บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์การทดลอง

1. สัตว์ทดลอง

1.1 ปลาช่อน, Ophiocephalus striatus (Bloch)

1.2 พยาธิหัวหนาม, Pallisentis sp.

1.3 ครัสเตเชียน (crustaceans) 3 กลุ่มคือ ไรน้ำ (order Cladocera:water flea) และ copepods (order Copepoda) ใน 2 suborder คือ Calanoida และ Cyclopoida

2. อาหารเลี้ยงสัตว์ทดลอง

2.1 ใบไม้น้ำและโคลน

2.2 เนื้อปลาและหรือเนื้อกบ, เชียด

3. เครื่องมือและอุปกรณ์ใช้ในการประกอบการศึกษา

3.1 กล้องจุลทรรศน์

3.1.1 กล้องจุลทรรศน์ 2 ตา แบบ B.H.A. (binocular compound microscope model B.H.A.) พร้อมอุปกรณ์วาดภาพ, อุปกรณ์ถ่ายภาพจากกล้อง

3.1.2 กล้องจุลทรรศน์ 2 ตา ธรรมดา (binocular compound microscops) พร้อม ocular micrometer และ stage micrometer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.3 กล้องผ่าตัด (dissecting microscope) พร้อม incident light

3.2 Triple beam balance

3.3 อุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่ กรรไกร, มีดผ่าตัด, ปากคีบ, เข็มเขี่ย

3.4 อุปกรณ์จับปลา ได้แก่ อวน, สวิง, ถังน้ำ, ตะข้อง

3.5 อุปกรณ์เลี้ยงปลา ได้แก่ aquarium ขนาดต่าง ๆ, airpump พร้อมสายยางนำอากาศ, ข้อต่อ 3 ทาง, และ หินถ่วง

3.6 อุปกรณ์ทำสไลด์ถาวร (permaneat slide) ได้แก่ กระจกสไลด์ (slide glass) กระจกปิด (cover slip), coupling jar, ขวดใส่แอลกอฮอล์เปอร์เซนต์ต่าง ๆ

3.7 อุปกรณ์จับและเลี้ยง ครัสเตเชี่ยน ได้แก่ planton net เส้นผ่าศูนย์กลางปาก 24 ซม. ขนาดรูตาข่าย 0.060-0.065 มม. petridish, syracuse dish, beaker

3.8 อุปกรณ์อัดขยายภาพ, กระดาษอัดภาพ, กล่องล้างฟิล์ม, ฟิล์ม

3.9 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น label paper, ดินสอ, สมุดบันทึก ยางรัดของ, ถุงพลาสติก, กระดาษชำระ, dropper ภู่กัน, สีเมจิก, disposable syrynge และ needles, polyethylene catheters ขวดใส่สารเคมี, ครก และ สาก, ไม้บรรทัด

4. สารเคมี

4.1 น้ำสะอาดจากบ่อน้ำธรรมชาติ

4.2 น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 ringer's solution

4.4 Bouin's fixative

4.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรได้แก่ ethyl alcohol 95% n-butyl alcohol, xylene, glycerol, acetic acid, methyl salicylate, permount

4.6 สีย้อมได้แก่ Delafield haematoxylene, Borax carmine, Eosin

4.7 น้ำยาล้างฟิล์ม และอัดภาพ (สูตรของ Kodak)

วิธีการวิจัย

ระหว่างเดือนพฤษภาคม-ธันวาคม 2524 ครัสเตเชียน (crustaceans) ได้แก่ ไรน้ำ (order Cladocera, water fleas) และ copepods (Subclass Copepoda) ใน 2 suborder คือ Calanoida และ Cyclopoida จับโดยใช้ plankton net จากคลองข้างถนนสายเชียงใหม่-ดอยสะเก็ด ระหว่าง กม.ที่ 7 และ 8 (ภาพที่ 2) แยกครัสเตเชียนและทำการตรวจครัสเตเชียนทุกตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อให้แน่ใจว่าปราศจากพยาธิ นำมาเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ส่วนผสมของใบไม้น้ำบดละเอียด ผสมกับโคลนละเอียด นำไปต้มให้เดือด 10-15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจึงจะนำไปให้ครัสเตเชียนกิน โดยใช้ dropper ดูดแล้วนำไปหยดใน syracuse dishes หรือ petridishes ที่มีครัสเตเชียนอยู่

ปลาช่อนซึ่งจับมาจากแหล่งต่าง ๆ ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2524-มกราคม 2525 ในจังหวัดเชียงใหม่ คือบริเวณคลองข้างถนนทางแยกเข้าตัวอำเภอดอยสะเก็ด กม.ที่ 13 ถนนสายเชียงใหม่-ดอยสะเก็ด (อำเภอสอยสะเก็ด) ในทุ่งนาตำบลป่าแดด หมู่ที่ 3 (อำเภอเมือง) และในคลองข้างถนนสายสันทราย-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แม่โจ้ บริเวณบ้านแม่ย่อย (อำเภอสันทราย) (ภาพที่ 2) นำมาผ่าเปิดช่องท้อง ตัดทางเดินอาหารทั้งหมด เช่นใน ringer's solution จากนั้นผ่าและเปิดลำไส้ตลอดตามยาว ตรวจหา Pallisentis sp. โดยใช้เข็มเขี่ยพยาธิออกมาล้าง และแช่ใน ringer's solution แยกตัวเมียที่มี mature shelled acanthors (gravid female) ออกมา และใช้เข็มฉีกลำตัว, shelled acanthors จะไหลออกมาจาก pseudocoelum จากนั้นดูด ringer's solution ออก และเติมน้ำจากบ่อธรรมชาติแทน ล้าง mature shelled acanthors เหล่านั้น 2-3 ครั้ง แต่ละครั้งตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที เพื่อให้ตกตะกอน เก็บ suspension นี้ไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาทำให้มีจำนวน mature shelled acanthors น้อยลง (ดูภาคผนวก ก) พบว่า โดยวิธีนี้ส่วนใหญ่ ครัสเตเซียน 1 ตัว จะมีตัวอ่อนพยาธิ infected 1 ตัว ทำให้ง่ายต่อการติดตามการเจริญ

แยก ครัสเตเซียน แต่ละชนิดใส่ใน syracuse dish ชนิดละ 2 dish, dish ละ 15 ตัว ป้องกันการกินกันเอง (canibalism) (Rojanapaibul, 1977) หยดส่วนผสมของอาหารและ mature shelled acanthors (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) ใส่ใน syracuse dish, dish และ 4 หยด เติมน้ำลงไปในแต่ละ dish ให้ได้ 2 ใน 3 ของ dish เพื่อให้แน่ใจว่า มีปริมาณน้ำเพียงพอ ตั้งการทดลองนี้ไว้ 1 คืน ในห้องทดลอง (อุณหภูมิ 23-30°C) โดยไม่รบกวน ในวันรุ่งขึ้นนำครัสเตเซียนทุกตัวมาตรวจ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูการ infections

จากการทดลองพบว่า Cyclops sp. ชนิดหนึ่ง ซึ่งยังไม่ทราบ species (ดูภาคผนวก ข) เป็น intermediate host ของ Pallisentis sp. ทำการ infect พยาธิให้กับ Cyclops sp. ตามวิธีข้างต้น หลังจากทิ้งไว้ 1 คืน ในวันรุ่งขึ้นเปลี่ยนน้ำในแต่ละ syracuse

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

dishes 3-4 ครั้ง โดยใช้น้ำจากบ่อธรรมชาติ เพื่อล้างเอา shelled acanthors ที่อาจติด Cyclops sp. ออกให้หมด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิด superimposed infections อันจะทำให้เกิดความยุ่งยากในการติดตามการเจริญขั้นต่อไปได้ เลี้ยง Cyclops sp. เหล่านั้นต่อไปในห้องทดลอง โดยเปลี่ยนน้ำและอาหารอาทิตย์ละ 2 ครั้ง เพื่อกำจัดของเสียจากการขับถ่าย

ตรวจ Cyclops sp. ที่ทำการทดลอง 5-10 นาที, 2 ชม. หลังจาก infections และในวันที่ 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15 หลังจาก infection แล้ว เริ่มค้นหาและติดตามการเจริญของตัวอ่อนของ Pallisentis sp. ใน haemocoel ของ Cyclops sp. ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสองตา ผ่าตัดเอาตัวอ่อนพยาธิออกมาจาก intermediate host ตัวอ่อนของพยาธิจะหลุดออกมาโดยง่าย เพราะไม่ได้ติดหรือเกาะกับเนื้อเยื่อของ host ทำให้พยาธิคงรูป (fixation) ย้อมสีทำสไลด์ถาวร (ดูภาคผนวก ค) วัดขนาด specimens จากสไลด์ ถ่ายรูป และวาดรูปโดยใช้ drawing tube, รายละเอียดบางอย่างวาดด้วยตาเปล่า

ปลาช่อน ซึ่งได้จากแหล่งต่าง ๆ 3 แหล่ง ดังกล่าวนั้นมีจำนวนน้อยไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ทำการทดลอง จึงต้องซื้อจากตลาดสด ทำการชั่งน้ำหนักและถ่ายพยาธิโดยใช้ Yomesan[1] 0.003gm. ต่อน้ำหนักปลา 100gm. โดยละลายยาในน้ำกลั่น และป้อนทางปาก โดยใช้หลอดและเข็มฉีดยาที่มี polyethylene catheter ที่ยาวประมาณ 3 นิ้ว ติดอยู่ตรงปลาย สอดเข้าไปทางปาก ให้ลึกเลยระดับ gill เข้าไปในลำคอ พร้อมกับฉีดยาเข้าไปตามปริมาณที่ต้องการ, ให้ยา 2 ครั้ง ในปริมาณเท่ากัน ห่างกัน 2 วัน

---

1 ชื่อทางการค้า, มีชื่อทางเคมีเป็น N-(2'-chloro-4'-nitrophenyl)-5-nitrophenyl)-5-chloro salicylamide

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และเลี้ยงปลาไว้ในห้องปฏิบัติการ

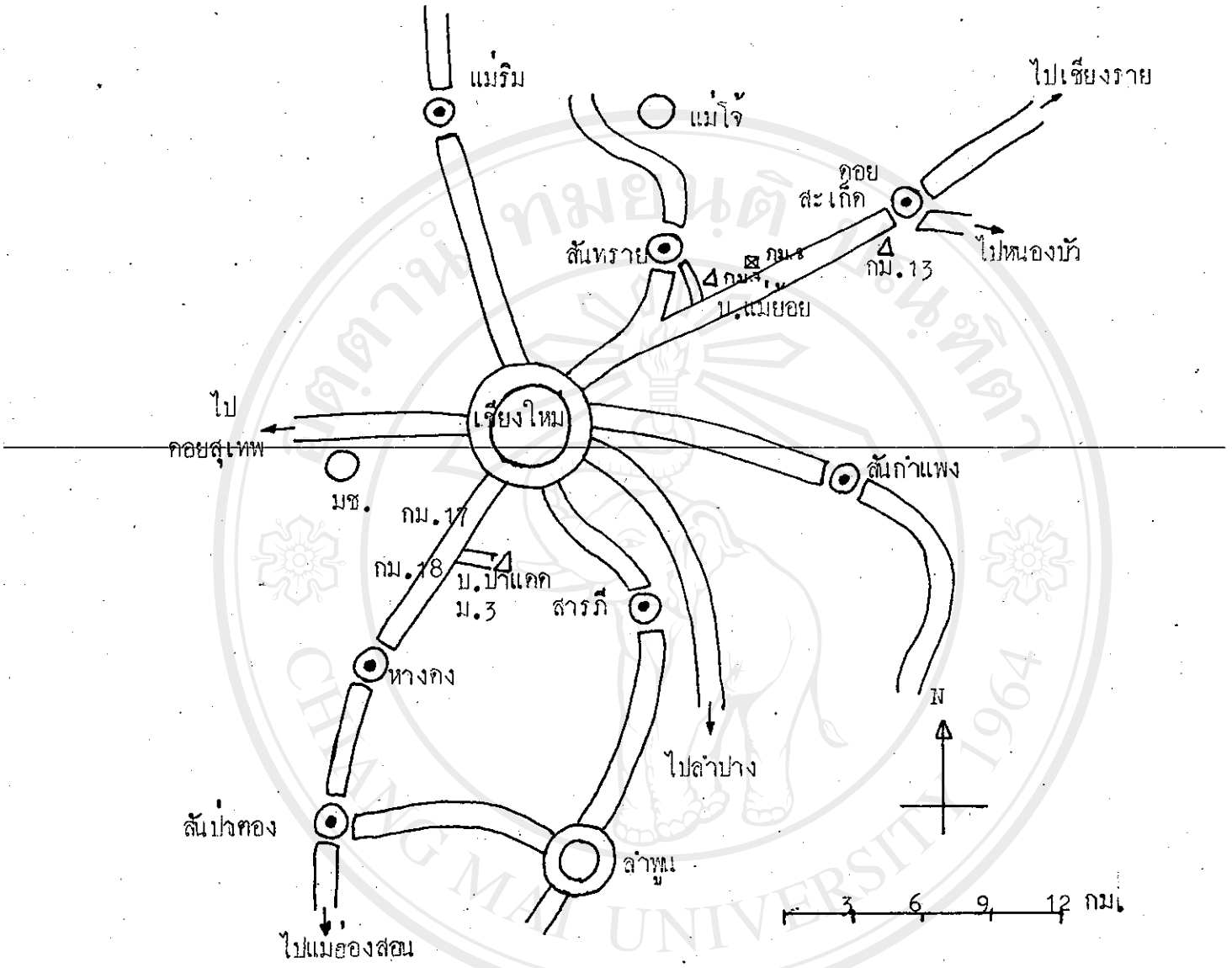
เมื่อพบว่ามี cystacanth ใน intermediate hosts ซึ่งแสดงว่าตัวอ่อนของ Pallisentis sp. เจริญถึงระยะ infective stage นำ infected intermediate hosts ทั้งตัวไปป้อน (force fed) ให้กับปลาช่อน ซึ่งถ่ายพยาธิเรียบร้อยแล้ว โดยใช้ปากคีบและ spatula บังคับเปิดปากปลา พร้อมกับสอดปลาย dropper ซึ่งมี infected Cyclops sp. เข้าไปในปากปลาให้ลึกพอประมาณ (เลยบริเวณเหงือกของปลาเข้าไป) เพื่อให้แน่ใจว่าสิ่งที่ป้อนเข้าไปนั้น เข้าไปในกระเพาะหมด เลี้ยงปลาเหล่านี้ไว้ในห้องทดลอง

ติดตามการเจริญโดยการผ่าลำไส้ปลา ใช้ spatula ขูดผิวลำไส้ด้านใน ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 9 อาทิตย์

นำ Pallisentis sp. ที่ตรวจพบมาทำ permanent slides ตามวิธีเดียวกับการทำ permanent slides ของตัวอ่อนของพยาธิ การวัดขนาดและบรรยายลักษณะกระทำภายหลังจากทำ permanent slides เสร็จเรียบร้อยแล้ว.

อนึ่ง ในการวัดขนาดตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ได้ใช้จำนวน 1-6 ตัว ขึ้นอยู่กับว่าพบตัวอ่อนพยาธิมากน้อยเท่าไร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 แผนที่แสดงเส้นทาง., แหล่งจับปลา, และครัสเตเซียน

◎ - จังหวัด

⊙ - อำเภอ

Δ - ที่จับปลา

// - ถนน

⊠ - ที่จับครัสเตเซียน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved