสิตมีการแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวางตามรายงานของ Lom และ Dykova (1992) คือปรสิตกลุ่มนี้มีการสร้างสปอร์ที่ยากต่อการโดนทำลายและพบว่าบางชนิดดำรงชีวิตอยู่ได้ในน้ำโดยปราศจากเจ้าบ้านนานถึง 15 ปีและมีการดัดแปลงลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่การสร้างเปลือกหุ้ม สปอร์ให้หนากว่าปกติและมีเยื่อเมือกคลุมหรือสปอร์ยื่นยาวออกมาและรวมถึงปัจจัยทางธรรมชาติ เช่น คลื่น กระแสน้ำ กระแสลม รวมทั้งพฤติกรรมการกิน การอพยพย้ายถิ่นเจ้าบ้านล้วนมีผลต่อการแพร่กระจายทั้งสิ้น

สำหรับปรสิตที่ได้ศึกษาไว้ซึ่งผลจากการทดลองพบปรสิตโดยทั่วไปได้แก่ *Henneguya* sp, *Myxobolus* sp, *Zschokkella* sp ได้จัดแบ่งลักษณะทางอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

***Henneguya* sp.**

กระสวยสองหาง หรือ *Henneguya* sp.เป็น Metazoa ซึ่งจัดอยู่ในชั้น Myxosporea พบในลักษณะรูปไข่เป็นเกราะสีขาว หรือสีเหลืองคล้ายหินปูน อยู่ตามเหงือกหรือตามลำตัว เกราะมีขนาดประมาณ 1.0 – 6.0 มิลลิเมตร ภายในมีสปอร์อยู่มากมาย สปอร์มีรูปร่างรียาวขนาดกว้างประมาณ 16 ไมครอน ส่วนหัวมี polar filament 2 เส้น ขดเป็นเกลียวอยู่ในกระเปาะ (polar capsule) กระเปาะละ 1 เส้น ซึ่งสามารถยืดหดได้ บริเวณลำตัวมี vacuole ขนาดใหญ่ภายในมีโปรโตพลาสซึม ส่วนท้ายมีอวัยวะคล้ายหาง 1-2 เส้น ซึ่งจากการศึกษาในประเทศไทย จงดี (2530) รายงานว่าตรวจพบ *Henneguya* ในปลาบู่ ปลาแรด และปลาช่อน ส่วนปลาสวยงามพบ *Henneguya* ในปลาแป้น แก้ว (*Chanda wolffii*) เพียงชนิดเดียว

***Myxobolus* sp.**

สปอร์ *Myxobolus* มีลักษณะสำคัญคือ สปอร์มีลักษณะคล้ายหยดน้ำจนถึงกลมขนาดยาวประมาณ 6 – 16.0 ไมครอน กว้าง 4.0 – 11.0 ไมครอน มีสปอร์โรพลาสซึมค่อนข้างใหญ่ มี polar capsule 2 อันภายในมี polar filament บรรจุอยู่ ในบางชนิดอาจพบ iodiophilous vacule ฮันบริเวณเซลล์ sporoplasm ปรสิตชนิดนี้จะ สามารถพบได้ทั้งลักษณะ histozoic และ coecozoic parasite ในประเทศไทยมีรายงานการพบในปลาตะเพียน ปลาสวายและปลาดุก โดยจะพบเป็นเกราะสีขาวเหลืองบนลำตัวปลาสวาย และปลาดุกมองดูคล้ายโรคจุดขาวที่เกิดจากอิ๊คแต่จะติดกับผิวปลาแน่นกว่าและมีสีต่างกัน (รังสัญ, 2544)

***Zschokkella* sp**

ลักษณะสปอร์ของปรสิตกลุ่มนี้มีรูปร่างแบบเกือบวงกลมหรือรูปไข่ ขนาดความยาวของสปอร์ 6.0 – 13.0 ไมครอน และความกว้างของสปอร์ 4.0 – 8.5 ไมครอน แนวแกนของสปอร์จะเป็นเส้นตรง และเฉียงเล็กน้อย แกนสปอร์จะพาดผ่านโพลาร์แคปซูลเซลล์หนึ่งมายังอีกเซลล์หนึ่งที่อยู่ตรงข้าม โพลาร์แคปซูล เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.1 – 3.0 ไมครอน ส่วนของโพลาร์ฟิลลาเมนท์ เป็นขดหมุนเป็นวง อยู่ภายใน 4 – 7 วงผิวของสปอร์จะมีลักษณะเป็นลายวน ซึ่งส่วนใหญ่จะพบเป็นปรสิตในลักษณะ histozoic parasite ประเทศไทยมีรายงานการพบในปลากะรังที่มีการเพาะเลี้ยงในจังหวัดสงขลาและสตูล (Supamattaya และคณะ, 1990)

ในปัจจุบันรายงานการศึกษา Myxosporidia ในประเทศไทยนั้นยังมีไม่มากนัก ส่วนใหญ่จะทำการศึกษาถึงลักษณะโดยทั่วไปของปรสิตที่พบรวมถึงลักษณะการก่อโรคเพียงบางประการเท่านั้น จึงทำให้ข้อมูลที่ได้ไม่เพียงพอต่อการต่อยอดศึกษาต่อและไม่สามารถทำการศึกษาได้อย่างเป็นระบบทั้งที่ในประเทศไทยมีการแพร่ระบาดของปรสิตกลุ่มนี้อย่างกว้างขวาง ในขณะที่ทั่วโลกได้ให้ความสำคัญต่อประเด็นการศึกษาปรสิตกลุ่มนี้มากยิ่งขึ้น จากรายงานวิจัยใน 3-4 ปีที่ผ่านมาได้มีการตีพิมพ์วารสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้องมากกว่า 300 ฉบับ นอกจากนี้ยังมีรายงานบางฉบับแสดงให้เห็นว่า Myxosporidia สามารถเป็นปรสิตในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ นอกจากปลา เช่น หนู, เต่า, เป็ด รวมถึงมีรายงานการพบเป็นปรสิตฉวยโอกาสในคนที่ติดเชื้อไวรัส HIV (ตารางที่ 1) ซึ่งทำให้ปรสิตกลุ่มนี้เป็นที่น่าสนใจและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของ Myxosporea ที่พบในเจ้าบ้านชนิดอื่นนอกเหนือจากปลา

เจ้าบ้าน	ชนิดของ Myxosporea	เอกสารอ้างอิง
หนอนตัวแบน (*Gassicutis archosagi*)	*Febespora vermicola*	Overstreet, 1976
หนู (*Sorex araneus*)	*Soricimyxum fegati*	Prulacu และคณะ, 2007
ตุ่น (*Talpa europaea*)	*Myxozoan-like organism*	Friedrich และคณะ, 2000
เป็ด	*Myxozoan-like organism*	Lowenstine และคณะ, 2002
เต่า (*Hardella thurjii*)	*Myxidium truttae*	Garner และคณะ, 2005
Opputonistic parasite ในลำไส้ใหญ่ของคนที่ติดเชื้อ HIV	*Myxobolus* sp.	Moncada และคณะ, 2001

ปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียที่พบในอวัยวะต่าง ๆ และพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในอวัยวะปลา

สำหรับปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดพยาธิสภาพต่างๆในเนื้อเยื่อภายในร่างกายพบได้ดังนี้ (Histopathology in organ of Myxosporidia)

ปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียแต่ละชนิดหรือแต่ละระยะการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตจะมีความจำเพาะกับอวัยวะเป้าหมายแตกต่างกัน โดยทั่วไปสามารถแบ่งประเภทปรสิตตามลักษณะโครงสร้างของอวัยวะเป้าหมายที่อาศัยอยู่ คือ พวกที่อาศัยอยู่ในช่องว่างภายในเนื้อเยื่อของเจ้าบ้าน ส่งผลทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยมีระดับรุนแรงและอันตรายที่เกิดขึ้นแตกต่างกันตามชนิดของปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรค (รังสัญ, 2544)

1 เหงือก เกล็ด ครีบและผิวหนัง (Gill, scales, fin and skin)

ในเหงือกพบปรสิต *Myxobolus centropomi* ในปลาฟีราลคอมมอนสนุ๊ค และปรสิต *Myxobolus toyamai* และ *Myxobolus* sp. ในปลาทองและปลาไน พบว่าปรสิตสร้างเกราะอยู่ภายในและระหว่างเซคคันดารี ลาเมลลา โดยก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่มีลักษณะเดียวกับปลาที่ติดเชื้อ *Henneguya* และได้มีรายงานพบปรสิต *Myxobolus squamae* และ *Myxobolus dermatobia* ในเกล็ดและผิวหนังของปลาไนและปลาสตีลเฮดเทราท์ พบว่าปรสิตสร้างเกราะมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนคล้ายเนื้องอกแพร่กระจายทั่วลำตัวโดยเฉพาะส่วนหัวใกล้ปากและรอบดวงตา ขณะเดียวกัน Egusa และคณะ (1990) ทำการตรวจสอบปรสิตในปลากระบอกโดยพบปรสิต *Myxobolus episqualmalis* ในเกล็ดมีผลทำให้เกล็ดถูกทำลายเสียรูปทรงและหลุดลอกออกจากผิวหนังจากติดเชื้อซ้ำ โดยแบคทีเรียและเชื้อรา

2 กล้ามเนื้อ (Muscle)

รายงานปรสิต *Myxobolus garrai* ในกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของปลาน้ำจืดชนิด *Garra tibanica* โดยปรสิตก่อให้เกิดพยาธิสภาพ คือ พบการตายของเซลล์และอักเสบบริเวณรอบ ๆ เกราะของปรสิต ขณะเดียวกัน ก็มีรายงานการติดเชื้อปรสิต *Myxobolus artus* ในปลาไน โดยปรสิตสร้างเกราะแทรกตัวอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่างมัดกล้ามเนื้อ ซึ่งระยะแรกของการติดเชื้อจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อมากนัก แต่แสดงผลหรือปรากฏชัดเจนเมื่อปรสิตมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้นทำให้เกิดการติดเชื้อลุกลามและเข้าทำลายมัดกล้ามเนื้อที่อยู่ติดกัน รวมทั้งเกิดการอักเสบและตกเลือดในบริเวณดังกล่าวและใกล้เคียง (Abdulrahman และคณะ (1991)

3 ระบบทางเดินอาหาร (Digestive system)

Paperna (1983) รายงานปรสิต *Chloromyxum* sp. ในกระเพาะอาหารและลำไส้ของปลาซีบริมพบว่าปรสิตระยะพลาสโมเดียมเกาะติดบริเวณผิวของเซลล์บุผิวกระเพาะอาหารหลังจากเคลื่อนที่เข้าภายในเซลล์เมื่อเข้าสู่ระยะสร้างสปอร์ ส่งผลทำให้เซลล์เกิดการขยายขนาดและสูญเสียรูปทรงจนกระทั่งเกิดการตายหลุดลอกออกจากชั้นสับมิวโคซา เกิดเป็นช่องว่างที่มีเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะเซลล์มาโครฟาจแพร่กระจายทั่วไปเนื่องจากเกิดการอักเสบ

4 ถุงน้ำดี และตับ (Gall bladder and liver)

Alvarez – Pelliteroและ Sitja – Bobadilla (1993) รายงานปรสิต *Zschokkella mugilis* ในปลากระบอก พบว่าปรสิตทำลายเซลล์ก่อให้เกิดช่องว่างในบริเวณเยื่อบุผิวของถุงน้ำดี และเกิดการอักเสบในบริเวณในบริเวณใกล้เคียงโดยเฉพาะชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรวมทั้งเกิดการติดเชื้อกลุกลามทำลายเซลล์ตับอ่อนที่อยู่ติดกับถุงน้ำดี Davies (1985) รายงานปรสิต *Zschokkella russelli* ในปลาเบียร์ดร็อคคกลิง พบว่าปรสิตก่อให้เกิดพยาธิสภาพในถุงน้ำดี คือ เนื้อเยื่อชั้นบุผิวหนาขึ้นเนื่องจากเกิดการขยายขนาดและแบ่งเซลล์มากกว่าปกติ นอกจากนี้ยังสามารถพบการติดเชื้อปรสิตชนิดดังกล่าวและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเยื่อตับ คือ เซลล์บุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหนามากขึ้นรวมทั้งเกิดการลีบฝ่อ และอักเสบในบริเวณที่มีการติดเชื้อรุนแรง สำหรับ *Zschokkella nova* มีรายงานในปลาบูลล์เฮด พบว่าปรสิตมีการอัดตัวแน่นทำให้ท่อน้ำดี เปลี่ยนแปลงขนาดและรูปร่างรวมทั้งยังพบการติดเชื้อ และการทำลายเซลล์ตับมีลักษณะเป็นช่องว่างที่มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเรียงตัวแบบหลวม ๆ (Bucher และคณะ, 1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อปรสิต ปลากระบอก (mullet, *Mugil persina*) จากรายงานดังกล่าวไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ชัดเจนเกิดขึ้นเนื่องจากปรสิตเหล่านี้อาศัยอยู่เฉพาะในช่องว่างของถุงน้ำดี

5 ระบบขับถ่ายปัสสาวะ (Urinary bladder)

Batholomew และคณะ (1989) รายงานติดเชื้อปรสิต *Ceratomyxa shasta* ในปลาสตีลเฮดเทราท์ พบว่าหลังจากปลาได้รับเชื้อนาน 52 วันพบการตายของเนื้อเยื่อไตโดยเฉพาะเซลล์บุผิวเกิดหลุดออกปะปนกับปรสิตอยู่ในท่อไต นอกจากนี้ปรสิตชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานพบในเนื้อเยื่อดังกล่าวได้แก่ *Parvicapsula renalis* และปรสิต *Henneguya ocellata* ในปลาแรดครัม

6 สมองและเนื้อเยื่อประสาท (Brain and nevouse tissue)

มีรายงานการพบปรสิต *Myxobolus hendricksoni* ในปลาแฟทเฮดมินนาว โดยปรสิตอยู่รวมกันภายในเกราะในสมองส่วนออปติกเทคตัมและคอปัสซีรีเบลไลก่อให้เกิดลักษณะทางพยาธิสภาพ คือ เกิดการลีบฝ่อและการตายของเซลล์โดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อชั้นนอกของออปติกเทคตัมมีผลทำให้เซลล์ที่เหลืออยู่มีการเรียงตัวแบบหลวม ๆ (Mitchell และคณะ, 1985)

7 ระบบสืบพันธุ์ (Reproductive system)

Masoumaian และคณะ (1996) รายงานปรสิต *Myxobolus bulbocordis* ในปลาบาร์บ โดยพบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อชั้นซีโรซา ของหัวใจบริเวณบัลบัสอาเทอริโอซัส และเอเตรียมคอร์ดีสพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น คือ ปรสิตสร้างเกราะที่มีเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์บางส่วนถูกทำลายเกิดการอักเสบและคั่งเลือดในบริเวณรอบ ๆ

มีรายงานการพบปรสิต *Sphaerospora testicularis* ในอัณฑะปลาซีแบส โดยพบปรสิตระยะก่อนสร้างสปอร์ซึ่งภายในประกอบด้วยเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวและระยะสร้างสปอร์อยู่ภายในท่อน้ำเชื้อทำให้ท่อขยายใหญ่ขึ้น เซลล์อสุจิลีบฝ่อและตายหลุดลอกเป็นช่องว่าง บริเวณที่ติดเชื้อเรื้อรังมีการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทดแทนเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายหัวใจ (heart) (Sitja – Bobadilla และ Alvarez – Pellitero, 1990)

8 กระเพาะลม (Swim bladder)

Csaba และคณะ (1984) รายงานการติดเชื้อปรสิต *Sphaerospora renicola* ระยะพลาสโมเดียมที่ประกอบด้วยเซลล์หลานอยู่ภายในเซลล์แม่ฝังตัวอยู่ภายในเซลล์แม่ฝังตัวอยู่ในผนังหุ้มและเยื่อบุผิวกระเพาะลมของปลาไนก่อให้เกิดลักษณะทางพยาธิสภาพ คือ เกิดการอักเสบที่มีเม็ดเลือดขาวและเซลล์กำจัดสิ่งแปลกปลอมแพร่กระจายอย่างหนาแน่นปะปนกับซากเซลล์ที่โดนปรสิตทำลาย

ผลกระทบของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Effect of Myxosporidia in Aquaculture)

ปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียมีความสำคัญและส่งผลกระทบต่อปลา โดยสามารถแพร่ระบาดได้ทั้งในกลุ่มที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติและกลุ่มที่มีการเพาะเลี้ยงซึ่งมีระดับความรุนแรงตั้งแต่ติดเชื้อทั่วไปถึงเกิดโรคที่มีความรุนแรง

โรคตัวหมุน (Whirling disease)

เป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดและก่อความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงปลาแซลมอลที่นิยมเลี้ยงกันมากในกลุ่มประเทศแถบยุโรป อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ สาเหตุเกิดการติดเชื้อปรสิต *Myxobolus cerebralis* ลักษณะอาการพบว่าหลังปลาได้รับเชื้อประมาณ 30 – 45 วัน บริเวณครอดหางมีสีดำเนื่องจากเกิดการสะสมของเมลานิน กระดูกสันหลังคดงอ กระดูกปิดเหงือกและขากรรไกรบิดเบี้ยว ระบบประสาทและกล้ามเนื้อสูญเสียการควบคุมทำให้ว่ายน้ำแบบควงสว่านและตายในเดือนที่ 4 ของการติดเชื้อ (Markiw, 1991)

เป็นโรคที่ก่อให้เกิดการสูญเสียอย่างมหาศาลแก่ธุรกิจการเลี้ยงปลาเทร้าต์และปลาแซลมอลในหลายบริเวณทั่วโลกสาเหตุเกิดจากเชื้อมิกโซสปอร์ริเดียพวก *Myxobolus cerebralis* ลักษณะอาการที่เกิดในปลาจะทำให้ปลาว่ายน้ำแบบตัวหมุน ควงสว่าน หางดำ และกระดูกคดงอเนื่องจากเชื้อชนิดนี้เข้าไปทำลายกระดูกอ่อนของปลา การตรวจวินิจฉัยโรคดังกล่าวกระทำได้โดยนำปลาที่ติดเชื้อมาแยกส่วนของกระดูกอ่อนและดูลักษณะสปอร์ของเชื้อภายในกระดูก หรือตรวจสอบยืนยันโดยใช้เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา การรักษายังไม่มี แต่เน้นวิธีการป้องกัน ไม่ให้ปลาที่เป็นพาหะเข้าสู่แหล่งเลี้ยงและใช้ปูนขาว หรือแคลเซียม ไซยาไนด์ ทำลายสปอร์พื้นบ่อ (กิจการ และคณะ, 2539)

1 โรคไตบวม (Proliferative kidney disease : PKX)

เป็นโรคที่มีความสำคัญและส่งผลรุนแรงต่อการเพาะเลี้ยงปลาเทราท์และแซลมอลลักษณะอาการของโรคตามรายงานพบว่าหลังจากปลาได้รับเชื้อจะเบื่ออาหารว่ายน้ำช้า ลำตัวมีสีเข้มตาโปนท้องโตและบวมน้ำ ม้ามและไตบวมมีขนาดใหญ่ขึ้น

โรคไตบวมเกิดจากเชื้อปรสิตในกลุ่มมิกโซสปอร์ริเดีย แต่ยังไม่สามารถแยกชนิดได้ จึงให้ชื่อตามอาการโรคว่า "PKX cell" โรคชนิดนี้จะทำให้เกิดอาการไตบวมอย่างรุนแรงและทำให้ปลาตาย ซึ่งพบในปลาเทร้าท์และแซลมอลที่เลี้ยงในทวีปอเมริกา และยุโรป

สาเหตุที่ตรวจพบได้ในเนื้อเยื่อไตของปลาที่เป็นโรคคือ trophozoite หรือ extrasporogonic stages ของปรสิต ซึ่งประกอบด้วย Primary cell หรือเซลล์แม่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 ไมครอน ภายในมีเซลล์ลูกหลายเซลล์ในบางระยะอาจจะพบเซลล์ลูกระยะที่ 3 ในเซลล์ลูกระยะที่ 2 ด้วย ระยะสปอร์ของปรสิตจะมีลักษณะคล้ายกับสปอร์ของ *Sphaerospora* หรือ *Parvicapsula* แต่ยังไม่มีการพิสูจน์ยืนยันชัดเจน (กิจการ และคณะ, 2539)

2 โรคเหงือกบวม (Proliferative gill disease: PGD)

มีรายงานการแพร่ระบาดและส่งผลต่อการเลี้ยงปลากดอเมริกันในสหรัฐอเมริกา โดยเฉพาะช่วงฤดูใบไม้ผลิจะมีอัตราการเกิดโรคและส่งผลการตายสูงกว่าฤดูกาลอื่น ลักษณะอาการของโรคตามรายงานของ (Thiyagarajah, 1993) พบว่าหลังปลาได้รับเชื้อจะผอม เบื่ออาหาร ลำตัวมีสีเข้มว่ายน้ำเชื่องช้าลอยตัวและหายใจแรงเนื่องจากเหงือกโดนทำลายมีผลทำให้ความสามารถในการแลกเปลี่ยนออกซิเจนลดลง อาการดังกล่าวจะรุนแรงมากขึ้นเมื่อน้ำในบ่อที่ใช้เลี้ยงปลามีปริมาณสารอินทรีย์สูง

3 โรคเซอราโตมิกโซซิส (Ceratomyxosis)

เป็นโรคที่มีรายงานการแพร่ระบาดและส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงปลาแซลมอลในสหรัฐอเมริกาและแคนนาดาสาเหตุเกิดการติดเชื้อ *Ceratomyxa shasta* ในบริเวณลำไส้ซึ่งก่อให้เกิดอาการของโรค คือระยะแรกจะเบื่ออาหารเซื่องซึม และเมื่อติดเชื้อมากปลาจะมีสีเข้มกว่าปกติ ตาโปน ท้องบวม และมีของเหลวอยู่เต็มท้อง รวมทั้งเกิดการตกเลือดและการตายของเนื้อเยื่อแพร่กระจายทั่วไปตามอวัยวะภายในโดยเฉพาะลำไส้ (Bartholomew และคณะ, 1989)

4 โรคถุงลมอักเสบ (Swimbladder inflammation)

เป็นโรคที่มีรายงานการแพร่ระบาดและส่งผลกระทบต่อการเลี้ยงปลาไนในประเทศที่ตั้งอยู่ตอนกลางและทางทิศตะวันออกของยุโรป สาเหตุเกิดจากปรสิต *Sphaerospora renicola* อาการของโรคพบว่าหลังได้รับเชื้อปลาจะเซื่องซึม เบื่ออาหาร ท้องบวม ว่ายน้ำเสียการทรงตัวเกิดการอักเสบบริเวณถุงลม (Korting, 1982)

5 โรคไตบวม (Kidney enlargement disease: KED)

เป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดและส่งผลต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาทองในญี่ปุ่นและในบางประเทศในยุโรป สาเหตุเกิดจากเชื้อปรสิต *Hoferellus carassii* ในไต อาการของโรค คือ ปลาจะเชื่องซึม สีซีด เบื่ออาหาร ว่ายน้ำเสียการทรงตัวและตาย (Yokoyama และคณะ, 1991)

ชนิดของปลาที่ศึกษาครั้งนี้ซึ่งถือว่าเป็น host ของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียซึ่งศึกษาในปลาน้ำจืด ปลาน้ำกร่อย ปลาน้ำเค็ม

ตารางที่ 2 แสดงปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียที่สำคัญก่อให้เกิดโรคร้ายแรงในต่างประเทศ

ลำดับที่	ชนิดของปรสิต	สัตว์น้ำ	ภูมิภาคที่พบ	เอกสารอ้างอิง
1	*Myxobolus cerebralis*	Salmonids	ยุโรป	Kent และ Hedrick (1985)
2	*Ceratomyxa shasta*	Salmonids	ยุโรป	Hoffmaster และคณะ (1988)
3	*Sphaerospora renicola*	*Cyprinus carpio*	ยุโรป	Csaba และคณะ (1984)
4	*Hoferellus carassii*	*Carassius auratus*	ยุโรป	Arkush และ Hearick (1990)
5	*Sphaerospora ictaluri*	*Ictalurus punctatus*	ยุโรป	Brown และคณะ (1991)

ตารางที่ 3 แสดงปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียที่พบในประเทศไทย

ลำดับที่	ชนิดของปรสิต	สัตว์น้ำ	ภูมิภาคที่พบ	เอกสารอ้างอิง
1	*Sphaerospora epinepheli*	*Epinephelus malabaricus*	สงขลา	Supamattya และคณะ (1990)
2	*Zschokkella* sp.	*Plotosus canius*	สตูล, สงขลา	นรสิงห์ (2542)
3	*Myxoproteus* sp.	*P. canius*	สตูล, สงขลา	นรสิงห์ (2542)
4	*Zschokkella* sp.	*Osteogeneiosus milsitaris*	สงขลา	รังสัญ (2544)
5	*Ceratomyxa* sp. Type A	*O. militaris*	สงขลา	รังสัญ (2544)
6	*Myxidium* sp. Type A	*Scatophagus argus*	สงขลา	รังสัญ (2544)
7	*Thelohanellus* sp.	*S. argus*	สงขลา	รังสัญ (2544)
8	*Ceratomyxa* Type B	*S. argus*	สงขลา	รังสัญ (2544)
9	*Sphaerospora* sp.	*Leiognathus drevirostris*	สงขลา	รังสัญ (2544)
10	*Myxidium* Type B	*Acentrogobius cyanomus*	สงขลา	รังสัญ (2544)
11	*Ceratomyxa* sp. Type C	*Hemiramphus garmardi*	สงขลา	รังสัญ (2544)
12	*Myxidium lieberkuhni*	*Systomus orphoides*	สุพรรณบุรี	ณัฐวดี (2550)
13	*Myxidium pfeifferi*	*Trichogaster pectoralis*	สุพรรณบุรี ราชบุรี	ณัฐวดี (2550)
14	*Myxidium macrocapsulare*	*Cyclocheilichthys* sp.	ชัยนาท	ณัฐวดี (2550)
15	*Myxidium oviforme*	*Trichogaster tricopterus*	อยุธยา	ณัฐวดี (2550)
16	*Myxidium truttae*	*Pangasius conchophilus* *Hemibagrus nemurus*	สิงห์บุรี	ณัฐวดี (2550)
17	*Zschokkella nova*	*Puntioplites proctozysron*	สุพรรณบุรี	ณัฐวดี (2550)
18	*Zschokkella* sp. I	*Oxyeleotris marmorata*	นครปฐม, อยุธยา	ณัฐวดี (2550)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับที่	ชนิดของปรสิต	สัตว์น้ำ	ภูมิภาคที่พบ	เอกสารอ้างอิง
19	*Zschokkella* sp. II	*Oreochromis niloticus*	ราชบุรี	ณัฐวดี (2550)
20	*Ceratomyxa seriolae*	*Hemibagrus nemurus*	สิงห์บุรี	ณัฐวดี (2550)
		Hemibagrus microphthamus	นครปฐม	
21	*Ceratomyxa* sp. I	*Puntius schwanenseldii*	ชัยนาท, นครปฐม	ณัฐวดี (2550)
22	*Chloromyxum cristatum*	*Channa striata*	สิงห์บุรี	ณัฐวดี (2550)
		Barbodes gonionotus	นครปฐม	
		Systomus orphoides		
		Puntius schwanenseldii		
23	*Chloromyxum legeri*	*Anabas testudineus*	สิงห์บุรี	ณัฐวดี (2550)
		Oxyeleotris marmorata	นครปฐม	
		Trichogaster tricopterus		
24	*Myxobolus muelleri*	*Puntioplites proctozysron*	สุพรรณบุรี	ณัฐวดี (2550)
25	*Myxobolus ellipsoides*	*Systomus orphoides*	สุพรรณบุรี	ณัฐวดี (2550)
26	*Myxobolus carassii*	*Osteochilus hasselti*	นครปฐม	ณัฐวดี (2550)
27	*Myxobolus koi*	*Ladiobarbus leptocheilus*	สุพรรณบุรี	ณัฐวดี (2550)
		Systomus orphoides		
28	*Myxobolus lobatus*	*Puntioplites proctozysron*	สุพรรณบุรี	ณัฐวดี (2550)
			อยุธยา	
29	*Myxobolus follius*	*Channa striata*	อยุธยา, นครปฐม	ณัฐวดี (2550)
			สิงห์บุรี	
30	*Myxobolus*	*Systomus orphoides*	สุพรรณบุรี	ณัฐวดี (2550)
	diversicapsullaris			
31	*Myxobolus osburni*	*Oxyeleotris marmorata*	นครปฐม	ณัฐวดี (2550)
32	*Myxobolus cyprini*	*Barbodes gonionotus*	นครปฐม	ณัฐวดี (2550)
		Puntius schwanenseldii	ราชบุรี	
			ชัยนาท	
33	*Henneguya* sp	*Trichogaster tricopterus*	ราชบุรี	ณัฐวดี (2550)
			อยุธยา	
34	*Henneguya creplini*	*Trichogaster tricopterus*	สุพรรณบุรี	ณัฐวดี (2550)
		Trichogaster microlepis	นครปฐม	
		Anabas testudineus	ชัยนาท	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับที่	ชนิดของปรสิต	สัตว์น้ำ	ภูมิภาคที่พบ	เอกสารอ้างอิง
35	*Henneguya zschokkei*	*Pangasius conchophilus*	สิงห์บุรี	ณัฐวดี (2550)
36	*Henneguya lobosa*	*Anabas testudineus*	สุพรรณบุรี	ณัฐวดี (2550)
		Trichogaster pectoralis	ราชบุรี	
37	*Henneguya alexeevi*	*Channa striata*	สุพรรณบุรี	ณัฐวดี (2550)
38	*Henneguya shaharini*	*Oxyeleotris mamoratus*	นครปฐม	ณัฐวดี (2550)
			อยุธยา	
			สุพรรณบุรี	
39	*Henneguya* sp. I	*Anabas testudineus*	สุพรรณบุรี	ณัฐวดี (2550)
		Trichogaster microlepis	อยุธยา	
40	*Hennegoides* sp. I	*Anabas testudineus*	ราชบุรี	ณัฐวดี (2550)
		Trichogaster microlepis	สุพรรณบุรี	
41	*Thelohanellus jiroveci*	*Barbodes gonionotus*	นครปฐม	ณัฐวดี (2550)
			ราชบุรี	
			ชัยนาท	

การควบคุมและป้องกันกำจัด

1. สำหรับโรงเพาะฟัก ควรมีการทำความสะอาด เตรียมบ่อ อุปกรณ์ ก่อนที่จะใช้ โดยใช้ Sodium chloride ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (กิจการ และสิทธิ, 2530)

การรักษา

1. กลุ่ม *Myxobolus* sp. ใช้ยา Triazinone หรือ Toltrozuril อัตรา 5 – 20 ไมโครกรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร แช่ปลา 4 ชั่วโมง

2. กลุ่ม *Henneguya* sp. ใช้ยา Quina crine hydrochloride อัตรา 8 – 12 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร (กิจการ และสิทธิ, 2530)

ระเบียบและวิธีวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างปลา

เก็บตัวอย่างปลาในพื้นที่จังหวัดตรังจำนวน 21 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยปลาจำนวน 3 กลุ่ม คือ ปลาน้ำจืดจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ ปลานิล,ปลาตะเพียนขาว, ปลาหมอไทย, ปลายี่สกเทศ, ปลาบ้า, ปลาดุกบิ๊กอุย, ปลาดุกยักษ์, ปลาขี้ขม, ปลาชะโอน, ปลาซิวหางควาย, ปลากดเหลือง และ ปลาช่อน ปลาน้ำกร่อยจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ ปลากระบอก, ปลากะพงขาว และปลากะรังจุดแดง รวมถึงปลาน้ำเค็มจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ปลาดุกทะเล, ปลากระเบน, ปลาตาหวาน, ปลาซีกเดียว, ปลาสีกุน และปลาลิ้นหมา โดยรวบรวมตัวอย่างปลาจากตลาดปลาในท้องถิ่นจังหวัดตรังและทำการเก็บตัวอย่างปลา เดือนละครั้ง เก็บจากตลาดอำเภอเมือง อำเภอกันตัง อำเภอปะเหลียน อำเภอวังวิเศษ จังหวัดตรัง จำนวนปลาที่เก็บได้แต่ละครั้งมีจำนวนไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับปลาที่นำมาขายในตลาด เป็นเวลา 9 เดือน ระหว่างเดือนมกราคม 2549 ถึงกันยายน 2549 โดยปลาที่นำมาทำการศึกษาจะต้องทำการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวทุกตัว ก่อนที่จะทำการตรวจหาปรสิต ซึ่งปลาแต่ละชนิดที่นำมาตรวจหาปรสิตต้องบันทึกข้อมูลทุกครั้ง ปลาที่นำมาตรวจแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ ปลาน้ำจืด ปลาน้ำกร่อย และปลาน้ำเค็ม ตามลำดับ

2. การตรวจหาปรสิต

2.1 ตรวจดูบริเวณลำตัวปลา เหงือก, ครีบ, ตา, ช่องจมูก และช่องทวาร ด้วยตาเปล่าว่าพบปรสิตหรือไม่ โดยเฉพาะลักษณะตุ่ม (Cust)

2.2 นำอวัยวะที่พบตุ่ม Cyst มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

2.3 แยกตุ่ม Cyst มาวางบน Slide แล้วกดทับด้วย Cover glass เพื่อให้ cyst แตกกระจาย แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.4 บันทึกรูปร่างลักษณะของกลุ่มมิกโซสปอร์ริเดีย และทำการถ่ายภาพบันทึก

3. การจำแนกปรสิตในระดับสกุล โดยศึกษาจากเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้องได้แก่ ประไพสิริ (2538), นรสิงห์ (2542), รังสัญ (2544), Lom and Dykova (1992), Shulman (1966),Lom and Dykova (2006)

4. คำนวณการแพร่กระจายและความชุกชุมตามสูตร ดังนี้

$$\text{ความชุกชุม (prevalence)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่พบว่ามีปรสิต}}{\text{จำนวนปลาที่ทำการตรวจ}} \times 100$$

5. การศึกษาทางด้านพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

ทำการตรวจอวัยวะปลาที่ดองด้วย formalin 16ปอร์เซ็นต์ อย่างน้อย 24 ชั่วโมงผ่าน automatic tissue processer ตัดเนื้อเยื่อแต่ละส่วนผ่านกระบวนการต่าง ๆ ตามวิธีการศึกษาของ Humason (1962) Bancro ft (1967) ตามลำดับ

6. การศึกษาโครงสร้างของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

6.1 การศึกษารูปร่างโครงสร้างของปรสิตโดยวิธีการศึกษาภายนอกเซลล์โดยวิธี Scanning electron microscope (SEM)

6.2 การศึกษารูปร่างโครงสร้างของปรสิตโดยวิธีการศึกษาภายในของเซลล์โดยวิธี Transmission electron microscope (TEM)

7 การศึกษาชนิดของปรสิต (species) โดยเทคนิค PCR

7.1 การสกัด genomic DNA

ทำการแยกสปอร์ของปรสิตออกจากเนื้อเยื่อของปลาเจ้าบ้านตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Buhri และคณะ(2003) โดยการนำเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อ 50 mg มาทำการขยี้ในน้ำกลั่นเพื่อให้สปอร์ของปรสิตที่เกาะกลุ่มกระจายตัวออกจากกัน ปั่นตกตะกอนที่ 6,000 g ที่อุณหภูมิ 4 ° C ทำการล้าง 2 ครั้ง ด้วย PBS buffer pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 ° C จากนั้นจะทำการแยกสปอร์ของปรสิตให้บริสุทธิ์โดยการทำ percoll gradient ที่ความเข้มข้น 25% 50% 75%และ 100% ตามลำดับและทำการหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 g ที่อุณหภูมิ 4 ° C เป็นเวลา 10 นาที ทำการเก็บสปอร์และล้างด้วย PBS buffer pH 7.4 จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นทำการย่อยเปลือกหุ้มสปอร์ โดยใช้เอนไซม์ protenase K (2% w/v) ที่อุณหภูมิ 60 ° C เป็นเวลา 1 – 2 ชั่วโมง ทำการสกัด genomic DNA จากสปอร์ของปรสิตโดยเติม DNAzol 400 μl บดสปอร์ให้ละเอียด จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 ° C เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายตะกอน DNA ด้วย absolute alcohol 200 μl จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 ° C เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอน DNA ด้วย 95% แอลกอฮอล์ที่เย็นจัด 2 ครั้ง ทำการละลายตะกอน DNA ในน้ำกลั่น 30 μl โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 60 ° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือจนกว่าตะกอน DNA จะละลายหมด ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ใน Tris – acetate (TAE; 0.04 M Tris – acetate, 0.001 M EDTA) ย้อมด้วย Ethidium bromideแล้วตรวจสอบด้วยเครื่อง UV trans – illuminator นำไปวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ด้วยเครื่อง Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm นอกจากนี้ยังทำการสกัด 18S rDNA ของปลาเจ้าปลาที่ไม่ได้ติดเชื้อปรสิตด้วยวิธีเดียวกัน เพื่อนำตรวจสอบด้วยความจำเพาะของ Primer ต่อปรสิต

7.2 การเพิ่มจำนวน 18S rDNA

18S rDNAของปลาเจ้าปลาที่ไม่ได้ติดเชื้อและของปรสิต จะถูกเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer MX5 และ MX3 Andree และคณะ(1998) ซึ่งสามารถสังเคราะห์สาย DNA จากปรสิตขนาดประมาณ 1,650 คู่เบส โดยใช้ DNA ต้นแบบ 10 – 100 nM $MgCl_2$ 1.5 mM dNTPs 200 μL primer 0.45 pMและเอนไซม์ Taq polymerase 2 Unit ด้วยเครื่อง Thermocycle (PTC – 100^{tm} MJ Research, MA) ด้วยรอบการทำงาน (cycle) 40 รอบ ตามขั้นตอนต่อไปนี้ บ่ม PCR reactionที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเริ่มปฏิกิริยา จากนั้น denaturation 95 °C 1นาที annealing 65 °C 1.5นาที elongation 72 °C 2นาที แต่รอบสุดท้ายจะเพิ่มเวลาเป็น 10 นาที (ดัดแปลงจาก Buhri และคณะ,2003) ตรวจสอบขนาด PCR product ด้วยเทคนิค Agarose gel eletrophoresis

ผลการทดลอง

1. การแพร่กระจายและปริมาณติดเชื้อปรสิตมิกโซสปอร์ริเดีย

จากการเก็บตัวอย่างปลา ปลาน้ำจืด ปลาน้ำกร่อย ปลาน้ำเค็มในจังหวัดตรัง ได้แก่ อำเภอเมือง อำเภอกันตัง อำเภอปะเหลียน อำเภอวังวิเศษ ในระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนกันยายน 2549 สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาได้ทั้งหมดจำนวน 647 ตัว ใน 16 วงศ์ (Family) 21 ชนิด ซึ่งปริมาณการเก็บตัวอย่าง น้ำหนักและความยาวของปลาแสดงในตารางที่ 4, 5, 6 พบการติดเชื้อในปลา 8 ชนิด โดยเป็นปลาน้ำจืด 2 ชนิดได้แก่ ปลาหมอไทย และปลากดเหลือง, ปลาน้ำกร่อย 3 ชนิด ได้แก่ ปลากระบอก, ปลากะรังจุดแดง และปลากะพงขาว ในขณะพบการติดเชื้อในที่ปลาน้ำเค็ม 3 ชนิด ได้แก่ ปลาดุกทะเล, ปลากะเบน และปลาซีกเดียว ซึ่งคิดเป็น 1.08 เปอร์เซ็นต์ของปลาที่ทำการสำรวจทั้งหมด ซึ่งการติดเชื้อปรสิตมีดังนี้ การติดเชื้อในปลาน้ำจืด ได้แก่ ปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) ติดเชื้อปรสิต *Henneguya* sp. ชนิด A จำนวน 2 ตัว จากปลาตัวอย่างจำนวน 28 ตัว คิดเป็น 7.1 เปอร์เซ็นต์, ปลากดเหลือง ติดเชื้อปรสิต *Henneguya* sp. ชนิด B จำนวน 2 ตัว จากปลาตัวอย่าง 36 ตัวคิดเป็น 5.5 เปอร์เซ็นต์, ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ติดเชื้อปรสิต *Henneguya* sp. ชนิด C จำนวน 2 ตัว จากปลาตัวอย่าง 20 ตัว คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์, ปลากระบอก (*Moolgarda seheli*) ติดเชื้อปรสิต *Myxobolus* sp.ชนิด A จำนวน 3 ตัว จากปลาตัวอย่าง 24 ตัว คิดเป็น 12.5 เปอร์เซ็นต์, ปลากะเบน (*Himantura imbricatus*) ติดเชื้อปรสิต *Myxobolus* ชนิด C, 1 ตัว จากปลาตัวอย่าง 69 ตัว คิดเป็น 1.4 เปอร์เซ็นต์ , ปลา กะรังจุดแดง (*Epinephelus coioides*) ติดเชื้อปรสิต *Myxobolus* sp. ชนิด B จำนวน 2 ตัว จากปลาตัวอย่าง 60 ตัว คิดเป็น 3.3 เปอร์เซ็นต์ , ปลา กะเบน (*Himantura imbricatus*) ติดเชื้อปรสิต *Myxobolus* sp. Type C จำนวน 4 ตัว จากปลาตัวอย่าง 69 ตัว คิดเป็น 5.7 เปอร์เซ็นต์, ปลาซีกเดียว (*Psettodes erumei*) ติดเชื้อปรสิต *Myxobolus* sp. ชนิด D จำนวน 1 ตัว จากปลาตัวอย่าง 31 ตัว คิดเป็น 3.2 เปอร์เซ็นต์, ปลาดุกทะเล (*Plotosus canius*) ติดเชื้อปรสิต *Zschokkella* sp. จำนวน 2 ตัว จากปลาตัวอย่าง 63 ตัว คิดเป็น 3.1 เปอร์เซ็นต์

จากข้อมูลปลาเศรษฐกิจในจังหวัดตรังที่มีการติดเชื้อปรสิตทั้ง 8 ชนิด ผลการสำรวจแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของมิกโซสปอร์ริเดียที่ก่อโรคโดย *Myxobolus* sp. และ *Henneguya* sp. พบการเป็นปรสิตในปลาจำนวน 4 ชนิดเท่ากัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่า *Myxobolus* sp. มีการแพร่กระจายที่สูงกว่า *Henneguya* sp. เล็กน้อย คือ 5.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Henneguya* sp. มีการแพร่กระจายในระดับ 4.58 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปรสิตกลุ่ม *Zschokkella* sp. พบการเป็นปรสิตในปลาเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ในด้านความหลากหลายของสายพันธุ์ปรสิตที่ก่อโรคนั้นพบว่าปลาแต่ละชนิดจะมีการติดเชื้อมิกโซสปอร์ริเดียต่างชนิดกัน ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีพื้นฐานของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียที่มีความจำเพาะต่อสัตว์เจ้าบ้านสูง

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักและความยาวของปลาน้ำจืด

ปลาน้ำจืด

ชนิดปลา	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนปลา	น้ำหนักต่ำสุด-สูงสุด (กรัม)	ความยาวต่ำสุด-สูงสุด (เซนติเมตร)
1. ปลานิล	*Oreochromis niloticus*	35	9.35-54.8	7.5-14.0
2. ปลาตะเพียนขาว	*Barbodes gonionotus*	20	46.36-99.75	14.5-18.5
3. ปลาหมอไทย	*Anabas testudineus*	28	27.43-69.27	13.3-16.2
4. ปลายี่สกเทศ	*Labeo rohita*	20	11.91-43.21	11.0-15.0
5. ปลาบ้า	*Loptobarbus hovemi*	20	4.70-8.12	7.5-10.5
6. ปลาดุกบิ๊กอุย	*Clarias* sp.	20	18.11-124.5	14.0-26.8
7. ปลาดุกยักษ์	*Clarias gariepinus*	20	16.5-104.95	15.0-24.4
8. ปลาขี้ขม	*Osteochilus hasseltii*	20	26.14-54.19	12.0-16.0
9. ปลาชะโอน	*Ompox bimaceelatus*	30	15.34-47.72	13.0-19.5
10. ปลาซิวหางควาย	*Rasbora trilineata*	20	5.83-12.82	8.5-11.0
11. ปลากดเหลือง	*Hemibagrus nemurus*	36	147.0-41.0	17.0-34.5
12. ปลาช่อน	*Channa striata*	25	54.6-263.1	18.4-31.0

ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนักและความยาวของปลาน้ำกร่อย

ปลาน้ำกร่อย

ชนิดปลา	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนปลา	น้ำหนักต่ำสุด-สูงสุด (กรัม)	ความยาวต่ำสุด-สูงสุด (เซนติเมตร)
1. ปลากระบอก	*Moolgarda seheli*	24	62.92-125.61	18.0-21.5
2. ปลากะพงขาว	*Lates calcarifer*	20	50-185.0	11.5-23.5
3. ปลากะรังจุดแดง	*Epinephelus coioides*	60	13.82-37.52	9.0-15.0

ตารางที่ 6 แสดงน้ำหนักและความยาวของปลาน้ำเค็ม

ปลาน้ำเค็ม

	ชนิดปลา	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนปลา (ตัว	น้ำหนักต่ำสุด-สูงสุด (กรัม)	ความยาวต่ำสุด-สูงสุด (เซนติเมตร)
1.	ปลาดุกทะเล	*Plotosus canius*	63	58.76-900.0	18.0-51.6
2.	ปลาลิ้นหมา	*Synuaptera panoides*	20	80.1-125.0	12.8-30.1
3.	ปลากะเบน	*Himantura imbricatus*	65	10.9-213.45	10.9-20.2
4.	ปลาตาหวาน	*Priacanthus tyenus*	20	38.24-65.62	15.2-18.4
5.	ปลาซีกเดียว	*Psettodes erumei*	31	33.23-235.43	15.0-31.0
6.	ปลาสีกุน	*Caranx* sp.	20	129.68-202.7	21.0-28.0

2 การจัดจำแนกชนิดปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียที่พบในปลาตัวอย่าง

จำแนกปรสิตที่พบในปลาตามหลักอนุกรมวิธาน รวมทั้งสรุปลักษณะเฉพาะของปรสิตแต่ละชนิดได้ดังนี้

2.1 ปรสิต *Myxobolus* sp. Type A.

Phylum Myxozoa

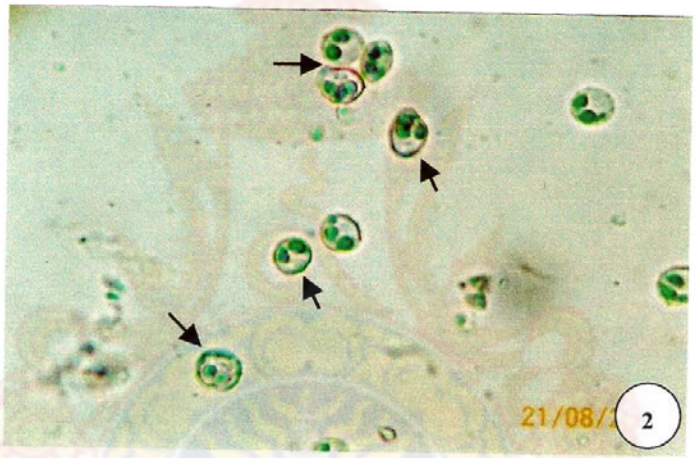
Class Myxosporea ของ Lom และ Dykova (2006)

Order Bivalvulida

Suborder Platysporina

Family Myxobolidae

Genus *Myxobolus*



***Myxobolus* sp. Type A.**

ภาพที่ 2 แสดงสปอร์ตัวเต็มวัยของปรสิต *Myxobolus* sp. (กำลังขยาย 40X)

ลักษณะจำเพาะ

Host : *Moolgarda seheli* (ปลากระบอก)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : Skin and Scale

Locality : Andaman Sea, Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 7.42 μm

ยาว = 8.48 μm

Polar capsule dimensions: กว้าง = 2.12 μm

ยาว = 3.18 μm

Prevalence : 3 of 24 (12.5 Percent)

2.2 ปรสิต *Myxobolus* sp. Type B.

Phylum Myxozoa

Class Myxosporea

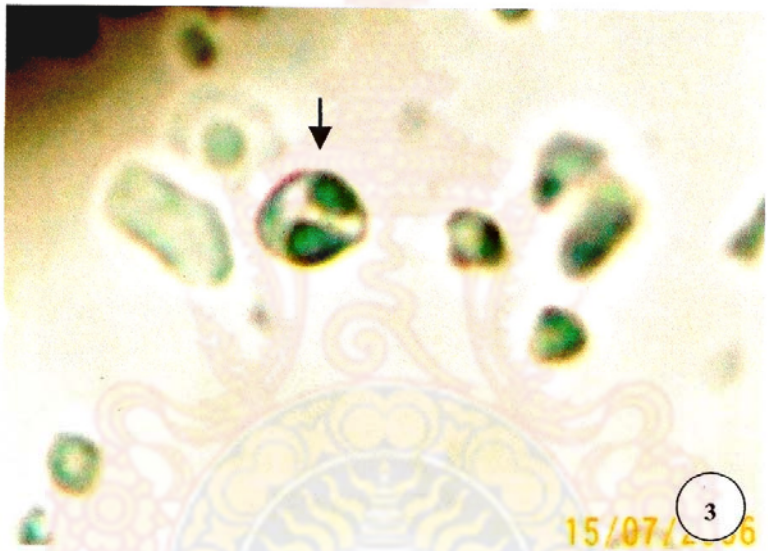
Order Bivalvulida

Suborder Platysporina

Family Myxobolidae

Genus *Myxobolus*

Myxobolus sp. Type B.



***Myxobolus* sp. Type B.**

ภาพที่ 3 แสดงปรสิต *Myxobolus* sp. ตัวเต็มวัย (กำลังขยาย 40X)

Host : *Epinephelus coioides* (กะรังจุดแดง)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : Gill

Locality : Andaman Sea, Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 14.84 μm

ยาว = 16.96 μm

Polar capsule dimensions: กว้าง = 5.3 μm

ยาว = 8.48 μm

Prevalence : 2 of 60 (3.3 Percent)

2.3 ปรสิต *Myxobolus* sp. Type C.

Phylum Myxozoa

Class Malacosporea

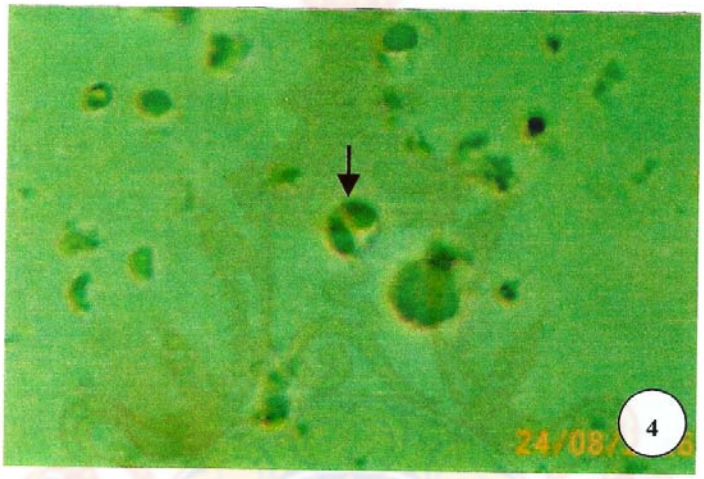
Order Malacovalvulida

Suborder Platysporina

Family Myxobolidae

Genus *Myxobolus*

Myxobolus sp. Type C.



***Myxobolus* sp. Type C**

ภาพที่ 4 แสดงปรสิต *Myxobolus* sp. ตัวเต็มวัย (กำลังขยาย 40X)

Host : *Himantura imbricatus* (กะเบน)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : gill

Locality : Andaman Sea, Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 18.02 μm

ยาว = 19.08 μm

Polar capsule dimensions: กว้าง = 2.12 μm

ยาว = 5.3 μm

Prevalence : 1 of 69 (1.4 Percent)

2.4 ปรสิต *Myxobolus* sp. Type D.

Phylum Myxozoa

Class Malacosporea

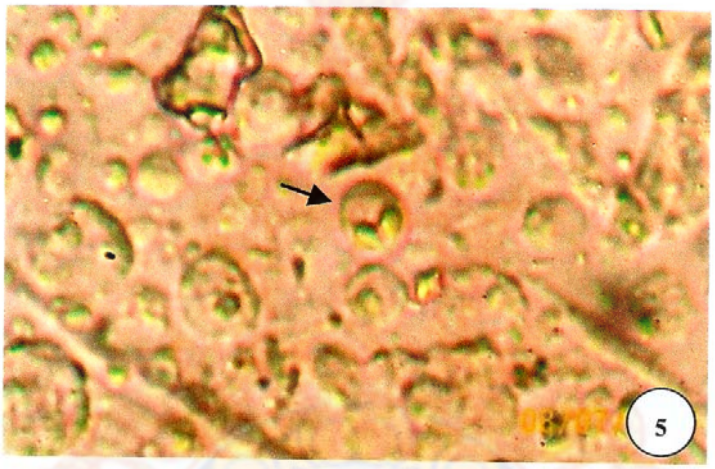
Order Malacovalvulida

Suborder Platysporina

Family Myxobolidae

Genus *Myxobolus*

Myxobolus sp. Type D.



***Myxobolus* sp. Type D**

ภาพที่ 5 แสดงปรสิต *Myxobolus* sp. ตัวเต็มวัย (กำลังขยาย 40X)

Host : *Psettodes erumei* (ปลาซีกเดียว)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : stomach

Locality : Andaman Sea, Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 9.54 μm

ยาว = 12.72 μm

Polar capsule dimensions: กว้าง = 3.18 μm

ยาว = 5.3 μm

Prevalence : 1 of 31 (3.2 Percent)

2.5 ปรสิต *Henneguya* sp. Type A

Phylum Myxozoa

Class Myxosporea

Order Bivalvulida

Suborder Platysporina

Family Myxobolidae

Genus Henneguya

Henneguya sp. Type A

***Henneguya* sp. Type A**

ภาพที่ 6 แสดงปรสิต ***Henneguya* sp. Type A.** ชนิด 2 หาง (กำลังขยาย 40X)

Host : *Anabas testudineus* (หมอไทย)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : gill

Locality :Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 9.54 μm

ยาว = 95.4 μm

Prevalence : 2 of 28 (7.1Percent)

2.6 ปรสิต *Henneguya* sp. Type B.

Phylum Myxozoa

Class Myxosporea

Order Bivalvulida

Suborder Platysporina

Family Myxobolidae

Genus Henneguya

Henneguya sp. Type B.

***Henneguya* sp. Type B**

ภาพที่ 7 แสดงปรสิต *Henneguya* sp. Type B ตัวเต็มวัย (กำลังขยาย 40X)

Host : *Hemibagrus nemurus* (กดเหลือง)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : gill

Locality :Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 7.42 μm

ยาว = 60.42 μm

Polar capsule dimensions: กว้าง = 2.12 μm

ยาว = 12.72 μm

Prevalence : 2 of 36 (5.5 Percent)

2.7 ปรสิต *Henneguya* sp. Type C.

Phylum Myxozoa

Class Myxosporea

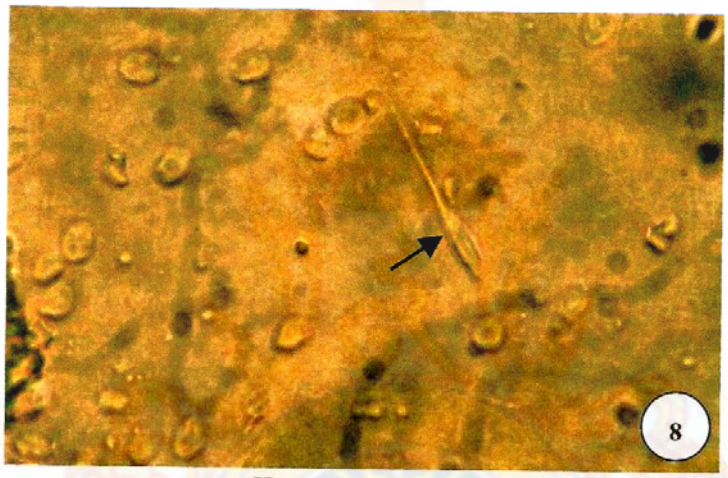
Order Bivalvulida (Shul'man, 1959)

Suborder Platysporina

Family Myxobolidae

Genus Henneguya

Henneguya sp. Type C.



***Henneguya* sp. Type C**

ภาพที่ 8 แสดงปรสิต *Henneguya* sp. Type C ตัวเต็มวัย (กำลังขยาย 40X)

Host : *Lates calcarifer* (กะพงขาว)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : gill

Locality : Andaman Sea, Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 3.18 μm

ยาว = 19.08 μm

Prevalence : 2 of 20 (10 Percent)

2.8 ปรสิต *Zschokkella* sp.

Phylum Myxozoa

Class Myxosporea

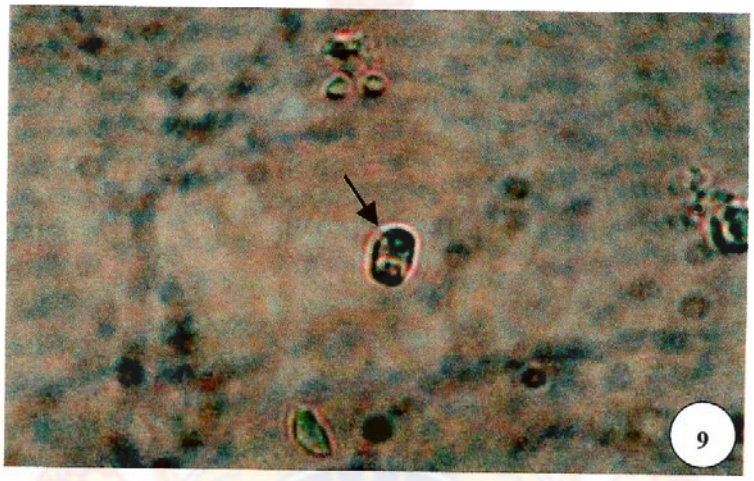
Order Bivalvulida

Suborder Variisporina

Family Myxidiidae

Genus Zschokkella

Zschokkella sp.



***Zschokkella* sp.**

ภาพที่ 9 แสดงปรสิต *Zschokkella* sp. ระยะตัวเต็มวัย (กำลังขยาย40X)

Host : *Plotosus canius* (ดุกทะเล)

Spore Stage: Mature spore

Site of infection : gall bladder

Locality : Andaman Sea, Trang Province, South of Thailand

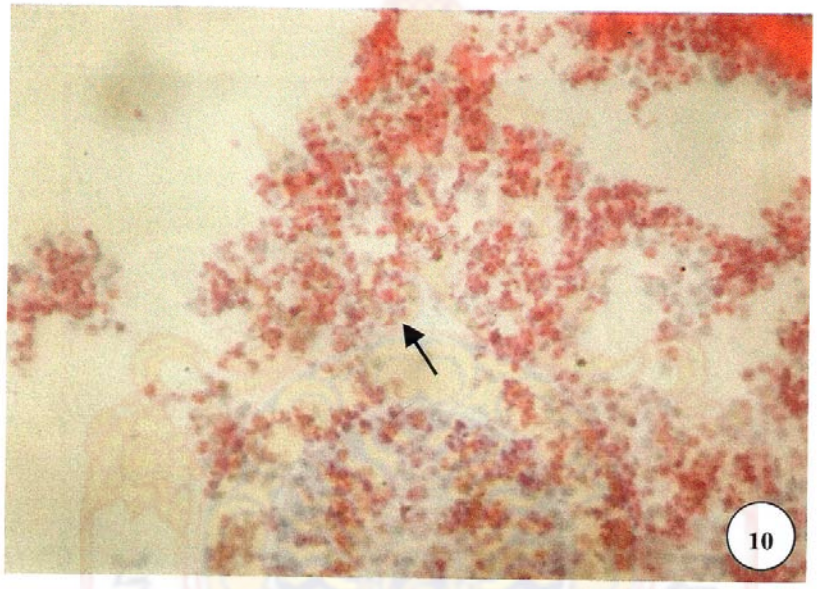
Spore dimensions: กว้าง = 8.48 μm

ยาว = 9.42 μm

Prevalence : 2 of 63 (3.1 Percent)

3 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่เกิดจากเชื้อปรสิตมิกโซปอร์ริเดีย

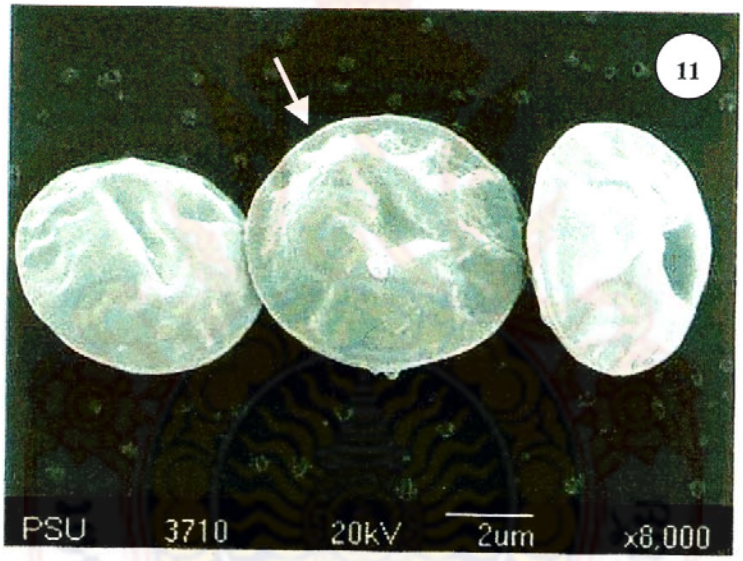
ปรสิตที่นำมาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาเจ้าบ้าน มี 1 ชนิด คือ ปรสิต *Myxobolus* sp. Type A เนื่องจากมีสัดส่วนการติดเชื้อในธรรมชาติสูงสุด ประกอบกับพบการเกิดหลุมบนเกล็ดที่มี plasmodia ของปรสิต จากการศึกษาพบว่าไม่พบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่เกิดจากการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังของปรสิตที่พบ *Myxobolus* sp.ในผิวหนังของปลากระบอก แต่อย่างไรก็ตาม พบการสะสมของเมลานินใน plasmodia ของปรสิต ซึ่งกลุ่มของสปอร์แสดงในภาพที่ 10



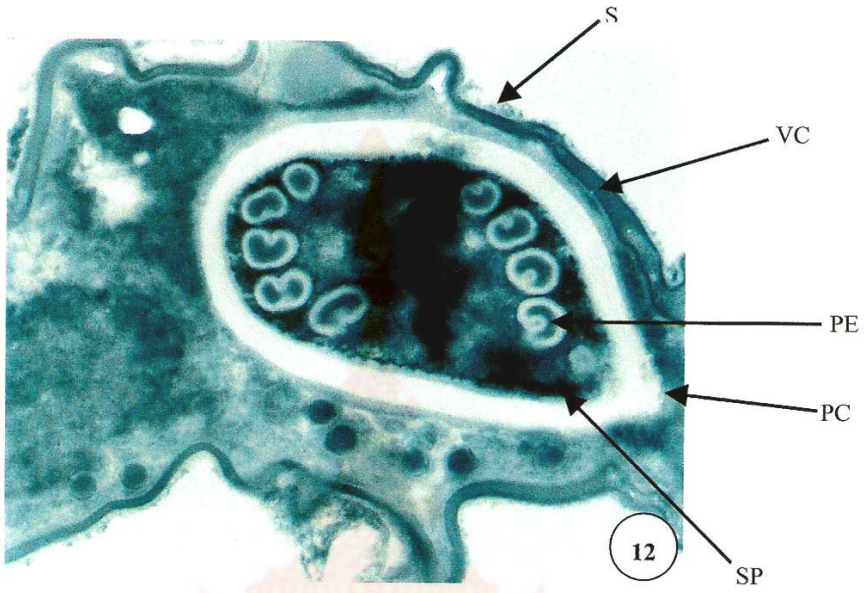
ภาพที่ 10 แสดงสปอร์ของ *Myxobolus* sp. ที่แตกออกจาก Cyst (H&E กำลังขยาย 40X)

4 การศึกษาปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

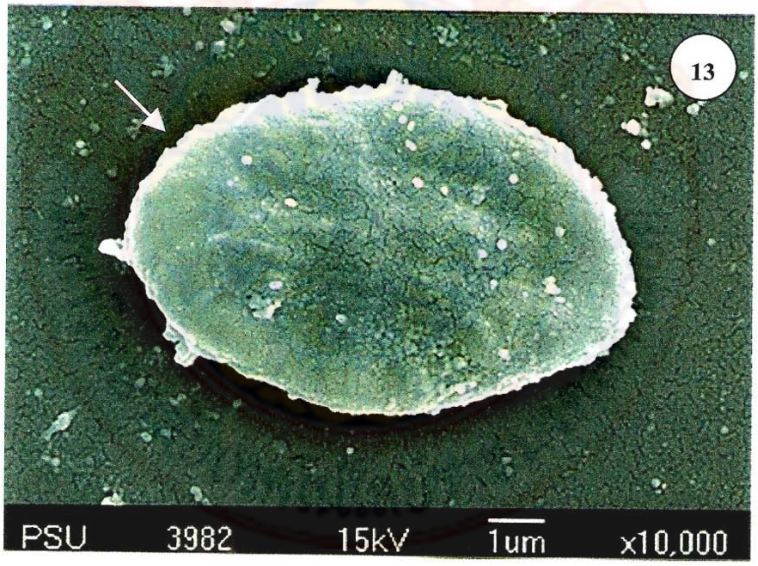
ปรสิตที่นำมาศึกษาโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศอิเล็กตรอนมีจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Myxobolus* sp. Type A ที่พบในปลากระบอก และ *Zschokklla* sp. ซึ่งพบในปลาดุกทะเล จากการศึกษาปรสิต *Myxobolus* sp. Type A แสดงให้เห็นว่า ผิวของสปอร์มีลักษณะเรียบ ภายใน polar capsule มี polar filament ขดเรียงเป็นเกลียว 4-5 รอบ รวมถึงเส้นขอบสปอร์ไม่พาดผ่านระหว่าง polar capsule ทั้ง 2 อัน (ดังแสดงในภาพที่ 11,12 และ 13) ในขณะที่การศึกษา *Zschokklla* sp. แสดงให้เห็นว่า บริเวณผิวของสปอร์มีลักษณะเรียบแบน แนวแกนสปอร์อยู่ระหว่าง polar capsule ของเซลล์ โดยภายในpolar capsule พบ polar filament ขดอยู่ (ดังแสดงในภาพที่ 13และ 14)



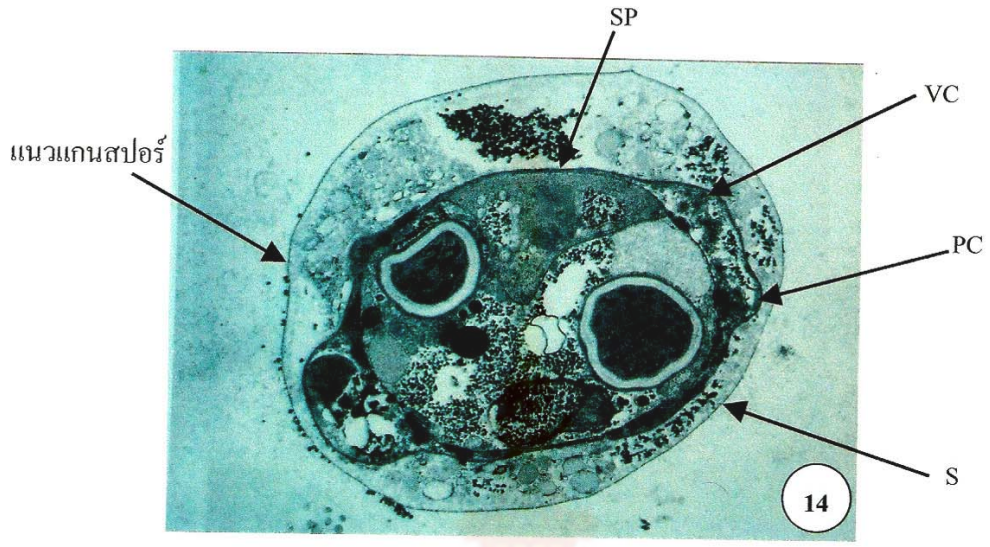
ภาพที่ 11 แสดง *Myxobolus* sp.Type A ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ยูรานิลอะซิเตรทและเลดซิเตรท 8,000X)



ภาพที่ 12 ปรสิต *Myxobolus* sp. ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ประกอบด้วย cell ระยะที่เป็นสปอร์โรพลาสซึม เปลือกหุ้มสปอร์ (vc), โพลาร์แคปซูล (PC) โพลาร์ฟิลลาเมนท์ (PE) และแนวแกนสปอร์ (ยูรานิลอะซิเตรทและเลคซิเตรท,กำลังขยาย 7,000X)



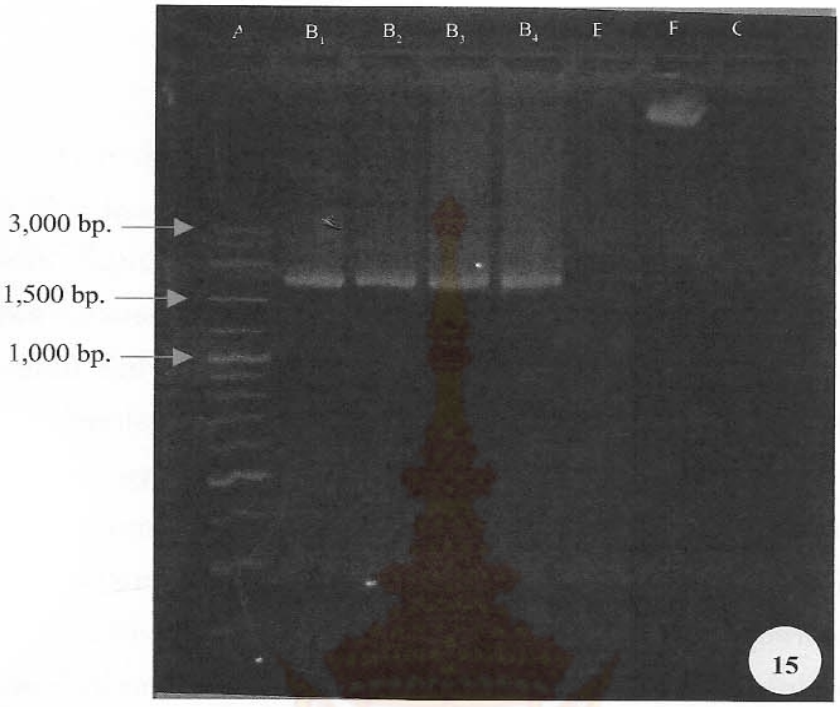
ภาพที่ 13 ปรสิต *Zschokkella* sp. แสดงโครงสร้างภายนอกลักษณะรีคล้ายรูปไข่ (ยูรานิลอะซิเตรทและเลคซิเตรท,กำลังขยาย 10,000X)



ภาพที่ 14 แสดงปรสิต *Zschokkella* sp. ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน *Zschokkella* sp. แสดงส่วนของสปอร์ประกอบด้วย cell ระยะที่เป็นสปอร์โรพลาสซึม (SP) เปลือกหุ้มสปอร์ (VC, โพลาร์แคปซูล (PC), สปอร์ (S) (ยูรานิลอะซิเตรทและเลคซิเตรท, 7,000X)

5. การเพิ่มจำนวน 18S rDNA ของปรสิตด้วยเทคนิค PCR

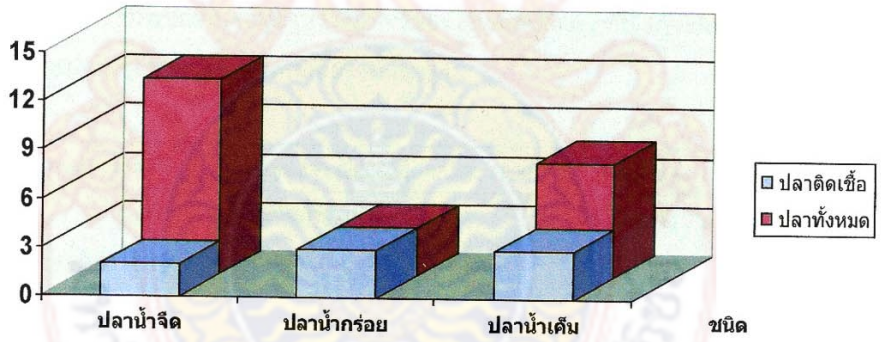
การศึกษาการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของปรสิตที่สนใจนั้น จะเลือกศึกษาเฉพาะ *Myxobolus* sp. ชนิดที่พบใต้เกล็ดปลากระบอกเท่านั้น (*Myxobolus* sp. Type A) ทั้งนี้เนื่องจากปรสิตดังกล่าวมีปริมาณตัวอย่างที่มากเพียงพอต่อการศึกษา ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัด DNA ดังกล่าวสามารถสกัด DNA ของปรสิตที่มีเปลือกแข็งและทนทานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการศึกษาการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของปรสิตสามารถใช้ primer MX3-MX5 ในการเพิ่มจำนวน 18S rDNA ของปรสิต *Myxobolus* sp. Type A ด้วยเทคนิค PCR ได้ดังแสดงดังภาพ 15 โดยสามารถสังเคราะห์ 18S rDNA ขนาดความยาวประมาณ 1,600 bp. ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานที่มีการใช้ primer ดังกล่าวในการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ในปรสิตกลุ่ม Myxosporidian สายพันธุ์อื่น ๆ และ primer ดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะต่อปรสิต โดยไม่เกิดการสังเคราะห์ DNA ในตำแหน่งที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าปลาประบอกที่ไม่มีการติดเชื้อปรสิตชนิดดังกล่าว จะไม่เกิดปฏิกิริยาในการเพิ่มจำนวน DNA ซึ่งผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า primer MX3-MX5 สามารถเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของปรสิต *Myxobolus* sp.A ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำ PCR product ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไปทำการศึกษาต่อไปได้



ภาพที่ 15 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของ *Myxobolus* sp. ด้วย MX3-MX5 primer (A. maker, B_1.-B_4. samples, C. healthy fish, F. extrected Myxosporidia DNA, E. negative control)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียในปลาเศรษฐกิจของจังหวัดตรัง พบปรสิต จำนวน 3 สกุล ได้แก่ *Myxobolus*, *Henneguya* และ *Zschokkella* จำนวน 8 ชนิด แต่เนื่องจากเป็นการศึกษาเบื้องต้น ที่มุ่งเน้นถึงชนิดและการแพร่กระจายของปรสิตเป็นสำคัญ จึงไม่สามารถศึกษาถึงรายละเอียดในส่วนของ Morphology และ SSU rDNA ของปรสิตแต่ละชนิดได้ แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยฉบับนี้ ก็เป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษาการแพร่กระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียในปลาทะเลเศรษฐกิจของจังหวัดตรัง ซึ่งจากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า มีการติดเชื้อในปลาเศรษฐกิจทั้งในเขตน้ำจืด, น้ำกร่อย และน้ำเค็ม จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ ปลาหมอไทย, ปลากดเหลือง, ปลากะพงขาว, ปลากระบอก, ปลากะเบน, ปลากะรังจุดแดง, ปลาดุกทะเล และ ปลาซีกเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างปลากลุ่มปลาน้ำกร่อยมีการติดเชื้อปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียทุกชนิดที่ทำการศึกษา นอกจากนี้กลุ่มปลาที่นำมาทำการศึกษาเป็นปลาที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงทั้งสิ้น ไม่ว่าจะเป็นปลากะพงขาว ปลากระบอก และปลากะรังจุดแดง นอกจากนี้ปลาทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวเป็นปลาที่มีการเพาะเลี้ยงในกระชังกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งจังหวัดตรังก็เป็นแหล่งผลิตที่สำคัญเช่นเดียวกัน โดยสัดส่วนของชนิดปลาที่ติดเชื้อปรสิตต่อชนิดปลาที่ทำการศึกษาแสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณชนิดของปลาที่ติดเชื้อต่อชนิดปลาที่ทำการศึกษา

ความหลากหลายทางชีวภาพของมิกโซสปอร์ริเดียในปลาเศรษฐกิจในจังหวัดตรัง จากการศึกษาพบจำนวน 8 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย *Myxobolus* spp. จำนวน 4 ชนิด *Henneguya* spp. จำนวน 3 ชนิดและ *Zschokkella* spp. จำนวน 1 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีขนาดของสปอร์และ polar capsule ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นชนิดที่ต่างกันและเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับชนิดที่มีรายงานในอดีตพบว่า มีหลายชนิดที่ไม่ตรงกับชนิดที่มีรายงานมาแล้ว (Lom and Dyková, 2006) ทั้งในแง่ของขนาดของสปอร์ ขนาดของ polar capsule รวมถึงสัตว์เจ้าบ้านและอวัยวะที่มีการติดเชื้อ

ปรสิต แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนกชนิดของปรสิตที่พบได้อย่างชัดเจน แต่แสดงให้เห็นว่าในพื้นที่จังหวัดตรังมีการแพร่กระจายของปรสิตกลุ่มดังกล่าวในปลาเศรษฐกิจที่สำคัญของจังหวัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาน้ำกร่อยที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง ถึงแม้ว่าการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาจากปลาธรรมชาติเพียงอย่างเดียว แต่อย่างไรก็ตามหากมีการแพร่ระบาดของปรสิตในธรรมชาติย่อมส่งผลต่อการเลี้ยงในกระชังของเกษตรกรอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ เนื่องจากการเลี้ยงปลาในกระชังจะได้รับอิทธิพลจากธรรมชาติสูงรวมถึงไม่สามารถกำจัดเชื้อก่อโรคที่อยู่ในแหล่งน้ำได้

Myxobolus sp. ในปลากระบอกเป็นปรสิตที่มีอัตราการพบสูงสุดจากการศึกษาครั้งนี้และปลากระบอกก็เป็นปลาเศรษฐกิจที่มีมูลค่าสูง จึงนำปรสิตชนิดดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับชนิดอื่น ๆ ซึ่งจากการรายงานของ Lom และ Dyková (2006) ในการจัดลำดับของปรสิต *Myxobolus* sp. พบว่ามีอยู่มากกว่า 790 ชนิด ในจำนวนนี้มีประมาณ 30 ชนิด ที่เป็นปรสิตในปลาน้ำกร่อยและน้ำเค็ม ซึ่งในปลากระบอกมีรายงานการพบ 13 ชนิด (Buhri และ Marqius, 1996; Kent และคณะ, 2001 และ Buhri และคณะ, 2003) ซึ่ง *Myxobolus* sp. ที่พบในปลากระบอกนั้นไม่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่มีรายงานในอดีต แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้ก็ไม่เพียงพอต่อการจำแนกชนิด ซึ่งการเปรียบเทียบรูปร่างของสปอร์แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลรูปร่างสปอร์ของ *Myxobolus* sp. กับ *Myxobolus* สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีขนาดสปอร์และอวัยวะในการติดเชื้อใกล้เคียงกัน

Myxobolus sp. (present work)	***M. episqmalis*** (Egusa และคณะ, 1990)	***M.muelleri*** (Buhri และคณะ, 2003)
1. สปอร์ กลม	1. สปอร์คล้ายรูปไข่	1. สปอร์รูปวงรี
- ความยาวสปอร์ 8.48 µm	- ความยาวสปอร์ 7.5 – 9.5 µm	- ความยาวสปอร์ 10 - 12 µm
- ความกว้างสปอร์ 7.42 µm	- ความกว้างสปอร์ 6.0 – 7.5 µm	- ความกว้างสปอร์9 - 11 µm
2. Polar capsule	2. Polar capsule	2. Polar capsule
- ความยาว 3.18 µm	- ความยาว 3.8 – 5.0 µm	- ความยาว 4 – 5 µm
- ความกว้าง 2.12 µm	- ความกว้าง 2.0 µm	- ความกว้าง 2 -3 µm
3. Localization	**3. Localization**	**3. Localization**
- Scale	- Scale	- gill filament

ลักษณะของปรสิต *Myxobolus* sp.ที่กล่าวมา แตกต่างกั บ *Myxobolus* ชนิดอื่นๆ ที่พบในปลากระบอก ไม่ว่าจะเป็นขนาดของสปอร์และPolar capsule แต่อย่างไรก็ตามยังจำเป็นที่จะต้องทราบถึง จำนวนรอบของ polar filament, intercapsular appendix, iodinophilus vacuole รวมถึงข้อ

มูลทางพันธุกรรม (SSU rDNA) เพื่อใช้ในการจัดจำแนกปรสิตที่พบตามสายวิวัฒนาการ ซึ่งข้อมูลทั้งหมดจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป

สำหรับ *Henneguya* sp. จากการศึกษาของ Lom, และ Dykova (1992) พบว่าปัจจุบันมีอยู่ 14 ชนิด ที่พบจากปลาเศรษฐกิจมีทั้ง 2 หาง และหางเดียว โดยปรสิตทำความรบกวนเซลล์เหงือกของปลา หากพบมีปริมาณมาก จะเกาะกันรูป cyst ทำให้ปลาหายใจไม่ได้ ปลาจะตายในที่สุด

สำหรับ *Zschokkella* sp. จากการศึกษาของ Lom และ Dykova (1992) พบว่าปัจจุบันมีอยู่ 7 ชนิด ที่พบในปลาดุกทะเล จากการศึกษาของนรสิงห์ (2542) พบว่าคล้ายกับ *Zschokkella orientalis* ทั้ง สปอร์ ความยาว ความกว้าง ขนาดของ Polar capsule อวัยวะที่พบ จะแตกต่างกันที่ส่วนของ host และแหล่งที่พบ ซึ่งต้องมีการศึกษาในรายละเอียดขั้นสูงต่อไป

เนื่องจากการจำแนกชนิดปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียโดยใช้ลักษณะทางกายวิภาคเพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถจำแนกชนิดของปรสิตได้อย่างชัดเจน การศึกษาครั้งนี้จึงนำ *Myxobolus* sp. Type A ซึ่งเป็นปรสิตที่พบในปลากระบอกมาทำการเพิ่มจำนวน 18S rDNA ของปรสิตในหลอดทดลอง เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาลำดับเบสและ Phylogennetic tree ต่อไป โดยได้เพิ่มจำนวน 18S rDNA ของปรสิตโดยใช้ primer MX3 – MX5 ซึ่งสามารถสังเคราะห์ 18S rDNA ของปรสิตขนาด 1,600 bp. ได้อย่างจำเพาะ นอกจากนี้ขนาดของ DNA เป้าหมายยังมีขนาดใกล้เคียงกับการทดลองอื่น ๆ ที่ใช้ primer ดังกล่าวในการเพิ่มจำนวน 18S rDNA ของปรสิตชนิดอื่น ๆ ในกลุ่มมิกโซสปอร์ริเดีย (Andree และคณะ, 1998; Buhri และคณะ, 2003 และ Dyková และคณะ, 2003) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วน DNA ที่สังเคราะห์ได้สามารถนำไปทำการศึกษาลำดับเบสและใช้ในการจัดสายวิวัฒนาการของปรสิตเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของปรสิตที่พบได้ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียในปลาเศรษฐกิจของจังหวัดตรัง สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาได้ทั้งหมดจำนวน 647 ตัว ใน 16 ครอบครัว 21 ชนิด สำหรับปลาที่นำมาตรวจพบปลาติดเชื้อปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียจำนวน 8 ชนิด ใน 16 ครอบครัว คิดเป็น 1.08 เปอร์เซ็นต์ของชนิดปลาทั้งหมด พบปรสิต *Myxobolus* sp. ในปลากะรัง จุดแดง บริเวณเหงือก 3.3 เปอร์เซ็นต์, ในปลาซีกเดียว บริเวณกระเพาะอาหาร 3.2 เปอร์เซ็นต์, ในปลากระเบน พบบริเวณ เหงือก 1.4 เปอร์เซ็นต์, ในปลากระบอก พบบริเวณผิวหนัง และ เกล็ด 12.5 เปอร์เซ็นต์, ในปลากะพงขาว พบบริเวณเหงือก 10 เปอร์เซ็นต์, ในปลาหมอไทย พบบริเวณเหงือก 7.1 เปอร์เซ็นต์, ในปลากดเหลือง พบบริเวณเหงือก 5.5 เปอร์เซ็นต์, และปรสิต *Zschokkella* sp. ที่พบในปลาดุกทะเล บริเวณถุงน้ำดี 3.1 เปอร์เซ็นต์

2. จากการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อแต่อย่างใด โดยกลุ่มของปรสิต *Myxobolus* sp. ที่พบมากบริเวณเกล็ดและผิวหนัง ของปลากระบอก เมื่อศึกษาทาง Histopathology ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ โดยเซลล์ Cyst ของปรสิตที่พบสีดำมีจำนวนมากมีตัวอ่อนอยู่ภายในจำนวนมากนับไม่ได้

3. การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบเซลล์ที่อยู่ภายใน ได้แก่ ปรสิต *Myxobolus* sp. และ *Zschokkella* sp. มีทั้งเซลล์ วัยอ่อนและตัวเต็มวัย จากการศึกษาโครงสร้างภายในพบเซลล์ Sporoplasm ที่ทำหน้าที่ในการสืบพันธุ์ Valvogenic cell เปลือกหุ้มสปอร์, Polar capsule 2 อัน ภายใน Polar capsule มี Polar filament 8 – 9 เกลียว สำหรับการศึกษาโครงสร้างภายนอกเห็นเซลล์ภายนอกชัดเจน สำหรับ *Myxobolus* sp. เซลล์ลักษณะกลม รี ส่วน *Zschokkella* sp. รูปร่างลักษณะวงรี ฝังนูนออกมา

4. การสกัด DNA โดยใช้เอนไซม์ Protenase K ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเปลือกหุ้มปรสิตก่อนทำการสกัด DNA เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60^{o} C ทำให้สามารถสกัด DNA จากปรสิตโดยใช้ DNAsol ได้อย่างมีประสิทธิภาพและได้ DNA ของปรสิตที่มีคุณภาพดี

5. การพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของปรสิต *Myxobolus* sp. (A) ซึ่งพบในปลากระบอกนั้น สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 18S rDNA ได้โดยใช้ primer MX3-MX5 ซึ่งสามารถสังเคราะห์สาย DNA ขนาดประมาณ 1,600 bp.

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2549. สถิติปริมาณและมูลค่าสัตว์น้ำ ณ ท่าขึ้นปลาน้ำเค็ม. เอกสารฉบับที่ 5/2549 กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง ศูนย์สารสนเทศกรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 36 หน้า.

กิจการ ศุภมาตย์ และสิทธิ บุณยรัตผลิน. 2530. การควบคุมและกำจัดโรคสัตว์น้ำ. วารสารสงขลานครินทร์ 9 (2) : 259 – 271.

กิจการ ศุภมาตย์, สาวิตรี ศิลาเกษ, วุฒิพร พรหมขุนทอง และสิทธิ บุณยรัตผลิน. 2539. โรคและพยาธิปลา. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา. 209 หน้า.

จงดี ศรีนพรัตน์วัฒน. 2530. โปรโตซัวที่เป็นปรสิตภายนอกของปลาน้ำจืดบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ณัฐวดี ประดิษฐ์ชัย. 2550. การจำแนกชนิดของมิกโซสปอร์และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อจากการเกิดโรคมิกโซสปอร์ในปลาน้ำจืดบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

นรสิงห์ เพ็ญประไพ. 2542. การศึกษาชนิดและพยาธิสภาพของการติดเชื้อมิกโซสปอร์ริเดียในปลาดุกทะเลที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ประไพสิริ สิริกาญจน. 2538. ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ. ภาควิชาชีววิทยาประมง, คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 199 หน้า.

รังสัญ รักกมล. 2544. การศึกษาปรสิตมิกโซสปอร์ริเดียในปลาทะเลและปลาน้ำกร่อยในบริเวณทะเลสาบสงขลารอบนอก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

Abdulrahman, M., Kalantan, N and Arfin, M. 1991. Studies on *Myxobolus garrai* sp. n. (Myxozoa : Myxosporea parasitizing of *Garra tibanica* in Saudi Arabia – Zool – Anz. 226 : 261 – 266.

Andree, K. B., MacConnell, E. and Hedrick, R.P. 1998. A nested polymerase chain reaction for the detection of genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat. Org. 34: 145-154.

Alvaver – Pellitero. P and Sitja – Bobadilla. A. 1993. Pathology of Myxosporea in marine fish culture. Dis Aquat. Org. 17 : 229 – 238.

Artush. K.D. and Hedrick. R.P. 1990. Experimental transmission. PKX, the causative agent of proliferative kidney disease of 3 species of the Pacific salmon. J. Appl. Ichthyol. 6 : 237 – 243.

Bancroft, J.D. 1967. Histological Techniques Butterworths. London. 348 p.

Bartholomew, J.L. Smith, C.E., Rohovec, J.S. and freer, J.L. 1989. Development, characterization and use to monoclonal and polyclonal autibodies. Against the Myxosporean *Ceratomyxa shasta* J. Protozool. 36 (4) : 397 – 401.

Batholomew, J.L., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. 1989. *Ceratomyxa shasta*, a Myxosporean Parasite of Salmonids. U.S. Fish and Wildlife Service. National Fisheries Research Center West Verginia. 8 p.

Bauer, O.N. 1962. Parasite of Freshwater fish and the Biological Basic for their Control. The National Science Foundation Washing ton D.C., Jerusalem. 230 p.

Brown, J.A., Thonney. J.P., Holwell, D and Wilsoh, W. R. 1991. A comparison of the susceptibility of *Salvelinus alpinus* and *Salmo salar* uaniche to proliferative kidney disease. Aquaculture. 96 : 1 – 6 .

Bucher. F, Hofer. Rand El – Matbouli, M. 1992. Prevalence and pathology of *Zschokkella nova* (Myxosporea) in the liver of bullhead *Cottus gobio* from a pulled river. Dis Aqust. Org. 14 : 137 – 143.

Buhri, S. and Marques, A. 1996. Myxosporean parasites of the genus *Myxololus* from *Mugil cephalus* in Ichkeul lagoon, Tunisia : decription of two new species. Dis Aquat. Org. 27 : 115 – 122.

Buhri, S., Andree, K.B. and Hedrick, R.P. 2003. Morphological and Phylogenetic studies of marine *Myxobolus* sp. from mullet in ichkeul lake, Tunisia. J. Eukaryot. Microbiol. 50: 463 – 470.

Csaba, G., Kovacs – Gayer, E., Bekest, L Bucsek, M. and Szalcolzal, J. 1984. Studies in to the possible protozoan actilogy of swimbladder inflammation in carp fry.J. fish Dis. 7 : 39 – 56.

Davies, A. J. 1985. *Zschokkella russelli* Tripathi (Myxozoa : Myxosporea) form the bearded rockling. *Ciliata mustela* L., (Teleostei : Gadidae) in Wales. J. Fish Dis. 8 : 299 – 308.

Dyková, I., Fiala, I. and Nie, P. 2003. New data on *Myxobolus longisporus* (Myxozoa: Myxobolidae), a gill infecting parasite of carp, *Cypinus carpio* haematopterus, from Chinese lakes

Egusa. S., Maen , 0 and Sorimachi, M. 1990. A new species of Myxozoa, *Myxobolus episqualmalis* sp. Nova infacting the Scales of the mullet, *Mugil cephalus*. Fish Patho. 25 : 87 – 94

Friedrich, C., Ingolic, E., Freitag, B., Kastberger, G., Hoffmann, V., Skofitsch, G., Neumeister, U. and Kepka, O. 2000. A Myxozoan-like parasite causing xenomas in the brain of the mole, *Talpa europaea* L., 1758 (Vertebrata, Mammalia). Parasitology 121: 483-492.

Garner, M; Bartholomew, L; Whipps, M, C; Nordhauseu and P. Raiti. 2005. Renal Myxozoanosis in Crowned River Turtles *Hardella thurjii* : Description of the Putative Agent *Myxidium hardella* n. sp. by Histopathology, Electron Microscopy, and DNA Sequencing Vet Pathol 42 : 589 – 595.

Hoffmaster. J.L. and Sanders, J.E., Rohovec, J.S. and Fryer. J.L. 1988. Geographic distribution of the Myxosporean parasite, *Ceratomyxa shasta* Noble 1950, in the columbia River Basin, usa.J. fish Dis. 11 : 97 – 100.

Humason, G. L. 1962. Animal Tissue Technique. Freeman and Company Ltd, Sanfrancisco 641 p.

Kent, M.L. and Hedrick, R.D. 1985. PKX, the causative agent of Proliferative kidney disease (PKD) in pacific salmonid fishes and its affinities with the Myxozoa J. Protozool. 32 (2) : 254 – 260.

Kent, M.L., Andree, K.B., Bartholomew, J.B., El-Matbouli, M., Desser, S.S., Devlin, R.H., Feist, S.W., Hedrick, R.P., Hoffman, R.W., Khattra, J., Hallett, S.L., lester, J.G., Longshaw, M., Palenzuela, O., Siddall, M.E. and Xiao,C. 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. J. Eukaryot. Microbiol. 48: 395-413.

Korting. W. 1982. Protozoan parasites associated with swimbladder inflammation (SBI) in young carp Bull. Eur Ass. Fish Path 25 – 28.

Lom, J and Arthur, J.R. 1989. Aguide line for the preparation of species descriptions in Myxosporea J. fish Dis. 12 : 151 – 156.

Lom, J. and E. R. Noble. 1984. Revised classification of the class Myxosporea Butschli. 1881. Folia Parasitologica 31 : 193 – 205.

Lom, J., D and Dykova,I. 1992. Protozoan Parasites of fish Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. 315 p.

Lom, J. and Dykova, I. 2006. Myxozoa genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. Folia Parasitol. 53: 1-36.

Lowenstine L.J., Rideout, B.A., Garner, M.M., busch, M., Mace M., Bartholomew J. and Gardiner C.H. 2002. Myxozoanosis in waterfowl: a new host record. Proc. Am. Assoc. Zoo. Vet. 86-87.

Markiw, M.E. 1991. Whirling disease : earliest susceptible age of rainbow trout to the triactinomyxid of *Myxobolus cerebralis* Aquaculture. 92 : 1 – 6 .

Masoumian, M., Bastic., F. and *Molnar*. K. 1996. Description. of *Myxobolus sulboccordis* sp nova. (Myxosporea : Myxobolidae) from the deart of *Barbus sharpeyi* (Gunther) and histopathological changes production by the parasite. J. fish Dis. 19 : 15 – 21.

Mitchell, L. G., Seymour, C.L. and Gamble, J.M. 1985. Light and electron microscopy of *Myxobolus hendvicksoui* sp. nova (Myxozoa : Myxobolidae) infecting the brain of the fathead minnow, *Pimephales promelas* Rafines que. J. fish Dis 8 : 75 – 89.

Moncada, L.J., Lopez M.C., Murcia M.L., Nicholls, S., Frecia, L., Guio, O.L. and Corredor, A. 2001. *Myxobolus* sp., an other opportunistic parasite in immunosuppressed patients. J. Clin. Microbiol. 39: 1938-1940.

Noble, E.R. 1966. Myxosporidia deepwater fish J. Parasitol. 52 (4) : 685 – 690.

Overstreet, R.M. 1976. *Febespora vermicola* sp. n., the first Myxosporidean from a platyhelminth. J Parasitol. 62 : 680 – 684.

Paperna, H. 1983. a Chloromyxum – like Myxosporean infection in the stomach of cultured *Sparus aurcta* (l. J. Fish Dis. 6 : 85 – 89.

Prulacu, C., Prunescu, P., Pucek, Z. and Lom, J. 2007. The first finding of Myxosporean development from plasmodia to spores in terrestrial mammals: *Soricimyxum fegati* gen. et sp. n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricomorpha)

Schmahl, G., Mehlhorn, H and Taraschewski, H 1989. Treatment of fish parasite 7 effect of sym Triazinone (Toltrazaril) on development stage of *Myxobolus* sp. Butshli, 1822 (Myxosporea), Myxozoa a light and electron microscopic study – Europ . J. Protistol. 25 : 26 – 32 .

Sitja – Bobadilla, A and Alvarez – Pellitero, P. 1990. – *Sphaerospora testicularis* sp. nova. (Myxosporea : Sphaerosporidae) in wild and cultured Sea bass, *Dicentrachus labrax* (L.), from the sponish Mediterranean area – J. fish Dis. 13 : 193 – 203.

Shulman, S.S. 1966. Myxosporidia of the ussr (English translation from Russian) American Publishing co, Washington, D.C. 631 p,

Supamattaya, K, Fisher – Schert. T.H. Hoffman. R.W. and Boonyaratpalin, S. 1990. Ren's Sphaero sporosis in cultured grouper *Epinephelus malabaricus* Dis August. Org 8 : 35 – 38.

Taylor, R. L. and Lott, M. 1978. Transmission of Salmonid Whirling Disease by bird fed trout infected with : *Myxosoma cerebralis*. J. Protozool – 25(1) : 105 – 109.

Thiyagarajch. A. 1993. Proliferative gill disease of fish from the Tennessee – Tombigbee waterway Missicippi J. Aquat Anim. Health. 5 : 219 – 222.

Yokoyama, H. Oguwa.H and Wakabayashi. H. 1991. A new collection method of actinosporeans, a probable infective stage of Myxosporean to fishes from tufificids and experiment al in fection of goldfish with the actinosporean, *Rabeia* sp. fish patho. 26 : 133 – 13.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ตัวอย่างปลาเก็บรวบรวมได้จากแม่น้ำในปลาน้ำจืด

	ชนิดปลา / ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนปลาตัวอย่าง	ครอบครัว	ปรสิตที่พบ
1.	ปลานิล *Oreochromis nilohcus*	35	Cichlidae	
2.	ปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus*	20	Cyprinidae	
3.	ปลาหมอไทย *Anabas testudineus*	28	Anabantidae	*Henneguya* sp. Type A
4.	ปลายี่สกเทศ *Labeo rohita*	20	Cyprinidae	
5.	ปลาบ้า *Leptobarbus hovemi*	20	Cyprinidae	
6.	ปลาดุกบิ๊กอุย *Clarias* sp.	20	Clariidae	
7.	ปลาดุกยักษ์ *Clarias gariepinus*	20	Clariidae	
8.	ปลาขี้ขม *Osteochilus hasseltii*	20	Cyprinidae	
9.	ปลาชะโอน *Ompox bimaceelatus*	30	Siluridae	
10.	ปลาซิวหางควาย *Rasbora trilineata*	20	Cyprinidae	
11.	ปลากดเหลือง *Hemibagrus nemurus*	36	Bagaridae	*Henneguya* sp. Type B
12.	ปลาช่อน *Channa striata*	25	Ophiocephalidae	

ตารางผนวกที่ 2 ตัวอย่างปลาเก็บรวบรวมได้จากแม่น้ำในปลาน้ำกร่อย

	ชนิดปลา / ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนปลาตัวอย่าง	ครอบครัว	ปรสิตที่พบ
1.	ปลากระบอก *Moolgarda seheli*	24	Mugilidae	*Myxobolus* sp. Type A
2.	ปลากะพงขาว *Lates calcarifer*	20	Centropomidae	*Henneguya* sp. Type C
3.	ปลากะรังจุดแดง *Epinephelus coioides*	60	Serranidae	*Myxobolus* sp. Type B

ตารางผนวกที่ 3 ตัวอย่างปลาเก็บรวบรวมได้จากแม่น้ำในปลาน้ำเค็ม

	ชนิดปลา / ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนปลาตัวอย่าง	ครอบครัว	ปรสิตที่พบ
1.	ปลาดุกทะเล *Plotosus canius*	63	Plotosidae	*Zschokkella* sp.
2.	ปลาลิ้นหมา *Brachirus panoides*	20	Soliedae	
3.	ปลากะเบน *Himantura imbricatus*	69	Dasyatidae	*Myxobolus* sp. Type C
4.	ปลาตาหวาน *Priacanthus tyenus*	20	Priacanthidae	
5.	ปลาซีกเดียว *Psettodes erumei*	31	Psettodidae	*Myxobolus* sp. Type D
6.	ปลาสีกุน *Caranx* sp.	20	Carangidae	

ภาพผนวกที่ 1 รูปร่างและลักษณะของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) SL : 10.75 cm.

ภาพผนวกที่ 2 รูปร่างและลักษณะของปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) SL : 16.5 cm.

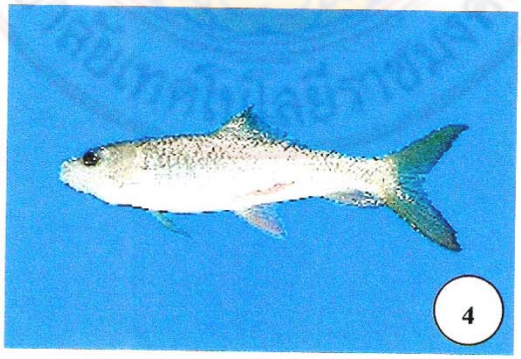
ภาพผนวกที่ 3 รูปร่างและลักษณะของปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) SL : 14.75 cm.

ภาพผนวกที่ 4 รูปร่างและลักษณะของปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) SL : 13.0 cm.

1

2

3


4

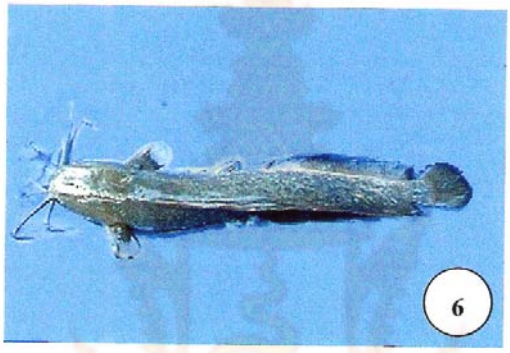
ภาพผนวกที่ 5 รูปร่างและลักษณะของปลาบ้า (*Leptobarbus hoevenii*) SL : 9.0 cm.

ภาพผนวกที่ 6 รูปร่างและลักษณะของปลาดุกบิ๊กอุย (*Clarias*) SL : 20.4 cm.

ภาพผนวกที่ 7 รูปร่างและลักษณะของปลาดุกยักษ์ (*Clarias gariepinus*) SL : 19.7 cm.

ภาพผนวกที่ 8 รูปร่างและลักษณะของปลาขี้ขม (*Osteochilus hasseltii*) SL : 14.0 cm.

5


6

7

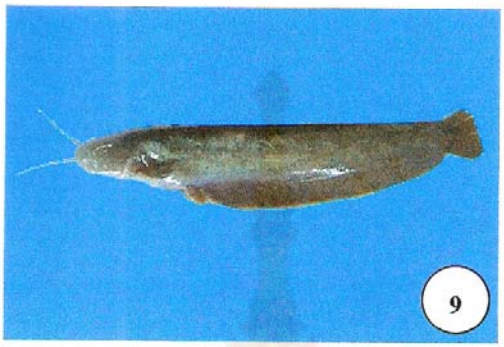
8

ภาพผนวกที่ 9 รูปร่างและลักษณะของปลาชะโอน (*Ompox bimaceelatus*) SL : 16.25 cm.

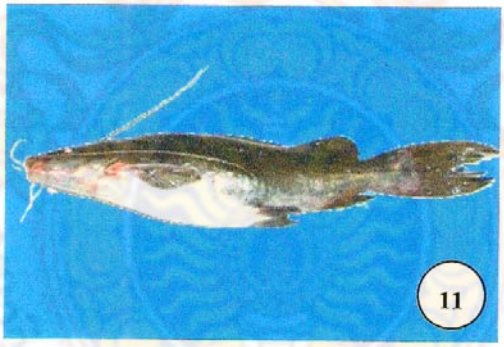
ภาพผนวกที่ 10 รูปร่างและลักษณะของปลาซิวควาย (*Rasbora trilineata*) SL : 9.75 cm.

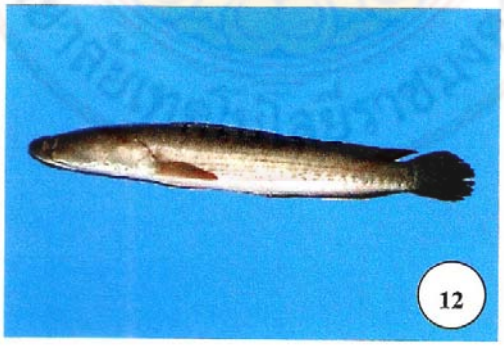
ภาพผนวกที่ 11 รูปร่างและลักษณะของปลากดเหลือง (*Hemibagrus nemurus*) SL : 25.75 cm.

ภาพผนวกที่ 12 รูปร่างและลักษณะของปลาช่อน (*Channa striata*) SL : 24.7 cm.


9

10


11

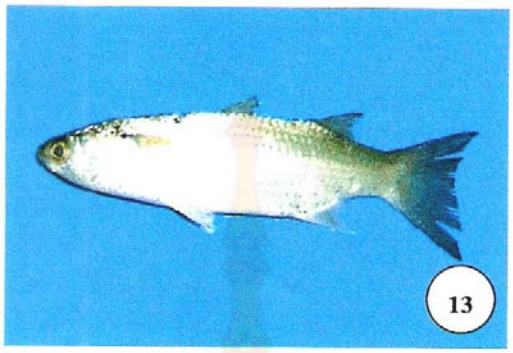

12

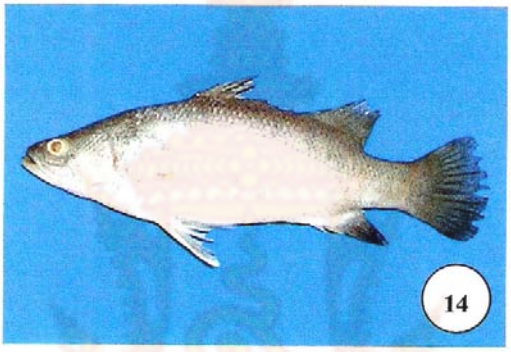
ภาพผนวกที่ 13 รูปร่างและลักษณะของปลากระบอก (*Moolgarda seheli*) SL : 19.75 cm.

ภาพผนวกที่ 14 รูปร่างและลักษณะของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer)* SL : 17.5 cm.

ภาพผนวกที่ 15 รูปร่างและลักษณะของปลากะรังจุดแดง *(Epinephelus coioides)* SL : 12.0 cm.

ภาพผนวกที่ 16 รูปร่างและลักษณะของปลาดุกทะเล (*Plotosus canius)* SL : 34.8 cm.


13


14

15

16

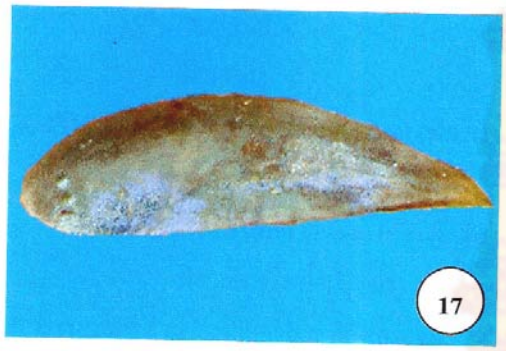
ภาพผนวกที่ 17 รูปร่างและลักษณะของปลาลิ้นหมา (*Brachirus panoides*) SL : 21.45 cm.

ภาพผนวกที่ 18 รูปร่างและลักษณะของปลากะเบน (*Himantura imbricatus*) SL : 15.5 cm.

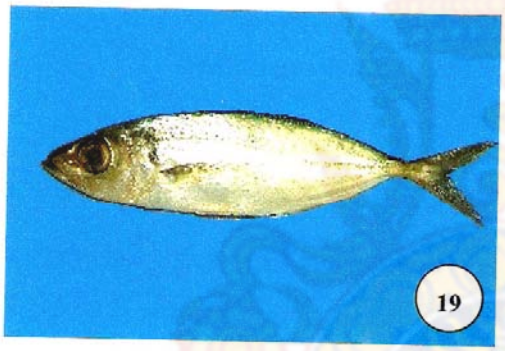
ภาพผนวกที่ 19 รูปร่างและลักษณะของปลาตาหวาน (*Priacanthus tyenus*) SL : 16.8 cm.

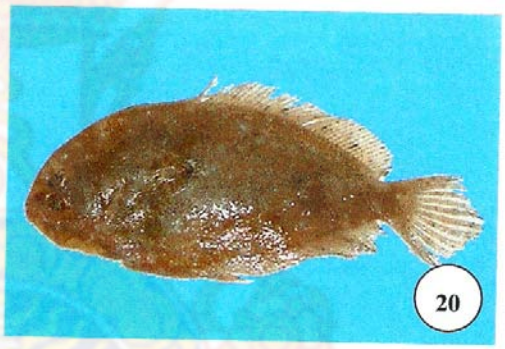
ภาพผนวกที่ 20 รูปร่างและลักษณะของปลาซีกเดียว (*Psettodes erumei*) SL : 23.0 cm.

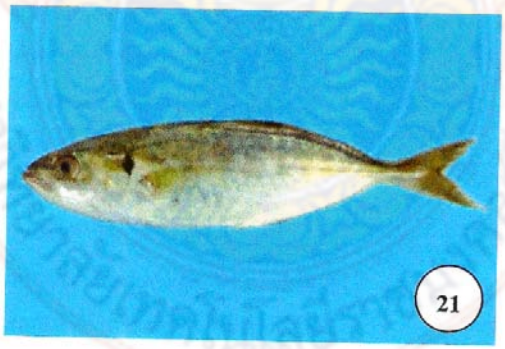
ภาพผนวกที่ 21 รูปร่างและลักษณะของปลาสีกุน (*Caranx* sp) SL : 24.5 cm.


17

18


19


20


21

สำหรับกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

1. สารละลายป้องกันเลือดแข็งตัว

วิธีเตรียม

สาร EDTA	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	25	มิลลิลิตร

2. สารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อ (fixative) (ฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์)

วิธีเตรียม

ฟอร์มาลีน (37 – 40 เปอร์เซ็นต์ของฟอร์มาดีไฮด์)	100 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำประปา	900 มิลลิลิตร

3. สารละลายสำหรับย่อยอวัยวะที่ติดกระดูก

วิธีเตรียม

อลูมิเนียมคลอไรด์	7	กรัม
หรืออลูมิเนียมคลอไรด์ผสมน้ำแทน		
กรดไฮโดรคลอริก	8	มิลลิลิตร
กรดฟอร์มิก	5	มิลลิลิตร

4. การนำตัวอย่างผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในเครื่องเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

ตารางผนวกที่ 4 ตัวอย่างเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการตามขั้นตอนในเครื่อง Automatic tissue Processor

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	แอซิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์	0.5 – 1.0
2	แอซิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ I	0.5 – 1.0
3	แอซิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ II	0.5 – 1.0
4	แอซิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ I	0.5 – 1.0
5	แอซิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ II	0.5 – 1.0
6	แอปโซลูทแอลกอฮอล์	0.5 – 1.0
7	ไอโซโปรพิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ I	0.5 – 1.0
8	ไอโซโปรพิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ II	0.5 – 1.0
9	ไซลีน I	1.0
10	ไซลีน II	1.0
11	พาราฟิน I	1.0
12	พาราฟิน II	1.0

ตัวอย่างเนื้อเยื่อผ่านการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) เข้าสู่ (clearing) และแทรกตัว (infiltration) อยู่ในพาราฟิน แล้วนำเนื้อเยื่อฝังในพาราฟิน (embedding) เตรียมตัด (cutting) และแต่ง (trim) ต่อไป

5. การย้อมสีฮีมาท้อกไซลีน

วิธีเตรียม เมเยอร์ฮีมาท้อกไซลีน (Mayer's hematoxylin)

ฮีมาท้อกไซลีน	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
โซเดียมไอโอเดท	0.20	กรัม
แอมโมเนียหรือโปแตสเซียมอลัม	50	กรัม
กรดซิตริก	1	มิลลิลิตร
คลอรอลไฮเดรท	50	กรัม

ละลายโปแตสเซียมอลัมในน้ำกลั่น แล้วเติม ฮีมาท้อกไซลีน คนให้ละลาย แล้วเติมโซเดียมไอโอเดท กรดซิตริก และคลอรอลไฮเดรทลงไป คนให้สารประกอบละลายแล้วทิ้งไว้1 – 2 สัปดาห์ ก่อนนำมาใช้ สีออกม่วงแดง

6. การย้อมสีอิโอซิน

วิธีเตรียม

อิโอซิน Y	1	กรัม
น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
ละลายให้เข้ากันแล้วเติมแอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น	95	เปอร์เซ็นต์
แอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์	80	มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ 5 ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาท้อกไซลีนและอิโอซิน

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน I	2
2	ไซลีน II	2
3	ไซลีน III	2
4	ไอโซโปรฟิลแอลกอฮอล์ I	1
5	ไอโซโปรฟิลแอลกอฮอล์ II	1
6	แอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์	1
7	แอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์	1
8	แอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์	1
9	น้ำกลั่น	1
10	ฮีมาท้อกไซลีน	4
11	น้ำประปา	1
12	น้ำกลั่น	1
13	แอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์	1
14	อิโอซิน	2
15	แอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์	2
16	แอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ I	2
17	แอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ II	2
18	แอปโซลูทแอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโปรฟิลแอลกอฮอล์ I	2
20	ไอโซโปรฟิลแอลกอฮอล์ II	2
21	ไซลีน I	2
22	ไซลีน II	2
23	ไซลีน III	2

เมื่อย้อมสีเสร็จ ทำการเม้าท์ด้วยน้ำยา ทิ้งสไลด์ให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาต่อไป

7. การย้อมสีทูลูดีนบูล

วิธีเตรียม ทูลูดีนบูล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (1 percent toluidine blue)

ทูลูดีนบูล	1	กรัม
สารละลายบอแรก	1	กรัม

ละลายสาร 2 อย่าง เข้าด้วยกันแล้วใช้แท่งแก้วคนหรือตั้งไว้ ใช้เครื่องกวนสาร อาจทิ้งไว้ตอนกลางคืน จากนั้น กรองสารดังกล่าวเก็บไว้ในขวดสีชา (เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

หมายเหตุ - สารละลายบอแรก อาจละลายได้ยาก ควรบดสารให้ละเอียดก่อนที่จะละลาย จะทำให้สารละลายได้ง่ายขึ้น

8. ขั้นตอนการย้อมสีทูลูดีนบูล

1. อุ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อบนเตาความร้อนอุณหภูมิที่เลข 4 – 5 ให้สไลด์แห้งเป็นเวลา 10 นาที

2. เอาสไลด์ขึ้นมาแล้วหยดสีบนเนื้อเยื่อ 2 – 3 หยด (ไม่ควรหยดขณะสไลด์ อยู่บนเตาความร้อน เพราะร้อนมาก ทำให้สไลด์ร้าวแตกได้ ขณะที่วางอยู่บนเตาความร้อน)

3. รอจนเห็นขอบของหยดสีมีสีเขียวเรือง ๆ (ใช้เวลา 30 – 60 นาที)

4. เอาสไลด์ขึ้นจากเตาความร้อน ล้างด้วยน้ำประปาจนสะอาด

5. ทิ้งสไลด์ให้แห้งสนิทบนเตาความร้อน แล้วนำสไลด์ที่แห้งดีแล้วไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

สำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่านและลำแสงส่องกราด

1. สารละลาย (stock solution)

วิธีเตรียม

บัฟเฟอร์โซเดียมคาโคดีเลท	0.4 M, pH 7.4	
โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น	10	เปอร์เซ็นต์
กลูตารอลดีไฮด์ ความเข้มข้น	2.5	เปอร์เซ็นต์
ออสเมียมเตทไตรไซด์ ความเข้มข้น	4	เปอร์เซ็นต์

เมื่อเตรียมสารละลายแล้ว ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ เก็บสารละลายไว้ในตู้เย็น

2. สารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อ (fixative)

วิธีเตรียม

กลูตารอลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์	2	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์โซเดียมคาโคดีเลท	5	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	9	มิลลิลิตร

3. สารละลายบัฟเฟอร์รักษาสภาพเนื้อเยื่อ (washing buffer)

วิธีเตรียม

บัฟเฟอร์โซเดียมคาโคดีเลท	5	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	9.40	มิลลิลิตร

4. ขั้นตอนเตรียมเนื้อเยื่อ

ตารางผนวกที่ 6 การแทนที่น้ำ (dehydration)

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	เอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ I	5
2	เอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ II	5
3	เอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ III	5
4	เอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ I	5
5	เอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ II	5
6	เอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ III	5
7	เอทานอลความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ I	5
8	เอทานอลความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ II	5
9	เอทานอลความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ III	5
10	เอทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ I	15
11	เอทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ II	15

ตารางผนวกที่ 7 การใช้สารแทรกในเนื้อเยื่อ (infiltration)

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	โปรไพลีนออกไซด์ ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์	15
2	โปรไพลีนออกไซด์ ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์	15
3	โปรไพลีนออกไซด์ ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ต่อ อีป็อกซีเรซิน เท่ากับ 1:1 โดยปริมาตร	1 – 2 (ชั่วโมง)
4	อีป็อกซีเรซินบริสุทธิ์	3 (ชั่วโมง)

หมายเหตุ : การเตรียมตัวอย่างทุกขั้นตอน จำเป็นต้องใช้เครื่องหมุน (rotor) ทุกขั้นตอน เพื่อให้สารเคมีต่าง ๆ ไหลซึมสู่เนื้อเยื่อสม่ำเสมอ

5. การย้อมสียูรานิล อะซิเตรท ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (5 percent uranyl acetate)

วิธีเตรียม

ยูรานิล อะซิเตรท	5	กรัม
เมทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้ง 2 อย่างเก็บใส่ขวดสีชา แล้วหุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียม เก็บไว้ในตู้เย็น ก่อนใช้ต้องนำมาปั่นและกรองก่อน

หมายเหตุ : สารยูรานิล อะซิเตรท จะไวต่อแสงมาก ไม่ควรเก็บในบริเวณที่มีแสงมากเกินไป

การย้อมสี

ขณะย้อมเนื้อเยื่อ ควรเอากล่องทึบแสงมาปิดเนื้อเยื่อด้วย ใช้เวลาย้อม 15 – 30 นาที

6. การย้อมสีเลดซิเตรท (lead citrate)

ผสมเลดซิเตรทกับโซเดียมซิเตรท (sodium citrate)

วิธีเตรียม

เตรียมสารละลาย A, B แยกกันแล้วจึงนำผสมกันทีหลัง

สารละลาย A (solution A)	ไนเตรท	1.33	กรัม
	น้ำกลั่น	15	มิลลิลิตร
สารละลาย B (solution B)	ซิเตรท	1.70	มิลลิลิตร
	น้ำกลั่น	15	มิลลิลิตร

6.1 นำสารละลาย A และ B เขย่าละลายจนหมด สารละลายมีลักษณะใส

6.2 เทสารละลาย A ลงไปยังสารละลาย B อย่างช้า หรือใช้ไปเปตดูดสารใส่ลงไป

6.3 ลักษณะสารละลาย A และ B มีลักษณะขาวขุ่น ให้ทำการเขย่าอย่างแรกอีก 5 นาที

6.4 เติมสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 M. ลงในสารละลาย A, B เป็นเวลา 4 หรือ 8 นาที (ตามต้องการ) จะเห็นสารละลายค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีขาวขุ่นจนใส

6.5 เติมน้ำให้ครบตามจำนวนที่ต้องการ คือ 1 – 25 หรือ 2 – 50 มิลลิลิตร

6.6 ทำการกรองสารที่ได้ใส่ขวดแก้วใส

หมายเหตุ : เลคซิเตรท ที่ยังใช้ได้ดีควรใสไม่มีตะกอน ควรปั่นและกรองสารก่อนใช้ทุกครั้ง

7. สารอีป๊อกซีเรซิน (epoxy resin)

วิธีเตรียม

เตรียมสารผสม A, B แยกกัน แล้วค่อยผสมกันทีหลัง

สารผสม A (stock mixture A) = epon – 812
DDSA

สารผสม B (stock mixture B) = epon – 812
NMA