



ค่าความชุกและการตรวจสอบพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ในปลาทอง
(*Carassius auratus*) ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

PREVALENCE AND DETECTION OF MONOGENEANS IN THE GENERA
DACTYLOGYRUS AND *GYRODACTYLUS* IN GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS*)
USING MOLECULAR BASED METHOD

ฉัตรพัฒน์ โคตะมะ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ค่าความชุกและการตรวจสอบพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ในปลา
ทอง (*Carassius auratus*) ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

PREVALENCE AND DETECTION OF MONOGENEANS IN THE GENERA
DACTYLOGYRUS AND *GYRODACTYLUS* IN GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS*)
USING MOLECULAR BASED METHOD



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF EDUCATION
(Biology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ค่าความชุกและการตรวจสอบพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ในปลาทอง
(*Carassius auratus*) ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

ของ

ณิชาพัฒน์ โคตะมะ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพนา ชลธนานารถ) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ พุทธิชาติ)

..... ที่ปรึกษารวม กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนวรรณ เตชะงูร) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล)

ชื่อเรื่อง	ค่าความชุกและการตรวจสอบพยาธิปลิงใส สกุล <i>Dactylogyrus</i> และ <i>Gyrodactylus</i> ในปลาทอง (<i>Carassius auratus</i>) ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา
ผู้วิจัย	ณิชาพัฒน์ โคตะมะ
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพนา ชลธนานารถ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนวรรณ เตชะกฤษ

การศึกษาค่าความชุกของพยาธิปลิงใส จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาทอง (*Carassius auratus*) จังหวัดราชบุรี รวมทั้งสิ้น 300 ตัวอย่าง สำหรับใช้เป็นแนวทางในการควบคุมโรคและการรักษามาตรฐานของฟาร์มปลา พบพยาธิปลิงใสทั้งหมด 2 สกุล จำแนกเป็น 6 ชนิด ได้แก่ *Dactylogyrus anchoratus*, *D. formosus*, *D. intermedius*, *D. vastator*, *Gyrodactylus gurleyi* และ *G. kobayashii* โดยมีค่าความชุกของการติดพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*, *Gyrodactylus* และค่าความชุกของการติดพยาธิปลิงใสทั้งสองสกุล (co-infection) เท่ากับร้อยละ 37.67, 1.00 และ 9.67 ตามลำดับ ในด้านการพัฒนาวิธี multiplex PCR ในการตรวจหาพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ที่พบในปลาทอง โดยการออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ที่จำเพาะจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 พบว่า แสดงผลบวกและให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความจำเพาะขนาด 223 และ 117 คู่เบส ตามลำดับ ในการศึกษาความไว (sensitivity) ของวิธี multiplex PCR พบว่า สามารถตรวจพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ได้ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 1.7×10^{-2} ng/ul และ 1.1 ng/ul ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบการติดพยาธิปลิงใส จากตัวอย่างเมือกและเหงือกของปลาทองจากสภาพธรรมชาติ 20 ตัวอย่าง ด้วยวิธี multiplex PCR พบว่าสามารถตรวจพบการติดพยาธิปลิงใส ทั้ง 2 สกุลจำนวน 18 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 90 ดังนั้น การนำวิธี multiplex PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาพยาธิปลิงใสทั้ง 2 สกุลที่พบในปลาทอง เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง และรวดเร็ว

คำสำคัญ : ปลาทอง, ค่าความชุก, พยาธิปลิงใส, multiplex PCR

Title	PREVALENCE AND DETECTION OF MONOGENEANS IN THE GENERA <i>DACTYLOGYRUS</i> AND <i>GYRODACTYLUS</i> IN GOLDFISH (<i>CARASSIUS AURATUS</i>) USING MOLECULAR BASED METHOD
Author	NICHAPAT KHOTAMA
Degree	MASTER OF EDUCATION
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Assistant Professor Thapana Chontanarith , Ph.D.
Co Advisor	Assistant Professor Thanawan Tejangkura , Ph.D.

The prevalence of monogenetic trematode infections in goldfish (*Carassius auratus*) were examined in Ratchaburi province for controlling and monitoring parasitic diseases in fish farms. A total number of 300 fish specimens were examined. Two genera and six species of monogeneans were presented, including *Dactylogyrus anchoratus*, *D. formosus*, *D. intermedius*, *D. vastator*, *Gyrodactylus gurleyi*, and *G. kobayashii*. The prevalence of *Dactylogyrus*, *Gyrodactylus*, and their Co-infection was 37.67, 1.00, and 9.67, respectively. The multiplex PCR for the detection of two genera of monogenetic trematodes were performed using two primer sets based on the ITS1 region of ribosomal RNA. Both specific PCR fragments site of 223 and 117 bp were obtained for *Dactylogyrus* and *Gyrodactylus*, respectively. The sensitivity of primer for *Dactylogyrus* and *Gyrodactylus* was estimated at 1.7×10^{-2} ng/ul and 1.1 ng/ul, respectively. Regarding the molecular identification at mucus and gill of goldfish from natural infected specimens, 18 out of 20 (90%) fish specimens gave positive results. The results from this study showed that the multiplex PCR method was specific and rapid for the detection of two genera of monogenetic trematodes.

Keyword : Goldfish prevalence mean intensity multiplex PCR

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาบัตรฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพนา ชลธนานารถ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาบัตรและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนวรรณ เตชะกฤษ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมปริญญาบัตร ได้ให้คำปรึกษา ความรู้ความช่วยเหลือ และการให้การสนับสนุนด้านการวิจัย รวมทั้งแนวคิดและหลักปฏิบัติสำหรับการทำงาน ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงต้องขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงด้วยความนับถือ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ พุทธิชาติ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการการสอบปากเปล่าปริญญาบัตร และให้คำแนะนำในการทำปริญญาบัตรฉบับนี้

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาบัตร และให้คำแนะนำในการทำปริญญาบัตรฉบับนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการทำปริญญาบัตรฉบับนี้

ขอขอบคุณทุนโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) จากสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่สนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ให้ผ่านลุล่วงและสำเร็จไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ น้อง และเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ได้ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาจนทำให้ปริญญาบัตรฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ณิชาพัฒน์ โคตะมะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
ขอบเขตของการวิจัย	4
สมมติฐานการวิจัย.....	4
ระยะเวลาในการทำการวิจัย	4
สถานที่ทำการวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. ปลาทอง (<i>Carassius auratus</i>).....	5
1.1 ข้อมูลทั่วไปของปลาทอง.....	5
1.2 พยาธิปลิงใสที่พบในปลาทอง.....	6
2. พยาธิปลิงใส.....	8
2.1 ข้อมูลทั่วไปของพยาธิปลิงใส.....	8

2.1.1 ระบบทางเดินอาหาร	9
2.1.2 ระบบขับถ่าย	10
2.1.3 ระบบสืบพันธุ์	11
2.2 วงชีวิตของพยาธิปลิงใส	12
2.2.1 วงชีวิตของพยาธิปลิงใสสกุล <i>Dactylogyrus</i>	12
2.2.2 วงชีวิตของพยาธิปลิงใสสกุล <i>Gyrodactylus</i>	14
2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงใสที่พบในปลาทอง	15
4. พยาธิสภาพของปลาที่ติดพยาธิปลิงใส	21
4.1 พยาธิสภาพของปลาที่ติดพยาธิปลิงใสสกุล <i>Dactylogyrus</i>	21
4.2 พยาธิสภาพของปลาที่ติดพยาธิปลิงใสสกุล <i>Gyrodactylus</i>	23
5. การศึกษาทางอนุชีววิทยา	24
6. การระบุชนิดเชิงโมเลกุลของพยาธิปลิงใส	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	29
วิธีการวิจัย	29
1. การขออนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์	29
2. การเก็บตัวอย่างปลาทอง	29
3. การตรวจหาพยาธิปลิงใสในตัวอย่างปลาทอง	29
4. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงใส	29
5. การศึกษาทางอนุชีววิทยาของพยาธิปลิงใส	30
5.1 การเตรียมตัวอย่างพยาธิ	30
5.2 การระบุชนิดเชิงโมเลกุลของพยาธิปลิงใส	30
5.3 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิปลิงใสสกุล <i>Dactylogyrus</i> และสกุล <i>Gyrodactylus</i>	31

5.4 การทดสอบคุณสมบัติที่เหมาะสมของไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยาพีซีอาร์	32
5.5 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์	32
5.6 การพัฒนา multiplex PCR เพื่อการตรวจสอบพยาธิปลิงใส	33
5.7 การตรวจสอบการติด (detection) ของพยาธิปลิงใสสกุล <i>Dactylogyrus</i> และ <i>Gyrodactylus</i> ในตัวอย่างปลาทองจากสภาพธรรมชาติ	33
7. การศึกษาค่าความชุก	34
บทที่ 4 ผลการศึกษา	35
4.1 ค่าความชุกของพยาธิปลิงใสที่พบในปลาทอง ในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาจังหวัดราชบุรี	35
4.1.1 ข้อมูลฟาร์มปลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง	35
4.1.2 ค่าความชุกเฉลี่ยรวมของการติดพยาธิปลิงใส	35
4.2 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของพยาธิปลิงใส	36
4.3 การศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา	47
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล	58
บรรณานุกรม	62
ประวัติผู้เขียน	71

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ข้อมูลฟาร์มปลาทองในจังหวัดราชบุรีที่ทำการเก็บตัวอย่าง	35
ตาราง 2 ค่าความชุกของพยาธิปลิงใสที่พบในปลาทอง	36
ตาราง 3 ตารางเปรียบเทียบการศึกษาลักษณะวิทยาของ <i>D. vastator</i>	37
ตาราง 4 ตารางเปรียบเทียบการศึกษาลักษณะวิทยาของ <i>D. intermedius</i>	39
ตาราง 5 ตารางเปรียบเทียบการศึกษาลักษณะวิทยาของ <i>D. formosus</i>	41
ตาราง 6 ตารางเปรียบเทียบการศึกษาลักษณะวิทยาของ <i>D. anchoratus</i>	43



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปลาทอง (<i>C. auratus</i>).....	6
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างและลักษณะสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของพยาธิปลิงใส	9
ภาพประกอบ 3 ระบบทางเดินอาหารของพยาธิปลิงใส	10
ภาพประกอบ 4 ช่องขับถ่ายของเสียของพยาธิปลิงใส	11
ภาพประกอบ 5 วงชีวิตของพยาธิปลิงใสสกุล <i>Dactylogyrus</i>	12
ภาพประกอบ 6 การพัฒนาของตัวอ่อนพยาธิปลิงใสสกุล <i>Dactylogyrus</i>	13
ภาพประกอบ 7 การพัฒนาตัวอ่อนของพยาธิปลิงใสสกุล <i>Gyrodactylus</i>	14
ภาพประกอบ 8 พยาธิปลิงใสสกุล <i>Dactylogyrus</i>	15
ภาพประกอบ 9 การวัดส่วนประกอบสำคัญของพยาธิปลิงใสสกุล <i>Dactylogyrus</i>	16
ภาพประกอบ 10 สัณฐานวิทยาของ <i>D. intermedius</i> ที่พบในปลาทอง (<i>C. auratus</i>).....	17
ภาพประกอบ 11 พยาธิปลิงใสสกุล <i>Gyrodactylus</i>	18
ภาพประกอบ 12 การวัดส่วนประกอบสำคัญของพยาธิปลิงใสสกุล <i>Gyrodactylus</i>	19
ภาพประกอบ 13 สัณฐานวิทยาของ <i>G. kobayashii</i> ที่พบในปลาทอง (<i>C. auratus</i>)	20
ภาพประกอบ 14 พยาธิสภาพของปลาที่ติดพยาธิปลิงใสสกุล <i>Dactylogyrus</i>	22
ภาพประกอบ 15 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากการติดพยาธิปลิงใสสกุล <i>Dactylogyrus</i>	23
ภาพประกอบ 16 ผิวหนังของปลาที่ถูกพยาธิปลิงใสสกุล <i>Gyrodactylus</i> เกาะ	24
ภาพประกอบ 17 โครงสร้างของ <i>rDNA</i> และ <i>pre-rRNA</i> ของยูคาริโอต.....	25
ภาพประกอบ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิปลิงใสในปลาทอง 2 สกุล จาก ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS 1 จำเพาะต่อสกุล <i>Dactylogyrus</i> (กรอบสีแดง)และจำเพาะต่อสกุล <i>Gyrodactylus</i> (กรอบสีม่วง).....	32
ภาพประกอบ 19 ลักษณะทั่วไปของ <i>Dactylogyrus vastator</i>	38

ภาพประกอบ 23 ลักษณะทั่วไปของ <i>Gyrodactylus gurleyi</i>	45
ภาพประกอบ 24 ลักษณะทั่วไปของ <i>Gyrodactylus kobayashii</i>	46
ภาพประกอบ 25 แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการของพยาธิปลิงสี่ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณยีน 18S และ บริเวณ ITS1	48
ภาพประกอบ 26 แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการของพยาธิปลิงสี่ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS2	49
ภาพประกอบ 27 การตรวจสอบ optimal annealing temperature ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิ ปลิงสี่สกุล <i>Dactylogyrus</i>	51
ภาพประกอบ 28 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อพยาธิปลิงสี่สกุล <i>Dactylogyrus</i>	51
ภาพประกอบ 29 ตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิปลิงสี่สกุล <i>Dactylogyrus</i>	52
ภาพประกอบ 30 การตรวจสอบ optimal annealing temperature ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิ ปลิงสี่สกุล <i>Gyrodactylus</i>	52
ภาพประกอบ 31 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อพยาธิปลิงสี่สกุล <i>Gyrodactylus</i>	53
ภาพประกอบ 32 ตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิปลิงสี่สกุล <i>Gyrodactylus</i>	53

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปลาทอง (*Carassius auratus*) เป็นปลาสวยงามชนิดหนึ่งที่ได้รับคามนิยมเพาะเลี้ยงทั่วโลก (Maceda-Veiga et al., 2013) โดยประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศที่มีการส่งออกปลาทองเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก เนื่องจากผู้ประกอบการได้พัฒนาสายพันธุ์ปลาทองให้สวยงามมีมาตรฐาน จนได้รับการยอมรับจากผู้ค้าในต่างประเทศ (อรุณี รอดลอย, 2558) โดยในปี พ.ศ. 2561 อัตราการส่งออกปลาทองมีมูลค่าสูงเป็นอันดับ 4 ของการส่งออกสัตว์น้ำสวยงามของประเทศ ซึ่งมีปริมาณการส่งออกเป็นจำนวน 3,283,269 ตัว คิดเป็นมูลค่า 2,389,087.01 บาท (ด้านตรวจสัตว์น้ำท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ, 2561)

ตลาดการส่งออกปลาสวยงามเป็นตลาดที่มีการแข่งขันสูงมาก (Dey, 2016) โดยปัจจัยสำคัญที่จะทำให้สามารถแข่งขันกับประเทศคู่แข่งการส่งออกปลาสวยงาม คือ การพัฒนาระบบการผลิตที่มีมาตรฐานในด้านต่าง ๆ เช่น การจัดการมาตรฐานสุขอนามัย มาตรฐานการผลิต และข้อกำหนดการส่งออกแก่เกษตรกร (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร และสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วมักประสบปัญหาเกี่ยวกับการติดโรคในปลาทำให้เกิดความสูญเสียอย่างมากต่อธุรกิจการเลี้ยงปลาสวยงาม (Bari & Yamazaki, 2018) ประกอบกับเมื่อเกิดการระบาดของโรคแต่ละครั้ง หากไม่สามารถป้องกันรักษาได้ทันที ส่งผลให้ผลผลิตที่ได้ไม่มีคุณภาพและไม่ตรงความต้องการของตลาด (วันเพ็ญ มีนกาญจน์ และคณะ, 2549) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดปรสิตและหนอนพยาธิชนิดต่างๆ ที่อาจเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคและพยาธิสภาพในปลา (Paperna, 1996; Gulelat et al., 2013; Gebrezgiher & Gebrehiwot, 2019) จากการศึกษาของ Thilakaratne et al. (2003) ได้รายงานการพบพยาธิปลิงใส (monogenea) ว่ามีการติดสูงสุดในปลาสวยงาม คิดเป็นร้อยละ 28.3 สอดคล้องกับรายงานของ Roohi et al. (2016) ว่าค่าความชุก (prevalence) ของปรสิตในปลาทองจากประเทศอิหร่านมีการติดพยาธิปลิงใสสูงที่สุด คิดเป็นร้อยละ 49.54

พยาธิปลิงใสเป็นปรสิตภายนอกที่พบได้มากบริเวณผิวหนังและเหงือกของปลา (Whittington & Kean, 2011) มักพบว่ามีการติดพยาธิปลิงใสในปลาทอง ได้แก่ สกุล *Gyrodactylus* ที่มักพบบริเวณผิวหนัง และสกุล *Dactylogyrus* ที่มักพบบริเวณเหงือก โดยสามารถพบได้หลายชนิด สอดคล้องกับการรายงานของ Mousavi et al. (2009), Chanda et al. (2011), Iqbal & Hussain (2013) และ Trujillo-Gonzalez et al. (2018)

การติดพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* ทำให้เหือกเกิดความเสียหาย เซลล์เยื่อผิวหนังเพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยหากเกิดในระดับรุนแรงมากจะทำให้เหือกแกเนลต์ต่าง ๆ ในเซลล์สลายตัว กิ่งเหือกเชื่อมรวมกัน มีลักษณะคล้ายกระบอง ทำให้พื้นผิวในการแลกเปลี่ยนแก๊สลดลง ส่งผลให้แผ่นปิดเหือกเปิดปิดเร็วกว่าปกติ อาจพบเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบกระจายไปทั่วบริเวณที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ อีกทั้งพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมือก ซึ่งมีอาการรวม รวมทั้งอาจพบภาวะเลือดคั่งในหลอดเลือด (สมาน แก้วไวยุทธ และคณะ, 2544) ส่วนสกุล *Gyrodactylus* ทำให้เกิดแผลที่ผิวหนังชั้นนอก เนื่องจากส่วนของสมอ (anchor) ของพยาธิฝังลึกในเนื้อเยื่อปลา โดยพยาธิปลิงใสจะเกาะติดและดูดกินอาหารที่บริเวณผิวหนังชั้นนอก ทำให้เกิดการผลิตเมือกเพิ่มมากขึ้น เมือกส่วนเกินจะรบกวนการทำงานของระบบทางเดินหายใจของผิวหนัง (Purivirojkul, 2012) ในกรณีที่มีการติดเชื้อรุนแรง (hyper-infection) ปลาอาจจะตายได้จากพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจากการติดพยาธิปลิงใสโดยตรง หรือเกิดจากการติดเชื้อแทรกซ้อนหรือเชื้อฉวยโอกาสชนิดอื่น เช่น เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และไวรัส (Reed et al., 2009) การแพร่ระบาดของพยาธิปลิงใสสามารถเกิดได้ตลอดทั้งปี โดยเฉพาะในปลาทองที่มีการเลี้ยงแบบหนาแน่นกว่าปกติ (กรมประมง, 2553) ซึ่งมักพบในฟาร์มปลาทอง เพื่อลดต้นทุนการผลิต ส่งผลต่อคุณภาพของปลาที่จะทำการส่งออก ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อร้ายแรงจากการติดเชื้อโรคในชนิดที่ไม่เคยพบในพื้นที่มาก่อน (Whittington & Chong, 2007) อีกทั้งการติดเชื้อร่วมจากปรสิตมากกว่า 1 ชนิด (co-infection) มีอิทธิพลมากต่อการดำรงชีวิตของปลา (Kotob et al., 2017) การระบุชนิดของปรสิตที่ติดในปลาทองจึงมีความสำคัญทั้งในด้านการควบคุมโรคระบาดและการรักษามาตรฐานของฟาร์มปลา โดยเฉพาะการระบุชนิดของพยาธิปลิงใสทั้งสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ที่ตรวจสอบ จัดจำแนก และระบุชนิดได้ยาก เนื่องจากลำตัวใสและมีขนาดเล็ก ทำให้การระบุชนิดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจึงมีข้อจำกัด ในกรณีที่ต้องตรวจในปริมาณมาก ซึ่งแตกต่างจากการระบุชนิดเชิงโมเลกุลด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR) ที่สามารถประยุกต์ใช้ในการแยกความแตกต่างของพยาธิปลิงใสที่มีความใกล้เคียงกันได้แม่นยำกว่า (Sharma, Agrawal, & Kumar, 2011) อีกทั้งมีความรวดเร็ว สะดวกต่อการตรวจในปริมาณมากในหนึ่งรอบการตรวจสอบ ส่วนใหญ่มักใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer 1 (ITS1) และ internal transcribed spacer 2 (ITS2) เป็นบริเวณที่เหมาะสมแก่การนำมาใช้จัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในระดับสกุลและชนิด (Schlotterer et al., 1994) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tu et al. (2014), Tu et al. (2015), Ling et al. (2016) และ Trujillo-Gonzalez et al. (2018) ที่ใช้ลำดับนิวคลีโอ

ไทด์บริเวณดังกล่าวระบุชนิดของพยาธิปลิงสีที่พบในปลาทอง ซึ่งจัดได้ว่าเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประโยชน์และมีความแม่นยำ

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการตรวจสอบค่าความชุก (prevalence) ของการติดพยาธิปลิงในปลาทอง ในฟาร์มปลาสวยงามจังหวัดราชบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการทำธุรกิจฟาร์มปลาทองจำนวนมาก โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับอณูชีววิทยา ในการตรวจสอบการติดของพยาธิปลิงสีในปลาทองจากสถานเพาะเลี้ยง เพื่อให้สามารถตรวจสอบการติดพยาธิปลิงสีสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ได้อย่างแม่นยำ เป็นประโยชน์ต่อการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพเป็นอันดับต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. ศึกษาค่าความชุกของพยาธิปลิงสีที่พบในปลาทอง (*Carassius auratus*) ในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาจังหวัดราชบุรี
2. พัฒนาเทคนิค multiplex PCR สำหรับการตรวจหาพยาธิปลิงสีสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* สำหรับเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบการติดพยาธิปลิงสีในปลาทอง

ความสำคัญของการวิจัย

การสำรวจความชุกของการติดพยาธิปลิงสีสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ที่พบในปลาทองจากฟาร์มปลาสวยงาม จังหวัดราชบุรี ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยานั้น ทำให้ทราบถึงข้อมูลสถานการณ์การระบาด ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้เป็นแนวทางในการควบคุมโรคและรักษามาตรฐานของฟาร์มปลาสวยงามได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ทำให้สามารถคัดแยกปลาที่ติดพยาธิปลิงสีมาทำการรักษาได้อย่างเจาะจง ลดการแพร่กระจาย อีกทั้งยังสร้างความน่าเชื่อถือในการตรวจคุณภาพของปลาก่อนการส่งออก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบค่าความชุกของการติดพยาธิปลิงสีในปลาทอง (*Carassius auratus*) จากจังหวัดราชบุรี
2. สามารถพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ที่สามารถใช้ในการตรวจหาการติดพยาธิปลิงสีสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ที่มีความจำเพาะและความไวสูงขึ้น

ขอบเขตของการวิจัย

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาทองที่เลี้ยงในฟาร์มปลาสวยงาม จังหวัดราชบุรี จำนวน 10 ฟาร์ม นำตัวอย่างปลาทองที่ยังคงมีชีวิตอยู่มาศึกษาที่ห้องปฏิบัติการ โดยทำการศึกษาด้านสัณฐานวิทยา ด้วยการชูดเมือกที่ผิว ครีบ และหางของปลาทองรวมถึงตัดบริเวณเหงือกเพื่อทำการตรวจหาพยาธิ ปลิงใสภายใต้กล้องสเตอริโอ จากนั้นทำการจำแนกชนิดของพยาธิปลิงใสภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และตัวอย่างบางส่วนนำไปศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา เพื่อระบุชนิดและออกแบบไพรเมอร์จำเพาะระดับสกุล ด้วยเทคนิค multiplex PCR

สมมติฐานการวิจัย

ปลาทองจากฟาร์มปลาสวยงามจังหวัดราชบุรีที่เลี้ยงแบบหนาแน่น มีโอกาสติดพยาธิปลิงใสทั้งในสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบการติดปลิงใสทั้งสองสกุล จะมีความรวดเร็วและแม่นยำขึ้นกว่าวิธีการแบบดั้งเดิม

ระยะเวลาในการทำการวิจัย

ระยะเวลาตั้งแต่เดือนธันวาคม 2561 – มีนาคม 2563

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ 1104 ชั้น 11 อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ (อาคาร 19) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ตรวจสอบเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. ปลาทอง (*Carassius auratus*)

- 1.1 ข้อมูลทั่วไปของปลาทอง
- 1.2 พยาธิปลิงใสที่พบในปลาทอง

2. พยาธิปลิงใส

- 2.1 ข้อมูลทั่วไปของพยาธิปลิงใส
- 2.2 วงชีวิตของพยาธิปลิงใส
- 2.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงใสที่พบในปลาทอง

3. พยาธิสภาพของปลาที่ติดพยาธิปลิงใส

- 3.1 พยาธิสภาพของปลาที่ติดพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*
- 3.2 พยาธิสภาพของปลาที่ติดพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus*

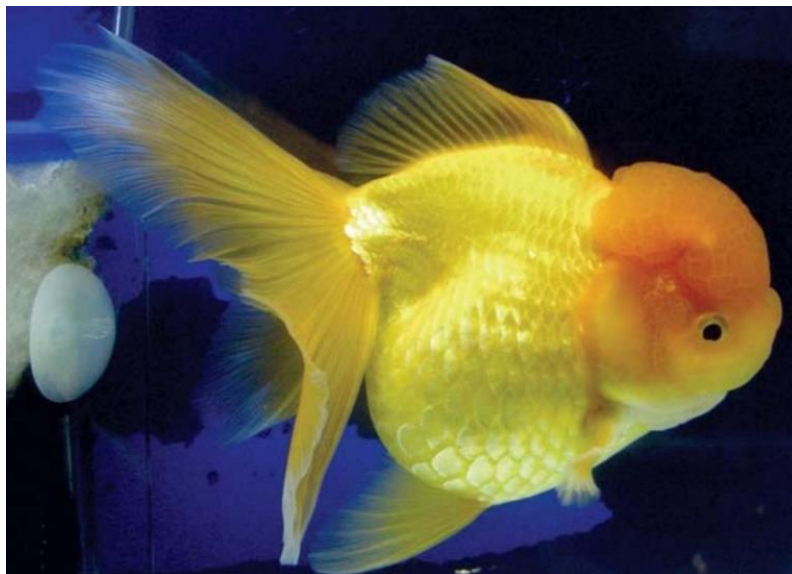
4. การศึกษาทางอนุชีววิทยา

5. การระบุชนิดเชิงโมเลกุลของพยาธิปลิงใส

1. ปลาทอง (*Carassius auratus*)

1.1 ข้อมูลทั่วไปของปลาทอง

ปลาทองมีถิ่นกำเนิดจากประเทศจีนเป็นปลาที่อยู่ในวงศ์ Cyprinidae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกันกับปลาไน (*Cyprinus*) และปลาตะเพียน (*Barbonymus*) จัดว่าเป็นวงศ์ปลาที่มีความหลากหลาย ซึ่งปลาวงศ์นี้มีลักษณะร่วมกัน คือมีขากรรไกรที่ไม่มีฟัน แต่จะพบฟันอยู่บริเวณคอหอย 1-3 แถวแต่ละแถวมีฟันได้สูงสุด 8 ซี่ ริมฝีปากบาง ไม่มีครีบไขมัน (adipose fin) (Nelson, Grande, & Wilson, 2016) ลักษณะของปลาทองจะมีความแตกต่าง และมีลักษณะเด่นของแต่ละสายพันธุ์ อีกทั้งมีหลายสี เช่น ทอง, แดง, ขาว-แดง, ส้ม, ดำ, ขาว และห้าสี ฯลฯ โดยทั่วไปปลาทองมีรูปร่างลำตัวอ้วน ป้อม มีเกล็ดแบบไซคลอยด์ (cycloid) ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นบาง ครีบอกกลมแบน และครีบหางเป็นรูปพัด บางชนิดจะมีกลิ่นคูลมอยู่บริเวณหัว (อรุณี และคณะ, 2552; ธนากร, 2554) (ภาพประกอบ 1)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปลาทอง (*C. auratus*) ซึ่งเป็นปลาที่ถูกจัดในวงศ์ Cyprinidae มีลักษณะรูปร่างอ้วน ป้อม มีเกล็ดแบบบางเรียบ ครีบอกกลมแบน และครีบหางเป็นรูปพัด

ที่มา: อรุณี รอดลอย และคณะ (2552)

1.2 พยาธิปลิงใสที่พบในปลาทอง

พยาธิปลิงใสเป็นปรสิตภายนอกที่พบได้ทั่วไปบริเวณผิวหนัง เหงือก และครีบของปลาทะเลและปลาน้ำจืด สำหรับในปลาทองมักพบรายงานการติดพยาธิปลิงใสทั้งหมด 2 สกุล ได้แก่ *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ตามรายงานที่ได้มีการทำการศึกษา ดังนี้

Ogawa and Egusa (1979) รายงานการติดพยาธิปลิงใสของปลาทองในประเทศญี่ปุ่น พบพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* 6 ชนิด ได้แก่ *Dactylogyrus anchoratus*, *D. baueri*, *D. dulceiti*, *D. formosus*, *D. intermedius* และ *D. vastator* จากนั้นนันทชัย บุญจร (2546) ได้รายงานการติดปรสิตในปลาสวยงามจากฟาร์มเพาะเลี้ยงบริเวณบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี โดยพบพยาธิปลิงใส 2 สกุล ได้แก่ *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ต่อมาคณิต ชูคันทอม และอนุชา เสนาราช (2551) รายงานการติดปรสิตภายนอกที่พบในเขตพื้นที่จังหวัดขอนแก่น โดยปลาทองมีค่าความชุกของการติดปรสิตสูงที่สุด ร้อยละ 72.50 โดยพบพยาธิปลิงใส 2 ชนิด ได้แก่ *Dactylogyrus* sp. และ *Gyrodactylus* sp. มีค่าความชุกร้อยละ 45.00 และ 46.25 ตามลำดับ ต่อมาจักรพงศ์ นีละมนต์ และคณะ (2553) ได้รายงานปัญหาโรคปรสิตภายนอกในปลาสวยงาม

ส่งออก ในจังหวัดมุกดาหารและจังหวัดอุบลราชธานี พบพยาธิปลิงใส 2 ชนิด ได้แก่ *Dactylogyrus* sp. และ *Gyrodactylus* sp. โดยมีค่าความชุกร้อยละ 21.15 และ 20.31 ตามลำดับ จากนั้น Mousavi et al. (2009) รายงานการติดปรสิตภายนอกของปลาทองที่นำเข้ามาในประเทศอิหร่าน พบพยาธิปลิงใสทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *Dactylogyrus* sp., *D. baueri*, *D. formosus*, *D. vastator*, *G. chinensis* และ *Gyrodactylus* sp. โดยมีค่าความชุก ร้อยละ 82.00, 50.00, 28.00, 26.00, 30.00 และ 19.00 ตามลำดับ ต่อมา Chanda et al. (2011) รายงานการติดปรสิตปลาทองใน 3 จังหวัดในรัฐเบงกอลตะวันตกของประเทศอินเดีย พบพยาธิปลิงใสทั้ง 2 สกุล ได้แก่ *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ตลอดทั้งปี โดยทั้งสองสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* มีความชุกสูงสุดในเดือนตุลาคม คิดเป็นร้อยละ 72.00 และ 76.00 ตามลำดับ หลังจากนั้น Borisov (2013) รายงานการติดพยาธิปลิงใสของปลาทองในประเทศสิงคโปร์ พบพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* 5 ชนิด ได้แก่ *D. anchoratus*, *D. baueri*, *D. formosus*, *D. intermedius* และ *D. vastator* ต่อมา Iqbal and Hussain (2011) รายงานการติดพยาธิปลิงใสในปลาทองที่นำเข้ามาในประเทศปากีสถาน พบพยาธิปลิงใสทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ *D. extensus* และ *Gyrodactylus* sp. โดย *D. extensus* มีค่าความชุกและความหนาแน่นเฉลี่ย เท่ากับ ร้อยละ 63.30 และ 22.31 ตามลำดับ ส่วน *Gyrodactylus* sp. ที่พบในการศึกษามีค่าความชุกและความหนาแน่นเฉลี่ย เท่ากับ ร้อยละ 46.60 และ 27.07 ตามลำดับ ต่อมา Moyses et al. (2015) รายงานการติดปรสิตภายนอกของปลาทองในฟาร์มปลาสวยงามที่เมืองเซาเปาโล ซึ่งพบพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* เพียงสกุลเดียว โดยมีค่าความชุกบริเวณผิวหนังและเหงือกร้อยละ 93.40 และ 83.40 ตามลำดับ หลังจากนั้น Roohi et al. (2016) รายงานการติดปรสิตของปลาทองในประเทศอิหร่าน พบว่าติดพยาธิปลิงใสสูงที่สุด มีค่าความชุก ร้อยละ 49.54 โดยพบพยาธิปลิงใสทั้งสองสกุลรวม 6 ชนิด ได้แก่ *D. anchoratus*, *D. baueri*, *D. formosus*, *D. intermedius*, *D. vastator* และ *Gyrodactylus* sp. ต่อมา Trujillo-Gonzalez et al. (2018) รายงานการติดพยาธิปลิงใสในปลาสวยงามที่นำเข้าสู่ประเทศออสเตรเลีย โดยปลาทองมีความหลากหลายชนิดของพยาธิปลิงใสมากที่สุดจำนวน 10 ชนิด ประกอบด้วย สกุล *Dactylogyrus* 7 ชนิด ได้แก่ *D. anchoratus*, *D. baueri*, *D. formosus*, *D. intermedius*, *D. vastator*, *Dactylogyrus* sp.1 และ *Dactylogyrus* sp.2 และ สกุล *Gyrodactylus* 3 ชนิด ได้แก่ *G. gurleyi*, *G. kobayashii* และ *Gyrodactylus* sp.1 ซึ่งปลาทองที่ถูกนำเข้ามาจากประเทศไทยมีค่าความชุก และความหนาแน่นของพยาธิปลิงใสมากที่สุด

2. พยาธิปลิงใส

2.1 ข้อมูลทั่วไปของพยาธิปลิงใส

Kingdom Animalia

Phylum Platyhelminthes

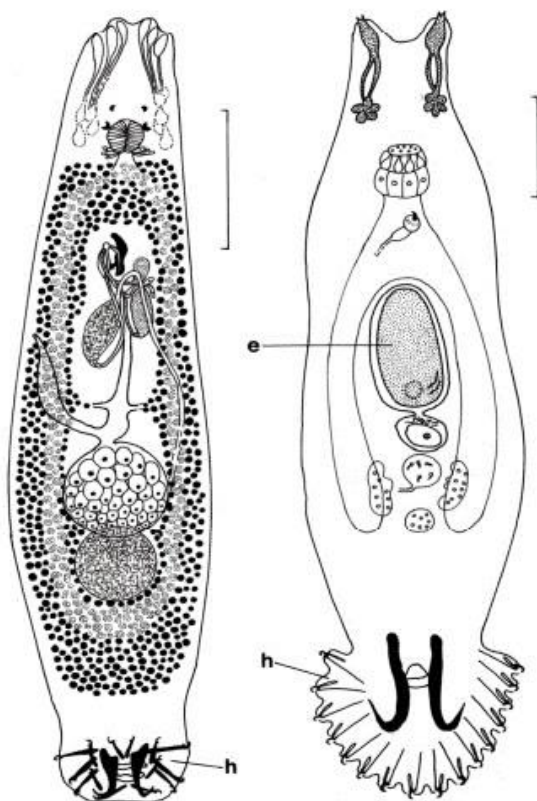
Class Monogenea

Subclass Monopisthocotylea

พยาธิปลิงใสเป็นสัตว์ในไฟลัมแพลทเทิลมิเนธิส (Platyhelminthes) มีเนื้อเยื่อ 3 ชั้น (triploblastic animal) มีลำตัวแบนตามแนวนกลาง (dorsoventrally flattened) มีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่าหนอนตัวแบน โดยคลาสโมโนจีเนีย (Monogenea) ซึ่งมีชื่อสามัญว่า พยาธิปลิงใส ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตเป็นปรสิตในสัตว์น้ำหรือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก บางครั้งอาจพบในกลุ่มครัสเตเชีย หรือมอลลัสกา (Yamaguti, 1963; Sinnappah et al., 2001)

ปัจจุบันพยาธิปลิงใสมีจำนวนมากกว่า 25,000 ชนิด โดยปรสิตกลุ่มนี้มีความสามารถในการหาเจ้าบ้าน (host) ที่เหมาะสม เนื่องจากมีระบบประสาทที่สามารถรับรู้สิ่งกระตุ้นเคมี และแสงตั้งแต่ในระยะตัวอ่อนที่ชื่อว่า ออนโคไมราซีเดียม (oncomiracidium) และสามารถอยู่รอดจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านได้ (Buchmann & Lindenstrom, 2002)

พยาธิปลิงใสสามารถพบบริเวณผิวหนัง เหงือก และครีบของปลา อาจพบได้ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก หรือสัตว์เลื้อยคลาน ส่วนใหญ่มีความยาวประมาณ 1-5 มิลลิเมตร แต่บางชนิดอาจมีความยาวถึง 20 มิลลิเมตร ในระยะเต็มวัย ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนลำตัว และส่วนท้าย โดยบริเวณปลายหน้าสุดมีอวัยวะส่วนหัว (head organ) อาจมีอวัยวะยึดเกาะทางด้านหน้าเป็นกล้ามเนื้ออยู่ล้อมรอบปากเรียกแวนคูตรอบปาก (oral sucker) หรือมีโพรแฮพเตอร์ (prohaptor) มีจุดตา (eye spot) 1-2 คู่ บางชนิดอาจไม่มีจุดตา คอหอย (pharynx) เป็นกล้ามเนื้อรูปร่างกลม ต่อจากนั้นเป็นหลอดอาหาร (esophagus) ที่มีลักษณะสั้น และส่วนของลำไส้ซึ่งแยกเป็น 2 แขนง (bifurcate intestinal caecum) ส่วนลำตัวจะมีโคพูลาทอรี ออร์แกน (copulatory organ) และส่วนท้ายมีอวัยวะช่วยยึดเกาะขนาดใหญ่ เรียกว่า โอพิสแฮพเตอร์ (opisthaptor หรือ opisthohaptor หรือ haptor) มีลักษณะเป็นถ้วยหรือเป็นแผ่นแบนกว้าง ภายในประกอบด้วยสมอ (anchor หรือ hamuli) แขนงตามขวาง (transverse bar) และมีมาร์จินอล ฮุก (marginal hook) อยู่บริเวณขอบของโอพิสแฮพเตอร์ (ภาพประกอบ 2) ในพยาธิปลิงใสบางกลุ่ม อาจพบแวนคูตรหรือแคลมป์ (clamp) เล็ก ๆ จำนวนมาก (วัชรียา, 2556)



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างและลักษณะสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของพยาธิปลิงใส

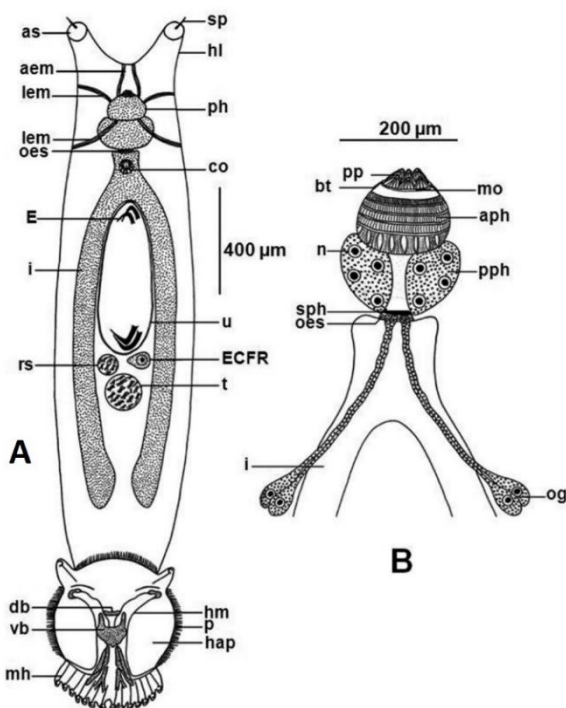
D. squaliobarbi (ซ้าย) และ *G. pungitii* (ขวา) (e =embryo, h =haptor)

(ขนาด scale bar =100 μ m)

ที่มา: Kearns (2014)

2.1.1 ระบบทางเดินอาหาร

ระบบทางเดินอาหารเป็นแบบไม่สมบูรณ์ (incomplete digestive tract) คือมีปากแต่ไม่มีทวารหนัก โดยปากอยู่บริเวณปลายสุด หรือเกือบปลายสุดทางด้านหน้าของลำตัว บางชนิดมีอวัยวะยึดเกาะอยู่บริเวณปาก ถัดจากปากเป็นส่วนของบัคเคิล ฟันเนล (buccal funnel) ซึ่งอยู่ติดกับกล้ามเนื้อคอหอย (muscle pharynx) โดยที่บริเวณส่วนท้ายของคอหอยต่อกับหลอดอาหาร ถัดมาเป็นส่วนของลำไส้ที่แยกเป็น 2 แขนง (ชโลบล, 2555) (ภาพประกอบ 3)



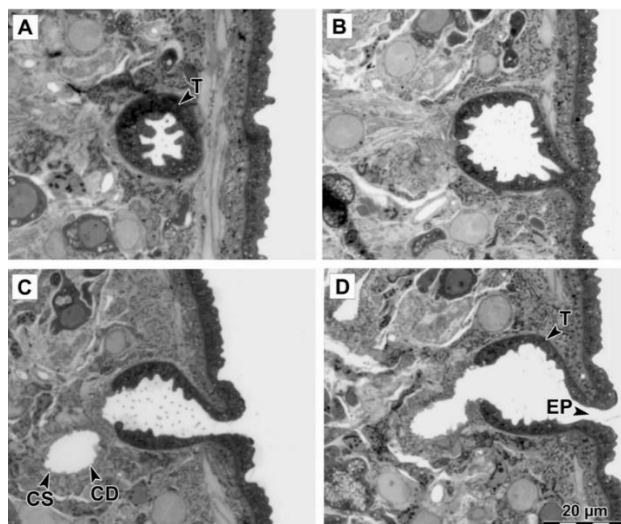
ภาพประกอบ 3 ระบบทางเดินอาหารของพยาธิตัวตืด

A = อวัยวะภายในด้านท้อง (ventral view), B = pharynx, oesophagus และ oesophageal glands (aph = anterior region of the pharynx, bt = buccal tube, i = intestine, n = nucleus, oes = oesophagus, og = oesophageal glands, ph = pharynx, pp = pharyngeal papillae, pph = posterior region of the pharynx) (ภาพ A ขนาด scale bar = 400 μ m และภาพ B ขนาด scale bar = 200 μ m)

ที่มา: Arafa et al. (2013)

2.1.2 ระบบขับถ่าย

การขับถ่ายของเสียใช้แฟลมเซลล์ (flame cell) ที่มีอยู่ทั้งด้านซีกซ้าย และซีกขวาของลำตัว มีท่อรวม (collecting duct) นำของเสียออกนอกตัวทางรูขับถ่าย (excretory pore) ซึ่งอยู่ทางข้างตัวทางด้านหลัง (dorsolateral) ข้างละ 1 ท่อ (ภาพประกอบ 4) นอกจากนั้นผิวหนังสามารถดูดซึมแลกเปลี่ยนก๊าซและสารเคมีต่าง ๆ จากน้ำภายนอกตัว (วัชรียา, 2556)



ภาพประกอบ 4 ช่องขั้บถ่ายของเสียของพยาธิปลิงใส

A-D = ภาพตัดตามยาวของรูขั้บถ่าย (T =body surface tegument, CD =collecting duct,

CS =ciliated surface, EP =excretory pore)

(ขนาด scale bar =20 μm)

ที่มา: Konstanzova et al. (2016)

2.1.3 ระบบสืบพันธุ์

พยาธิปลิงใสมีเพศรวม (hermaphrodite) สามารถผสมข้ามตัว (cross-fertilization) หรือผสมภายในตัวเดียวกัน (self-fertilization) ได้ ระบบสืบพันธุ์เพศผู้มีอัณฑะ (testis) ที่มีรูปไข่หรือกลม มักอยู่บริเวณส่วนท้ายของลำตัว จำนวนไม่แน่นอนขึ้นกับชนิด เชื่อมต่อกับท่อนำอสุจิ (vas deferens) ที่มีการโป่งออกเป็นถุงผลิตน้ำเลี้ยงอสุจิ (seminal vesicle) แล้วนำไปสู่โคพูลาทอรี ออร์แกน ส่วนระบบสืบพันธุ์ของเพศเมียมีรังไข่ (ovary) 1 อัน และมักจะอยู่หน้าอัณฑะ รูปร่างอาจกลมเป็นรูปไข่หรือเป็นพู (lobulated) มีท่อไข่ (oviduct) ออกจากรังไข่และไปเปิดที่บริเวณคูโทป (ootype) โดยมีท่อจากบริเวณที่รับอสุจิ (seminal receptacle) และท่อวิเทลลีน (common vitelline duct) มาเปิดร่วมด้วย

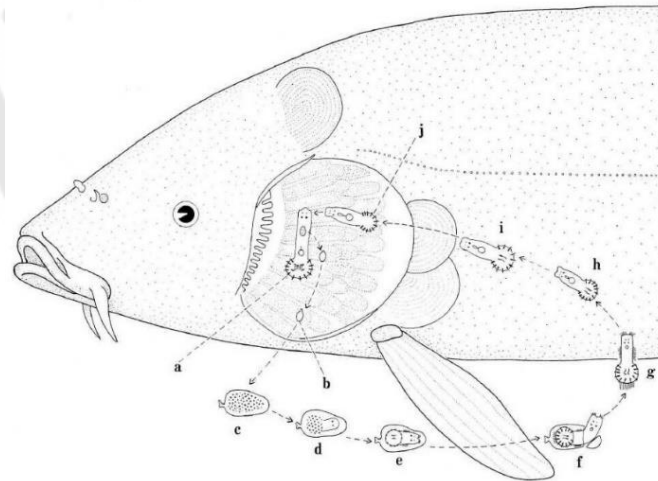
การผสมพันธุ์ อสุจิหรือสเปิร์ม (sperm) จะผ่านไปที่ช่องคลอด (vagina) และถูกเก็บในบริเวณที่รับอสุจิ โดยอสุจิจะถูกปล่อยออกมาผสมกับไข่บริเวณคูโทป จากนั้นไข่ที่ได้รับการผสมจะเข้าสู่มดลูก (uterus) และออกนอกตัวทางช่องเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ (genital pore หรือ uterine pore) (ชโลบล, 2555; วัชรียา, 2556)

2.2 วงชีวิตของพยาธิปลิงใส

พยาธิปลิงใสต้องการเจ้าบ้านเพียงชนิดเดียว โดยมีรายละเอียดของทั้งสองสกุล ดังนี้

2.2.1 วงชีวิตของพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*

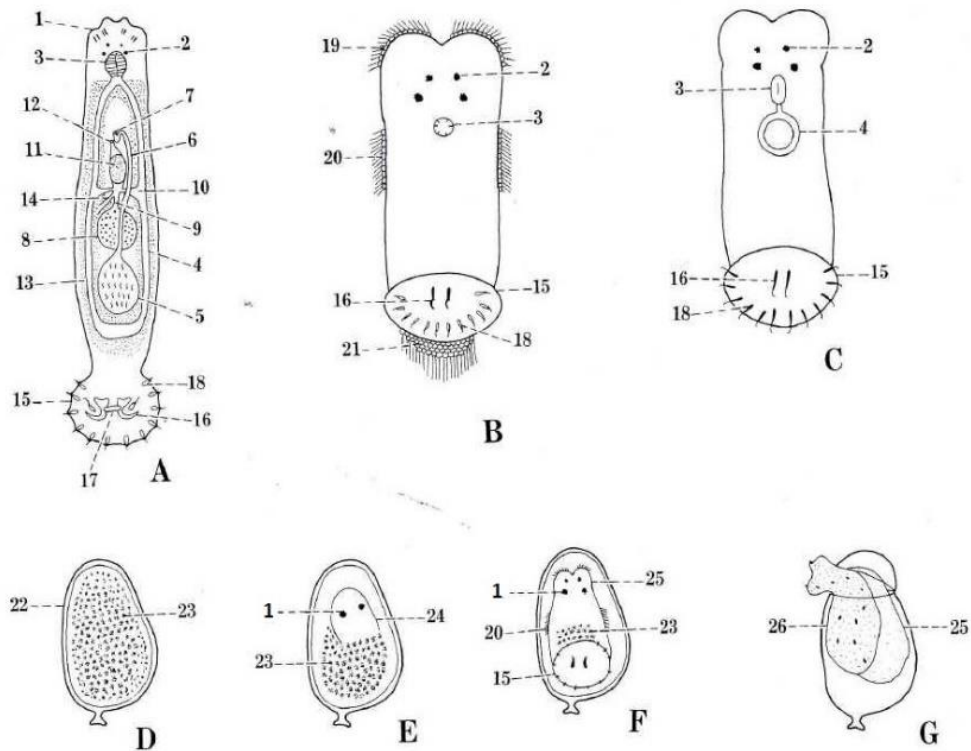
พยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* ออกลูกเป็นไข่ โดยต่อมสร้างไข่แดง (vitelline gland) ซึ่งอยู่บริเวณใกล้คูโทป ที่จะให้สารอาหารกับไข่ รวมทั้งมีการสร้างเปลือก แล้วส่งออกนอกตัวทางช่องเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ ที่อยู่ทางด้านท้องทางส่วนหน้าตัว หลังจากไข่ออกมาจะถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ (ภาพประกอบ 5) ไข่ฟักออกเป็นตัวอ่อนที่มีซีเลีย คือ ออนโคไมราซิเดียม ตัวอ่อนระยะนี้จะมีจุดตา 2 คู่ (ภาพประกอบ 6) โดยตัวอ่อนจะหาเจ้าบ้านใหม่ให้ได้ภายใน 1 วันจึงจะอยู่รอด โดยตัวอ่อนใช้โอพิสแธพเตอร์ เกาะกับเจ้าบ้านและเจริญเป็นตัวเต็มวัย (วัชรียา, 2556) ความสามารถในการแพร่กระจายพันธุ์ของพยาธิปลิงใสสัมพันธ์กับคุณภาพของน้ำอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล โดยมีการแพร่กระจายพันธุ์สูงสุดในช่วงฤดูหนาว และน้อยที่สุดในช่วงฤดูฝน เนื่องจาก ช่วงฤดูฝนเป็นช่วงมรสุม น้ำฝนที่ไหลหลากได้พัดพาดินตะกอน เกิดตกตะกอนแขวนลอยในน้ำมาก ส่งผลให้ตัวอ่อนไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้จึงมีจำนวนลดลง (Modu et al., 2014)



ภาพประกอบ 5 วงชีวิตของพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*

a-b = ไข่ที่ถูกปล่อยลงสู่พื้นด้านล่างของแหล่งน้ำ, c-f = ไข่ฟักเป็นตัวอ่อนที่มีซีเลีย,
g-j = ตัวอ่อนเข้าหาเจ้าบ้านบริเวณเหงือก

ที่มา: Olsen et al. (1962)

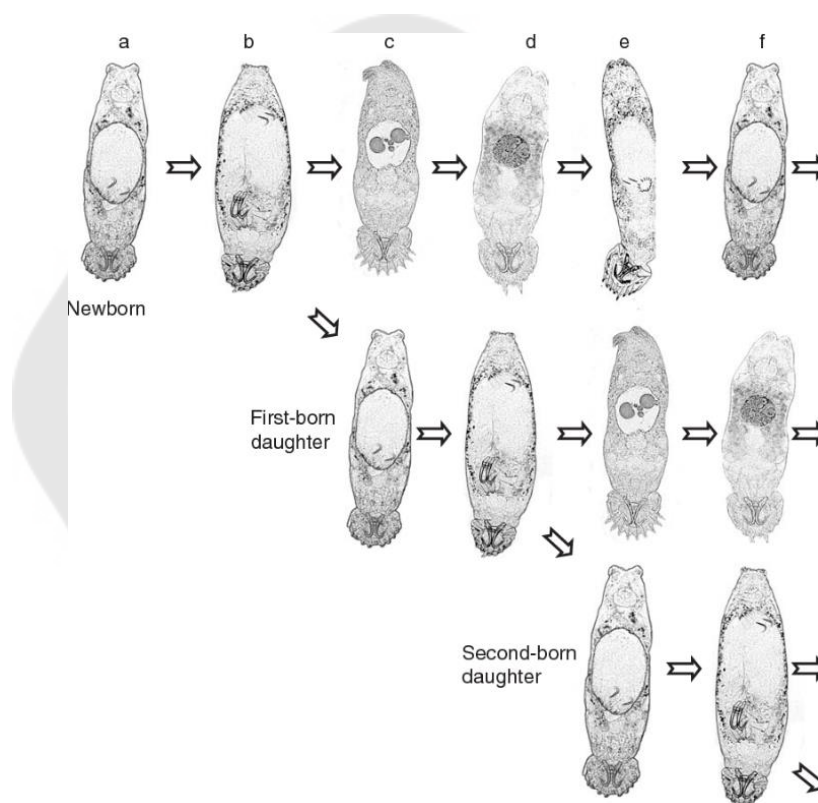


ภาพประกอบ 6 การพัฒนาของตัวอ่อนพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*
 A = ตัวเต็มวัย, B = ตัวอ่อนที่พัฒนาเต็มที่, C = ตัวอ่อนที่ยังไม่มีซีเลีย, D-F = การเจริญของตัวอ่อน
 ภายในไข่, G = ตัวอ่อนพื้จากไข่ (1 = อวัยวะส่วนหัว, 2 = จุดตา, 3 = คอหอย,
 4 = ลำไส้, 5 = อวัยวะ, 6 = ท่อน้ำสุจิ, 7 = ช่องเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์, 8 = รังไข่, 9 = ท่อน้ำ,
 10 = genitointestinal canal, 11 = ไข่ที่ยังไม่มีเยื่อหุ้ม (unembryonated egg), 12 = ช่องเปิดของ
 อวัยวะสืบพันธุ์เพศหญิง, 13 = ต่อมสร้างไข่แดง, 14 = ท่อวิเทลลิน, 15 = โอปิสแซพเตอร์,
 16 = สมอ, 17 = แท่งตามขวาง, 18 = มาร์จิ้นอล สุก, 19-21 = ซีเลีย, 22 = ไข่ที่ไม่มีตัวอ่อน, 23 = ไข่
 แดง, 24 = ตัวอ่อนที่กำลังเจริญเติบโต, 25 = เยื่อหุ้มตัวอ่อน)

ที่มา: Olsen et al. (1962)

2.2.2 วงชีวิตของพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus*

พยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* ออกลูกเป็นตัว มีการพัฒนาตัวอ่อนในมดลูก ของตัวเต็มวัย โดยในตัวเต็มวัยจะมีตัวอ่อนรุ่นที่ 1 อยู่ภายใน และในตัวอ่อนรุ่นที่ 1 ก็มีตัวอ่อนรุ่นที่ 2 ส่วนในตัวอ่อนรุ่นที่ 2 ก็มีตัวอ่อนรุ่นที่ 3 อยู่ตามลำดับ ดังนั้นในตัวเต็มวัยจะมีตัวอ่อนแต่ละรุ่นถัดลงไปรวม 3 ตัว (ภาพประกอบ 7) (Bakke et al., 2007) ทำให้เกิดการแพร่กระจายพันธุ์ขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อตัวอ่อนออกมาจากตัวแม่จะอาศัยอยู่กับเจ้าบ้านตัวเดิมต่อไป หรืออาจจะว่ายน้ำไปหาเจ้าบ้านใหม่ได้ (ชโลบล, 2555)



ภาพประกอบ 7 การพัฒนาตัวอ่อนของพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus*

a = ตัวอ่อนที่เกิดใหม่ (newborn, first-born daughter และ second-born daughter) จะมีตัวอ่อนรุ่นถัดเจริญอยู่ภายในมดลูก, b = สมองของตัวอ่อนรุ่นถัดไปมีการพัฒนาเกือบสมบูรณ์, c = มดลูกหดตัวหลังจากคลอด, d = ยังไม่มีการพัฒนาของตัวอ่อนภายในมดลูก, e = มีการพัฒนาของสมอง และ มาร์จินอล ฮุก, f = มีการพัฒนาของตัวอ่อนรุ่นถัดไปภายในมดลูก

ที่มา: Bakke et al. (2007)

2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงใสที่พบในปลาทอง

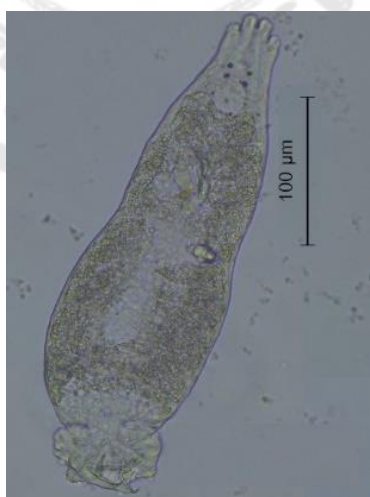
รายละเอียดของปรสิต subclass Monopisthocotylea ที่มีรายงานพบในปลาทอง มีดังนี้

1. Order Dactylogyridea

Family Dactylogyridea

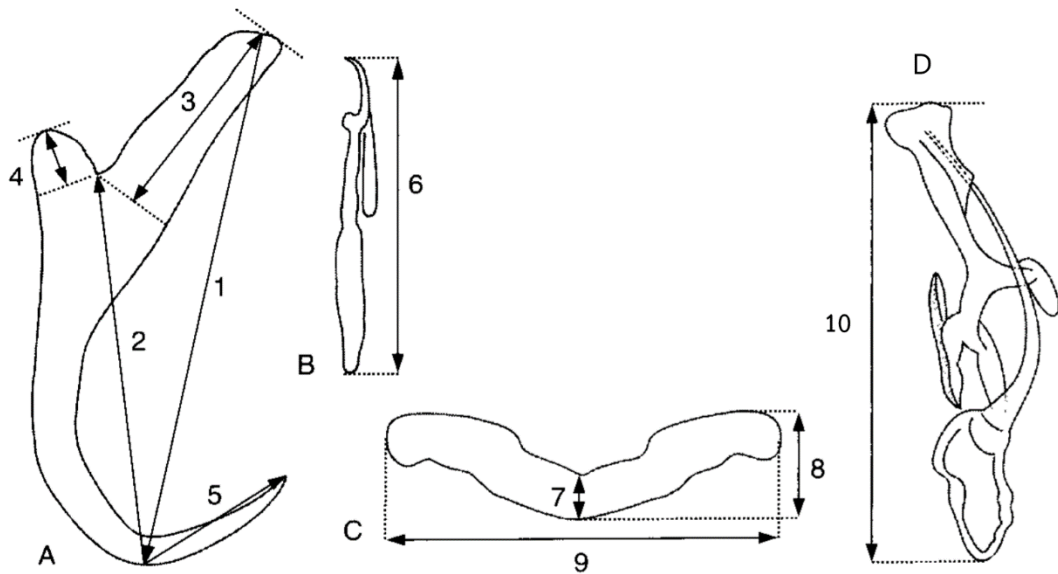
Genus *Dactylogyrus*

พยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* ตัวเต็มวัยมีลำตัวยาว 0.2-1 มิลลิเมตร อวัยวะส่วนหัวพัฒนาดี มีจุดตา 2 คู่ โอปิสแธพเตอร์ประกอบด้วยสมอ 1 คู่ มีแท่งตามขวางยึดสมอทั้งคู่ไว้ ปลายสมอโค้งงอ มีมาร์จินอลสไปน 14-16 อัน ซึ่งมีรูปร่างเหมือนกันแต่อาจมีขนาดแตกต่างกัน อาจพบสมอ และแท่งตามขวาง ด้านท้องที่มีขนาดเล็ก หรือเป็นเพียงร่องรอย อวัยวะส่วนหัวพัฒนาดี อยู่ปลายสุดของพินิส (penis) ลักษณะเป็นท่อนมีรูปร่างแตกต่างกันในแต่ละชนิด อาจตรง โค้ง ขด เป็นวง หรือเป็นเส้น มี แอคเซสเซอร์รี่ พีซ (accessory piece) มีช่องคลอดอยู่ทางด้านท้อง และมักพบทางด้านขวา มีต่อมสร้างไข่แดงกระจายอยู่จำนวนมากตามความยาวของแขนงลำไส้ (ภาพประกอบ 8 และ 10) ส่วนประกอบสำคัญในการแยกชนิด ได้แก่ สมอ, มาร์จินอล สไปน, แท่งตามขวาง และโคพูลาทอรี ออร์แกน โดยมีวิธีการวัดส่วนประกอบสำคัญของสกุล *Dactylogyrus* ดังที่แสดงในภาพประกอบที่ 9 (ประไพศิริ, 2538; วัชรียา, 2556)



ภาพประกอบ 8 พยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*

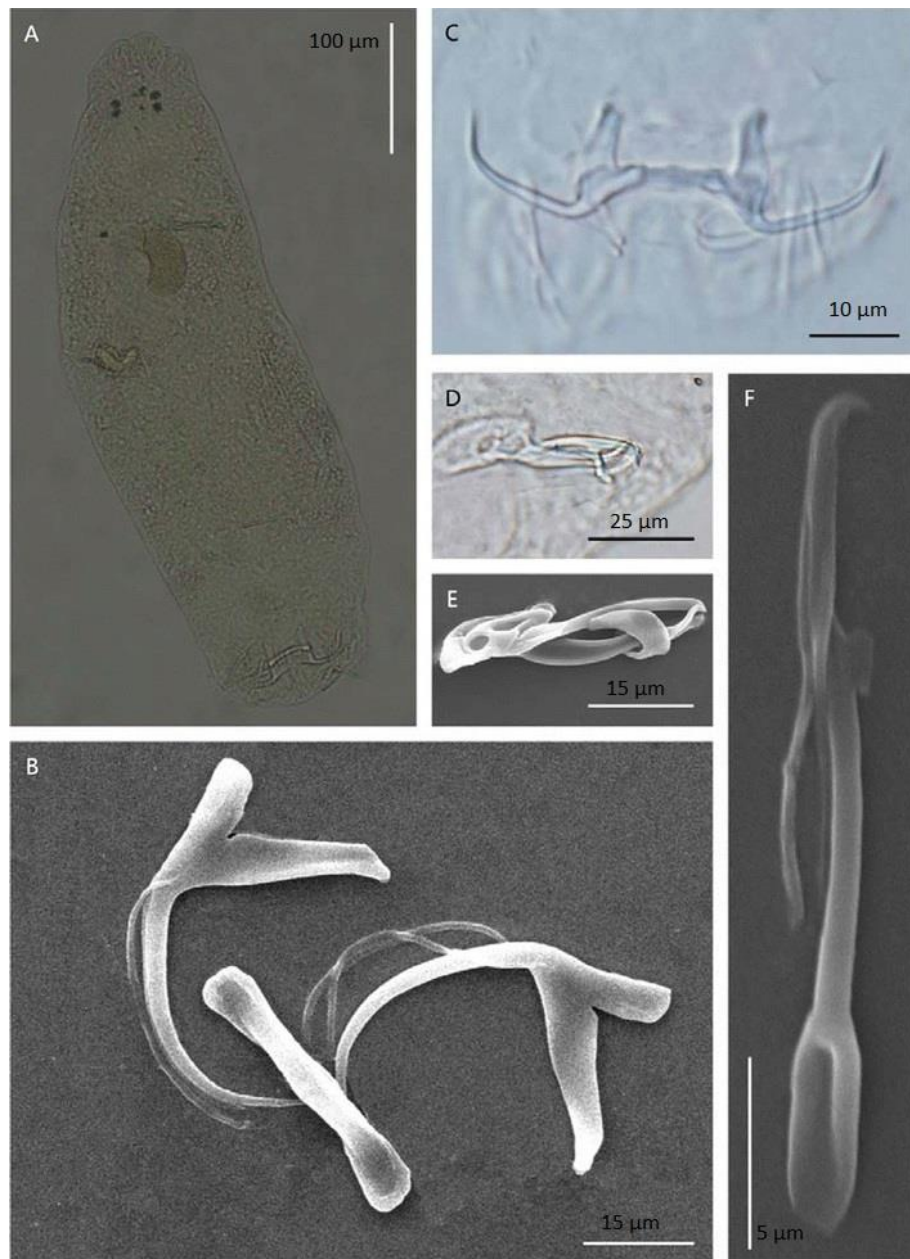
ที่มา: ภาพถ่ายโดยนางสาวณิชาพัฒน์ โคตะมะ



ภาพประกอบ 9 การวัดส่วนประกอบสำคัญของพยาธิปลิงใส่สกุล *Dactylogyrus*

A = ส่วนของส่มอ (1 = ความยาวทั้งหมด, 2 = ความยาวของ main body, 3 = ความยาวของ inner root, 4 = ความยาวของ outer root, 5 = ความยาวของ point), B = มารีจิ้นอล ฮูด (6 = ความยาวทั้งหมด), C = ดอซอล บาร์ (dorsal bar) (7 = ความยาวกึ่งกลาง, 8 = ความยาวทั้งหมด, 9 = ความกว้าง), D = โคพูลาทอรี ออร์แกน (10 = ความยาวทั้งหมด)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Simkova et al. (2007)



ภาพประกอบ 10 สัณฐานวิทยาของ *D. intermedius* ที่พบในปลาทอง (*C. auratus*)
 A = โครงสร้างภายนอกของพยาธิปลิงใต้, B และ C = opisthaptor central hook complex, D
 และ E = โคพูลาทอรี ออร์แกน, F = มาร์จิ้นอล ฮูด (ภาพ A ขนาด scale bar = 100 μm , ภาพ B
 ขนาด scale bar = 15 μm , ภาพ C ขนาด scale bar = 10 μm , ภาพ D ขนาด scale bar = 25 μm ,
 ภาพ E ขนาด scale bar = 15 μm และภาพ F ขนาด scale bar = 5 μm)

ที่มา: Ling et al. (2016)

2. Order Gyrodactylidea

Family Gyrodactylidea

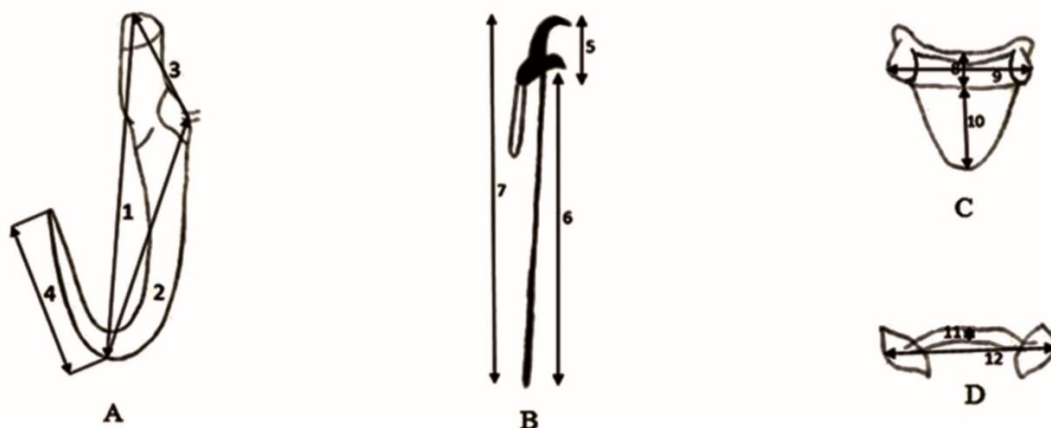
Genus *Gyrodactylus*

พยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* ตัวเต็มวัยมีขนาดประมาณ 0.3-1 มิลลิเมตร ปลายหน้าสุดของลำตัวแยกออกเป็น 2 แฉก ไม่มีจุดตา มีโอพิสแซพเตอร์เป็นรูปถ้วย ตรงกลางมีสมอใหญ่ 1 คู่ มีแท่งตามขวาง 2 อันยึดไว้ ตรงขอบมีมาร์จินอล ฮูด 16 อัน อวัยวะส่วนหัว 1 คู่ ออกลูกเป็นตัว มีรังไข่อยู่หน้าหรือหลังถุงอัมตะ คอหอยแบ่งเป็น 2 ตอน ไม่มีต่อมสร้างไข่แดงหรือมีการพัฒนาน้อย (ภาพประกอบ 11 และ 13) ส่วนประกอบสำคัญในการแยกชนิด ได้แก่ สมอ, แท่งตามขวาง และ มาร์จินอล ฮูด โดยมีวิธีการวัดส่วนประกอบสำคัญของสกุล *Gyrodactylus* ดังที่แสดงในภาพประกอบที่ 12 (ประไพศิริ, 2538; วัชรिया, 2556)



ภาพประกอบ 11 พยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus*

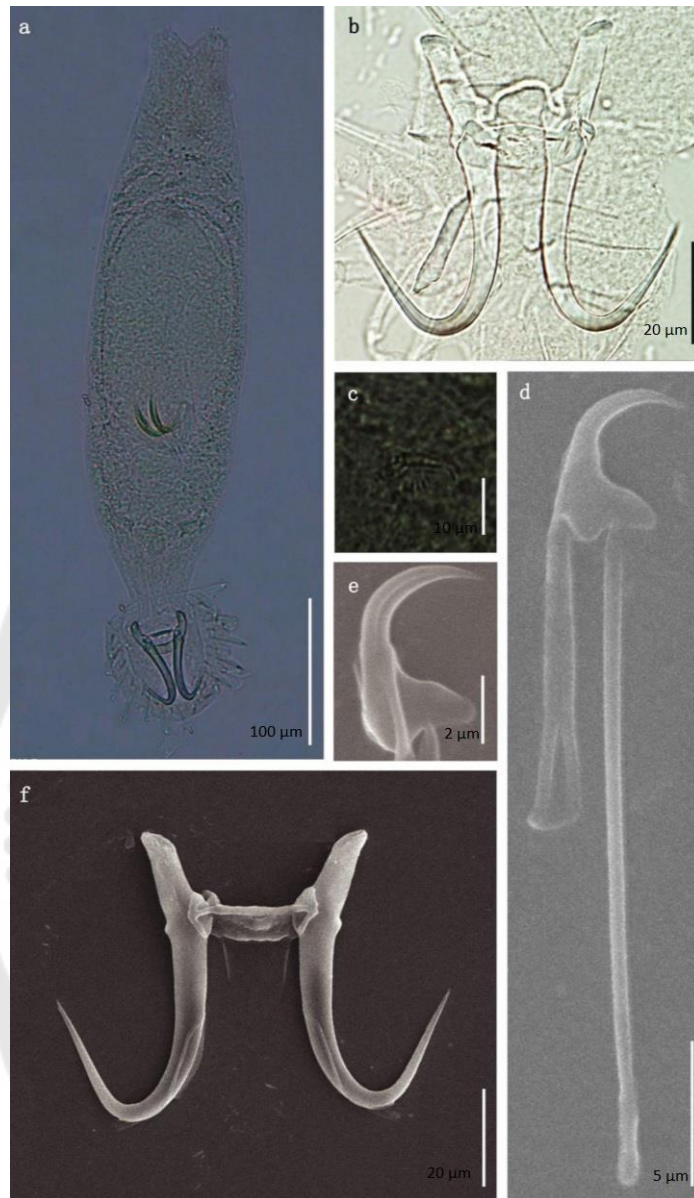
ที่มา: Bakke et al. (2007)



ภาพประกอบ 12 การวัดส่วนประกอบสำคัญของพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus*

A = ส่วนของสหมอ (1 = ความยาวของ main body, 2 = ความยาวของ shaft, 3 = ความยาวของ root, 4 = ความยาวของ point), B = มารู้จึนอด สู้ค (5 = ความยาวของ sickle, 6 = ความยาวของ handle, 7 = ความยาวทั้งหมด) C = เวนทรัล บาร์ (ventral bar) (8 = ความกว้าง, 9 = ความยาวของเวนทรัล บาร์, 10 = ความยาวของเวนทรัล บาร์ เมมเบรน (ventral bar membrane)), D = ดอซอล บาร์ (dorsal bar) (11 = ความกว้าง, 12 = ความยาว),

ที่มา: Ebrahimzadeh et al. (2012)



ภาพประกอบ 13 สัณฐานวิทยาของ *G. kobayashii* ที่พบในปลาทอง (*C. auratus*)
 a = โครงสร้างภายนอกของพยาธิปลิงใส, b และ f = opisthaptoral central hook complex,
 c = โคพูลาทอรี ออร์แกน, d และ e = มาร์จินอล สุก (ภาพ a ขนาด scale bar = 100 µm, ภาพ b
 ขนาด scale bar = 20 µm, ภาพ c ขนาด scale bar = 10 µm, ภาพ d ขนาด scale bar = 5 µm,
 ภาพ e ขนาด scale bar = 2 µm และภาพ f ขนาด scale bar = 20 µm)

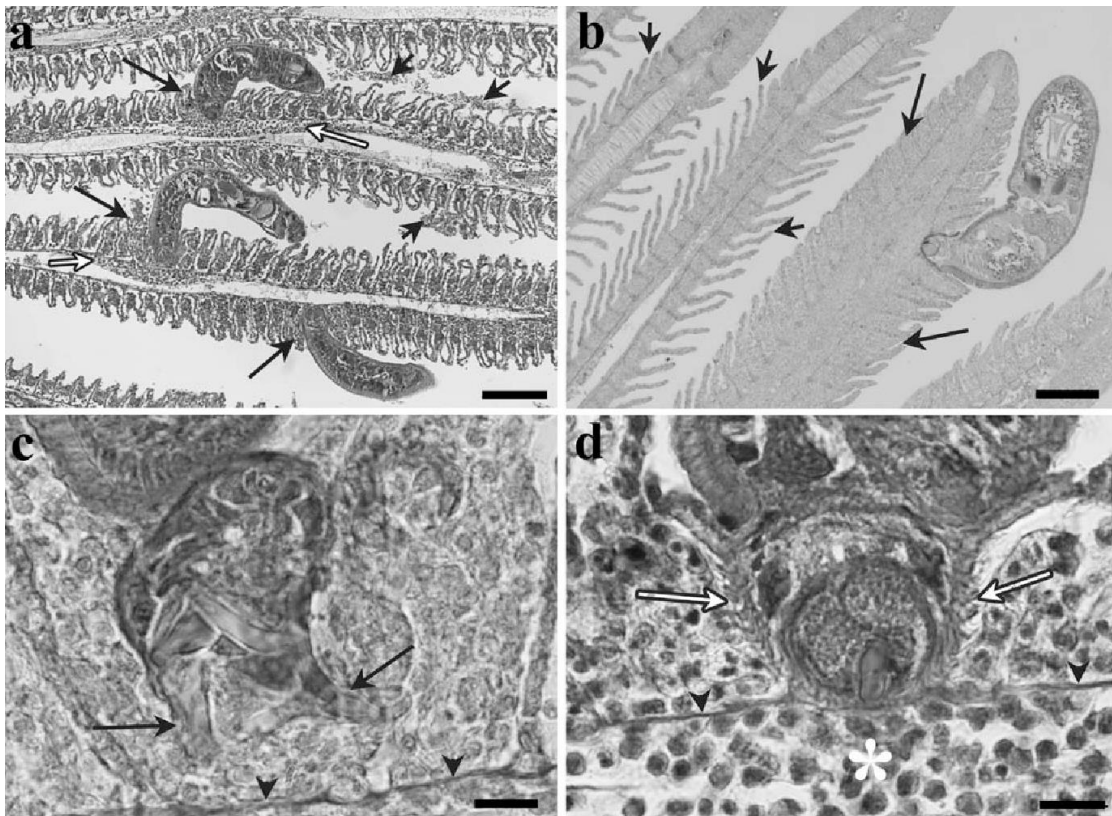
ที่มา: Tu et al. (2015a)

4. พยาธิสภาพของปลาที่ติดพยาธิปลิงใส

4.1 พยาธิสภาพของปลาที่ติดพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*

พยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* มักเข้าเกาะเจ้าบ้านบริเวณเหงือก โดยใช้โอพิสแอสเพเตอร์เกาะเข้าที่เบสเมมเบรน (basement membrane) (ภาพประกอบ 14) (Dezfuli et al., 2007) ทำให้เกิดการระคายเคืองที่เหงือก รวมถึงเกิดการฉีกขาดของเส้นเหงือก ส่งผลให้มีปริมาณของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial hyperplasia) และเซลล์เยื่อบุผิวมีขนาดใหญ่ (hypertrophy) ขึ้น นอกจากนี้ยังพบภาวะเซลล์สลายตัว (cytolysis) และเซลล์ตาย (necrotic cell) รวมอยู่ด้วย ในระดับความรุนแรงน้อยเกิดการบวมของไมโทคอนเดรีย รวมทั้งคริสตี้ เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย กอลจิคอมเพลกซ์และเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมชนิดขรุขระเสื่อม โดยหากเกิดในระดับความรุนแรงมาก จะทำให้ออกแกเนลล์ต่าง ๆ ในเซลล์สลายตัว รวมถึงนิวคลีโอลัส และโครมาทินที่อยู่ภายในนิวเคลียสด้วย (ภาพประกอบ 15) อีกทั้งทำให้กึ่งเหงือก (gill filament) แต่ละกึ่งเชื่อมรวมกันตลอดความยาวของซี่เหงือก (gill arch) มีลักษณะคล้ายกระบอง (clubbed filament) จึงทำให้เกิดภาวะเลือดคั่งในหลอดเลือด (hyperemia) ทั้งในหลอดเลือดฝอยในซี่เหงือกและหลอดเลือดของกึ่งเหงือก จากการเชื่อมรวมกันของกึ่งเหงือก ทำให้พื้นผิวในการแลกเปลี่ยนแก๊สลดลงและการทำงานของซี่เหงือกในด้านการแลกเปลี่ยนแก๊สลดลงไปด้วย

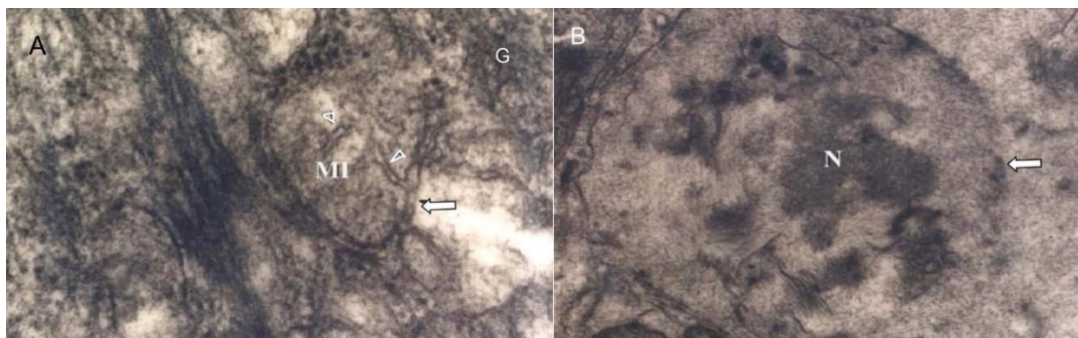
อาจพบเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cell) กระจายไปทั่วบริเวณที่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) มาโครฟาจ (macrophage) และ ทรอมโบไซต์ (thrombocyte) นอกจากนี้ยังพบเซลล์อีโอซิโนฟิลิก แกรนูลาร์ (eosinophilic granular cell) กระจายอยู่ด้วย อีกทั้งพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมือก (goblet cell) (สมาน และคณะ, 2544)



ภาพประกอบ 14 พยาธิสภาพของปลาที่ติดพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*
 a = โอฟิสแซพเตอร์ของพยาธิปลิงใสเกาะบริเวณเหงือก (ลูกศรทึบ) ส่งผลให้เกิดการบวมบริเวณกิ่ง
 เหงือก (ลูกศรโปร่ง) และมีเยื่อบุผิวตกค้างอยู่ใกล้กับพยาธิปลิงใส (ลูกศรสั้น),
 b = บริเวณที่มีการเชื่อมกันของกิ่งเหงือก (ลูกศรสั้น) และบริเวณปกติ (ลูกศรสั้น),
 c = แรงจากการยึดเกาะของโอฟิสแซพเตอร์ที่อยู่ใกล้กับบริเวณเบสเม้นท์เมมเบรน (หัวลูกศร) ด้วย
 สมอ (ลูกศร) ได้เจาะเข้าบริเวณเซลล์เหงือก, d = การยึดเกาะของโอฟิสแซพเตอร์ที่อยู่ใกล้กับบริเวณ
 เบสเม้นท์เมมเบรน (หัวลูกศร) ทำให้กิ่งเหงือกเกิดความเสียหาย (เครื่องหมายดอกจัน)

หมายเหตุ: opisthotal squamodisce เข้าจับ (ลูกศร)

ที่มา: Dezfuli et al. (2007)



ภาพประกอบ 15 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากการติดพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*
 A = การสลายตัวของคริสตี (หัวลูกศร) และเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (ลูกศร) (MI = ไมโทคอนเดรีย),
 B = การสลายตัวของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (หัวลูกศร) และนิวเคลียส (N = นิวเคลียส)

ที่มา: สมาน และคณะ (2544)

4.2 พยาธิสภาพของปลาที่ติดพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus*

พยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* มักเข้าเกาะเจ้าบ้านบริเวณผิวหนังและครีบ ส่งผลให้บริเวณที่มีพยาธิปลิงใสเกาะมีจำนวนเซลล์เยื่อผิวหนังเพิ่มมากขึ้น (epidermal hyperplasia) และเกิดการผลิตเมือกจำนวนมาก มักไปบดบังเซลล์สี (chromophores) ทำให้ผิวหนังดูซีดกว่าปกติ โดยการติดพยาธิปลิงใสอย่างรุนแรงอาจทำให้ปลาเกิดแผลที่ผิวหนังชั้นนอก เนื่องจากสมอฝังลึกในเนื้อเยื่อปลา (Kabata, 1985) ซึ่งพยาธิปลิงใสจะเกาะติดและดูดกินอาหารที่บริเวณผิวหนังชั้นนอก ทำให้เกิดการผลิตเมือกเพิ่มมากขึ้น เมือกส่วนเกินจะรบกวนการทำงานของระบบทางเดินหายใจของผิวหนัง (Ferguson, 1989) (ภาพประกอบ 16)



ภาพประกอบ 16 ผีหนอนของปลาที่ถูกลูกปลาปลิงไส้สกุล *Gyrodactylus* เกาะ

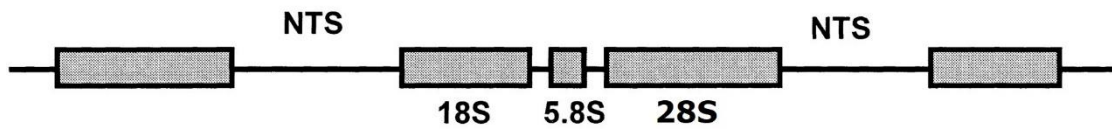
ที่มา: Cone & Odense (1984)

5. การศึกษาทางอณูชีววิทยา

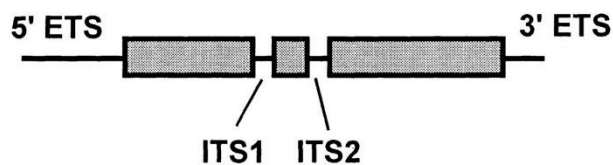
การศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาเพื่อใช้ในการระบุความแตกต่างและจัดจำแนกปรสิต เริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1990 (Wilson, 1991) ซึ่งให้ข้อมูลที่แม่นยำกว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ในปัจจุบันมีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nuclear ribosomal DNA (*nrDNA*) เพื่อมาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกและวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของปรสิตอย่างแพร่หลาย (Matejusova & Cunningham, 2004)

Nuclear ribosomal DNA (*nrDNA*) คือ บริเวณที่จะถอดรหัสเป็น rRNA มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุด (repeat unit) ซึ่งแต่ละหน่วยซ้ำมีส่วนของ nontranscribed spacers (NTS) คั่นกลางอยู่ โดยแต่ละหน่วยซ้ำมีส่วนที่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน (coding region) ได้แก่ 18S, 5.8S และ 28S rDNA และส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัส (non-coding region) ได้แก่ internal transcribed spacer 1 (ITS1) และ internal transcribed spacer 2 (ITS2) โดยการถอดรหัสจะถูกลอดเริ่มจากส่วน external transcribed spacer (ETS), 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 และ 28S rDNA ตามลำดับ (ภาพประกอบ 17) โดยบริเวณ ITS1 และ ITS2 จึงเป็นบริเวณที่มีอัตราการเกิดวิวัฒนาการสูงกว่าเมื่อเทียบกับส่วนที่เป็นยีน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ จึงเหมาะแก่การนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในระดับสกุลและชนิด (Schlotterer et al., 1994)

rDNA



pre-rRNA



ภาพประกอบ 17 โครงสร้างของ rDNA และ pre-rRNA ของยูคาริโอต

ที่มา: ดัดแปลงจาก Brown et al. (1998)

6. การระบุชนิดเชิงโมเลกุลของพยาธิปลิงใส

การจำแนกชนิดของปรสิต สามารถทำได้โดยการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นการศึกษาโครงสร้างและรูปร่างของปรสิตแต่ละชนิด การเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากปรสิตนั้นความรุนแรงของโรคจะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของเชื้อ สำหรับการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของปรสิตนั้นทำได้ค่อนข้างยาก เพราะส่วนใหญ่ยังไม่สามารถเพาะหรือเลี้ยงปรสิตในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ จึงมีความสำคัญต่อการตรวจสอบหาสาเหตุของการเกิดโรค เนื่องจากทำได้รวดเร็วและแม่นยำ (ปณรัตน์, 2552) ในปัจจุบันการระบุชนิดของพยาธิปลิงใสที่พบในปลาชนิดต่าง ๆ ได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาประยุกต์ใช้ร่วมกับการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ดังนี้

Harris & Cable (2000) เลือกใช้บริเวณ ITS1, ITS2 และยีน 5.8S เพื่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการระบุชนิดด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาของพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* ที่พบในปลาหมอสี (*Poecilia caucana*) ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ P3(5'-CGCGAAGCTTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCAA-3') และไพรเมอร์ P4 (5'GTCCGGATCCTCCGCTTATTGATATGC-3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 1,023 คู่เบส จากนั้น Matejusová et al. (2001) เลือกใช้บริเวณ V4 ในยีน 18S, บริเวณ ITS1 และ บริเวณ ITS2 เพื่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการตรวจสอบชนิดของพยาธิปลิงใส สกุล *Gyrodactylus* ที่พบในปลา 5 วงศ์ โดยทดสอบ

ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยบริเวณ V4 มี forward primer คือ V4F (5'-CTATTGGAGGGCAGTCT-3') และ reverse primer คือ V4R(5'-TTTTTCAGGCTTCAAGG-3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 330 คู่เบส ส่วนบริเวณ ITS1 มี forward primer คือ ITS1A (5'-GTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3') และ reverse primer คือ ITS3A (5'-GAGCCGAGTGATCCACC-3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 420-930 คู่เบส และบริเวณ ITS2 มี forward primer คือ ITS4.5 (5'-CATCGGTCTCTCGAACG-3') และ reverse primer คือ ITS2 (5'-TCCGCTTAGTGATATCC-3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 420-520 คู่เบส ซึ่งทั้งสามบริเวณนี้เพียงพอการจำแนกชนิดของพยาธิปลิงใสในสกุล *Gyrodactylus* ต่อมา King & Cone (2009) ได้เลือกใช้บริเวณ ITS1 บริเวณ ITS2 และ ยีน 5.8S เพื่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการระบุชนิดด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาของพยาธิปลิงใสชนิด *G. stephanus* ที่พบในปลามัมมิช็อก (Mummichong) ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TTTCCGTAGGTGAACCT-3') และ ITS2 (5'-TCCTCCGCTTAGTGATA-3'), ITS3A (5'-GAGCCGAGTG ATCCACC-3') และ ITS4.5 (5'-CATCGGTCTCTCGAACG-3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 1,011 คู่เบส หลังจากนั้น Collins et al. (2010) ได้พัฒนาการตรวจสอบชนิดของ *G. salaris* ร่วมกับสกุล *Gyrodactylus* ชนิดอื่น ๆ ที่ติดในปลาแซลมอน ด้วยวิธีการ real-time multiplex PCR โดยเลือกใช้บริเวณ ITS ในการตรวจสอบ ซึ่งในวิธีนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *G. salaris* ที่ก่อโรค และ *G. thymalli* ที่ไม่ก่อโรคได้ แต่วิธีนี้สามารถใช้เป็นวิธีการวินิจฉัยเบื้องต้นก่อนการวิเคราะห์เชิงลึกต่อไป ต่อมา Sharma & Agrawal (2011) เลือกใช้ยีน 18S ยีน 5.8S และบริเวณ ITS1 เพื่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการระบุชนิดด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาของพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* ที่พบในปลาน้ำจืดจากประเทศอินเดีย ทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ S1(5'-ATTCCGATAACGAACGAGACT-3') และ H7 (5'-GCTGCGTTCTTCCATCGATACTCG -3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 1,000-1,500 คู่เบส ต่อมา Tu te al. (2015a) เลือกใช้ยีน 18S ยีน 5.8S บริเวณ ITS1 และ บริเวณ ITS2 เพื่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการระบุชนิดด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาของพยาธิปลิงใสชนิด *G. kobayashii* ที่เกี่ยวข้องกับการตายของปลาทอง จากภาคกลางของประเทศไทย ทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS-1A (5'-GTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3') และ ไพรเมอร์ ITS-2 (5'-TCC TCCGCTTAGTGATA-3')

พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 1,275 คู่เบส ต่อมา Tu et al. (2015b) เลือกใช้ยีน 18S ยีน 5.8S และ บริเวณ ITS1 เพื่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการระบุชนิดด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาของพยาธิปลิงไส้ชนิด *D. formosus* ที่พบครั้งแรกในปลาทอง ครั้งแรกจากภาคกลางของประเทศไทย ทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ S1 (5'- ATTCCGATAACGAACGAGACT -3') และไพรเมอร์ H7 (5'- GCTGCGTTCTTCCATCGATACTCG -3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 1,020 คู่เบส ต่อมา Garcia et al. (2015) นำเทคนิคทางอณูชีววิทยาช่วยในการระบุชนิดพยาธิปลิงไส้สกุล *Gyrodactylus* ทั้ง 8 ชนิด เนื่องจากสัณฐานวิทยาที่มีความใกล้เคียงกันมากในแต่ละชนิด งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้บริเวณ ITS1 บริเวณ ITS2 และยีน 5.8S ทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 A (5'-GTAACAAGTTTTCCGTAGGTG- 3'), ITS2 (5'- TCCTCCGCTTAGTGATA-3'), ITS1-fm (5'- TAGAGGAAGTACAAGTCG-3') และ ITS2-rm (5'-CGCTYGAATCGAGGTCAGGAC-3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 928-1054 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ บริเวณ ITS2 ของทั้ง 8 ชนิดแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประโยชน์และแม่นยำมาก ต่อมา Ling et al. (2016) เลือกใช้ยีน 18S ยีน 5.8S และ บริเวณ ITS1 เพื่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการระบุชนิดด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาของพยาธิปลิงไส้ชนิด *D. vastator* และ *D. intermedius* ในปลาทอง ทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ S1 (5'- ATTCCGATAACGAACGAGACT -3') และไพรเมอร์ H7 (5'- GCTGCGTTCTTCCATCGATACTCG -3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 1,035-1,049 คู่เบส ต่อมา Chaudhary et al. (2016) เลือกใช้ยีน 18S เพื่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับอธิบายข้อมูลทางอณูชีววิทยาของ *Diaphorocleidus armillatus* ที่พบในปลา black tetra จากประเทศอินเดีย ทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ worm A (5'-GCGAATGGCTCATTAATCAG-3') และไพรเมอร์ 1270R (5'- CCGTCAATTCCTTTAAGT-3') และทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่สอง โดยใช้ไพรเมอร์ 930F (5'-GCATGGAATAATGGAATAGG-3') และ Worm B (5'-CTTGTTACGACTTTTACTTCC-3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส หลังจากนั้น Chaudhary et al. (2016) ได้ตรวจสอบชนิดของพยาธิปลิงไส้ที่ถูกนำเข้ามายังประเทศออสเตรเลีย ด้วยวิธีการ nested PCR เลือกใช้ยีน 18S เพื่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในปฏิกิริยาประกอบด้วยไพรเมอร์ Worm A (5'- GCGAATGGCTCATTAATCAG-3') and Worm

B (5'- CTTGTTACGACTTTTACTTCC-3'), 1270R (5'-CCGTCAATTCCTTTAAGT- 3 ') และ 930F (5 '-GCATGGAATAATGGAATAGG-3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 1,035-1768 คู่เบส อีกทั้งยังตรวจสอบด้วยวิธีการ simplex PCR กับแต่ละสกุล โดยในการตรวจสอบใช้ไพรเมอร์ Dact A (5'- GGTGAACCTGCGGAAGGATC - 3') และ Dact B (5'- AGCCGAGTGATCCAGCAC -3') มีเป้าหมายที่ยีนและบริเวณ 18S และ ITS1 ของสกุล *Dactylogyrus* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 366-588 คู่เบส และไพรเมอร์ ITS4.5 (5'- CATCGGTCTCTCGAACG -3') และไพรเมอร์ ITS 2 (5'- TCCTCCGCTTAGTGATA -3') มีเป้าหมายบริเวณ ITS2 ของสกุล *Gyrodactylus* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 464-500 คู่เบส ต่อมา Garcia et al. (2019) อธิบายข้อมูลชนิดใหม่ของสกุล *Gyrodactylus* ด้วยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและทางอณูชีววิทยา งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ยีนและบริเวณ ITS1, ITS2 และ ยีน 5.8S ทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1fm (5'- TAGAGGAAGTACAAGTCG-3'), ITS2rm (5'-CGCTYGAATCGAGGTCAGGAC-3'), ITS4.5 (5'-CATCGGTCTCTCGAACG-3') และ ITS3A (5'-GAGCCGAGTGATCCACC-3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 900-1054 คู่เบส

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการวิจัย

1. การขออนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้สัตว์ทดลองทางวิทยาศาสตร์ ต้องมีการพิจารณาขั้นตอนและวิธีการทดลองในสัตว์ รวมไปถึงวิธีการการุณยฆาต โดยผู้วิจัยได้ทำการขออนุญาตต่อคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยได้เลขที่ขออนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ SWU-A-024-2562

2. การเก็บตัวอย่างปลาทอง

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาทอง (*C. auratus*) โดยทำการสุ่มอย่างง่าย (simple random sampling) (Tizie et al., 2014) จากบ่อดินในฟาร์มปลาทอง จังหวัดราชบุรี 10 ฟาร์ม จำนวนฟาร์มละ 30 ตัวอย่าง ปลาทั้งหมด 300 ตัว นำตัวอย่างปลาที่มีชีวิตมายังห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการถ่ายภาพและวัดขนาดของตัวปลาเพื่อทำการจดบันทึก

3. การตรวจหาพยาธิปลิงใสในตัวอย่างปลาทอง

สลับปลาด้วยน้ำมันกานพลูตามวิธีการของ Javaheri et al. (2012) จากนั้นตรวจสอบตัวอย่างปลาที่เหงือกและผิวหนังลำตัว ตามวิธีของ Noga (2010) โดยใช้กระจกปิดสไลด์ชุดเมือกที่ลำตัวปลา จากนั้นนำตัวอย่างเมือกเกลี่ยลงบนสไลด์ที่มีหยดน้ำแล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ตรวจสอบการติดพยาธิปลิงใสภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope) สำหรับการตรวจสอบการติดพยาธิปลิงใสที่บริเวณเหงือกดำเนินการโดยใช้กรรไกรตัดซี่เหงือก และตรวจสอบการติดพยาธิปลิงใสภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) ทำการจดบันทึกจำนวนและถ่ายภาพพยาธิปลิงใสที่พบ

แยกตัวอย่างพยาธิปลิงใสเพื่อการศึกษาด้านสัณฐานวิทยา ส่วนการศึกษาอนุชีววิทยา ตัวอย่างพยาธิปลิงใสจะเก็บรักษาในหลอดเก็บตัวอย่าง ทำการคงสภาพตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 95% รักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงใส

ศึกษาเบื้องต้นด้วยการทำสไลด์สด (wet mount) เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น จากนั้นศึกษาตามวิธีของ Wong et al. (2016) โดยการหยด 10% SDS ลงบนสไลด์ที่มีตัวอย่างพยาธิปลิงใส จำนวน 1-2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นใช้น้ำยาทาเล็บแบบใสทาบริเวณขอบของแผ่นปิดสไลด์ รอประมาณ 5-10 นาที เพื่อย่อยสลายเนื้อเยื่อรอบลำตัวของ

พยาธิปลิงใส แล้วคงไว้เฉพาะ โคพูลาทอรี ออร์แกน, สมอ, แท่งตามขวาง และมาร์จินอล ฮูด จากนั้นทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจัดจำแนกตามรูปวิธานของ Yamaguti (1963) ร่วมกับประไพศิริ (2538) โดยในสกุล *Dactylogyrus* ทำการวัดขนาดลำตัว, สมอ, แท่งตามขวาง และมาร์จินอล ฮูด ส่วนสกุล *Gyrodactylus* ทำการวัดขนาดลำตัว, สมอ, ดอซอล บาร์, เวทรีล บาร์ และมาร์จินอล ฮูด

5. การศึกษาทางอนุชีววิทยาของพยาธิปลิงใส

5.1 การเตรียมตัวอย่างพยาธิ

ในการศึกษาทางอนุชีววิทยาจำเป็นต้องมีพยาธิปลิงใสที่จะทำการศึกษา และตัวอย่างพยาธิอื่นที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงเพื่อนำมาทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ โดยมีการเตรียมตัวอย่างพยาธิดังต่อไปนี้

ตัวอย่างพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* และปรสิตอื่นๆ ที่พบในปลาทอง เช่น *Argulus foliaceus* และ *Trichodina* sp. สามารถเตรียมตัวอย่างได้จากบริเวณผิวหนัง ในขณะที่พยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และปรสิตอื่นๆ ที่พบในปลาทอง เช่น *Centrocestus formosanus* เก็บตัวอย่างจากบริเวณที่เหียงอก ตามวิธีของ Noga (2010)

5.2 การระบุชนิดเชิงโมเลกุลของพยาธิปลิงใส

1. สกัดดีเอ็นเอของพยาธิปลิงใสจากตัวอย่างที่เตรียมไว้ตามคู่มือของชุดสกัด GF-1 tissue DNA extraction kit (Vivantis company, Malaysia) จากนั้นตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอและปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้เท่ากับที่ความเข้มข้น 2.2 ng/ul แล้วจึงเก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. ยืนยันชนิดของพยาธิปลิงใส โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีน 18S บริเวณ ITS1 และบริเวณ ITS2 เนื่องจากเป็นบริเวณที่ประกอบด้วยทั้งบริเวณอนุรักษ์และบริเวณที่มีความหลากหลายในแต่ละสปีชีส์ (Bakke et al., 2007; Simkova et al., 2014) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

2.1 การยืนยันชนิดของพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* เลือกยีน 18S และบริเวณ ITS1 โดย forward primer คือ S1 (5'- ATCCGATAACGAACGAGACT -3') และ reverse primer คือ H7 (5'- GCTGCGTTCTCCATCGATACTCG -3') (Sinnappah et al., 2001; Sharma, Agrawal, & Kumar, 2011; Ling et al., 2016) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่ควาหวางขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส

2.2 การยืนยันชนิดของพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* เลือกบริเวณ ITS2 โดย forward primer คือ ITS4.5 (5'-CATCGGTCTCTCGAACG-3') และ reverse primer คือ ITS2

(5'-TCCTCCGCTTAGTGATA-3') ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่คาดหวังขนาดประมาณ 420-520 คู่เบส (Matejusova et al., 2001; Trujillo et al., 2018)

3. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใน TBE Buffer จากนั้นส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st BASE Company (Malaysia)

4. นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาปรับตัด (trim) ให้มีความถูกต้องสำหรับใช้ในการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) เพื่อยืนยันชนิดของตัวอย่างพยาธิปลิงใสที่ใช้ในการศึกษา

5. นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาจัดทำแผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้ maximum likelihood โดยกำหนดค่า bootstrap จำนวน 10,000 รอบ ซึ่งพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* เปรียบเทียบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18S และ บริเวณ ITS1 จากไพรเมอร์ S1 และ H7 (Sinnappah et al., 2001; Sharma, Agrawal, & Kumar, 2011; Ling et al., 2016) ส่วนพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* เปรียบเทียบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 จากไพรเมอร์ ITS4.5 และ ITS2 (Matejusova et al., 2001; Trujillo et al., 2018) ด้วยโปรแกรม MEGA-X (Kumar et al., 2008) เพื่อยืนยันการระบุชนิดของพยาธิปลิงใสในแต่ละสกุล

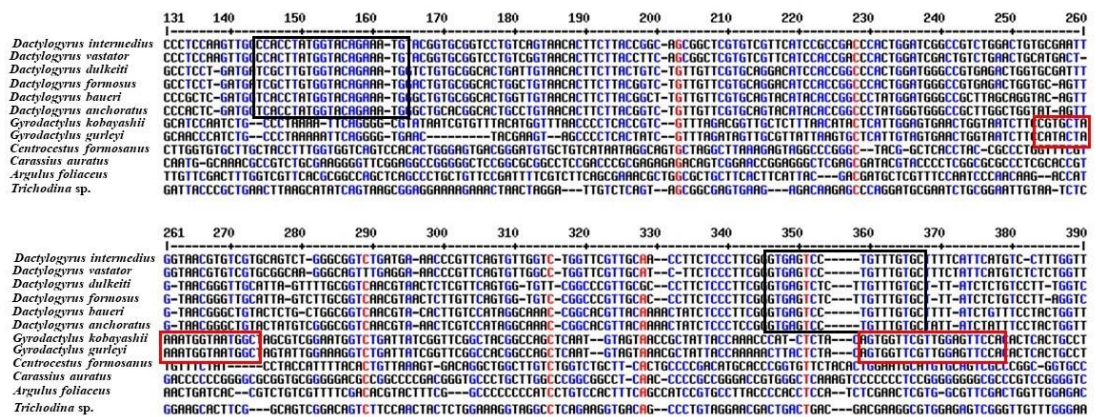
5.3 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และสกุล *Gyrodactylus*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะในระดับสกุลของพยาธิปลิงใสที่พบในปลาทอง 2 สกุล คือ *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* โดยออกแบบจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 จาก Genbank database ของพยาธิปลิงใสที่พบในปลาทองประกอบด้วย *D. anchoratus* (AJ490161), *D. baueri* (MF356248), *D. dulkeiti* (KX369217), *D. formosus* (AJ564135), *D. intermedius* (KC876017), *D. vastator* (KY201104), *G. guryeli* (KC922453) และ *G. kobayashii* (KJ524572) พร้อมทั้งพยาธิชนิดอื่นที่มีการติดร่วมนั้นในปลาทอง เช่น *A. foliaceus* (JQ740818), *Ce. formosanus* (KY075664), *Trichodina* sp. (HQ407392) รวมถึงปลาทอง (MH362747) เพื่อหาบริเวณที่มีความจำเพาะของพยาธิปลิงใสในแต่ละสกุลสำหรับออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม MEGA-X (Kumar et al., 2008) โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

1. ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสกุล *Dactylogyrus* มี forward primer คือ 5'-TCACCTATGGTACAGAAATG-3' และ reverse primer คือ 5'-GCACAAACAGGACTCAC-3' ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 223 คู่เบส

2. ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสกุล *Gyrodactylus* มี forward primer คือ 5'-CGTGCTAAAATGGTAATGGC-3' และ reverse primer คือ 5'-TGGAACTCCAACGAACCAC T-3' ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 117 คู่เบส (ภาพประกอบ 18)

จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบมาตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์ เช่น อุณหภูมิในขั้น annealing, อัตราส่วนระหว่างเบส G และ C, การจับกันเองของไพรเมอร์ โดยใช้ Oligo Analyzer 3.1 (Miles, 2017)



ภาพประกอบ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิปลิงใสในปลาทอง 2 สกุล จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS 1 จำเพาะต่อสกุล *Dactylogyrus* (กรอบสีดำ) และจำเพาะต่อสกุล *Gyrodactylus* (กรอบสีแดง)

5.4 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยาพีซีอาร์

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของคู่ไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิปลิงใสแต่ละสกุล เพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งเป็นการทดสอบ optimal annealing temperature โดยการทำ gradient PCR โดยการปรับอุณหภูมิในขั้น annealing ให้มีความแตกต่างกัน ตั้งแต่ 45-55 องศาเซลเซียส ดังนี้ 45, 45.7, 46.9, 48.8, 51.2, 53.1, 54.3 และ 55 องศาเซลเซียส โดยมี deionized water เป็น negative control

5.5 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์

1. ทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์แต่ละคู่ต่อพยาธิปลิงใสที่พบในปลาทองที่พบจากการศึกษา ได้แก่ *D. anchoratus*, *D. formosus*, *D. intermedius*, *D. vastator*, *G. gurleyi* และ *G. kobayashii* อีกทั้งทดสอบกับพยาธิชนิดอื่นที่มีการติดร่วมกันในปลาทอง เช่น *A.*

foliaceus, *C. Formosanus*, *Trichodina* sp. รวมถึงทดสอบกับเนื้อเยื่อของปลาทอง โดยมี deionized water เป็น negative control

2. ทำการทดสอบความไวของไพรเมอร์ เพื่อหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยทำการเจือจางดีเอ็นเอของพยาธิปลิงใสครั้งละ 2 เท่า (two-fold serial dilutions) ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ $2.2 - 4.2 \times 10^{-3}$ ng/ul

5.6 การพัฒนา multiplex PCR เพื่อการตรวจสอบพยาธิปลิงใส

การทำงานร่วมกันของคู่ไพรเมอร์จำเพาะจากพยาธิปลิงใสทั้งสองสกุลในหนึ่งปฏิกิริยา ต้องมีการทดสอบสภาวะที่เหมาะสม ความจำเพาะ และความไวของคู่ไพรเมอร์ ดังนี้

1. ทดสอบ optimal annealing temperature โดยการทำให้ gradient PCR โดยการปรับอุณหภูมิในขั้น annealing ให้มีความแตกต่างกัน ตั้งแต่ 45-55 องศาเซลเซียส ดังนี้ 45, 45.7, 46.9, 48.8, 51.2, 53.1, 54.3 และ 55 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเข้าทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์และดีเอ็นเอแม่แบบ โดยมี deionized water เป็น negative control

2. ทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อพยาธิปลิงใสที่พบในปลาทอง โดยการทดสอบกับพยาธิชนิดอื่นที่มีการติดร่วมกันในปลาทอง เช่น *Trichodina* sp., *A. foliaceus*, *C. formosanus* รวมถึงทดสอบเนื้อเยื่อของปลาทอง โดยมี deionized water เป็น negative control

3. ทำการทดสอบความไวในการตรวจสอบพยาธิปลิงใสของไพรเมอร์ โดยการใช้ดีเอ็นเอของพยาธิปลิงใสในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพื่อหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของดีเอ็นเอ โดยเจือจางครั้งละ 2 เท่า (two-fold serial dilutions) ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ $2.2 - 4.2 \times 10^{-3}$ ng/ul โดยมี deionized water เป็น negative control

5.7 การตรวจสอบการติด (detection) ของพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ในตัวอย่างปลาทองจากสภาพธรรมชาติ

ตรวจสอบการติดพยาธิปลิงใสในปลาทองจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* โดยทำการขูดเมือกบริเวณลำตัวและครีบ รวมถึงตัดบริเวณเหงือกปลาทอง เพื่อนำมาตรวจสอบการติดพยาธิปลิงใสภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเมือกและเหงือกปลาที่พบการติดพยาธิปลิงใส บริเวณละ 10 ตัวอย่าง นำตัวอย่างทั้งหมดมาสกัดและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์จำเพาะด้วยวิธี multiplex PCR ที่ได้มีการปรับสภาวะที่เหมาะสมตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อก่อนหน้านี้

7. การศึกษาค่าความชุก

การวิเคราะห์ค่าความชุกของพยาธิปลิงใส ทำได้โดยการนำจำนวนพยาธิปลิงใสที่นับได้มาคำนวณหาค่าความชุก ตามวิธีของ Margolis et al. (1982)

$$\text{ค่าความชุก (\%)} = \frac{\text{จำนวนปลาทองที่พบพยาธิปลิงใส (ตัว)}}{\text{จำนวนปลาทองที่ตรวจทั้งหมด (ตัว)}} \times 100$$



บทที่ 4 ผลการศึกษา

4.1 ค่าความชุกของพยาธิปลิงใสที่พบในปลาทอง ในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาจังหวัดราชบุรี

4.1.1 ข้อมูลฟาร์มปลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างปลาทองจากฟาร์มปลาทอง ในจังหวัดราชบุรี 10 ฟาร์ม โดยทำการสุ่มอย่างง่าย (simple random sampling) จากฟาร์มปลาทองในจังหวัดราชบุรีที่มีการเพาะเลี้ยงโดยใช้บ่อดิน จำนวนฟาร์มละ 30 ตัวอย่าง รวมปลาทั้งหมด 300 ตัว ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ตาราง 1 ข้อมูลฟาร์มปลาทองในจังหวัดราชบุรีที่ทำการเก็บตัวอย่าง

ลำดับที่	ชื่อฟาร์ม	ที่อยู่
1	เอกวัฒน์นันทกุล ฟาร์มปลาทอง	ซอย 16 หมู่ 17 ต.ปากแรต อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี 70110
2	ผึ้งหลวงฟาร์ม	เลขที่ 33/1 หมู่ 8 ต.ปากแรต อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี 70110
3	นิวยอร์กฟาร์ม	เลขที่ 49/3 หมู่ 6 ต.ปากแรต อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี 70110
4	สมานฟาร์ม	เลขที่ 73/5 หมู่ 5 ต.ปากแรต อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี 70110
5	น้อยฟาร์ม	เลขที่ 33 หมู่ 8 ต.ปากแรต อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี 70110
6	ธนภัทรฟาร์ม	เลขที่ 73 หมู่ 5 ต.ปากแรต อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี 70110
7	สิทธิกรฟาร์ม	33/2 หมู่ 5 ต.ปากแรต อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี 70110
8	คำมีฟาร์ม	17/1 หมู่ 7 ต.ท่าผา อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี 70110
9	รุ่งมณีชาฟาร์ม	เลขที่ 25/9 ต.ปากแรต อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี 70110
10	มณฑาฟาร์มปลาทอง	เลขที่ 167/2 หมู่ 4 หมู่บ้านข้างคลอง ต.ปากแรต อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี 70110

4.1.2 ค่าความชุกเฉลี่ยรวมของการติดพยาธิปลิงใส

จากการสุ่มตัวอย่างปลาทองรวมทั้งสิ้น 300 ตัว จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาทอง จังหวัดราชบุรีทั้งหมด 10 ฟาร์ม โดยตัวอย่างปลาทองมีความยาวเหยียด (total length) และความกว้าง 4.7-9.8 (6.73 ± 1.10) เซนติเมตร และ 2.0-4.0 (2.69 ± 0.41) เซนติเมตร ตามลำดับ พบการ

ติดพยาธิปลิงใสบริเวณผิวหนังและเหงือกของปลา รวมทั้งสิ้น 2 สกุล ได้แก่ *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* โดยค่าความชุกของการติดพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* เท่ากับร้อยละ 37.67 (113/300) และ 1.00 (3/300) ตามลำดับ ค่าความชุกของการติดพยาธิปลิงใสทั้งสองสกุล (co-infection) เท่ากับร้อยละ 9.67 (29/300)

ตาราง 2 ค่าความชุกของพยาธิปลิงใสที่พบในปลาทอง

พยาธิปลิงใส (สกุล)	จำนวนปลา ทองที่ติด (ตัว)	จำนวนพยาธิ ที่พบทั้งหมด (ตัว)	ค่าความชุก
<i>Dactylogyrus</i>	113	4040	37.67
<i>Gyrodactylus</i>	3	537	1.00
Co-infection	29	-	9.67

4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงใส

4.2.1 *Dactylogyrus vastator*

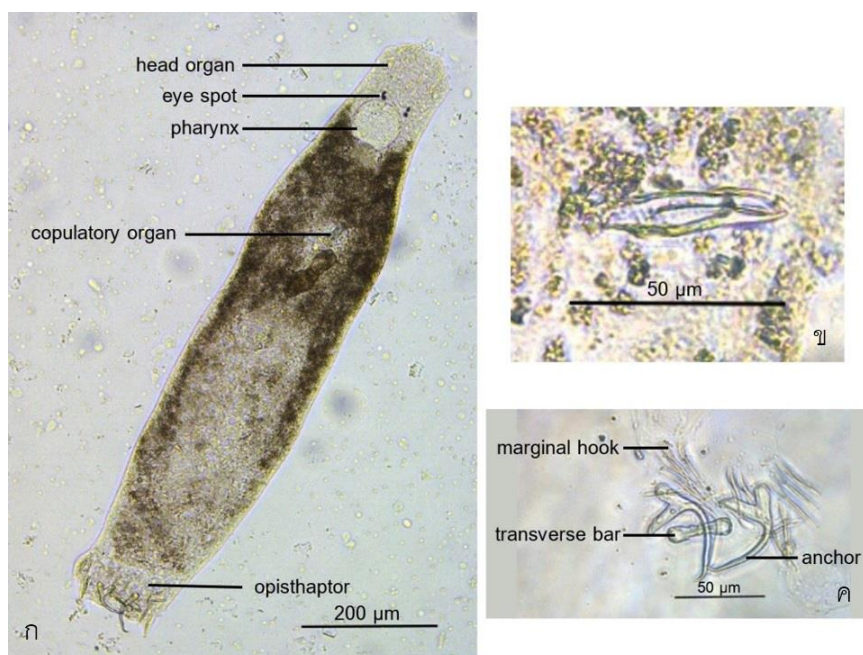
ลักษณะสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีลักษณะบางใส ขนาดความยาวเฉลี่ย 746.29-1260.43 (956.69±198.06) ไมโครเมตร บริเวณส่วนหัวมีจุดตา 2 คู่ ถัดลงมาเป็นคอหอยที่มีลักษณะกลมพัฒนาดี ลำไส้แยกเป็นสองแขนงยาวขนานกับความยาวลำตัว มีโคพูลาทอรี ออร์แกน ลักษณะเรียวยาว โดยปลายด้านหนึ่งเป็นแผ่นทึบ ส่วนปลายอีกด้านคล้ายกลามปู มีขนาด 42.40-61.98 (51.42±6.23) ไมโครเมตร ส่วนท้ายของลำตัวเป็นบริเวณของ opisthaptor มีสมอ 1 คู่ ที่มีขนาด 40.59-46.67 (41.90±2.15) ไมโครเมตร ความยาวของ main body เท่ากับ 42.99-49.52 (45.35±2.26) ไมโครเมตร ความยาวของ inner root เท่ากับ 14.264-20.79 (17.20±2.03) ไมโครเมตร ความยาวของ outer root เท่ากับ 10.09-13.20 (11.41±1.24) ไมโครเมตร ซึ่งปลายของ inner root และ outer root เสมอกัน ความยาวของ point เท่ากับ 5.23-8.482 (6.44±1.27) ไมโครเมตร โดยมีแท่งตามขวาง 1 อัน ลักษณะเว้าเล็กน้อยบริเวณตรงกลางทำหน้าที่ยึดสมอไว้ มีความยาว 7.13-10.07 (8.58±0.93) ไมโครเมตร ความกว้าง เท่ากับ 36.64-41.64 (38.71±1.98) ไมโครเมตร ความยาวกึ่งกลาง เท่ากับ 5.03-7.33 (6.27±0.71) ไมโครเมตร มีมาร์จินอล ฮูด 14 อันอยู่รอบโอพิสแฮพเตอร์ ความยาว

34.78-40.78 (36.97±2.36) ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 19) โดยมีข้อมูลเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น ดังตารางที่ 3

ตาราง 3 ตารางเปรียบเทียบการศึกษาสัณฐานวิทยาของ *D. vastator*

เกณฑ์การวัด (ไมโครเมตร)	การศึกษา ครั้งนี้	Gussev (1985)	Ogawa (1979)	Borisov et al. (2013)	Ling et al. (2016)
ลำตัว	746.29- 1260.43	-	445.00- 1155.00	-	576.92- 1076.92
โคพูลาทอรี	42.40-	40.00-	-	31.00-	37.97-
ออร์แกน	61.98	69.00		49.00	45.30
สมอ					
ความยาว	40.59- 46.67	36.00- 45.00	37.00- 44.00	35.00- 45.00	30.41- 36.26
main body	42.99- 49.52	49.00- 65.00	40.00- 45.00	46.00- 55.00	30.34- 35.92
inner root	14.264- 20.79	16.00- 25.00	17.00- 21.00	13.00- 27.00	15.93- 20.05
outer root	10.09- 13.20	9.00-15.00 34.00-	10.00- 12.00	5.00-13.00 33.00-	9.34-12.38 13.19-
point	5.23-8.482	40.00	4.00-6.50	36.00	16.96
แท่งตามขวาง					
ความยาว	7.13-10.07	5.00-9.00	-	5.00-9.00	6.54-9.66
ความกว้าง	36.64- 41.64	35.00- 44.00	31.00- 39.00	31.00- 39.00	32.97- 42.11
ความยาว กึ่งกลาง	5.03-7.33	-	-	-	5.38-8.24
มาร์จินอล สุก					
ความยาว	34.78- 40.78	25.00- 45.00	25.00- 40.00	24.00- 36.00	30.22- 36.84



ภาพประกอบ 19 ลักษณะทั่วไปของ *Dactylogyrus vastator*
 ก = โครงสร้างภายนอกของพยาธิปลิงใส, ข = โคพูลาทอรี ออร์แกน,
 และค = โอฟิสแซพเตอร์ (ภาพ ก ขนาด scale bar = 200 μm
 และภาพ ข และ ค ขนาด scale bar = 50 μm)

4.2.2 *Dactylogyrus intermidius*

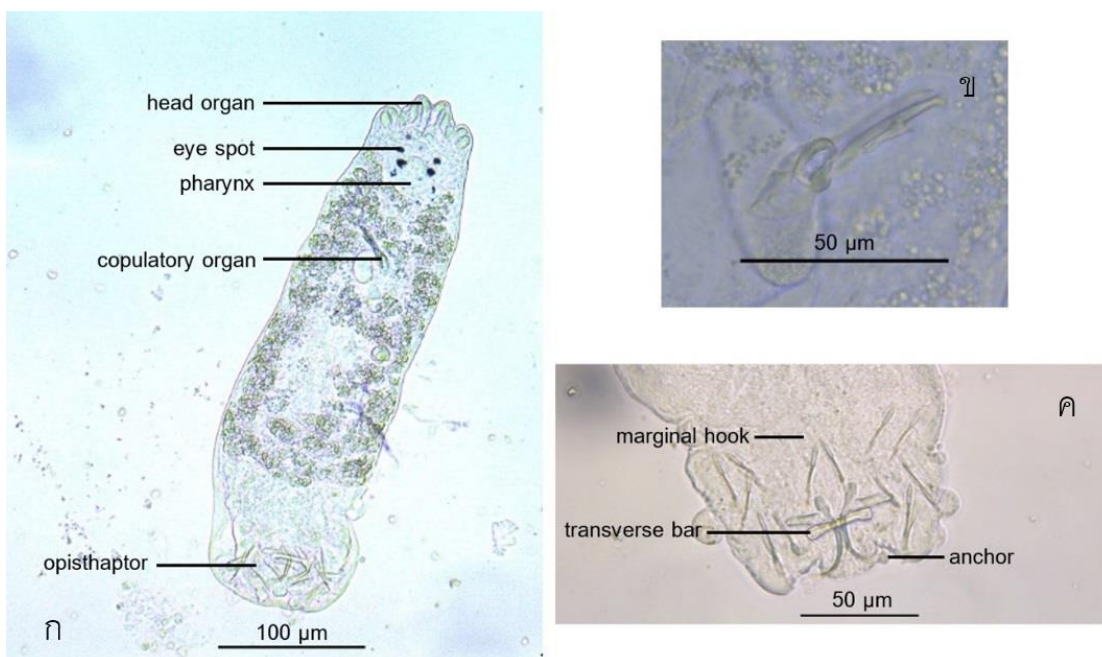
ลักษณะสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีลักษณะบางใส ขนาดความยาวเฉลี่ย 483.95-788.99 (637.61 ± 112.55) ไมโครเมตร บริเวณส่วนหัวมีจุดตา 2 คู่ ถัดลงมาเป็นคอคอหอยที่มีลักษณะกลมพัฒนาดี ลำไส้แยกเป็นสองแขนงยาวขนานกับความยาวลำตัว มีโคพูลาทอรี ออร์แกน มีลักษณะเรียวยาว โดยปลายด้านหนึ่งเป็นแผ่นคล้ายวงรี ส่วนปลายอีกด้านเป็น 2 แฉก มีขนาด 45.81-58.28 (52.93 ± 3.81) ไมโครเมตร ส่วนท้ายของลำตัวเป็นบริเวณของโอฟิสแซพเตอร์ มีสมอ 1 คู่ ที่มีขนาด 24.93-29.86 (27.52 ± 1.62) ไมโครเมตร ความยาวของ main body เท่ากับ 22.37-26.89 (24.06 ± 1.46) ไมโครเมตร ความยาวของ inner root เท่ากับ 10.78-14.77 (13.46 ± 1.51) ไมโครเมตร ความยาวของ outer root เท่ากับ 3.94-7.27 (5.66 ± 1.25) ไมโครเมตร ซึ่งปลายของ inner root ยาวกว่า outer root ความยาวของ point เท่ากับ 6.95-12.44 (9.42 ± 2.07) ไมโครเมตร มีแท่งตามขวาง 1 อันลักษณะเว้าเล็กน้อยบริเวณตรงกลางทำหน้าที่ยึดสมอไว้ โดยมีความยาว 4.54-6.73 (5.70 ± 0.68) ไมโครเมตร ความกว้าง เท่ากับ 25.90-28.56 (27.29 ± 1.02) ไมโครเมตร ความยาว

กึ่งกลาง เท่ากับ 2.27-4.40 (3.37 ± 0.66) ไมโครเมตร มีมาร์จินอล สูด 14 อันอยู่รอบโอพิสแฮพเตอร์ ความยาว 25.90-32.56 (29.35 ± 2.37) ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 20) โดยมีข้อมูลเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น ดังตารางที่ 4

ตาราง 4 ตารางเปรียบเทียบการศึกษาสัณฐานวิทยาของ *D. intermedius*

เกณฑ์การวัด (ไมโครเมตร)	การศึกษา ครั้งนี้	Ogawa (1979)	Gussev (1985)	Borisov et al. (2013)	Ling et al. (2016)
ลำตัว	483.95-	375.00-	-	-	388.46-
	788.99	1380.00			800.00
โคพูลาทอรี	45.81-	-	33.00-	20.00-42.00	32.79-42.73
ออร์แกน	58.28		60.00		
สมอ					
ความยาว	24.93-	23.00-	23.00-	16.00-25.00	21.28-28.97
	29.86	30.00	31.00	18.00-28.00	19.26-28.32
main body	22.37-	22.00-	23.00-	9.00-14.00	11.72-15.29
	26.89	28.00	31.00	2.00-6.00	3.85-6.76
inner root	10.78-	12.00-	9.00-15.00	11.00-17.00	8.70-12.45
	14.77	17.00	3.00-5.00		
outer root point	3.94-7.27	4.50-6.00	7.00-11.00	-	
	6.95-12.44	7.00-11.00		-	
แทงตามขวาง					
ความยาว	4.54-6.73	-	3.00-4.00	2.00-3.00	4.13-6.98
ความกว้าง	25.90-	3.00-29.00	23.00-	14.00-24.00	22.67-30.00
	28.56		30.00		
ความยาว กึ่งกลาง	2.27-4.40	-	-	-	2.64-4.58
มาร์จินอล สูด					
ความยาว	25.90-	21.00-	15.00-	17.00-27.00	19.83-32.23
	32.56	43.00	37.00		



ภาพประกอบ 20 ลักษณะทั่วไปของ *Dactylogyrus intermedius*

ก = โครงสร้างภายนอกของพยาธิปลิงใส, ข = โคพูลาทอรี ออร์แกน,

และค = โอฟิสแซพเตอร์ (ภาพ ก ขนาด scale bar = 100 µm

และภาพ ข และ ค ขนาด scale bar = 50 µm)

4.2.3 *Dactylogyrus formosus*

ลักษณะสัณฐานวิทยา

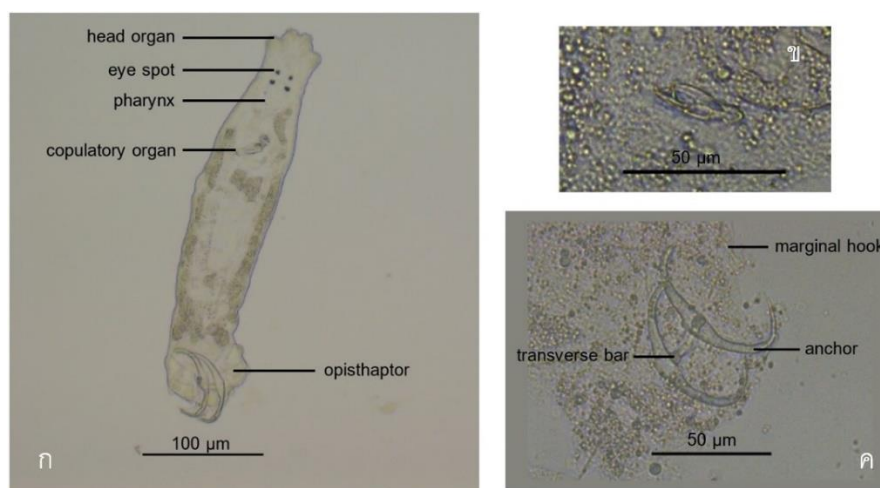
ลำตัวมีลักษณะบางใส ขนาดความยาวเฉลี่ย 295.46-428.57 (362.01 ± 94.13) ไมโครเมตร บริเวณส่วนหัวมีจุดตา 2 คู่ ถัดลงมาเป็นคอหอยที่มีลักษณะกลมพัฒนาดี ลำไส้แยกเป็นสองแขนงยาวขนานกับความยาวลำตัว มีโคพูลาทอรี ออร์แกน รูปร่างค่อนข้างรี โดยปลายด้านหนึ่งลักษณะเป็นแผ่น ส่วนปลายอีกด้านลักษณะเป็นแฉก มีขนาด 27.27-30.51 (28.89 ± 2.29) ไมโครเมตร ส่วนท้ายของลำตัวเป็นบริเวณของโอฟิสแซพเตอร์ มีสมอ 1 คู่ ที่มีขนาด 57.65-59.09 (58.37 ± 1.02) ไมโครเมตร ความยาวของ main body เท่ากับ 36.36-39.48 (37.92 ± 2.20) ไมโครเมตร ความยาวของ inner root เท่ากับ 29.38-31.82 (30.60 ± 1.73) ไมโครเมตร ความยาวของ outer root เท่ากับ 1.14-1.46 (1.30 ± 0.23) ไมโครเมตร ซึ่ง outer root สั้นกว่า inner root มาก ความยาวของ point เท่ากับ 18.18-18.25 (18.22 ± 0.05) ไมโครเมตร มีแท่งตามขวาง 1 อัน ลักษณะโค้งตรงกลางเล็กน้อยทำหน้าที่ยึดสมอไว้ โดยมีความยาว 4.98-6.44 (5.71 ± 1.03) ไมโครเมตร ความกว้าง เท่ากับ 19.86-21.93 (20.89 ± 1.46) ไมโครเมตร ความยาวกึ่งกลาง เท่ากับ

2.05-2.29 (2.17±0.17) ไมโครเมตร มีมาร์จิ้นอล สุก 14 อันอยู่รอบโอพิสแฮพเตอร์ ความยาว 30.21-31.55 (30.88±0.95) ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 21) โดยมีข้อมูลเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น ดังตารางที่ 5

ตาราง 5 ตารางเปรียบเทียบการศึกษาสัณฐานวิทยาของ *D. formosus*

เกณฑ์การวัด (ไมโครเมตร)	การศึกษา ครั้งนี้	Ogawa (1979)	Gussev (1985)	Borisov et al. (2013)	Tu et al. (2015a)
ลำตัว	295.46-	240.00-	-	-	283.50-
	428.57	496.00			444.90
โคพูลาทอรี ออร์แกน	27.27-	-	25.00-	18.00-31.00	22.90-28.90
	30.51		32.00		
สมอ					
ความยาว	57.65-	47.00-	60.00-	46.00-55.00	43.70-57.10
	59.09	60.00	74.00		
main body	36.36-	31.00-	-	-	27.60-39.00
	39.48	39.00			
inner root	29.38-	24.00-	30.00-	16.00-31.00	24.20-31.60
	31.82	31.00	35.00		
outer root point	1.14-1.46	1.00-2.00	-	-	-
	18.18-	14.00-	18.00-	13.00-16.00	14.80-18.70
	18.25	18.00	22.00		
แทงตามขวาง					
ความยาว	4.98-6.44	-	3.00-5.00	2.00-4.00	7.80-9.60
ความกว้าง	19.86-	16.00-	14.00-	13.00-20.00	16.10-19.20
	21.93	23.00	25.00		
ความยาว กึ่งกลาง	2.05-2.29	-	-	-	3.0-5.10
มาร์จิ้นอล สุก					

เกณฑ์การวัด (ไมโครเมตร)	การศึกษา ครั้งนี้	Ogawa (1979)	Gussev (1985)	Borisov et al. (2013)	Tu et al. (2015a)
ความยาว	30.21- 31.55	10.00- 27.00	12.00- 30.00	14.00-24.00	18.0-28.7



ภาพประกอบ 21 ลักษณะทั่วไปของ *Dactylogyrus formosus*
 ก = โครงสร้างภายนอกของพยาธิปลิงใส, ข = โคพูลาทอรี ออร์แกน,
 และค = โอฟิสแซพเตอร์ (ภาพ ก ขนาด scale bar = 100 μ m
 และภาพ ข และ ค ขนาด scale bar = 50 μ m)

4.2.4 *Dactylogyrus anchoratus*

ลักษณะสัณฐานวิทยา

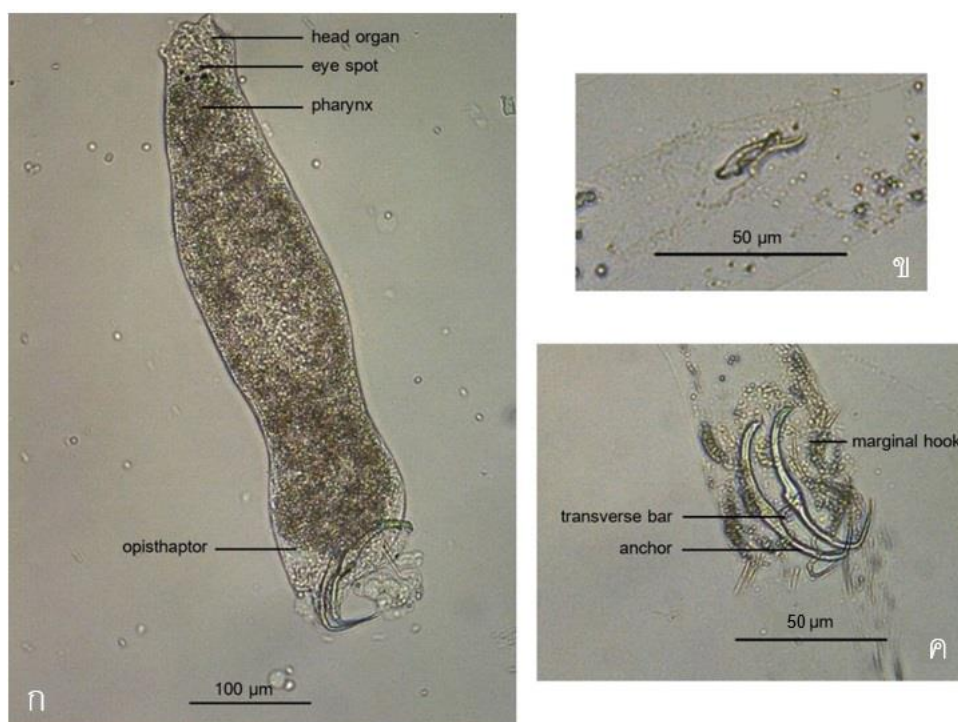
ลำตัวมีลักษณะบางใส ขนาดความยาวเฉลี่ย 486.32-552.34 (519.33 \pm 46.68) ไมโครเมตร บริเวณส่วนหัวมีจุดตา 2 คู่ ถัดลงมาเป็นคอคอหอยที่มีลักษณะกลมพัฒนาดี ลำไส้แยกเป็นสองแขนงยาวขนานกับความยาวลำตัว มีโคพูลาทอรี ออร์แกนมีลักษณะเรียวยาว โดยปลายด้านหนึ่งเป็นแผ่นคล้ายสามเหลี่ยม ส่วนปลายอีกด้านเป็น 2 แฉก มีขนาด 25.94-28.65 (27.30 \pm 1.91) ไมโครเมตร ส่วนท้ายของลำตัวเป็นบริเวณของโอฟิสแซพเตอร์ มีสมอ 1 คู่ ที่มีขนาด 105.12-105.58 (105.35 \pm 0.33) ไมโครเมตร ความยาวของ main body เท่ากับ 61.68-62.45 (62.06 \pm 0.54) ไมโครเมตร ความยาวของ inner root เท่ากับ 57.03-60.41 (58.72 \pm 0.16) ไมโครเมตร ความยาวของ outer root เท่ากับ 2.13-2.36 (2.24 \pm 0.16) ไมโครเมตร ซึ่ง outer root สั้นกว่า inner root มาก ความยาวของ point เท่ากับ 31.76-31.82 (31.79 \pm 0.04) ไมโครเมตร มี

แท่งตามขวาง 1 อันลักษณะคล้ายกระดูกทำหน้าที่ยึดสมอไว้ โดยมีความยาว 4.98-6.44 (5.71±1.03) ไมโครเมตร ความกว้าง เท่ากับ 19.86-21.93 (20.89±1.46) ไมโครเมตร ความยาว กึ่งกลาง เท่ากับ 2.05-2.29 (2.17±0.17) ไมโครเมตร มีมาร์จิ้นอล ฮูด 14 อันอยู่รอบโอพิสแฮพ เตอร์ ความยาว 30.21-31.55 (30.88±0.95) ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 22) โดยมีข้อมูล เปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น ดังตารางที่ 6

ตาราง 6 ตารางเปรียบเทียบการศึกษาสัณฐานวิทยาของ *D. anchoratus*

เกณฑ์การวัด (ไมโครเมตร)	การศึกษา ครั้งนี้	Ogawa (1979)	Gussev (1985)	Borisov et al. (2013)	Chaudhary et al. (2017)	
ลำตัว	486.32-	345.00-	-	-	335.00-	
	552.34	465.00			345.00	
โคพูลาทอรี ออร์แกน	25.94-	-	20.00-36.00	13.00-22.00		
	28.65					
สมอ	ความยาว	105.12-	88.00-	92.00-	79.00-110.00	112.00-
		105.58	103.00	130.00		116.00
	main body	61.68-	49.00-	-	-	41.50-46.50
		62.45	59.00	43.00-70.00		
	inner root	57.03-	50.00-	-	49.00-63.00	48.70-52.00
		60.41	66.00			
	outer root	2.13-.236	1.00-2.00	24.00-32.00	-	-
	point	31.76-	25.00-	-	16.00-22.00	23.00-27.00
		31.82	30.00			
	แท่งตามขวาง	ความยาว	4.98-6.44	-	5.00-8.00	2.00-5.00
ความกว้าง		19.86-	16.00-	18.00-29.00	14.00-17.00	24.50-25.00
		21.93	22.00			
ความยาว กึ่งกลาง		2.05-2.29	-	-	-	-

เกณฑ์การวัด (ไมโครเมตร)	การศึกษา ครั้งนี้	Ogawa (1979)	Gussev (1985)	Borisov et al. (2013)	Chaudhary et al. (2017)
มารจिनอล ฮูด					
ความยาว	30.21- 31.55	12.00- 27.00	14.00-35.00	14.00-22.00	22.5-27.00



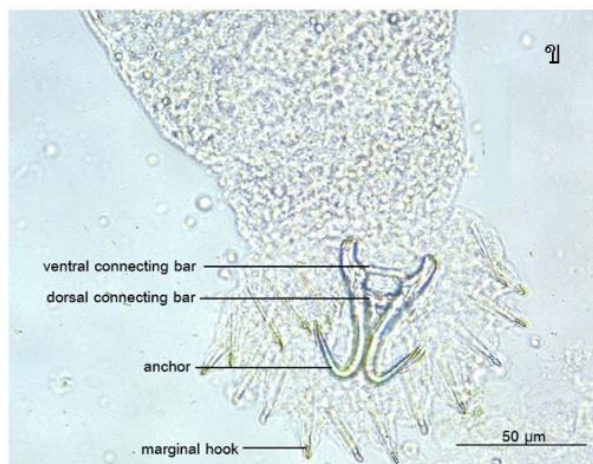
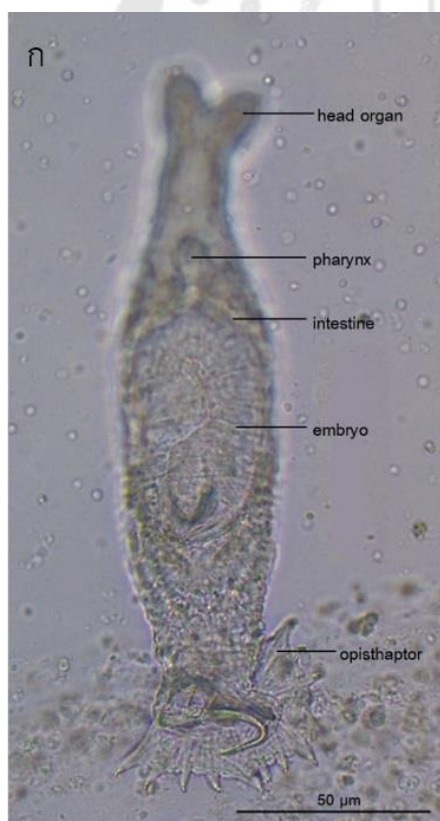
ภาพประกอบ 22 ลักษณะทั่วไปของ *Dactylogyrus anchoratus*
 ก = โครงสร้างภายนอกของพยาธิปลิงใส, ข = โคพูลาทอรี ออร์แกน,
 และค = โอพิสแทพเตอร์ (ภาพ ก และ ค ขนาด scale bar = 100 µm
 และภาพ ข ขนาด scale bar = 50 µm)

4.2.5 *Gyrodactylus gurleyi*

ลักษณะสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีลักษณะบางใส ขนาดความยาวลำตัวเฉลี่ย 229.50-588.82 (399.86±106.26) ไมโครเมตร บริเวณปลายหน้าสุดของลำตัวแยกเป็น 2 แฉก มีอวัยวะส่วนหัว 1 คู่พัฒนาดี ไม่มีจุดตา ถัดลงมาเป็นคอหอยมีลักษณะกลมหนา หลอดอาหารสั้นมาก ลำไส้แยกเป็น

2 แขนง ยาวขนานกับความยาวลำตัว มีตัวอ่อนพัฒนาอยู่ภายในลำตัว ส่วนท้ายของลำตัวเป็นบริเวณของโอพิสแธเตอร์ มีสมอ 1 คู่ ที่มีขนาด 52.58-58.76 (55.70±2.50) ไมโครเมตร ความยาวของ shaft เท่ากับ 39.48-45.72 (42.70±2.10) ไมโครเมตร ความยาวของ root เท่ากับ 11.73-18.43 (14.97±2.58) ไมโครเมตร ความยาวของ point เท่ากับ 20.06-27.65 (24.40±2.60) ไมโครเมตร โดยมีแท่งตามขวาง 2 อันยึดสมอไว้ ได้แก่ ดอซอล บาร์ที่มีความกว้าง เท่ากับ 2.05-2.78 (2.39±0.26) ไมโครเมตร ความยาว เท่ากับ 18.06-28.26 (2.24±0.22) ไมโครเมตร และ เวนทรัล บาร์ที่มีความกว้าง เท่ากับ 4.71-6.73 (5.43±0.77) ไมโครเมตร ความยาว เท่ากับ 20.02-24.14 (21.74±1.61) ไมโครเมตร ความยาวของ เวนทรัล บาร์ เมมเบรน เท่ากับ 13.95-16.70 (15.20±1.18) ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังมีมาร์จินอล ฮุค 16 อัน อยู่รอบโอพิสแธเตอร์ ความยาว เท่ากับ 26.33-32.31 (28.57±1.81) ไมโครเมตร มี sickle ที่ปลายด้านหนึ่งยาวเกินขอบปลาย อีกด้านหนึ่งมีความยาว เท่ากับ 4.69-7.37 (5.63±0.91) ไมโครเมตร และความยาวของ handle เท่ากับ 21.52-25.58 (22.92±1.51) ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 23)



ภาพประกอบ 20 ลักษณะทั่วไปของ *Gyrodactylus gurleyi*

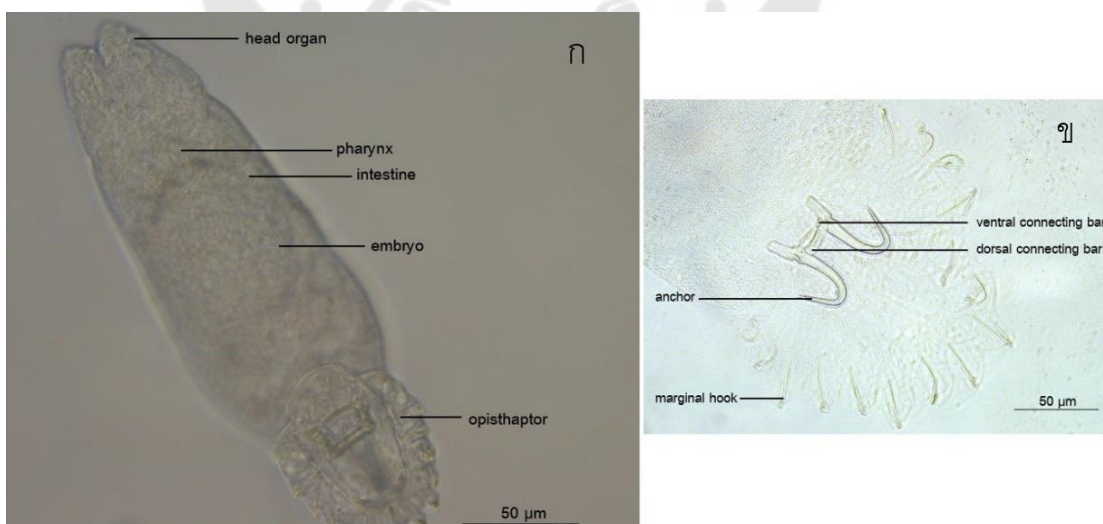
ก = โครงสร้างภายนอกของพยาธิปลิงใส และ ข = โอพิสแธเตอร์

(ภาพ ก และ ข ขนาด scale bar = 50 μm)

4.2.6 *Gyrodactylus kobayashii*

ลักษณะสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีลักษณะบางใส ขนาดความยาวลำตัวเฉลี่ย 270.92-519.73.73 (396.84±86.06) ไมโครเมตร บริเวณปลายหน้าสุดของลำตัวแยกเป็น 2 แฉก มีอวัยวะส่วนหัว 1 คู่ พัฒนาการ ไม่มีจุดตา ถัดลงมาเป็นคอหอยมีลักษณะกลมหนา หลอดอาหารสั้นมาก ลำไส้แยกเป็น 2 แขนง ยาวขนานกับความยาวลำตัว มีตัวอ่อนพัฒนาอยู่ภายในลำตัว ส่วนท้ายของลำตัวเป็นบริเวณของโอพิสแชนเตอร์ มีสมอ 1 คู่ ที่มีขนาด 42.43-59.26 (56.30±5.65) ไมโครเมตร ความยาวของ shaft เท่ากับ 44.13-47.47 (46.53±1.30) ไมโครเมตร ความยาวของ root เท่ากับ 15.06-19.89 (17.62±1.60) ไมโครเมตร ความยาวของ point เท่ากับ 23.37-32.06 (28.56±2.78) ไมโครเมตร โดยมี แท่งตามขวาง 2 อันยึดสมอไว้ ได้แก่ ดอซอล บาร์ที่มีความกว้าง เท่ากับ 1.78-2.36 (1.94±0.21) ไมโครเมตร ความยาว เท่ากับ 18.88-23.87 (22.23±1.84) ไมโครเมตร และ เวนทรัล บาร์ที่มีความกว้าง เท่ากับ 4.42-6.73 (5.99±0.74) ไมโครเมตร ความยาว เท่ากับ 4.43-6.73 (5.99±0.74) ไมโครเมตร ความยาวของ เวนทรัล บาร์ เมมเบรน เท่ากับ 9.78-18.33 (15.05±3.01) ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังมีมาร์จินอล ฮุค 16 อันอยู่รอบโอพิสแชนเตอร์ ความยาว เท่ากับ 28.49-31.67 (29.73±1.13) ไมโครเมตร มี sickle ตั้งฉากกับฐาน handle ซึ่งมีความยาว เท่ากับ 4.97-7.95 (5.63±0.91) ไมโครเมตร และความยาวของ handle เท่ากับ 22.28-25.32 (23.81±1.28) ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 24)



ภาพประกอบ 21 ลักษณะทั่วไปของ *Gyrodactylus kobayashii*

ก = โครงสร้างภายนอกของพยาธิปลิงใส และ ข = โอพิสแชนเตอร์

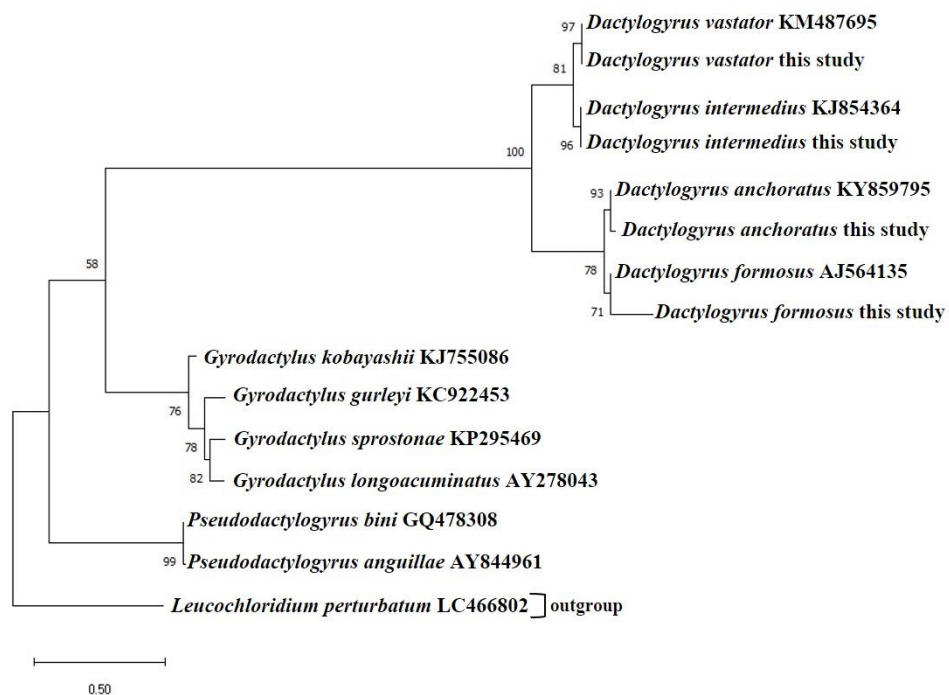
(ภาพ ก และ ข ขนาด scale bar = 50 μm)

4.3 การศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา

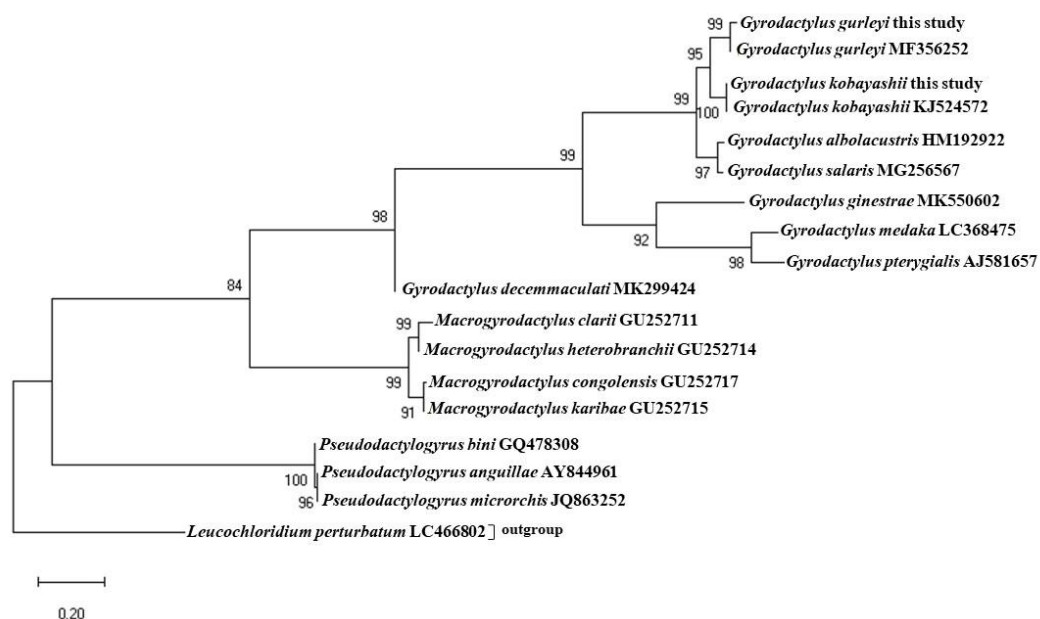
จากการตรวจสอบเพื่อยืนยันชนิดของพยาธิปลิงสี่ที่พบในปลาทองด้วยการสกัดสารพันธุกรรมแล้วนำมาระบุอัตลักษณ์เชิงโมเลกุล โดยทำการระบุชนิดพยาธิปลิงสี่สกุล *Dactylogyrus* 4 ชนิด ได้แก่ *D. anchoratus*, *D. formosus*, *D. intermedius* และ *D. vastator* โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะประกอบด้วย forward primer คือ S1 (5'-ATTCCGATAACGAACGAGACT-3') และ reverse primer คือ H7 (5'-GCTGCGTTCTCCATCGATACTCG-3') จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าแสดงผลบวกและให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาด 988, 1024, 856 และ 1016 คู่เบสตามลำดับ จากนั้นทำการเปรียบเทียบ (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้อมูลที่ได้ บนฐานข้อมูลเอ็นซีบีไอ (NCBI database) พบว่า มีความคล้ายคลึง *D. anchoratus* อยู่ในช่วงร้อยละ 99.14-98.44 คล้ายคลึง *D. formosus* อยู่ในช่วงร้อยละ 94.91-94.77 ตามลำดับ คล้ายคลึง *D. intermedius* อยู่ในช่วงร้อยละ 93.77-93.07 และคล้ายคลึง *D. vastator* อยู่ในช่วงร้อยละ 99.49-95.36 ส่วนพยาธิปลิงสี่สกุล *Gyrodactylus* ที่พบทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ *G. gurleyi* และ *G. kobayashii* ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะประกอบด้วย forward primer คือ ITS4.5 (5'-CATCGGTCTCTCGAACG-3') และ reverse primer คือ ITS2 (5'-TCCTCCGCTTAGTGATA-3') จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าแสดงผลบวกและให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาด 523 และ 532 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นทำการเปรียบเทียบ (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้อมูลที่ได้ บนฐานข้อมูลเอ็นซีบีไอ (NCBI database) พบว่า มีความคล้ายคลึง *G. gurleyi* อยู่ในช่วงร้อยละ 96.49-95.33 และ มีความคล้ายคลึง *G. kobayashii* อยู่ในช่วงร้อยละ 99.62-99.58 ตามลำดับ

สอดคล้องกับข้อมูลที่วิเคราะห์จากจากแผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการ โดยแผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการที่ใช้ในการเปรียบเทียบพยาธิปลิงสี่ชนิด *D. vastator* สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18S และ บริเวณ ITS1 วิเคราะห์ร่วมกับพยาธิปลิงสี่ในสกุลอื่น โดยมี *Leucochloridium perturbatum* เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) วิเคราะห์ด้วย maximum likelihood ที่ 10,000 รอบ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิปลิงสี่ชนิด *D. vastator* ในการศึกษาครั้งนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *D. vastator* (KM487695) โดยมีค่า bootstrap value อยู่ที่ 97 พยาธิปลิงสี่ชนิด *D. intermedius* ในการศึกษาครั้งนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *D. intermedius* (KJ854364) โดยมีค่า bootstrap value อยู่ที่ 96 พยาธิปลิงสี่ชนิด *D. anchoratus*

ในการศึกษาครั้งนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *D. anchoratus* (KY859795) โดยมีค่า bootstrap value อยู่ที่ 93 พยาธิปลิงใสชนิด *D. formosus* ในการศึกษาครั้งนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *D. formosus* (AJ564135) โดยมีค่า bootstrap value อยู่ที่ 71 อีกทั้งพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* แยกออกจากพยาธิปลิงใสสกุลอื่น ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จากศึกษาเป็นพยาธิปลิงใสชนิด *D. Vastator*, *D. intermedius*, *D. anchoratus* และ *D. formosus* ตามลำดับ (ภาพประกอบ 25) ส่วนแผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการที่ใช้ในการเปรียบเทียบพยาธิปลิงใสชนิด *G. gurleyi* และ *G. kobayashii* สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ร่วมกับพยาธิปลิงใสในสกุลอื่น โดยมี *L. perturbatum* เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม วิเคราะห์ด้วย maximum likelihood ที่ 10,000 รอบ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิปลิงใสชนิด *G. gurleyi* ในการศึกษาครั้งนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *G. gurleyi* (MF356252) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิปลิงใสชนิด *G. kobayashii* ในการศึกษาครั้งนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *G. kobayashii* (KJ524572) โดยมีค่า bootstrap value อยู่ที่ 99 และ 100 ตามลำดับ อีกทั้งพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* แยกออกจากพยาธิปลิงใสสกุลอื่น ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จากศึกษาเป็นพยาธิปลิงใสชนิด *G. gurleyi* และ *G. kobayashii* ตามลำดับ (ภาพประกอบ 26)



ภาพประกอบ 22 แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการของพยาธิปลิงใสที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18S และ บริเวณ ITS1



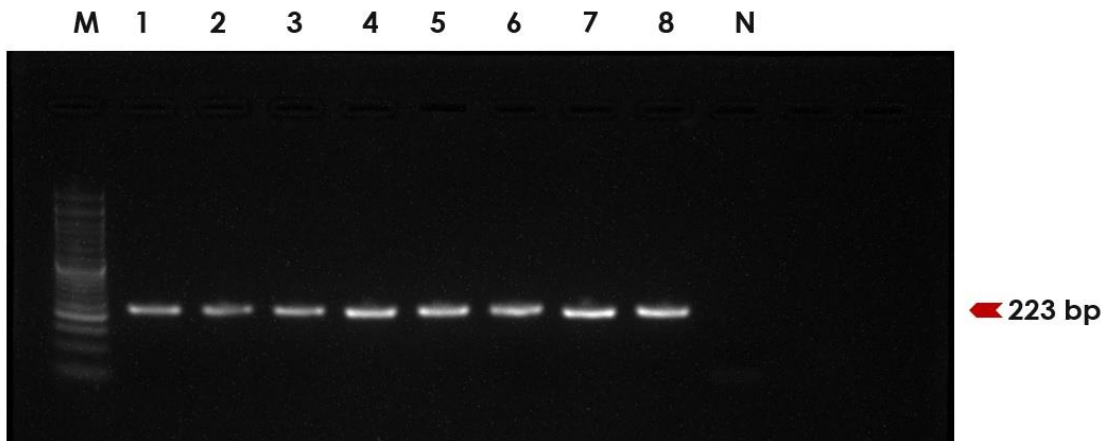
ภาพประกอบ 23 แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการของพยาธิปลิงใสที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS2

จากการตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสม optimal annealing temperature ของไพรเมอร์พบว่าสามารถใช้ได้ในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส (ภาพประกอบ 27) เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* ที่พบในปลาทอง พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อพยาธิปลิงใสชนิด *D. anchoratus*, *D. formosus*, *D. intermedius*, และ *D. vastator* เมื่อใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.6 μM และไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 0.32 μM ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยแสดงผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 223 คู่เบส และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับปรสิตที่ติดร่วมกันในปลาทองและปลาทอง ได้แก่ *A. foliaceus*, *Ce. formosanus*, *C. auratus* และ *Trichodina* sp. รวมถึงพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* (ภาพประกอบ 28) และเมื่อตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดเท่ากับ 1.3×10^{-1} ng/ul (ภาพประกอบ 29)

จากการตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสม optimal annealing temperature ของไพรเมอร์พบว่าสามารถใช้ได้ในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส (ภาพประกอบ 30) เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* ที่พบในปลาทอง พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อพยาธิปลิงใสชนิด *G. gurleyi* และ *G. kobayashii* เมื่อใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.5 μM และไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 0.2 μM ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยแสดงผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด

ประมาณ 117 คู่เบส และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับปรสดีที่ติดต่อกันในปลาทองและปลาทอง ได้แก่ *A. foliaceus*, *Ce. formosanus*, *C. auratus* และ *Trichodina sp.* รวมถึงพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* (ภาพประกอบ 31) และเมื่อตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดเท่ากับ 2.7×10^{-1} ng/ul (ภาพประกอบ 32)

จากการตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสม optimal annealing temperature ของไพรเมอร์ พบว่าสามารถใช้ได้ในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส (ภาพประกอบ 33) เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* ด้วยวิธี multiplex PCR พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และสกุล *Gyrodactylus* เมื่อใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.44 μM และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสกุล *Dactylogyrus* ที่ความเข้มข้น 0.4 μM ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสกุล *Gyrodactylus* ที่ความเข้มข้น 0.144 μM ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส โดยแสดงผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 223 และ 117 คู่เบส ตามลำดับ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับปรสดีที่ติดต่อกันในปลาทองและปลาทอง ได้แก่ *A. foliaceus*, *Ce. formosanus*, *C. auratus* และ *Trichodina sp.* รวมถึงสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งสองสกุลได้ในหลอดเดียว (ภาพประกอบ 34 และ 35) และเมื่อตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และสกุล *Gyrodactylus* ที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดเท่ากับ 2.7×10^{-1} ng/ul และ 1.1 ng/ul ตามลำดับ (ภาพประกอบ 36)

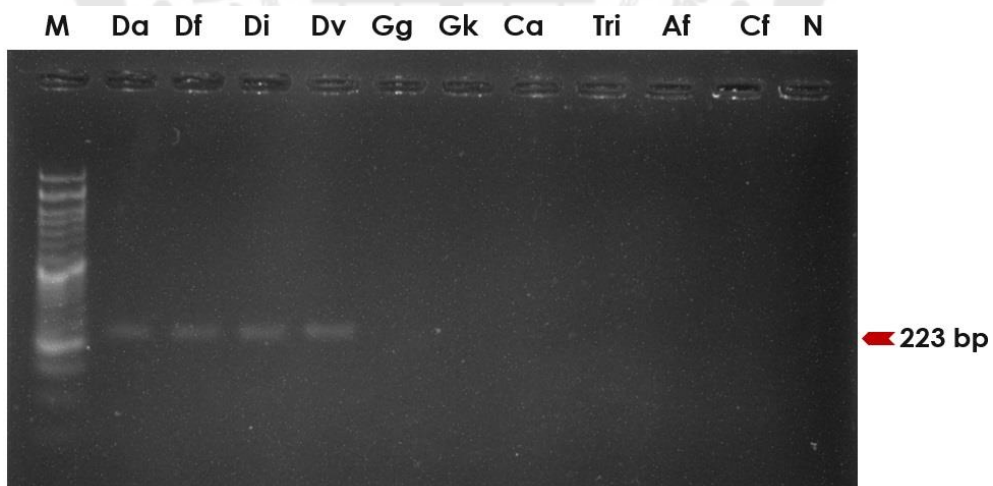


ภาพประกอบ 24 การตรวจสอบ optimal annealing temperature ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิ

ปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*

ช่อง M = marker 50 คู่เบส, ช่อง 1 = 45 องศาเซลเซียส, ช่อง 2 = 45.7 องศาเซลเซียส,
 ช่อง 3 = 46.9 องศาเซลเซียส, ช่อง 4 = 48.8 องศาเซลเซียส, ช่อง 5 = 51.2 องศาเซลเซียส,
 ช่อง 6 = 53.1 องศาเซลเซียส, ช่อง 7 = 54.3 องศาเซลเซียส, ช่อง 8 = 55 องศาเซลเซียส

และช่อง N = negative control

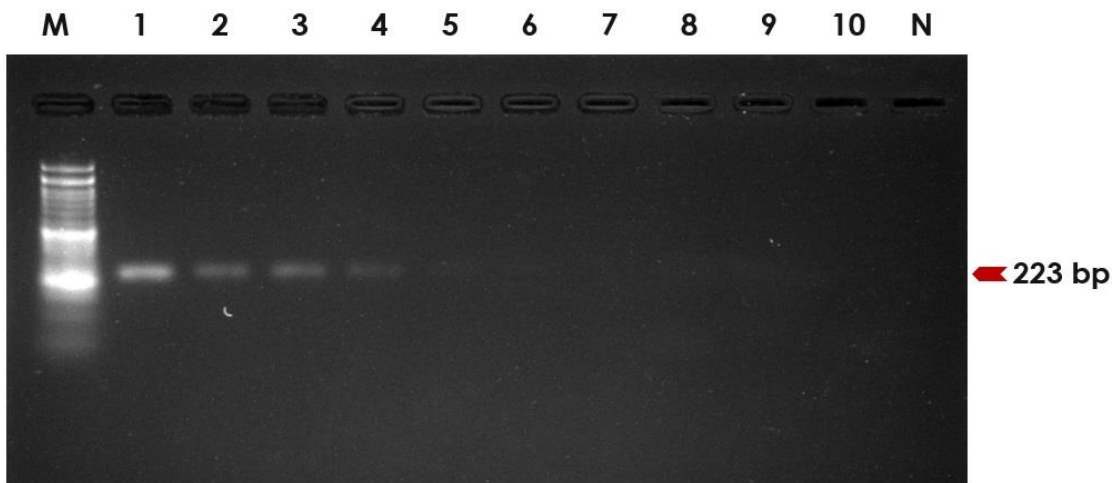


ภาพประกอบ 25 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*

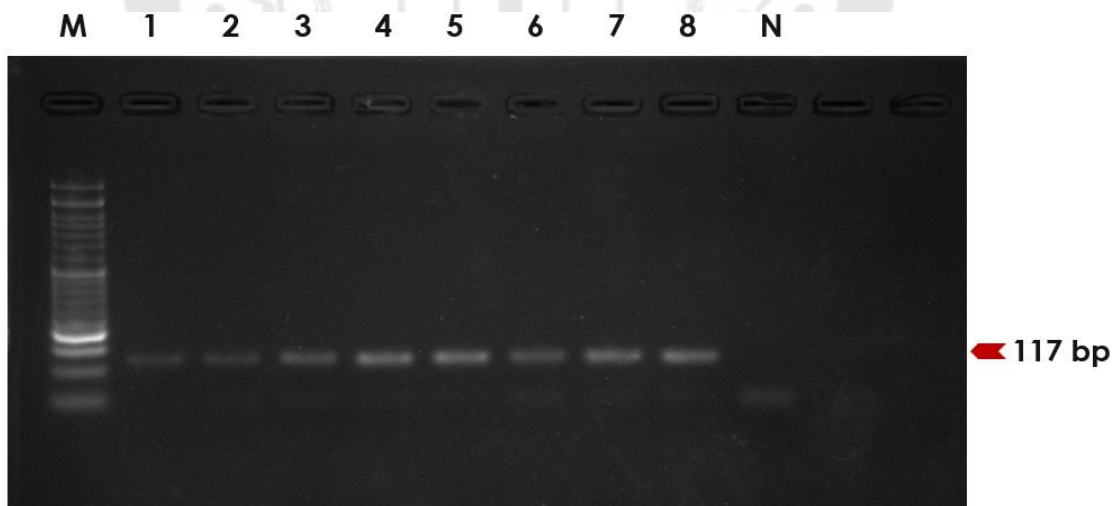
ช่อง (Lane) M = marker 50 คู่เบส, ช่อง 1 = *D. anchoratus*, ช่อง 2 = *D. formosus*, ช่อง 3 = *D. intermedius*,
 ช่อง 4 = *D. vastator*, ช่อง 5 = *G. gurleyi*, ช่อง 6 = *G. kobayashii*, ช่อง 7 = *C.*

auratus, ช่อง 8 = *Trichodina* sp., ช่อง 9 = *A. foliaceus*,

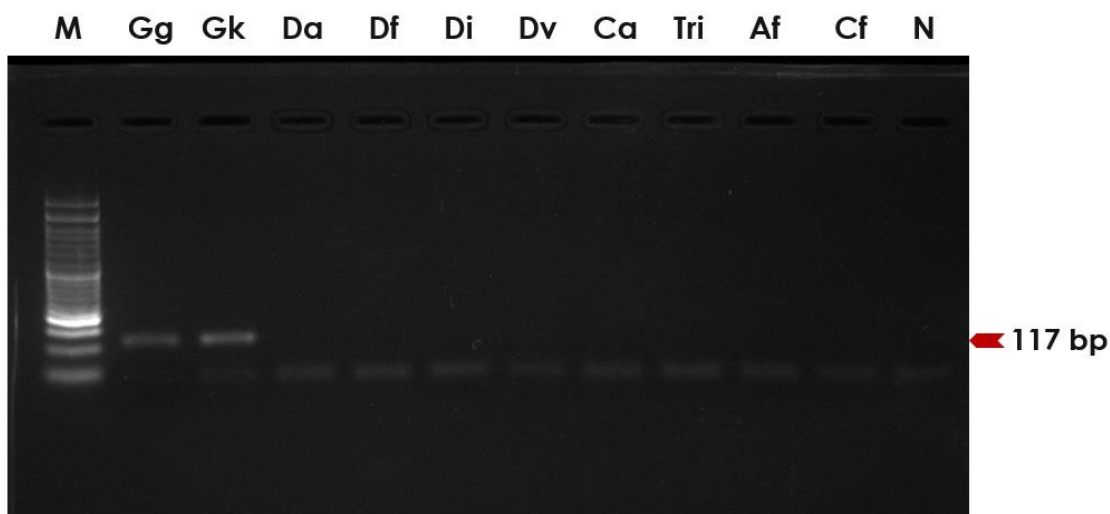
ช่อง 10 = *C. formosanus* และช่อง N = negative control



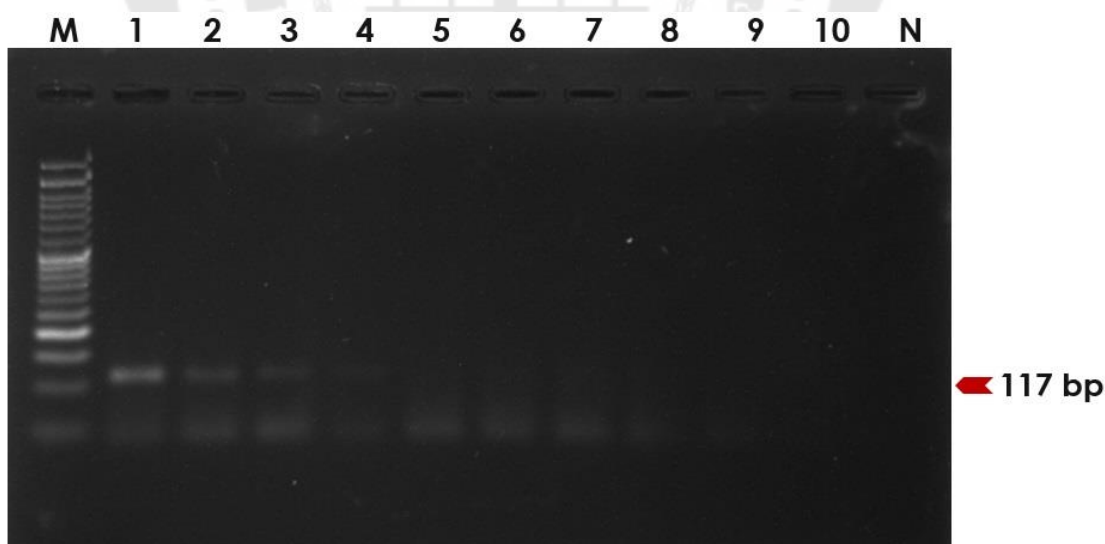
ภาพประกอบ 26 ตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*
 ช่อง M = marker 50 คู่เบส, ช่อง 1 = 2.2 ng/ul, ช่อง 2 = 1.1 ng/ul, ช่อง 3 = 5.5×10^{-1} ng/ul,
 ช่อง 4 = 2.7×10^{-1} ng/ul, ช่อง 5 = 1.3×10^{-1} ng/ul, ช่อง 6 = 6.8×10^{-2} ng/ul, ช่อง 7 = 3.4×10^{-2}
 ng/ul, ช่อง 8 = 1.7×10^{-2} ng/ul, ช่อง 9 = 8.5×10^{-3} ng/ul, ช่อง 10 = 4.2×10^{-3} ng/ul
 และช่อง N = negative control



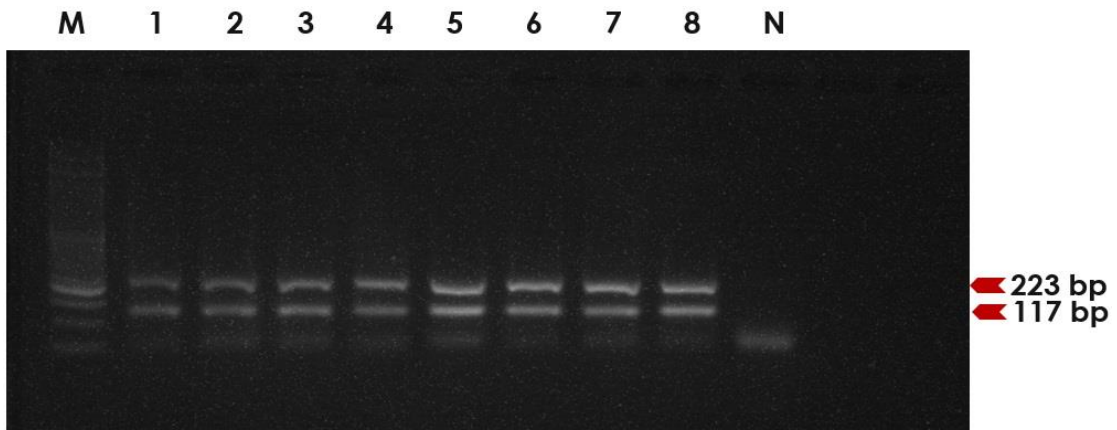
ภาพประกอบ 27 การตรวจสอบ optimal annealing temperature ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิ
 ปลิงใสสกุล *Gyrodactylus*
 ช่อง M = marker 50 คู่เบส, ช่อง 1 = 45 องศาเซลเซียส, ช่อง 2 = 45.7 องศาเซลเซียส,
 ช่อง 3 = 46.9 องศาเซลเซียส, ช่อง 4 = 48.8 องศาเซลเซียส, ช่อง 5 = 51.2 องศาเซลเซียส,
 ช่อง 6 = 53.1 องศาเซลเซียส, ช่อง 7 = 54.3 องศาเซลเซียส, ช่อง 8 = 55 องศาเซลเซียส
 และช่อง N = negative control



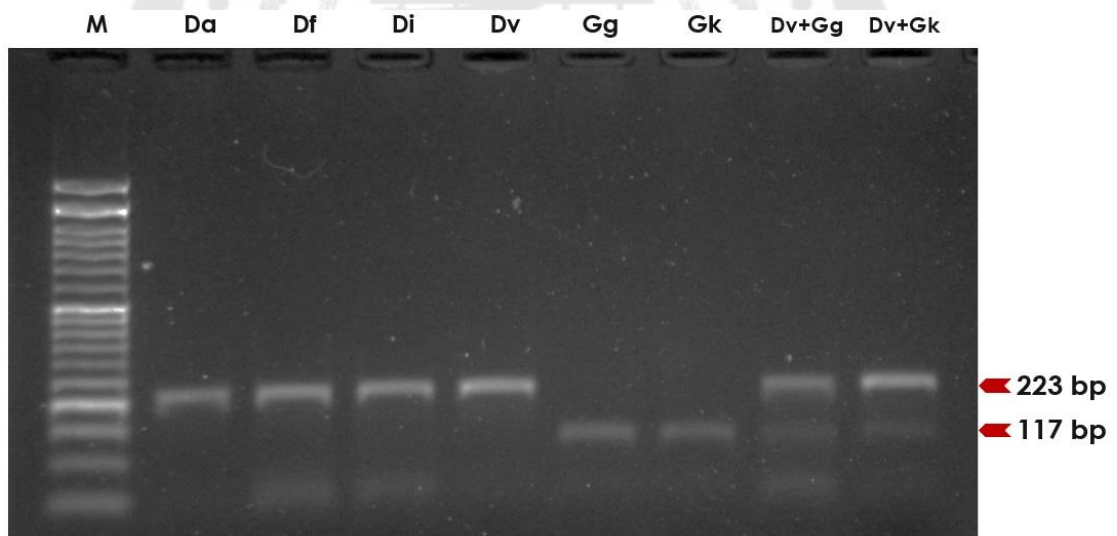
ภาพประกอบ 28 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus*
 ช่อง M = marker 50 คู่เบส, ช่อง 1 = *G. gurleyi*, ช่อง 2 = *G. kobayashii*, ช่อง 3 = *D. anchoratus*,
 ช่อง 4 = *D. formosus*, ช่อง 5 = *D. intermedius*, ช่อง 6 = *D. vastator*, ช่อง 7 = *C. auratus*, ช่อง
 8 = *Trichodina* sp., ช่อง 9 = *A. foliaceus*, ช่อง 10 = *C. formosanus* และช่อง N = negative
 control



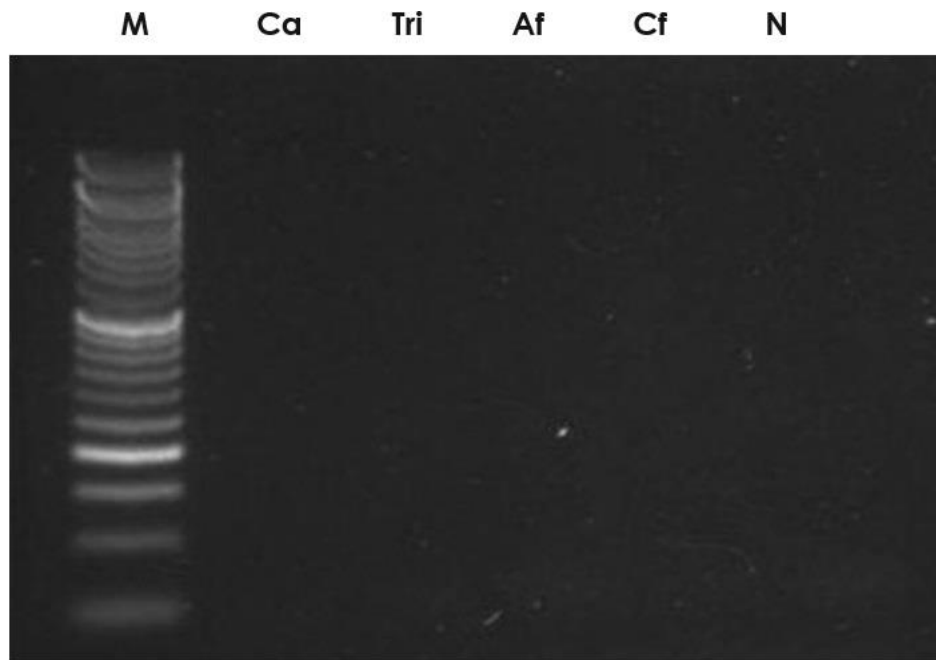
ภาพประกอบ 29 ตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus*
 ช่อง M = marker 50 คู่เบส, ช่อง 1 = 2.2 ng/ul, ช่อง 2 = 1.1 ng/ul, ช่อง 3 = 5.5×10^{-1} ng/ul,
 ช่อง 4 = 2.7×10^{-1} ng/ul, ช่อง 5 = 1.3×10^{-1} ng/ul, ช่อง 6 = 6.8×10^{-2} ng/ul, ช่อง 7 = 3.4×10^{-2}
 ng/ul, ช่อง 8 = 1.7×10^{-2} ng/ul, ช่อง 9 = 8.5×10^{-3} ng/ul, ช่อง 10 = 4.2×10^{-3} ng/ul
 และช่อง N = negative control



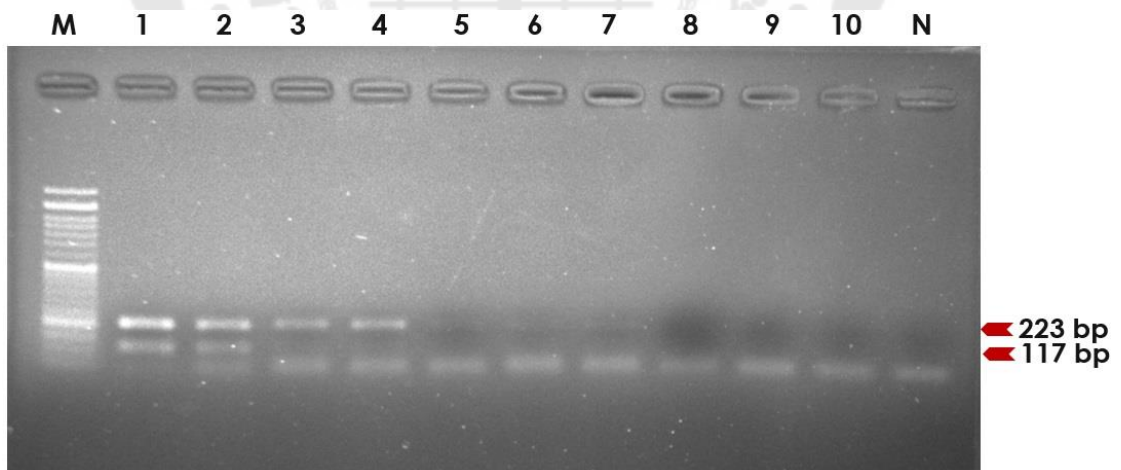
ภาพประกอบ 33 การตรวจสอบ optimal annealing temperature ของวิธี multiplex PCR
 ช่อง M = marker 50 คู่เบส, ช่อง 1 = 45 องศาเซลเซียส, ช่อง 2 = 45.7 องศาเซลเซียส,
 ช่อง 3 = 46.9 องศาเซลเซียส, ช่อง 4 = 48.8 องศาเซลเซียส, ช่อง 5 = 51.2 องศาเซลเซียส,
 ช่อง 6 = 53.1 องศาเซลเซียส, ช่อง 7 = 54.3 องศาเซลเซียส, ช่อง 8 = 55 องศาเซลเซียส
 และช่อง N = negative control



ภาพประกอบ 34 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR
 ช่อง (Lane) M = marker 50 คู่เบส, ช่อง 1 = *D. anchoratus*, ช่อง 2 = *D. formosus*, ช่อง 3 = *D.*
intermedius, ช่อง 4 = *D. vastator*, ช่อง 5 = *G. gurleyi*, ช่อง 6 = *G. kobayashii*, ช่อง 5 = *G.*
gurleyi+*D. Vastator* และช่อง 8 = *G. kobayashii* + *D. vastator*

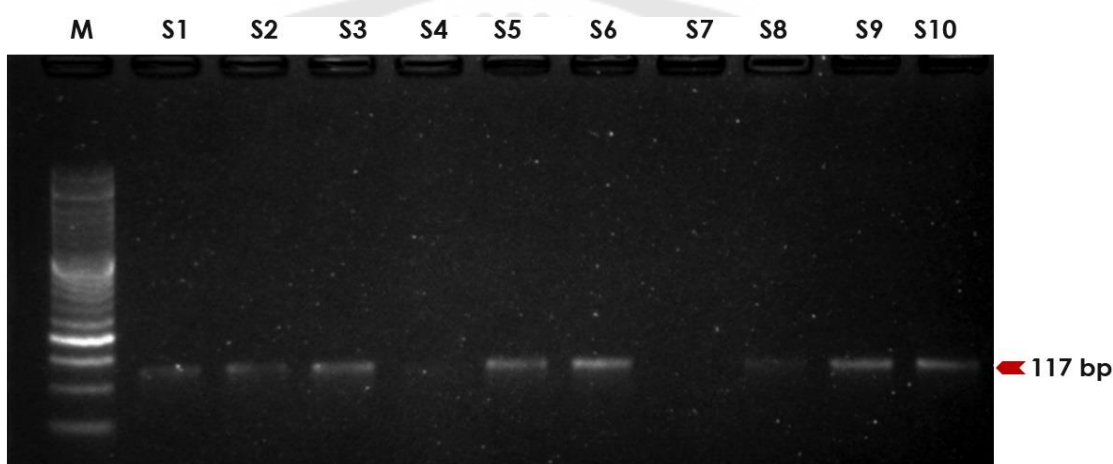


ภาพประกอบ 35 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR (ต่อ)
 ช่อง M = marker 50 คู่เบส, ช่อง 1 = *C. auratus*, ช่อง 2 = *Trichodina* spp.,
 ช่อง 3 = *A. foliaceus*, ช่อง 4 = *C. formosanus* และช่อง N = negative control

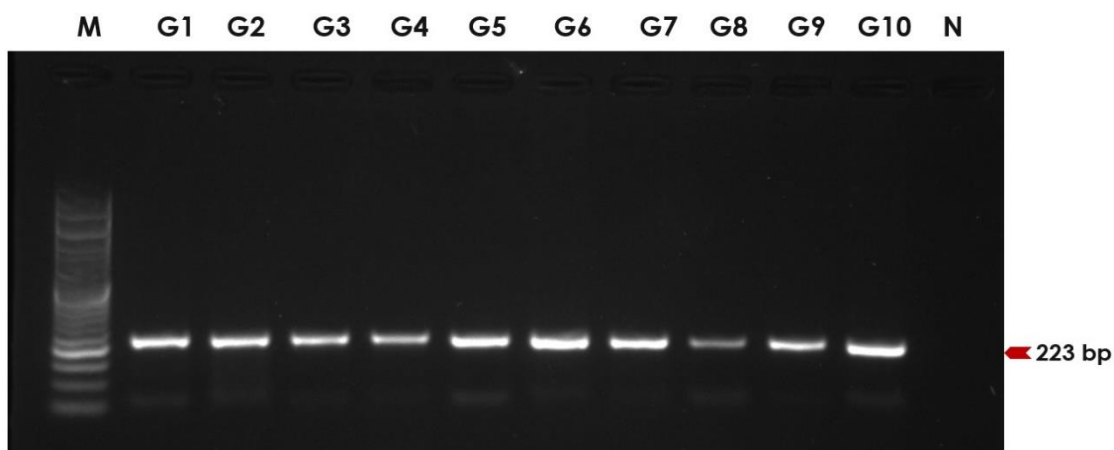


ภาพประกอบ 36 การตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR
 ช่อง M = marker 50 คู่เบส, ช่อง 1 = 2.2 ng/ul, ช่อง 2 = 1.1 ng/ul, ช่อง 3 = 5.5×10^{-1} ng/ul,
 ช่อง 4 = 2.7×10^{-1} ng/ul, ช่อง 5 = 1.3×10^{-1} ng/ul, ช่อง 6 = 6.8×10^{-2} ng/ul, ช่อง 7 = 3.4×10^{-2}
 ng/ul, ช่อง 8 = 1.7×10^{-2} ng/ul, ช่อง 9 = 8.5×10^{-3} ng/ul, ช่อง 10 = 4.2×10^{-3} ng/ul
 และช่อง N = negative control

จากการตรวจสอบการติด (detection) ของพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และสกุล *Gyrodactylus* ในตัวอย่างปลาทองจากสภาพธรรมชาติด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา พบว่าบริเวณเมือกลำตัว 10 ตัวอย่าง พบพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* จำนวน 10 ตัวอย่าง ส่วนบริเวณเหงือก 10 ตัวอย่าง พบพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* จำนวน 10 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างทั้ง 20 ตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี multiplex PCR พบว่าบริเวณเมือกลำตัว 10 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* จำนวน 8 ตัวอย่าง และไม่พบการติดพยาธิปลิงใส จำนวน 2 ตัวอย่าง (ภาพประกอบ 37) ส่วนบริเวณเหงือก 10 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบการติดพยาธิปลิงใสเฉพาะสกุล *Dactylogyrus* จำนวน 10 ตัวอย่าง (ภาพประกอบ 38)



ภาพประกอบ 37 การตรวจการติดพยาธิปลิงใสบริเวณลำตัวจากปลาทองจากสภาพธรรมชาติ
 ของ M =marker 50 คู่เบส, ช่อง S1-S3, S5, S6, S8-S10 =พบการติดพยาธิปลิงใสสกุล
Gyrodactylus และช่อง S4และ S7 =ไม่พบการติดพยาธิปลิงใส



ภาพประกอบ 38 การตรวจการติดพยาธิปลิงใสบริเวณเหงือกจากปลาทองจากสภาพธรรมชาติ
ช่อง M =marker 50 คู่เบส, ช่อง G1-G10 =พบการติดพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus*
และช่อง N =negative control

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาค่าความชุกของการติดพยาธิปลิงใสในปลาทอง จากแหล่งเพาะเลี้ยงปลาทองในจังหวัดราชบุรี พบการติดพยาธิปลิงใสรวม 2 สกุล คือ สกุล *Dactylogyrus* และสกุล *Gyrodactylus* สอดคล้องกับการศึกษาของนันทชัย บุญจร (2546), จักรพงษ์ นีละมนต์ (2552), Mousavi et al. (2009), Iqbal and Hussain (2013), Younis and Shamall (2013) และ Roohi et al. (2016) โดยในการศึกษาคั้งนี้พบพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* 4 ชนิด คือ *D. anchoratus*, *D. formosus*, *D. intermedius* และ *D. vastator* และสกุล *Gyrodactylus* 2 ชนิด คือ *G. gurleyi* และ *G. kobayashii* สอดคล้องกับการศึกษาของ Ogawa and Egusa (1979), Borisov (2013) และ Trujillo (2018) ที่พบพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* 4 ชนิด คือ *D. anchoratus*, *D. formosus*, *D. intermedius* และ *D. vastator* ในปลาทอง นอกจากนี้การศึกษานี้ของ Moeini et al. (2017) และ Trujillo (2018) พบพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* ได้แก่ *G. kobayashii* และ *G. gurleyi* ตามลำดับ ซึ่งจากการรายงานของ Ling et al. (2016) พบว่า พยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* ชนิด *D. intermedius* และ *D. vastator* เป็นชนิดพันธุ์ใหม่ที่พบในปลาทอง จากการรายงานของ Moeini et al. (2017) พบว่า พยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* ชนิด *G. kobayashii* พบได้มากในปลาทอง

การศึกษาคั้งนี้มีค่าความชุกของการติดพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* เท่ากับร้อยละ 37.67 และ 1.00 ตามลำดับ ค่าความชุกของการติดพยาธิปลิงใสทั้งสองสกุล (co-infection) เท่ากับร้อยละ 9.67 ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ Trujillo (2018) ที่ได้ทำการสำรวจพยาธิปลิงใสที่ติดในปลาสวยงามที่นำเข้าสู่ประเทศออสเตรเลีย โดยมีการรายงานค่าความชุกของการติดพยาธิปลิงใสในปลาทองที่นำเข้าจากประเทศไทย ซึ่งแหล่งส่งออกปลาสวยงามของประเทศไทยตั้งอยู่ในพื้นที่จังหวัดราชบุรีและนครปฐม โดยมีค่าความชุกในพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* มากกว่าการติดพยาธิปลิงใสในสกุล *Gyrodactylus* ซึ่งพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* มีค่าความชุกสูงสุดถึงร้อยละ 60.00 และในสกุล *Gyrodactylus* มีค่าความชุกร้อยละ 3.30 โดยค่าความชุกของพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* ในการศึกษาคั้งนี้มีค่าความชุกสูงกว่าการศึกษาของจักรพงษ์ นีละมนต์ (2552) คือ ร้อยละ 21.15 แต่ค่าความชุกของพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* มีค่าน้อยกว่า คือ ร้อยละ 20.31 นอกจากนี้มีค่าความชุกมีค่าน้อยกว่าการศึกษาของคณิต ชูคันทอม และอนุชา เสนาราช (2551) โดยมีค่าความชุกของปลิงใส

สกุล *Dactylogyrus* มีค่าความชุกร้อยละ 45.00 และในสกุล *Gyrodactylus* มีค่าความชุกร้อยละ 46.25 และต่ำกว่าการศึกษาของ Iqbal and Hussain (2013) โดยมีค่าความชุกของปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* มีค่าความชุกสูงสุดถึงร้อยละ 63.30 และในสกุล *Gyrodactylus* มีค่าความชุกร้อยละ 46.60

โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาด้วยวิธีมาตรฐานวิทยาร่วมกับวิธีทางอณูชีววิทยา ซึ่งจากการตรวจสอบพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* ในทางสัตวศาสตร์ได้ทำการวัดขนาดของอวัยวะยึดเกาะ และโคพูลาทอริ ออร์แกนมีส่วนสำคัญในการพิจารณาเปรียบเทียบสำหรับการระบุชนิด (Simkova et al., 2017) พร้อมทั้งวิเคราะห์ร่วมกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18S และ บริเวณ ITS1 ด้วยไพรเมอร์ที่อ้างอิงจาก Ling et al. (2016), Sharma, Agrawal, & Kumar (2011) และ Sinnappah et al. (2001) เพื่อช่วยในการระบุชนิดของพยาธิปลิงใสทั้ง 4 ชนิด คือ *D. anchoratus*, *D. formosus*, *D. intermedius* และ *D. vastator* ได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Ling et al. (2016), Simkova et al. (2004) และ Tu et al. (2015b) ที่ได้ใช้ลักษณะทางสัตวศาสตร์ร่วมกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน 18S และบริเวณ ITS1 ส่วนระบุชนิดพยาธิปลิงใสสกุล *Gyrodactylus* ทางสัตวศาสตร์ได้ทำการวัดขนาดตามวิธีการของ Prikrylova et al. (2008) เพื่อช่วยในการระบุชนิดของพยาธิปลิงใสทั้ง 2 ชนิด คือ *G. gurleyi* และ *G. kobayashii* โดยพยาธิปลิงใสทั้งสองชนิดมีความใกล้เคียงกันมาก แต่สามารถแยกความแตกต่างได้จากขนาด และลักษณะโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะ เช่น สมอ และมาร์จินอลซูด พร้อมทั้งวิเคราะห์ร่วมกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ด้วยไพรเมอร์ที่อ้างอิงจาก Matejusova et al. (2001) และ Trujillo Gonzalez et al. (2018) ซึ่งสามารถยืนยันชนิดของ *G. gurleyi* และ *G. kobayashii* ได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Tu et al. (2015a) ได้ใช้ลักษณะทางสัตวศาสตร์ร่วมกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS2

จากการใช้สัตวศาสตร์ในการจัดจำแนกพยาธิปลิงก็สามารทำให้ระบุชนิดของพยาธิปลิงใสได้ แต่วิธีดังกล่าวมีข้อเสียในด้านที่ต้องใช้ความเชี่ยวชาญของผู้ตรวจสอบ และไม่สามารถตรวจสอบการติดพยาธิได้คร่าวๆ ดังนั้น การพัฒนาเทคนิคที่นำมาช่วยในการตรวจการติดปรสิตของปลาให้มีความแม่นยำและรวดเร็วขึ้นจึงมีความจำเป็นอย่างมาก ซึ่งการใช้เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยามีแนวโน้มในการวินิจฉัยการติดปรสิตในปลาได้อย่างรวดเร็ว โดยหากการตรวจปรสิตที่มีมากกว่า 1 ชนิดนั้น การใช้เทคนิค multiplex PCR เข้ามาช่วยตรวจสอบจะยิ่งทำให้การตรวจมีประสิทธิภาพและรวดเร็วยิ่งขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงนำเอาเทคนิค multiplex PCR มาช่วยในการตรวจหาชนิดของพยาธิปลิงใส โดยการออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่จากบริเวณ ITS2 ที่มี

ความจำเพาะต่อพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และ *Gyrodactylus* ที่พบในปลาทอง ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส จากการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของพยาธิปลิงใสทั้ง 2 สกุลที่เป็นเป้าหมาย และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับปรสิตที่ติดร่วมกันในปลาทอง ได้แก่ *A. foliaceus*, *Ce. formosanus* และ *Trichodina* sp., รวมถึงเนื้อเยื่อปลาทอง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาความไวของไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสกุล *Dactylogyrus* มีความไวมากกว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสกุล *Gyrodactylus* ได้ที่ปริมาณดีเอ็นเอต่ำที่สุดเท่ากับ 1.3×10^{-1} ng/ul และ 2.7×10^{-1} ng/ul ตามลำดับ ซึ่งมีความไวค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับไพรเมอร์จากการศึกษาของ Ek-huchim et al. (2012) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 5 คู่ ที่มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำที่สุด ดังนี้ ไพรเมอร์ Cicly1 3×10^{-2} ng/ul, ไพรเมอร์ Cicly2 1 ng/ul, ไพรเมอร์ Cicly3 6×10^{-3} ng/ul, ไพรเมอร์ Cicly4 7×10^{-3} ng/ul และไพรเมอร์ Cicly5 1.2×10^{-1} ng/ul โดยไพรเมอร์ที่ได้ทำการศึกษา มีค่าความไวสูงกว่าไพรเมอร์ Cicly2 เพียงคู่เดียว จากการตรวจสอบด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ที่ออกแบบพร้อมกันในปฏิกิริยาเดี่ยวภายใต้สภาวะที่มีความจำเพาะ สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของพยาธิปลิงใสทั้ง 2 สกุลที่เป็นเป้าหมาย และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับปรสิตที่ติดร่วมกันในปลาทอง ได้แก่ *A. foliaceus*, *Ce. formosanus* และ *Trichodina* sp. รวมถึงเนื้อเยื่อปลาทอง โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสกุล *Dactylogyrus* มีความไวมากกว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสกุล *Gyrodactylus* มีค่าเท่ากับ 2.7×10^{-1} ng/ul และ 1.1 ng/ul ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Collins et al. (2010) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ ที่มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำที่สุด ดังนี้ ไพรเมอร์ Gsal2 10^{-2} ng/ul, ไพรเมอร์ Gder2 10^{-3} ng/ul และไพรเมอร์ Gtrutt2 10^{-3} ng/ul ซึ่งมีเพียงไพรเมอร์ Gsal2 ที่มีความไวน้อยกว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสกุล *Gyrodactylus* ถึงแม้ว่าความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความไวค่อนข้างต่ำ แต่เพียงพอต่อการตรวจสอบพยาธิปลิงใส เนื่องจากการสกัดดีเอ็นเอของพยาธิปลิงใส 1 ตัว มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอประมาณ 2-4 ng/ul จึงทำให้สามารถใช้ในการตรวจสอบได้ เมื่อนำวิธี multiplex PCR ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการติดพยาธิปลิงใสจากเมือก 10 ตัวอย่าง และเหงือก 10 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 20 ตัวอย่างที่มีการพบพยาธิปลิงใส พบว่าสามารถตรวจพบถึง 18 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 90

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงค่าความซุกของพยาธิปลิงใสที่ติดในปลาทอง จากฟาร์มปลาสวยงามในจังหวัดราชบุรีสำหรับใช้เป็นแนวทางในการควบคุมโรคและการรักษามาตรฐานของ

ฟาร์มปลา อีกรั้งได้ทำการนำวิธี multiplex PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาพยาธิปลิงไส้ทั้ง 2 สกกุลที่พบในปลาทอง ทำให้สามารถตรวจสอบการติดพยาธิปลิงไส้ได้อย่างจำเพาะ รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบได้ปริมาณมาก สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของปลา ก่อนการจำหน่ายและส่งออก



บรรณานุกรม

- Arafa, S. Z., El-Naggar, M. M., & Kearn, G. C. (2013). Ultrastructure of the digestive system and experimental study of feeding in the monogenean skin and fin parasite *Macrogyrodactylus congolensis*. *Acta Parasitologica*, 58(4), 420-433.
- Bakke, T., Cable, J., & Harris, P. D. (2007). The biology of gyrodactylid monogeneans: The "Russian-Doll Killers". *Advances in parasitology*, 64, 161-376.
- Bari, M. L., & Yamazaki, K. (2018). *Seafood Safety and Quality*: CRC Press.
- Borisov, E. V. (2013). Representatives of dactylogyridae family of the monogenea class in gold fish (*Carassius auratus auratus*) imported in Bulgaria from Singapore. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19, 237-242.
- Brown, J. W., & Shaw, P. J. (1998). Small nucleolar RNAs and pre-rRNA processing in plants. *The Plant Cell*, 10(5), 649-657.
- Buchmann, K., & Lindenstrøm, T. (2002). Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *International Journal for Parasitology*, 32(3), 309-319.
- Chanda, M., Paul, M., Maity, J., Dash, G., Gupta, S. S., & Patra, B. C. (2011). Ornamental fish goldfish, *Carassius auratus* and related parasites in three districts of West Bengal, India. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 51-54.
- Chaudhary, A., Verma, C., & Singh, H. S. (2016). First report on the molecular characterization of *Diaphorocleidus armillatus* Jogunoori et al. 2004 (Monogenea: Dactylogyridae) infecting the gills of introduced fish, *Gymnocorymbus ternetzi* in India. *Acta Parasitologica*, 61(3), 639-644.
- Collins, C. M., Kerr, R., McIntosh, R., & Snow, M. (2010). Development of a real-time PCR assay for the identification of *Gyrodactylus* parasites infecting salmonids in northern Europe. *Diseases of aquatic organisms*, 90(2), 135-142.
- Dey, V. (2016). The global trade in ornamental fish. *Infofish International*, 52-55.
- Dezfuli, B., Giari, L., Simoni, E., Menegatti, R., Shinn, A., & Manera, M. (2007). Gill histopathology of cultured European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), infected with *Diplectanum aequans* (Wagener 1857) Diesing 1958 (Diplectanidae:

- Monogenea). *Parasitology Research*, 100, 707-713.
- Ebrahimzadeh Mousavi, H. A., Soltani, M., Shayan, P., Ebrahimzadeh, E., & Hoseini, M. (2012). Identification of *Gyrodactylus gurleyi* in *Carassius auratus* using morphometric and molecular characterization. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 6(1), 41-46.
- Ek-Huchim, J. P., Jimenez-Garcia, I., Pérez-Vega, J. A., & Rodríguez-Canul, R. (2012). Non-lethal detection of DNA from *Cichlidogyrus* spp. (Monogenea, Ancyrocephalinae) in gill mucus of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Diseases of aquatic organisms*, 98(2), 155-162.
- Ferguson, H. W. (1989). *Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts*: Iowa State University Press.
- García-Vásquez, A., Pinacho-Pinacho, C. D., Guzmán-Valdivieso, I., Salgado-Maldonado, G., & Rubio-Godoy, M. (2019). New species of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 from native fish from Chiapas, Mexico, studied by morphology and molecular analyses. *Acta Parasitologica*, 1-15.
- García-Vásquez, A., Pinacho-Pinacho, C. D., Martínez-Ramírez, E., & Rubio-Godoy, M. (2018). Two new species of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 from *Profundulus oaxacae* (Pisces: Profundulidae) from Oaxaca, Mexico, studied by morphology and molecular analyses. *Parasitology International*, 67(4), 517-527.
- Gebrezgiher, G. B., & Gebrehiwot, M. T. (2019). *Oreochromis niloticus* L. and *Cyprinus carpio* as a host for helminthes parasite. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 7(4), 101-104.
- Gulelat, Y., Yimer, E., Asmare, K., & Bekele, J. (2013). Study on parasitic helminths infecting three fish species from Koka reservoir, Ethiopia. *SINET: Ethiopian Journal of Science*, 36(2), 73-80.
- Harris, P., & Cable, J. (2000). *Gyrodactylus poeciliae* n. sp. and *G. milleri* n. sp. (Monogenea: Gyrodactylidae) from *Poecilia caucana* (Steindachner) in Venezuela. *Systematic parasitology*, 47(2), 79-85.
- Iqbal, Z., & Hussain, U. (2013). Parasitic infection of an ornamental fish, Shubunkin,

- Carassius auratus* L. imported to Pakistan. *Biologia*, 59(29), 281-286.
- Javahery, S., Nekoubin, H., & Moradlu, A. H. (2012). Effect of anaesthesia with clove oil in fish. *Fish physiology and biochemistry*, 38(6), 1545-1552.
- Kabata, Z. (1985). *Parasites and diseases of fish cultured in the tropics*: Taylor & Francis Ltd.
- Kearn, G. (2014). Some aspects of the biology of monogenean (Platyhelminth) parasites of marine and freshwater fishes. *Oceanography*, 2(1).
- King, S. D., & Cone, D. K. (2009). Morphological and molecular taxonomy of a new species of *Fundulotrema* and comments on *Gyrodactylus stephanus* (Monogenea: Gyrodactylidae) from *Fundulus heteroclitus* (Actinopterygii: Cyprinodontiformes) in Nova Scotia, Canada. *Journal of Parasitology*, 95(4), 846-850.
- Konstanzova, V., Koubkova, B., Kasny, M., Ilgova, J., Dzika, E., & Gelnar, M. (2016). Excretory system of representatives from family Diplozoidae (Monogenea). *Parasitology Research*, 115(4), 1493-1500.
- Kotob, M. H., Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Abdelzaher, M., & El-Matbouli, M. (2017). The impact of co-infections on fish: a review. *Veterinary Research*, 47(1), 98.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., & Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics*, 9(4), 299-306.
- Ling, F., Tu, X., Huang, A., & Wang, G. (2016). Morphometric and molecular characterization of *Dactylogyrus vastator* and *D. intermedius* in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, 115(5), 1755-1765.
- Maceda-Veiga, A., Escribano-Alacid, J., de Sostoa, A., & García-Berthou, E. (2013). The aquarium trade as a potential source of fish introductions in southwestern Europe. *Biological Invasions*, 15(12), 2707-2716.
- Margolis, L., Esch, G., Holmes, J., Kuris, A., & Schad, G. (1982). The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *The Journal of Parasitology*, 68(1), 131-133.

- Matejusova, I., & Cunningham, C. (2004). The first complete monogenean ribosomal RNA gene operon: sequence and secondary structure of the *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957, large subunit ribosomal RNA gene. *Journal of Parasitology*, 90(1), 146-152.
- Matejusová, I., Gelnar, M., McBeath, A. J. A., Collins, C. M., & Cunningham, C. O. (2001). Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). *International Journal for Parasitology*, 31(7), 738-745.
Retrieved from
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002075190100176X>
- Miles, T. D., Martin, F. N., Robideau, G. P., Bilodeau, G. J., & Coffey, M. D. (2017). Systematic development of Phytophthora species-specific mitochondrial diagnostic markers for economically important members of the genus. *Plant disease*, 101(7), 1162-1170.
- Modu, B., Zaleha, K., & Shaharom-Harrison, F. (2014). Water quality assessment using monogenean gill parasites of fish in Kenyir Lake, Malaysia. *Nigerian Journal of Fisheries and Aquaculture*, 2(1), 37-47.
- Moeini Jazani, M., Ebrahimzadeh Mosavi, H., Rahmati Holasoo, H., Barzegar, M., Soltani, M., & Taheri Mirghaed, A. (2017). A survey on monogeneans parasites infestation of goldfish emphasizing the farming carp species. *Journal of Veterinary Research*, 72(2), 207-212.
- Mousavi, H. E., Mood, S., Omrani, B., Mokhayer, B., Ahmadi, M., Soltani, M., . . . Pazooki, J. (2009). Gill ectoparasites of goldfish (*Carassius auratus*, pearl scale variety) imported into Iran. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 29(5), 175-180.
- Moyses, C. R. S., Spadacci-Morena, D. D., Xavier, J. G., Antonucci, A. M., & Lallo, M. A. (2015). Ectocommensal and ectoparasites in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) in farmed in the State of Sao Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24, 283-289.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*: John Wiley & Sons.

- Noga, E. J. (2010). *Fish disease: diagnosis and treatment*: John Wiley & Sons.
- Ogawa, K., & Egusa, S. (1979). Six species of *Dactylogyrus* (Monogenea : Dactylogyridae) collected from goldfish and carp cultured in Japan. *Fish Pathology*, 14(1), 21-31.
- Olsen, O. W. (1962). *Animal parasites: their biology and life cycles*: Minneapolis: Burgess.
- Paperna, I. (1996). *Parasites, infections and diseases of fishes in Africa*: Food & Agriculture Org.
- Prikrylova, I., Matejusova, I., Jarkovsky, J., & Gelnar, M. (2008). Morphometric comparison of three members of the *Gyrodactylus nemachili*-like species group (Monogenea: Gyrodactylidae) on *Barbatula barbatula* L. in the Czech Republic, with a reinstatement of *G. papernai* Ergens & Bychowsky, 1967. *Systematic parasitology*, 69(1), 33-44.
- Purivirojkul, W. (2012). Histological change of aquatic animals by parasitic infection. *Histopathology-reviews and recent advances*, 153-176.
- Reed, P., Francis-Floyd, R., Klinger, R., & Petty, D. (2009). Monogenean parasites of fish. *Fisheries and aquatic sciences*, 4, 1-4.
- Roohi, J. D., Ghasemzadeh, K., & Amini, M. (2016). Occurrence and intensity of parasites in goldfish (*Carassius auratus* L.) from Guilan province fish ponds, north Iran. *Croatian journal of fisheries*, 74(1), 20-24.
- Schlotterer, C., Hauser, M.-T., von Haeseler, A., & Tautz, D. (1994). Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molecular biology and evolution*, 11(3), 513-522.
- Sharma, P., Agarwal, N., & Kumar, S. (2011). Ribosomal DNA and morphological analysis of *Dactylogyrus* species from freshwater fishes of India. *Journal of Parasitic Diseases*, 35(2), 210-214.
- Simkova, A., Morand, S., Jobet, E., Gelnar, M., & Verneau, O. (2004). Molecular phylogeny of congeneric monogenean parasites (*Dactylogyrus*): a case of intrahost speciation. *Evolution*, 58(5), 1001-1018.
- Simkova, A., Pecinkova, M., Rehulkova, E., Vyskocilova, M., & Ondrackova, M. (2007). *Dactylogyrus* species parasitizing European *Barbus* species: morphometric and

- molecular variability. *Parasitology*, 134(12), 1751-1765.
- Sinnappah, N. D., Lim, L.-H. S., Rohde, K., Tinsley, R., Combes, C., & Verneau, O. (2001). A paedomorphic parasite associated with a neotenic amphibian host: phylogenetic evidence suggests a revised systematic position for Sphyrnariidae within anuran and turtle polystomatoineans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(2), 189-201.
- Thilakaratne, I., Rajapaksha, G., Hewakopara, A., Rajapakse, R., & Faizal, A. (2003). Parasitic infections in freshwater ornamental fish in Sri Lanka. *Diseases of aquatic organisms*, 54(2), 157-162.
- Tizie, E., Baye, D., & Mohamed, A. (2014). Prevalence of *Ligula intestinalis* larvae in *Barbus* fish genera at Lake Tana, Ethiopia. *World J Fish Marine Sci*, 6(6), 408-416.
- Trujillo-González, A., Becker, J., Vaughan, D., & Hutson, K. (2018). Monogenean parasites infect ornamental fish imported to Australia. *Parasitology Research*, 117(4), 995-1011.
- Tu, X., Ling, F., Huang, A., & Wang, G. (2015a). An infection of *Gyrodactylus kobayashii* Hukuda, 1940 (Monogenea) associated with the mortality of goldfish (*Carassius auratus*) from central China. *Parasitology Research*, 114(2), 737-745.
- Tu, X., Ling, F., Huang, A., & Wang, G. (2015b). The first report of *Dactylogyrus formosus* Kulwiec, 1927 (Monogenea: Dactylogyridae) from goldfish (*Carassius auratus*) in central China. *Parasitology Research*, 114(7), 2689-2696.
- Whittington, I. D., & Kearn, G. C. (2011). Hatching strategies in monogenean (Platyhelminth) parasites that facilitate host infection. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 91-99.
- Whittington, R., & Chong, R. (2007). Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: the case for revised import risk analysis and management strategies. *Preventive veterinary medicine*, 81(1-3), 92-116.
- Wilson, S. (1991). Nucleic acid techniques and the detection of parasitic diseases. *Parasitology Today*, 7(9), 255-259.
- Wong, W., Tan, W., & Lim, L. (2006). Sodium dodecyl sulphate as a rapid clearing agent

- for studying the hard parts of monogeneans and nematodes. *Journal of helminthology*, 80(1), 87-90.
- Yamaguti, S. (1963). *Systema Helminthum. Vol 4 Monogenea and Aspidocotylea*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Younis, A., & Shamall, M. A. A. (2013). Monogenean infections on fishes from Darbandikhan lake in Kurdistan region, Iraq. *Basrah J. Agric. Sci*, 26, 117-131.
- กรมประมง. (2553). การป้องกันและกำจัดโรคปลา. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- คณิต ชูคันทอม, & อนุชา เสนาราช. (2551). ปรสิตภายนอกที่พบในปลาสวยงามในเขตพื้นที่จังหวัดขอนแก่น. Paper presented at the การประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 9, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- จักรพงษ์ นีละมนต์, รัตติยากร อินทุไส, & ทองดี สีสันต์. (2553). สภาวะการด้านมูลค่าและปัญหาโรคปรสิตภายนอกในปลาสวยงามส่งออก ในจังหวัดมุกดาหาร และจังหวัดอุบลราชธานี. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี: อุบลราชธานี.
- ชโลบล วงศ์สวัสดิ์. (2555). *ปรสิตวิทยา*. เชียงใหม่: ชมพู่การพิมพ์.
- ด้านตรวจสัตว์น้ำทำอากาศยานสุวรรณภูมิ. (2561). รายงานประจำปี 2560. Retrieved from <http://www.fisheries.go.th/>
- ธนากร ฤทธิ์ไธสง. (2544). สายพันธุ์และการเลี้ยงปลาทองเชิงธุรกิจฉบับสมบูรณ์. กรุงเทพฯ: เพชรกะรัต.
- นันทชัย บุญจรร. (2546). ปรสิตในปลาสวยงามบางชนิดจากฟาร์มเพาะเลี้ยงบริเวณบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี. (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ปณรัตน์ ผาดี. (2552). โรคและการวินิจฉัยโรคปลา. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- ประไพสิริ สิริกาญจน. (2538). ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ (พิมพ์ครั้งที่ 5 ed.). กรุงเทพฯ: ไร่เขียว.
- วัชรวิภา ภูรีวิโรจน์กุล. (2556). *ปรสิตวิทยาของสัตว์น้ำ*. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วันเพ็ญ มีนกาญจน์, กาญจนา จิรพันธุ์พัฒน์, สมศรี งามวงศ์ชน, & อาคม ชุ่มฉิ. (2549). ต้นทุนการผลิตและผลตอบแทนการลงทุนการเพาะเลี้ยงปลาทอง *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) ในภาคกลาง. กรุงเทพฯ: กรมประมง.
- สมาน แก้วไวยุทธ, นิตยา เลาะห์จินดา, สุปราณี ชินบุตร, & ประไพสิริ สิริกาญจน. (2544). พยาธิ

สภาพของเห็บอกปลาไซพรีนิตที่เกิดจากปรสิตปลิงใส. Paper presented at the การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร และสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2554). การศึกษาเศรษฐกิจการผลิตปลาสวยงาม. กรุงเทพฯ: กระทรวงการเกษตรและสหกรณ์.

อรุณี รอดลอย. (2558). มาตรฐานสายพันธุ์และเกณฑ์การตัดสินปลาทองในประเทศไทย. นนทบุรี: วนิดาการพิมพ์.

อรุณี รอดลอย, สุจินต์ หนูขวัญ, จารุวรรณ เรืองทอง, & นาฎดา ศุภผล. (2552). 100 สายพันธุ์ปลาสวยงามต่างประเทศ. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ณิชาพัฒน์ โคตะมะ
วัน เดือน ปี เกิด	24 มีนาคม 2538
สถานที่เกิด	จังหวัดมหาสารคาม
วุฒิการศึกษา	หลักสูตรการศึกษาระดับบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	321 หมู่ที่ 1 อ.บรบือ ต.บรบือ จ.มหาสารคาม 44130

