

บทที่ 4

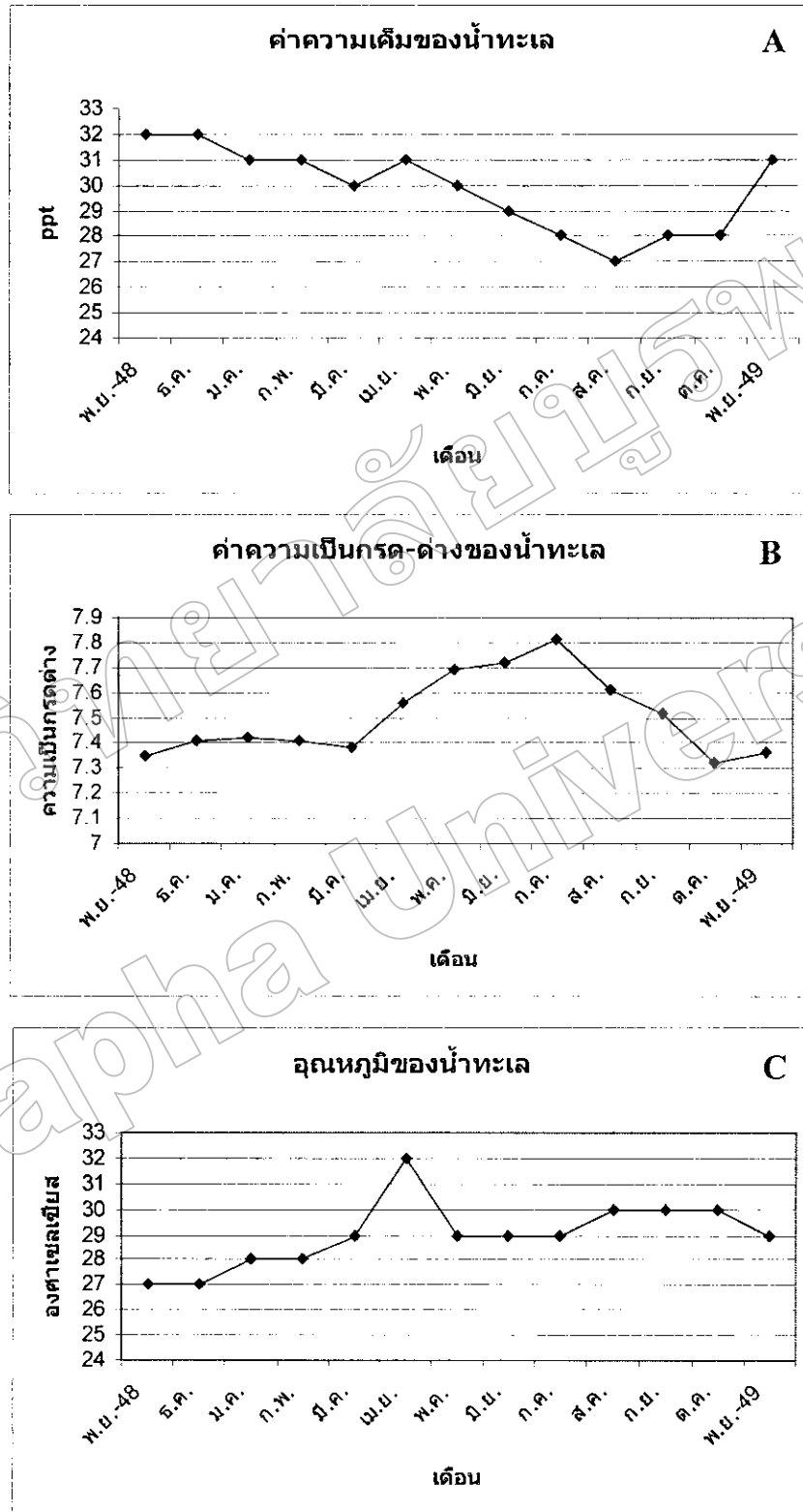
ผลการวิจัย

การศึกษาถิ่นฐานวิทยาและค่าความชุกของ *Nematopsis*

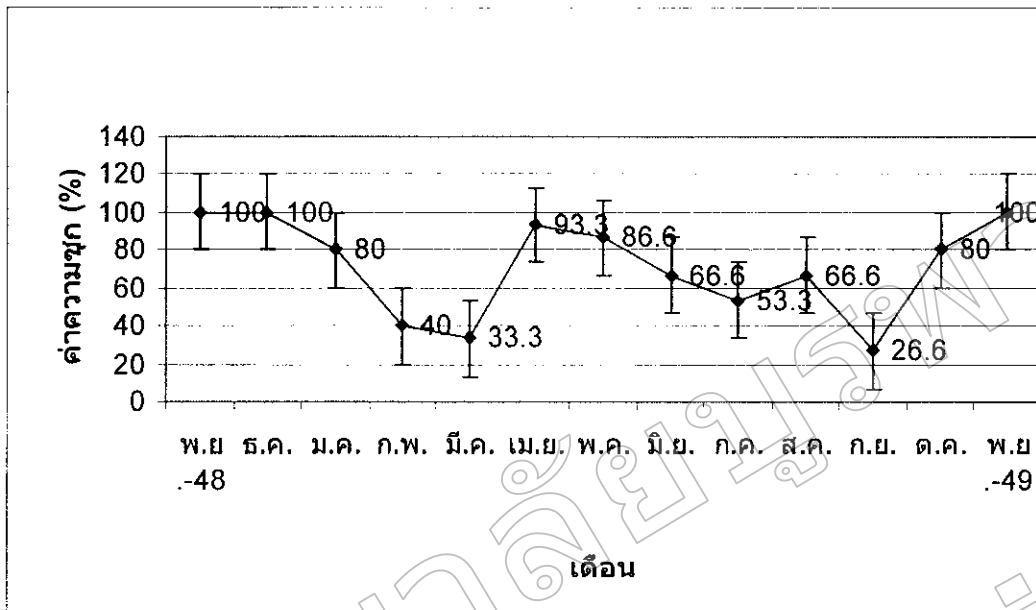
ผลการสำรวจ *Nematopsis* ในเหงือกของหอยแครง ที่ได้จากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของอ่าวไทย ณ แหล่งเลี้ยงอำเภอลง จังหวัดจันทบุรี จำนวน 195 ตัว ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2548 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2549 ผลการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลทุกเดือน เพื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และความเค็ม พบว่าอุณหภูมิ 27.00°C - 32.00°C (Average = $29.00 \pm 1.35^{\circ}\text{C}$), ค่าความเค็ม 27 ppt-32 ppt (Average = 29.84 ± 1.67 ppt) และค่าความเป็นกรดด่าง 7.32-7.81 (Average = 7.50 ± 0.16) (ภาพที่ 7) ในตารางที่ 1 พบว่ามีความชุกของ *Nematopsis* ทั้งหมด 139 ตัว คิดเป็นร้อยละ 71.28 และตรวจพบปรสิตทุกเดือน โดยพบว่าในเดือนพฤศจิกายน และเดือนธันวาคม มีความชุกมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 100 และในเดือนกันยายน มีความชุกน้อยที่สุด คิดเป็นร้อยละ 26.67 (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละค่าความชุกของ *Nematopsis* ในรอบปี

เดือน/ปี	ค่าความชุกในเหงือกของหอยแครง		
	จำนวนหอยที่ตรวจ (ตัว)	พบปรสิต (ตัว)	ค่าความชุก (%)
พฤศจิกายน/ 2548	15	15	100
ธันวาคม/ 2548	15	15	100
มกราคม/ 2549	15	12	80
กุมภาพันธ์/ 2549	15	6	40
มีนาคม/ 2549	15	5	33.33
เมษายน/ 2549	15	14	93.33
พฤษภาคม/ 2549	15	13	86.67
มิถุนายน/ 2549	15	10	66.67
กรกฎาคม/ 2549	15	8	53.33
สิงหาคม/ 2549	15	10	66.67
กันยายน/ 2549	15	4	26.67
ตุลาคม/ 2549	15	12	80
พฤศจิกายน/ 2549	15	15	100
รวม	195	139	71.28

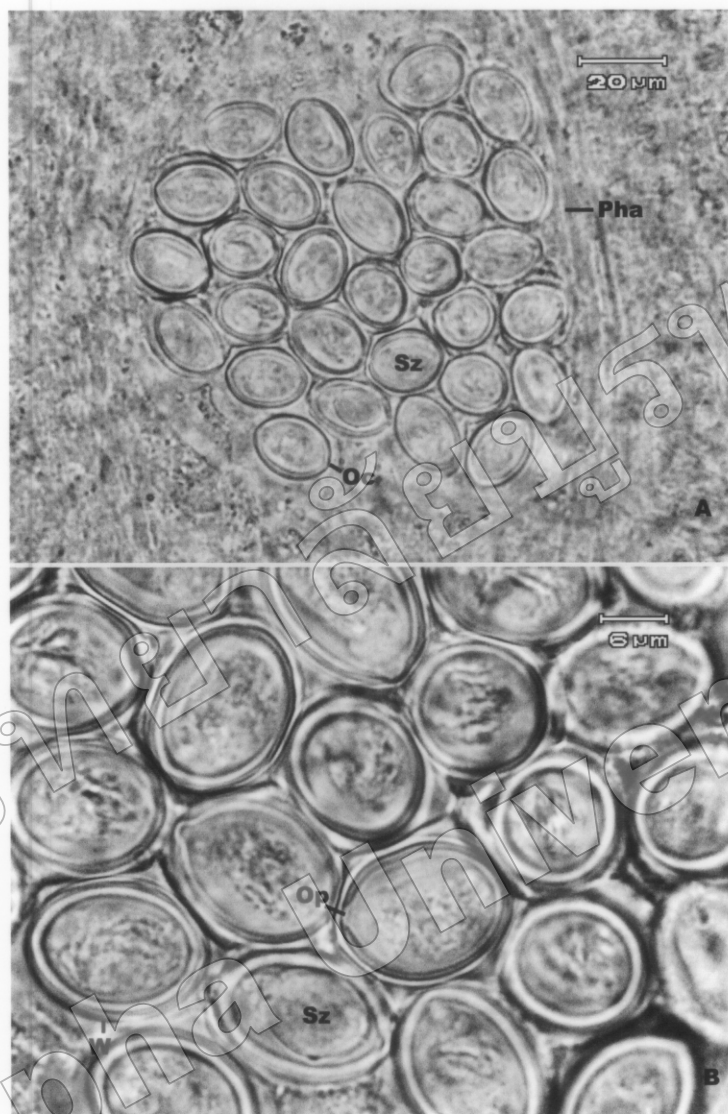


ภาพที่ 7 น้ำทะเลในแต่ละเดือน (A) ค่าความเค็ม, (B) ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ (C) อุณหภูมิ



ภาพที่ 8 แสดงร้อยละ ความชุกของ *Nematopsis* ในหอยแครง ในแต่ละเดือน

ผลการเก็บตัวอย่าง เมื่อดูร้อยละค่าความชุกของ *Nematopsis* ในหอยแครงที่พบได้ ในแต่ละเดือนนั้น มีค่าความชุกมากที่สุดในช่วงเดือนพฤศจิกายนและเดือนธันวาคม เดือนมกราคม ถึงเดือนมีนาคมลดต่ำลง เพิ่มขึ้นอีกในเดือนเมษายนถึงเดือนพฤษภาคม และลดต่ำลงตั้งแต่เดือน มิถุนายนถึงเดือนกันยายน และเพิ่มขึ้นอีกในเดือนธันวาคม

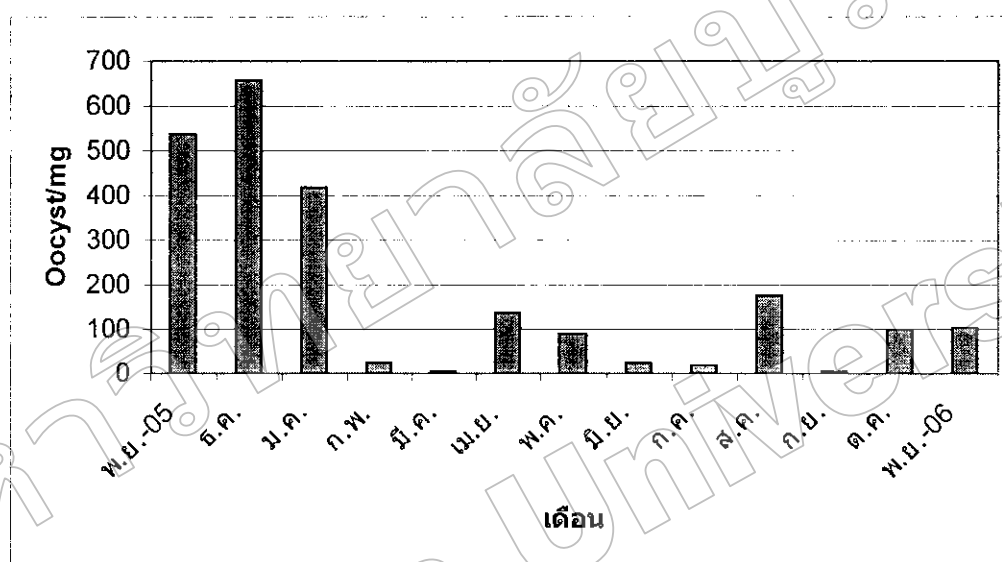


ภาพที่ 9 บริเวณของเหงือกหอยแครง แสดงให้เห็น Phagocytes (Pha) ภายในบรรจุ Oocysts (Oc) มีลักษณะกลม รี คล้ายไข่ ภายในบรรจุตัวอ่อนระยะ Sporozoite (Sz) และลักษณะของ Operculum (Op)

การตรวจหาค่าความหนาแน่น (Intensity of Infection) ของ *Nematopsis*

ผลการตรวจหาค่าความหนาแน่น (Intensity of Infection) ของ *Nematopsis* ในเหงือกของหอยแครงที่ได้จากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของอ่าวไทย ณ แหล่งเลี้ยงอำเภอลง จังหวัดจันทบุรี จำนวน 195 ตัว ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2548 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2549 พบว่ามีค่าความหนาแน่นของ *Nematopsis* ของเนื้อเยื่อเหงือกโดยนำมาคิดเป็น Oocyst ต่อมิลลิกรัม ตรวจพบปรสิตได้ในทุกเดือน ปริมาณความหนาแน่นของ *Nematopsis* ในเดือนพฤศจิกายน เดือนธันวาคม

และเดือนมกราคมนี้อยู่ในระดับที่สูง ต่อมาในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงมีนาคม ปริมาณความหนาแน่นลดลงมาก และเพิ่มขึ้นในเดือนเมษายน จากนั้นในเดือนมิถุนายน เดือนกรกฎาคมลดลง และเพิ่มขึ้นเดือนสิงหาคม จากนั้นในเดือนกันยายนลดลง และเพิ่มขึ้นอีกในเดือนพฤศจิกายน โดยพบว่าในเดือนธันวาคมมีความหนาแน่นของ *Nematopsis* มากที่สุด คิดเป็น 655 มิลลิกรัมบนเหงือกแห้ง และในเดือนกันยายน มีความหนาแน่นน้อยที่สุด คิดเป็น 6 มิลลิกรัมบนเหงือกแห้ง ในระยะเวลา 13 เดือน (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 แผนภูมิแสดงค่าความหนาแน่น (Intensity of Infection) ของ *Nematopsis* ในเหงือกของหอยแครงค่อน้ำหนักแห้งของเหงือกเป็นมิลลิกรัม

การศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาและโครงสร้างละเอียดของเหงือกหอยแครงที่ติดเชื้อ *Nematopsis*

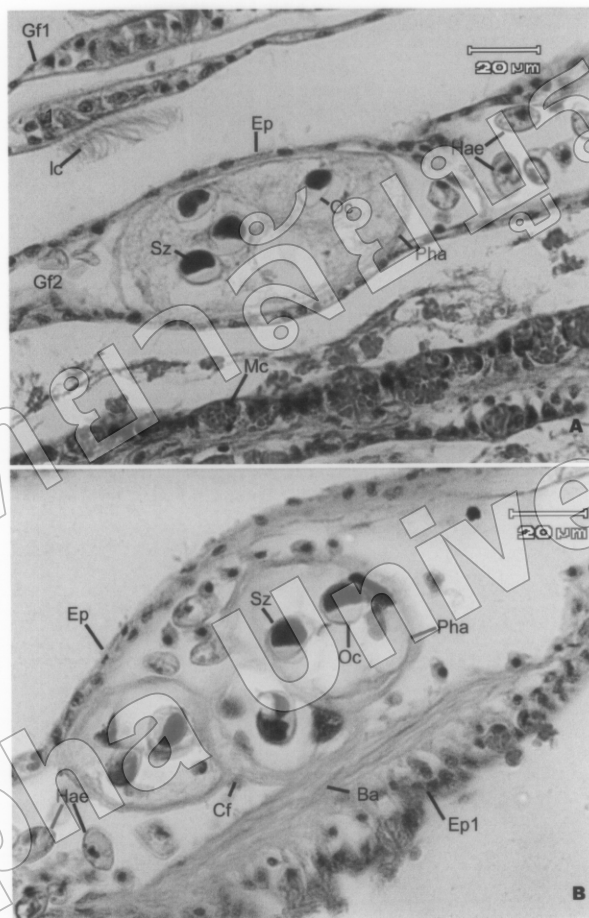
การศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยาจากการทำภาคตัดเนื้อเยื่อของเหงือกหอยแครง *Anadara granosa* โดยผ่านการเตรียมเนื้อเยื่อด้วย Paraffin Section Technique และย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin และศึกษาโครงสร้างละเอียดของ *Nematopsis* ที่ระบอบในหอยแครง โดยการตัด Ultrathin Section จากนั้นทำการย้อมสีด้วย Uranyl Acetate และ Lead Citrate แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) โดยตำแหน่งที่ศึกษา *Nematopsis* อาศัยอยู่บริเวณเยื่อผิวของเหงือกจะมีรูปร่าง 2 แบบ คือ แบบ Simple Cuboidal Epithelium มีลักษณะเซลล์เป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมลูกบาศก์เรียงตัวติดกันแน่นเป็นชั้นเดียว มีนิวเคลียสกลมอยู่ตรงกลางเซลล์ และแบบ Simple Columnar Epithelium มีลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่งทรงกระบอกสูง เรียงตัวติดกันแน่นเป็น

ชั้นเดียว เซลล์แต่ละเซลล์ที่ประกอบเป็นเนื้อเยื่อผิวหนังมีนิวเคลียสรูปรี หรือไข่ (Ovoid-Shaped Nucleus) และมี Basement Membrane มีลักษณะเป็นแผ่นที่ประกอบขึ้นด้วยสารพื้นที่มีลักษณะคล้ายวุ้น (Gel-Like) ทำหน้าที่ยึดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ด้านล่าง จากการศึกษาค้นพบว่า *Nematopsis* ในระยะ Oocyst นั้นพบได้ 2 ลักษณะ คือ

ลักษณะแรกเป็น Oocyst ลักษณะปกติที่สามารถพบได้ในส่วนบริเวณซั้งเหงือกที่บุด้วย Simple Columnar Epithelium และ Simple Cuboidal Epithelium และ Haemolymph Sinus ที่อยู่ใน Basement Membrane ซึ่งบรรจุ Hemocytes จำนวนมาก Oocyst จะฝังตัวอยู่ตลอดแนวความยาวของซั้งเหงือก โดยจะพบอย่างหนาแน่นในส่วนบริเวณปลายสุดของซั้งเหงือก พบว่า คู่มือกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายปานกลาง Oocyst มีลักษณะกลม รี คล้ายไข่ มีเปลือกหนา และแข็ง มีขนาดความกว้าง $12.2-13.5 \mu\text{m}$ ($12.57 \pm 0.4 \mu\text{m}$) ($n=15$) และมีขนาดความยาว $16.4-17.5 \mu\text{m}$ ($16.81 \pm 0.28 \mu\text{m}$) ($n=15$) (ภาพที่ 11) และเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า Oocyst มีลักษณะกลมรี คล้ายไข่ มีขนาดความยาว $8.2-9 \mu\text{m}$ มีขนาดความกว้าง $7.5-8 \mu\text{m}$ ความหนาของผนัง Oocyst มีขนาด $1-1.2 \mu\text{m}$ ซึ่งมีขนาดความหนาไม่สม่ำเสมอทั้งหมดทั้งเปลือก แต่ละ Oocyst จะมีถุงหุ้มอีกชั้นหนึ่ง เรียกว่า Parasitophorous Vacuole และหลาย ๆ ถุง จะถูกหุ้มด้วย Phagocyte หรือ Phagocystic Sac ซึ่งเป็นส่วนที่หอยสร้างขึ้นมาเพื่อหุ้มปรสิตไว้ (ภาพที่ 13) มีหลายขนาดตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลาง $30 \mu\text{m}$ ไปจนถึง $120 \mu\text{m}$ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวน Oocyst ที่บรรจุอยู่ภายใน ซึ่งมีจำนวนไม่แน่นอน มีตั้งแต่ 1 ถึง 45 Oocyst นอกจากนี้ภายใน Phagocytic Wall ปกคลุมด้วย Collagen Fiber จำนวนมาก ที่สร้างมาจากเซลล์ Fibroblast ที่อยู่ด้านในของ Basement Membrane ของ Epithelial Cell และ Phagocystic Sac สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ Dense Zone ที่อยู่ติดกับ phagocystic wall มีลักษณะเป็นส่วนที่ Oocyst กัดหลังออกมา และส่วน Clear Zone ซึ่งอยู่รอบ ๆ Oocyst ภายใน Oocyst จะบรรจุตัวอ่อนของปรสิตในระยะ Sporozoite ซึ่งมีลักษณะเป็นทรงกระบอกคล้ายหนอน (ภาพที่ 15) ผนังของ Oocyst พบเส้นใย Microfibrils มีลักษณะเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ บริเวณใกล้กันจะเป็น Adherent Microfibrils ซึ่งยึดเกาะกับ Microfibril และทอดตัวกระจายตัวอยู่ภายใน Clear Zone และไปยึดเกาะกับ Protein Particle ที่อยู่ใน Dense Zone ของ Phagocytic Sac (ภาพที่ 16) ขนาดของ Operculum กว้าง $1.4-1.5 \mu\text{m}$ มีความหนา $0.5-0.6 \mu\text{m}$ และบริเวณฝาปิดของ Operculum จะไม่พบเส้นใย Microfibrils (ภาพที่ 17)

ลักษณะที่สองเป็นลักษณะ Oocyst ที่พบใน Epithelial Cell ซึ่งซั้งเหงือกที่บุด้วย Simple Columnar Epithelium และ Simple Cuboidal Epithelium มี Haemolymph Sinus ที่อยู่ใน Basement Membrane ซึ่งบรรจุ Hemocytes จำนวนมาก และ Oocyst มีลักษณะเป็น Clear Zone และ Sporozoite ของ *Nematopsis* ที่อยู่ใน Oocyst Wall มีการสะสมไขมัน และมี Nucleolus ขนาดใหญ่ ขนาดของ Oocyst มีขนาดเท่ากับ Oocyst ลักษณะแรก แต่ไม่มีถุง Phagocyte หุ้ม

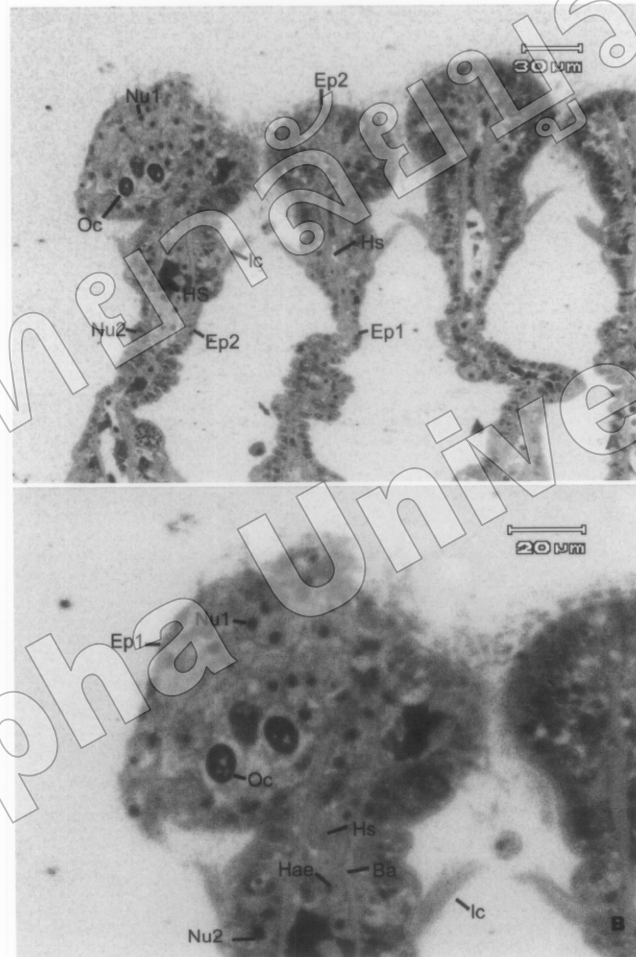
Nucleus ของ Epithelial Cells ที่อยู่โดยรอบของ Oocysts และอัดกันแน่นเมื่อเทียบกับ Nucleus ของ Epithelial Cells บริเวณอื่นๆ (ภาพที่ 12) ผิวด้านนอกของ Oocyst Wall ถูกปกคลุมด้วย Cytoplasm ของ Epithelial Cell บางๆ โดยไม่พบ Adherent Microfibrils และ Microfibril (ภาพที่ 14)



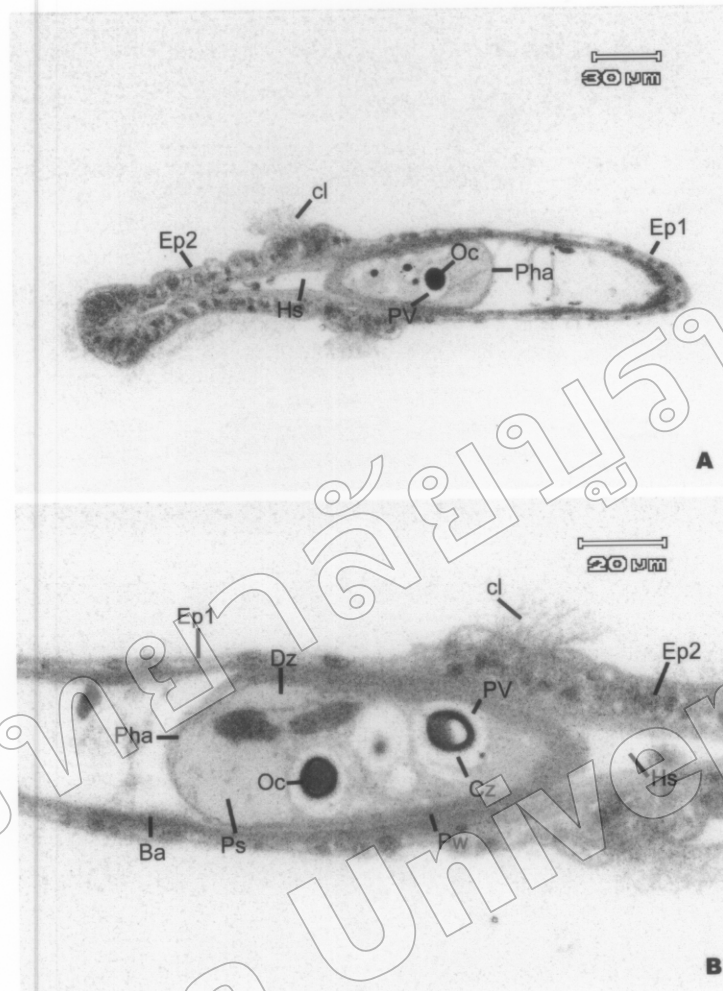
ภาพที่ 11 ภาพถ่าย Oocysts จากกล้องจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อเหงือกของหอยแครง (*Anadara granosa*) ที่ติดเชื้อ *Nematopsis* ซึ่งผ่านการเตรียมเนื้อเยื่อด้วย Paraffin Section Technique และย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin

A: แสดงซี่เหงือกหอยแครงปกติ (Gf1) ซึ่งบุด้วย Simple Cuboidal Epithelium และ Mucus Cells (Mc) และบางบริเวณบุด้วย Simple Columnar Epithelium ที่มีซีเลียยาว (Ic) ปกคลุมอยู่เป็นจำนวนมากด้านในของ Basement Membrane มี Haemolymph Sinus แคบ และซี่เหงือกที่ติดเชื้อ *Nematopsis* (Gf2) ที่บุด้วย Simple Cuboidal Epithelium (Ep1) ภายในซี่เหงือกมี Endolymph Sinus (Es) ขยายกว้าง ภายในบรรจุ Hemocyte (Hae) จำนวนมาก และถุง Phagocyte ที่มี Oocytes อยู่ภายใน Phagocytic Sac (Ps) และเซลล์เยื่อหุ้มจะบางไม่มีซีเลีย และมีเซลล์เม็ดเลือดของหอย

B: ภาพขยายของซีเหงือกบริเวณที่ติดเชื้อ *Nematopsis* แสดง Phagocyte (Pha) ที่อยู่ใน Haemolymph Sinus (Hs) ซึ่งผนังของ Phagocyte ประกอบด้วยเซลล์ Fibrocyte (Fc) และ Collagen Fiber (Cf) ภายใน Phagocytic Sac มีตัวอ่อนของระยะ Sporozoite (Sz) ของโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* ที่มี Oocystic Wall (Oc) ห่อหุ้มอยู่ภายนอกของซีเหงือกถูกปกคลุมด้วย Simple Cuboidal Epithelium และ Mucus Cells (Mc) และบางบริเวณบุด้วย Simple Columnar Epithelium (Ep2)



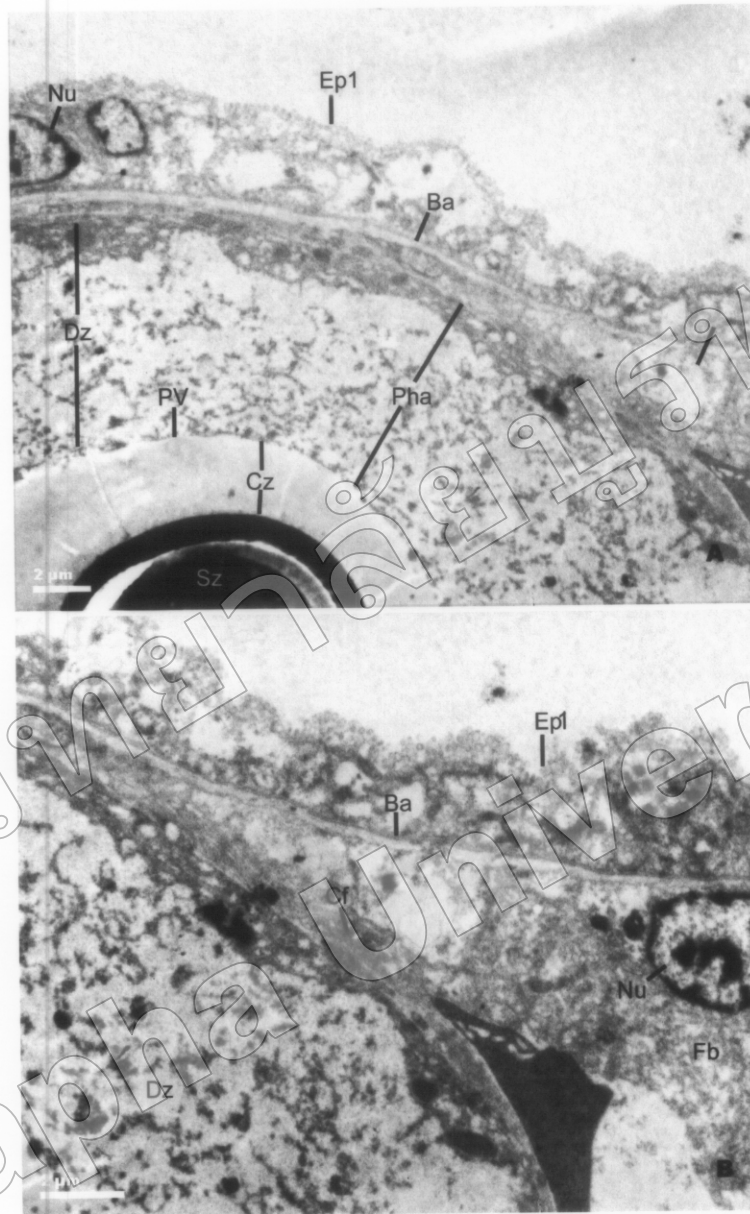
ภาพที่ 12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายปานกลาง (A) และสูง (B) ของเนื้อเยื่อเหงือกของหอยแครง (*Anadara granosa*) ที่ติดเชื้อ *Nematopsis* ซึ่งผ่านการเตรียมเนื้อเยื่อด้วย Semithin Section Technique และย้อมด้วย Methylene Blue แสดงซีเหงือกที่บุด้วย Simple Columnar Epithelium (Ep2) และ Simple Cuboidal Epithelium (Ep1) และ Haemolymph Sinus (Hs) ที่อยู่ภายใน Basement Membrane (Ba) ซึ่งบรรจุ Hemocytes (Hae) จำนวนมากอยู่ และ Oocysts (Oc) ของโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* ที่ฝังตัวอยู่ใน Epithelial Cell ซึ่ง Nucleus (Nu1) ของ Epithelial Cells ที่อยู่โดยรอบของ Oocytes และอัดกันแน่นเมื่อเทียบกับ Nucleus (Nu2) ของ Epithelial Cells บริเวณอื่น ๆ



ภาพที่ 13 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายปานกลาง (A) และสูง (B) ของเนื้อเยื่อเหงือกของหอยแครง (*Anadara granosa*) ที่ติดเชื้อโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* ซึ่งผ่านการเตรียมเนื้อเยื่อด้วย Semithin Section Technique และย้อมด้วย Methylene Blue แสดงซึ่งเหงือกที่บุด้วย Simple Columnar Epithelium (Ep2) และ Simple Cuboidal Epithelium (Ep1) และ Haemolymph Sinus ที่อยู่ภายใน Basement Membrane (Ba) ซึ่งบรรจุ Hemocytes (Hae) จำนวนมาก และถุง Phagocyte (Pha) ที่ห่อหุ้ม Oocyst ของโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* ไว้ภายใน Phagocystic Sac (Ps) นอกจากนี้ภายใน Phagocystic Sac สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ Dense Zone (Dz) ที่อยู่ติดกับ Phagocystic Wall (Pw) และ Clear Zone (Cz) ซึ่งอยู่รอบ ๆ Oocyst



ภาพที่ 14 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) กำล้างขยายต่ำ (A) และสูง (B) ของ Epithelial Cell ของเงือกหอยแครง แสดง Oocyst (Oc) ของโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* ที่ฝังตัวอยู่ใน Cytoplasm ของ Epithelial Cell และทำให้ Cytoplasm ของ Epithelial Cell ที่อยู่รอบ ๆ Oocyst มีลักษณะเป็น Clear Zone (Cz) และ Sporozoite (Sz) ของ *Nematopsis* ที่อยู่ภายใน Oocyst Wall (W) มีการสะสมไขมัน (Lp) ไว้ภายใน Cytoplasm และ Nucleus (Nu) มี Nucleolus (Nc) ขนาดใหญ่ เมื่อศึกษาด้วยกำล้างขยายที่สูงขึ้นพบว่าผิวหนังด้านนอกของ Oocyst Wall ถูกปกคลุมด้วย Cytoplasm ของ Epithelial Cell (Ep) บาง ๆ โดยไม่พบ Adherent Microfibrils และ Microfibril



ภาพที่ 15 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) กำลังขยายต่ำ (A) และสูง (B) ของเหงือกหอยแครงที่ติดเชื้อ *Nematopsis* แสดง ถุง Phagocyte (Pha) ที่อยู่ภายใน Haemolymph Sinus ซึ่ง Phagocytic Wall ปกคลุมด้วย Collagen Fiber (Cf) จำนวนมาก ที่สร้างมาจากเซลล์ Fibroblast (Fb) ที่อยู่ด้านในของ Basement Membrane (Ba) ของ Epithelial Cell (Ep1) ภายใน Phagocytic Sac สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ Dense Zone (Dz) ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มของ Protein Particle จำนวนมากกระจายตัวอยู่ชิดกับ Phagocytic Wall และ Clear Zone (Cz) ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่รอบ ๆ Oocyst (Oc) ของ *Nematopsis*



ภาพที่ 16 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (TEM) ของ Oocystic Wall (W) และ Clear Zone ของ Phagocytic Sac แสดง Microfibril (Mf) จำนวนมากที่ผิวด้านนอกของ Oocystic Wall และ Adherent Microfibrils (Am) ซึ่งยึดเกาะกับ Microfibril และทอดตัวกระจายตัวอยู่ใน Clear Zone และไปยึดเกาะกับ Protein Particle ที่อยู่ใน Dense Zone ของ Phagocytic Sac



ภาพที่ 17 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (TEM) ของ Oocystic Wall (W) แสดงลักษณะของ Operculum ซึ่งเป็นทางผ่านของตัวอ่อนระยะ Sporozoite (Sz) ออกจาก Oocyst บริเวณ Clear Zone ของผนังโดยรอบจะมี Microfibrils (Mf) ปกคลุมอยู่และ Adherent Microfibrils (Am) ชกเว้นบริเวณรูเปิด Operculum (Op)