

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง หอยแครงขนาด 3-4 เซนติเมตร
2. เครื่องมือผ่าตัด
3. แผ่นสไลด์ และ กระจกปิดสไลด์ (Slide and Cover Glass)
4. ภาชนะใส่หอยแครง
5. เครื่องปั๊มออกซิเจน
6. โหลแก้ว
7. หลอดหยด
8. เข็มฉีดยา
9. คีมคีบ
10. กระบอกใส่สารเคมี
11. เครื่องอุ่นสไลด์ (Slide Warmer)
12. กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ (Light Microscope)
13. Rotary Microtome
14. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Transmission Electron Microscope)
15. Ultramicrotome
16. pH Meter
17. เทอร์โมมิเตอร์
18. Hand Refractometer
19. ตู้อบ (Oven)

สารเคมี

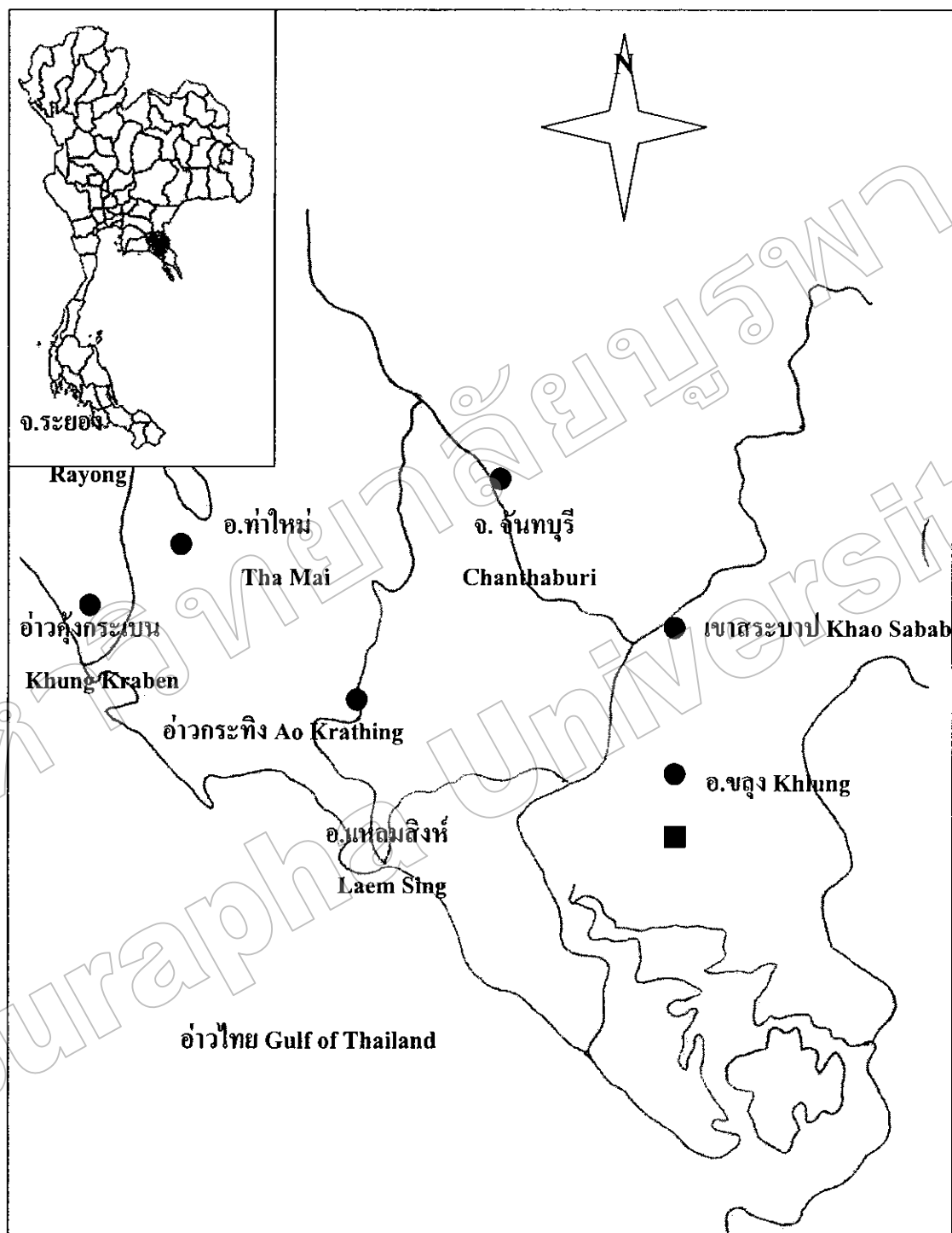
1. น้ำกลั่น
2. แอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol)
3. Paraffin (Paraplast)
4. Egg Albumin
5. Xylene

6. Mounting Medium (Permount)
7. สีย้อม Hematoxylin
8. สีย้อม Eosin Y
9. Glutaraldehyde
10. Osmium tetroxide
11. Phosphotungstic
12. Uranyl Acetate
13. Lead Citrate
14. Propylene Oxide
15. Araldite 502 Resin

วิธีดำเนินงาน

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างหอยแครงที่ยังมีชีวิตอยู่ ณ แหล่งเลี้ยงหอยแครง บริเวณทะเลตะวันออกไทย อำเภอลำลูกขัน จังหวัดจันทบุรี นำมาใส่โหลแก้วที่มีน้ำทะเลบรรจุอยู่ วัดค่าความเค็มในโหลแก้วให้มีค่าใกล้เคียงกับบริเวณที่นำหอยแครงมา แล้วเปิดป้อนออกซิเจน เพื่อเป็นการเลี้ยงหอยแครงจนกว่าจะทำการผ่าตัด โดยเริ่มทำการสำรวจและศึกษาตัวอย่างตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2548 ถึง เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2549 เป็นระยะเวลา 13 เดือน ทำการสำรวจเดือนละ 1 ครั้ง ๆ ละ 15 ตัว เก็บตัวอย่างน้ำทะเลทุกเดือน เพื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และความเค็ม ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง โปรทัวคิออน และเครื่องวัดความเค็ม ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แผนที่บริเวณทะเลตะวันออกไทย อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ที่ทำการสำรวจโปรโตซัว
ปรสิต *Nematopsis* ในหอยแครง ■ แหล่งบริเวณที่ทำการสำรวจ

การศึกษาพื้นฐานวิทยา และค่าความชุก (Prevalence)

ทำการผ่าตัดหอยแครงโดยใช้เข็มเข็ม และคีมคีบจับเปลือกหอยออก หลังจากนั้นใช้กรรไกรตัดเปลือกหอยด้านซ้ายบริเวณกึ่งกลางของเหงือก (หันด้าน Umbo ขึ้นด้านบน) ขนาดประมาณ 16 ตารางมิลลิเมตร ใช้คีมคีบหนีบดึงเอาส่วนของเหงือกออกมา (ระวังอย่าให้ขาด) วางบนไสลด์ แล้วใช้หลอดหยด หยดน้ำทะเลประมาณ 1-2 หยด ที่เหงือก ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (Cover Glass) ที่เตรียมไว้ ใช้แรงกดทับเล็กน้อย นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่ำ (4X) เพื่อสำรวจหาปรสิต เมื่อพบปรสิตให้ใช้กำลังขยายที่สูงขึ้น (10X หรือ 40X) เพื่อดูสัณฐานวิทยาของ *Nematopsis* พร้อมบันทึกภาพ และบันทึกค่าร้อยละความชุก

การวินิจฉัย

ตรวจหาโปรโตซัวปรสิตเพื่อดูลักษณะสัณฐานวิทยา หาค่าความชุก ใน 13 เดือน และทำการวัดขนาดของ Oocyst พร้อมทั้งบันทึกภาพไว้เป็นหลักฐาน นำผลการศึกษาที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการศึกษา เขียนรายงานผลการศึกษา

$$\text{ร้อยละความชุก (\%)} = \frac{\text{จำนวนหอยที่ถูก Infected (ตัว)} \times 100}{\text{จำนวนหอยทั้งหมด (ตัว)}}$$

การตรวจหาค่าความหนาแน่น (Intensity of Infection) ของ *Nematopsis*

นำกระจกปิดสไลด์ ชั่งน้ำหนัก แล้วบันทึกค่าของน้ำหนักที่ได้ เช่นเดียวกับข้อ 1 นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่ำ (4X) เพื่อสำรวจหาปรสิต เมื่อพบปรสิตให้ใช้กำลังขยายที่สูงขึ้น (10X หรือ 40X) เพื่อนับจำนวน Oocyst บันทึกผลจำนวน Oocyst ในแต่ละครั้ง ดึงเอากระจกปิดสไลด์ออก พร้อมชุดเอาส่วนของเนื้อเยื่อของเหงือกหอยติดออกมาให้อยู่บนกระจกปิดสไลด์ทั้งหมด นำกระจกปิดสไลด์ที่ได้ ไปอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของเหงือกหอย โดยนำน้ำหนักที่ได้ทั้งหมด นำมาลบด้วยน้ำหนักของกระจกปิดสไลด์ที่เราได้บันทึกค่าไว้ครั้งแรก

การวินิจฉัย

ตรวจนับจำนวน Oocyst โดยการคำนวณเทียบกับน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อเหงือกหอย ต่อ 1 หน่วยมิลลิกรัม

$$\text{ค่าความหนาแน่น} = \frac{\text{ปริมาณ Oocyst ที่พบในเหงือกหอย} \times 0.001}{\text{น้ำหนักแห้งของเหงือกหอย}}$$

เนื้อเยื่อวิทยาของเหงือกหอยแครงที่ติดเชื้อ *Nematopsis*

ตัดเนื้อเยื่อเหงือกหอยแครงที่ติดเชื้อ *Nematopsis* นำไปรีดิวซ์ปริสติดีผ่านการคงสภาพใน Bouin's Fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และล้างด้วย 70% แอลกอฮอล์จนกระทั่งไม่มีสี ทำการ Dehydration โดยเพิ่มความเข้มข้นของ Ethyl Alcohol ให้มากขึ้นจาก 70% 80% 90% 95% และ 100% (3 ครั้ง) ครั้งละ 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการ Clearing ใน Xylene และสารผสมระหว่าง Xylene กับ Paraffin อัตราส่วน 1:2, 1:1 และ 2:1 ครั้งละ 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน Pure Paraffin 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 58 °C แล้วนำไปฝังเนื้อเยื่อ (Embedding) ลงใน Pure Paraffin แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C หลังจากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่อง Rotary Microtome หนา 4-6 µm นำเนื้อเยื่อที่ตัดไปยึดและยึดกับแผ่นสไลด์ โดยหยดสารละลาย Egg Albumin ลงบนสไลด์แล้วลอย Section ลงบนสารละลาย จากนั้นนำสไลด์ไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ ที่อุณหภูมิ 48°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนการย้อมสี Harris's Hematoxylin และ Eosin ดังนี้

ละลาย Paraffin ออกจากสไลด์ด้วย Xylene 2 ครั้ง ๆ 3 นาที หลังจากนั้น Rehydration เนื้อเยื่อโดยลดความเข้มข้นของ Ethyl Alcohol จาก 100% (2 ครั้ง) 90% 70% ครั้งละ 3 นาที แล้วแช่สไลด์ในน้ำกลั่น ย้อมเนื้อเยื่อด้วย Harris's Hematoxylin 5 นาที แล้วล้างในน้ำประปา 15 นาที จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเนื้อเยื่อติดสีเข้มเกินไปแช่ใน 1% Acid Alcohol แต่ถ้าน้ำสีจางเกินไปให้แช่ในสีต่อจนกว่าเนื้อเยื่อจะติดสีเข้ม จากนั้น Counterstain ด้วย Eosin 2 นาที แล้วจุ่มใน 95% Ethyl Alcohol 1-2 ครั้ง เพื่อล้างสีส่วนเกินออก และดึงน้ำออกด้วย Absolute Ethyl Alcohol 100% 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที จากนั้น Clear ด้วย Xylene (2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที) นำสไลด์ที่ได้ไปทำสไลด์ถาวร (Howard & Smith, 2004)

การวินิจฉัย

ศึกษาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเปรียบเทียบเนื้อเยื่อของเหงือกหอยแครงที่ติดเชื้อ *Nematopsis* และไม่ติดเชื้อโดย *Nematopsis* โดยทำการวัดขนาด คุณภาพเนื้อเยื่อ พร้อมทั้งบันทึกภาพไว้เป็นหลักฐาน ตลอดจนศึกษาโครงสร้างและสัณฐานวิทยาของ *Nematopsis* ที่พบในเหงือกของหอยแครงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายขนาดต่าง ๆ นำผลการศึกษาที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการศึกษา เขียนรายงานผลการศึกษา

โครงสร้างละเอียดของ *Nematopsis* ที่ระบาดในหอยแครง

ตัดเนื้อเยื่อเหงือกหอยแครงที่ติดเชื้อ *Nematopsis* นำไปรีดิวซ์ปริสติดีผ่านการคงสภาพในสูตรของน้ำยาคงสภาพ Karnovsky 0.1 M PBS pH 7.8 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที และคงสภาพด้วย 1% Osmium Tetroxide

ใน 0.1 M PBS pH 7.8 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที นำโปรโตซัวปรสิตที่ได้มาขจัดน้ำออกโดยแช่ใน ethyl alcohol 70% 80% 90% 95% (2 ครั้ง) และ 100% (3 ครั้ง) เวลาในการแช่จะแช่ครั้งละ 12 ชั่วโมง ทำการ Clearing โดยนำชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อแช่ใน Propylene Oxide (PO) ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ๆ ละ 6 ชั่วโมง และ Infiltrate ด้วย PO: Araldite 502 ที่อุณหภูมิห้อง ในอัตราส่วน 2: 1 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 1: 2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้นฝังเนื้อเยื่อหอยลงใน Araldite 502 บริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง ฝังเนื้อเยื่อลงใน Flat Mold เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปอบเพื่อให้เกิด Polymerized ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 65°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำ Block Plastic มาตัดด้วยเครื่อง Ultramicrotome (Leica Ultracut R) นำส่วน Semithin มาย้อมสี Methylene Blue เพื่อดูลักษณะบริเวณที่มีปรสิต จากนั้นตัดแต่งอย่างละเอียด (Fine Trimming) นำส่วน Ultrathin Section ที่ตัดแล้วซึ่งมีความหนา 0.06-0.07 ไมโครเมตร นำมาติดบน Copper Grid ขนาด 200 Mesh ฝังให้แห้ง หลังจากนั้นย้อมด้วยสี Saturated Uranyl Acetate ใน Absolute Ethyl Alcohol 70% และ Lead Citrate ตามลำดับ อย่างละ 30 นาที แล้วนำไปศึกษาและถ่ายภาพลักษณะภายในของ Oocyst ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TECNAI G², Phillip) ที่ 75 kV

การวินิจฉัย

ศึกษาสัณฐานวิทยาของปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยทำการวัดขนาดของ Oocyst ความหนาของผนัง Oocyst ดูสภาพเนื้อเยื่อ พร้อมทั้งบันทึกภาพไว้เป็นหลักฐาน นำผลการศึกษาที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการศึกษาเขียนรายงานผลการศึกษา