บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 เชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบนาธรรมชาติ

จากการเก็บตัวอย่างกบนาธรรมชาติเพื่อหากบนาติดเชื้อ *Lankesterella* sp. ที่มีค่าความหนาแน่นเชื้อสูงสุดไปใช้ในการทดลองแพร่เชื้อในกบนาโดยผ่านปลิงพาหะ โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2549 ได้ตัวอย่างกบนาจำนวน 160 ตัวจาก 6 จังหวัดของประเทศไทยได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ เชียงใหม่ แพร่ และสระแก้ว ข้อมูลแสดงน้ำหนัก ขนาด SVL ของตัวอย่างกบที่นำมาศึกษาแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 แสดงข้อมูลตัวอย่างกบนาธรรมชาติที่นำมาทำการศึกษา

ตัวอย่างกบนาธรรมชาติ			ข้อมูลจากการวัดโดยเฉลี่ย	
จังหวัด	เดือน (พ.ศ. 2549)	จำนวน	น้ำหนัก (กรัม)	SVL (เซนติเมตร)
อุบลราชธานี	มีนาคม - ตุลาคม	55	55.53 ± 16.20	8.04 ± 1.04
นครราชสีมา	มิถุนายน	35	56.89 ± 16.69	8.09 ± 1.08
สุรินทร์	กรกฎาคม	14	54.00 ± 16.86	8.13 ± 1.01
เชียงใหม่	มีนาคม - กรกฎาคม	9	57.33 ± 14.65	8.11 ± 0.95
แพร่	สิงหาคม	17	51.00 ± 15.85	7.66 ± 1.13
สระแก้ว	สิงหาคม	30	56.37 ± 15.88	8.07 ± 1.00
รวม		160	55.47 ± 16.04	8.03 ± 1.04

4.1.1 ค่าการติดเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบนาธรรมชาติ

นำกบที่ได้จากการเก็บตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการ เจาะเลือดกบทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางและย้อมสี Giemsa ตรวจหาเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง นับจำนวนสปอโรซอยท์นำมาคำนวณค่าการติดเชื้อและค่าความหนาแน่นเชื้อในประชากรกบนาจากแต่ละจังหวัด ดังแสดงในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 แสดงค่าการติดเชื้อและค่าความหนาแน่นของเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบนาธรรมชาติจาก 6 จังหวัดของประเทศไทย

จังหวัด	ระยะเวลา (พ.ศ. 2549)	จำนวนกบ (ตัว)	จำนวนกบที่ติดเชื้อ (ตัว)	ค่าการติดเชื้อ (%)	ค่าความหนาแน่น (%)	
					ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด
อุบลราชธานี	มีนาคม – ตุลาคม	55	31	56.36	0.51 ± 0.68	0.01 – 2.87
นครราชสีมา	มิถุนายน	35	1	2.86	0.01 ± 0.00	0.01 – 0.01
สุรินทร์	กรกฎาคม	14	4	28.57	0.07 ± 0.06	0.01 – 0.15
เชียงใหม่	มีนาคม – กรกฎาคม	9	5	55.56	0.10 ± 0.10	0.03 – 0.26
แพร่	สิงหาคม	17	1	5.88	0.50 ± 0.00	0.50 – 0.50
สระแก้ว	สิงหาคม	30	11	36.67	1.49 ± 2.26	0.01 – 7.68
รวม		**160**	**53**	**33.13**	**0.63 ± 2.22%**	**0.01 – 7.68 %**

หมายเหตุ: ค่าการติดเชื้อ = $\frac{\text{จำนวนกบที่ติดเชื้อ}}{\text{จำนวนกบทั้งหมด}} \times 100$

ค่าความหนาแน่นเชื้อ = $\frac{\text{จำนวนสปอโรซอยท์ที่พบต่อเม็ดเลือดแดง 10,000 เซลล์}}{100}$

ผลการตรวจเชื้อในกบนาที่แสดงในตารางที่ 4-2 แสดงให้เห็นว่าค่าการติดเชื้อในประชากรกบและค่าความหนาแน่นเชื้อในกบแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันไป ประชากรกบนาจากจังหวัดเชียงใหม่ที่เก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคมถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2549 มีค่าการติดเชื้อสูงที่สุดคือ 80.00 % (พบการติดเชื้อในกบ 4 ตัวจากกบ 5 ตัว) ประชากรกบนาจากจังหวัดนครราชสีมาที่เก็บตัวอย่างในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2549 มีค่าการติดเชื้อต่ำที่สุดคือ 2.86 % (พบการติดเชื้อในกบ 1 ตัวจากกบ 35 ตัว)

ประชากรกบนาจากจังหวัดสระแก้วที่เก็บตัวอย่างในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549 มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นเชื้อสูงสุดคือ 1.49 % ประชากรกบนาจากจังหวัดนครราชสีมาที่เก็บตัวอย่างในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2549 มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นเชื้อต่ำสุดคือ 0.01%

ในการตรวจหากบนาตัวที่มีค่าความหนาแน่นเชื้อสูงสุดไปใช้ในการทดลองการแพร่เชื้อในกบนาผ่านปลิงพาหะต่อไปนั้น พบว่ากบนาที่มีค่าความหนาแน่นเชื้อสูงสุดได้แก่กบนาจากจังหวัดสระแก้วที่เก็บตัวอย่างในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549 ข้อมูลกบนาที่มีค่าความหนาแน่นเชื้อสูงสุดแสดงในตารางที่ 4-3 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4-3 แสดงข้อมูลกบนาที่มีค่าความหนาแน่นเชื้อ *Lankesterella* sp. สูงสุด

รหัสกบ	เพศ	ขนาด (SVL; cm)	น้ำหนัก (g)	จังหวัด	เวลา (พ.ศ. 2549)	ค่าความหนาแน่นเชื้อ
H_{srk}008	เมีย	8.3	41	สระแก้ว	สิงหาคม	7.68 %

นำกบที่มีค่าความหนาแน่นเชื้อสูงสุดไปใช้เป็นกบตัวให้เชื้อในการทดลองแพร่เชื้อโดยปลิงพาหะต่อไป

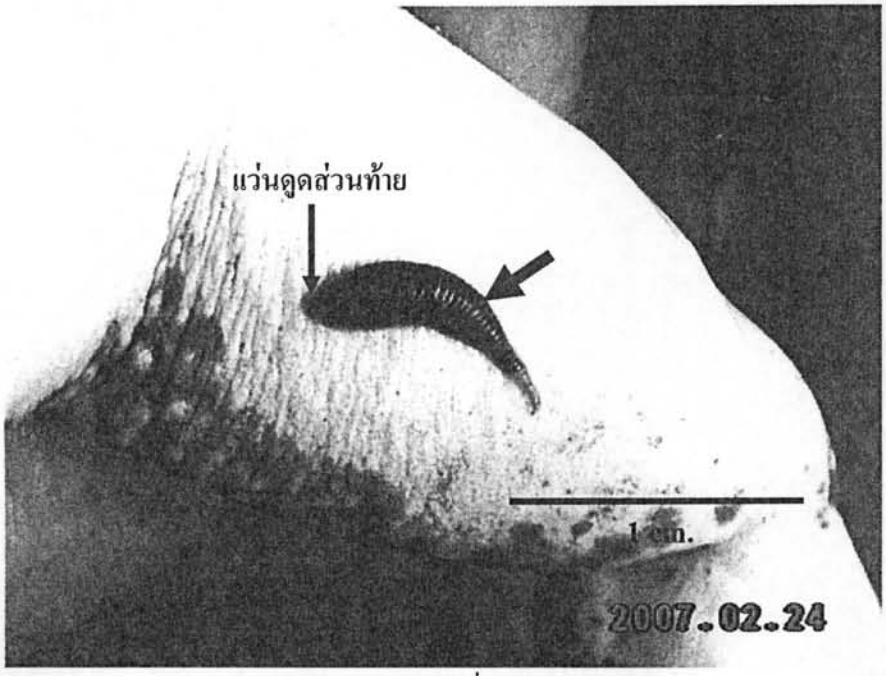
4.2 ตัวอย่างปลิง

4.2.1 การเก็บตัวอย่างปลิง

ในการเก็บตัวอย่างปลิงเพื่อนำมาใช้เป็นปลิงพาหะในการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบนานั้น ได้ทำการเก็บตัวอย่างปลิงจากกบนาธรรมชาติจำนวน 327 ตัวจากจังหวัดอุบลราชธานี ในเดือนตุลาคม 2549 พบปลิงจากธรรมชาติจำนวน 9 ตัวที่อาศัยอยู่บนตัวของกบนาและสามารถนำปลิงออกมาจากลำตัวกบ โดยใช้ปากคีบดึงปลิงบริเวณลำตัวส่วนที่ติดกับโคนแว่นดูดด้านท้ายเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ ข้อมูลผู้ให้อาศัยที่ปลิงเกาะอาศัย ตำแหน่งที่พบ ขนาดและจำนวนปลิงแสดงในตารางที่ 4-4 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4-4 แสดงข้อมูลผู้ให้อาศัย ตำแหน่งที่พบ จำนวนและขนาดโดยเฉลี่ยของปลิงที่เก็บตัวอย่าง

ผู้ให้อาศัย	ตำแหน่งที่พบ	จังหวัด	เดือน / พ.ศ.	จำนวนปลิง (ตัว)	ขนาด BL โดยเฉลี่ย (เซนติเมตร)
กบนาตัวเต็มวัย 327 ตัว	ซอกขา เท้า วงหูและท้อง	อุบลราชธานี	ตุลาคม/ 2549	9	0.72



ภาพที่ 4-1 แสดงตัวอย่างปลิง (ปลายหัวลูกศรใหญ่) ที่พบในบริเวณซอกขาของกบนาธรรมชาติจากจังหวัดอุบลราชธานีที่เก็บตัวอย่างในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2549 (ปลายหัวลูกศรเล็กแสดงแว่นดูดส่วนท้ายของปลิงที่ใช้เกาะยึดติดกับกบ)

4.2.2 การตรวจสอบชื่อชนิดทางวิทยาศาสตร์ของปลิง

จากการทำให้ปลิงสลบโดยใส่ใน 5-10 % ethyl alcohol และเก็บรักษาตัวอย่างใน 10% formalin ตรวจสอบชื่อชนิดทางวิทยาศาสตร์ของปลิงอ้างอิงตาม KEY TO THE FRESHWATER AND TERRESTRIAL EUHIRUDINEA OF THE SINO-JAPANESE REGION EXCLUDING BORNEAN SUBREGION และ KEY TO THE FRESHWATER AND TERRESTRIAL EUHIRUDINEA REPORTED FROM THE BORNEAN SUBREGION และ KEY TO THE FRESHWATER AND TERRESTRIAL EUHIRUDINEA OF THE INDIAN REGION (Sawyer, 1986) พบว่าตัวอย่างปลิงที่เก็บได้คือปลิงในกลุ่ม glossiphoniid ชนิด *Alboglossiphonia weberi* (Blanchard, 1897) แสดงผลการตรวจสอบทางอนุกรมวิธานดังต่อไปนี้

Phylum Annelida

Class Hirudinea Lamarck, 1818

Subclass Euhirudinea Lukin, 1956

Order Rhynchobdellida Blanchard, 1894

Family Glossiphoniidae Vaillant, 1890

Subfamily Haementeriinae Autrum, 1939

Genus *Alboglossiphonia* Lukin, 1976

Species *Alboglossiphonia weberi* (Blanchard, 1897)

Synonym: *Glossiphonia weberi* Blanchard, 1897

Type locality: Lake Manindjau, Sumatra

ตัวอย่างปลิงจัดอยู่ในไฟลัม Annelida ชั้น Hirudinea Lamarck, 1818 ชั้นย่อย Hirudinea Lamarck, 1818 เนื่องจากลักษณะการมีปล้องจำนวนทั้งหมด 32 ปล้อง เฉพาะแว่นดูดส่วนท้ายมี 7 ปล้อง และการวินิจฉัยขั้นต่อไปจัดอยู่ในอันดับ Rhynchobdellida Blanchard, 1894 เนื่องจากลักษณะการมีโพรบอสซีสที่ยืดหดได้ มีระบบหมุนเวียนเลือดที่แยกจากช่องว่างลำตัวและอาศัยอยู่ในน้ำ การมีลักษณะลำตัวรูปร่างแบนในแนวราบ มีการเลี้ยงดูตัวอ่อน จึงทำให้จัดอยู่ในวงศ์ Glossiphoniidae Vaillant, 1890 หรือปลิงในกลุ่ม glossiphoniid และเนื่องจากมีลักษณะการใช้สเปอร์มาโทฟอร์ในการผสมพันธุ์และมีการวางไข่ไว้ใต้ลำตัว ทำให้จัดอยู่ในวงศ์ย่อย Haementeriinae Autrum, 1939 ลักษณะที่ทำให้จัดอยู่ในสกุล *Alboglossiphonia* Lukin, 1976 ได้แก่ การมีจำนวนตา 3 คู่ โดยตาคู่แรกจากทางด้านหน้ามีระยะระหว่างตาทั้งสองที่ใกล้ชิดกันมากกว่าอีกสองคู่ถัดไป และต่อมน้ำลายเป็นแบบกระจายตัว

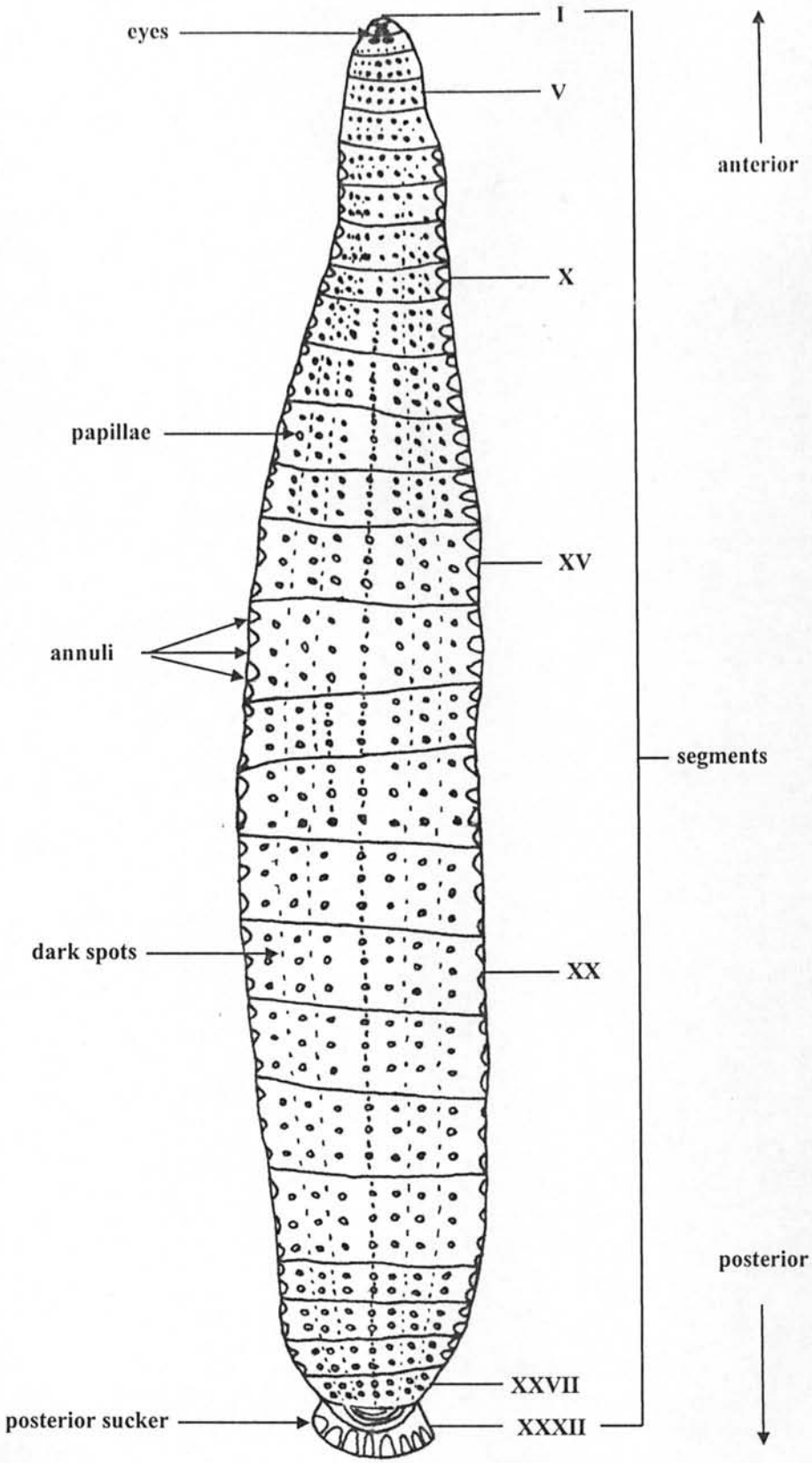
ลักษณะที่ใช้ในการวินิจฉัยว่าเป็นปลิงชนิด *Alboglossiphonia weberi* (Blanchard, 1897) ได้แก่ ทางด้านหลังของปล้องใหญ่แต่ละปล้องมีปุ่มขนาดเล็ก (papillae) จำนวน 7 ปุ่มต่อหนึ่งปล้อง เมื่อสังเกตดูปลิงทั้งตัวทางด้านหลังจะเห็นปุ่มเหล่านี้เรียงเป็นแถวตามแนวยาวของลำตัวจำนวน 7 แถว นอกจากนั้นทางด้านหลังของลำตัวปลิงยังสังเกตพบมีจุดดำขนาดเล็ก (dark spot) เรียงตามแนวยาวของลำตัวจำนวน 5 แถว (ภาพที่ 4-3)

4.2.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปลิง

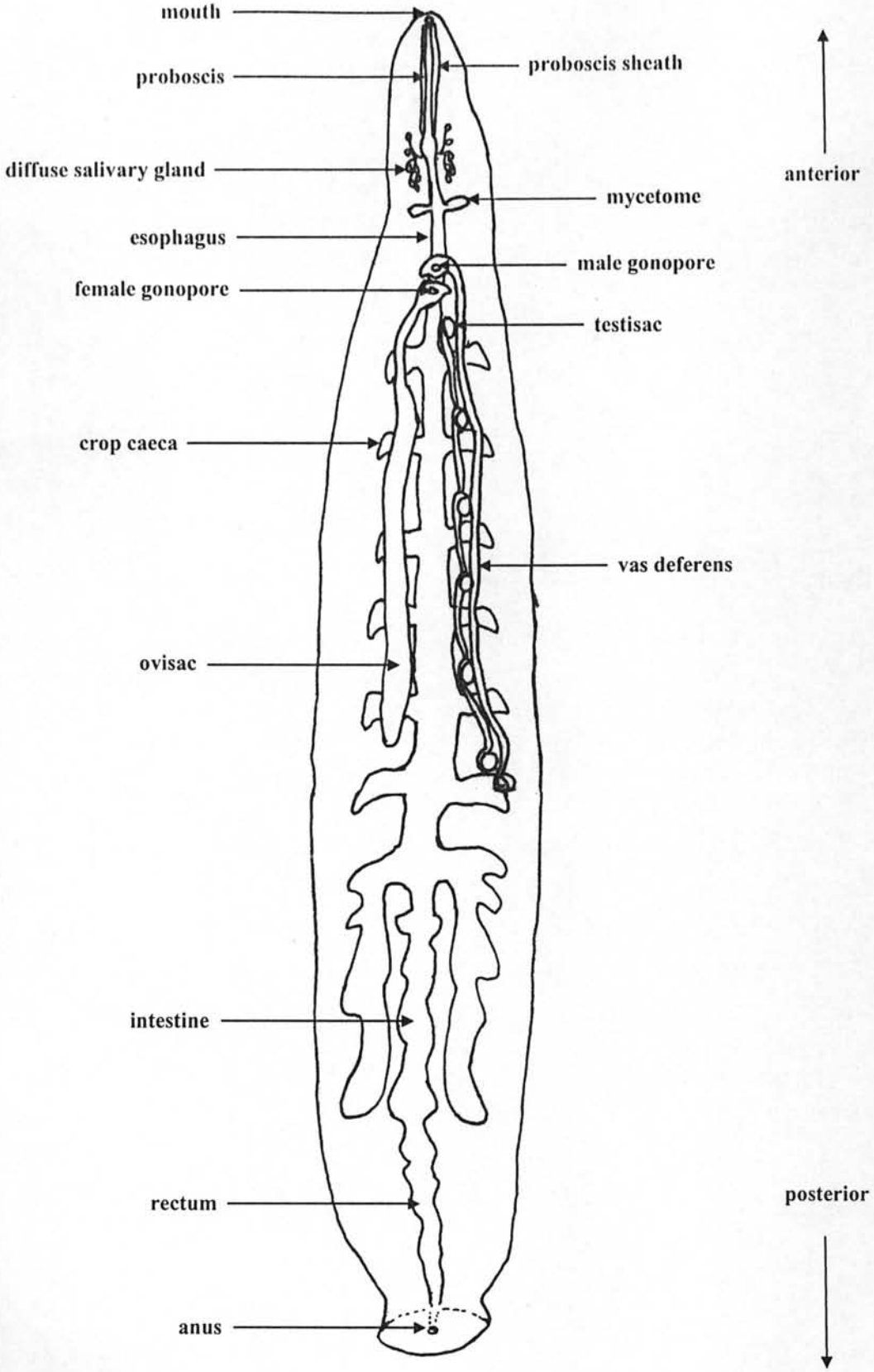
จากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของตัวอย่างปลิงที่ได้จากกบนาธรรมชาติได้ข้อมูลดังต่อไปนี้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา : จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างปลิงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่าลำตัวปลิงมีรูปร่างแบนในแนวราบ (dorsal - ventral flattened) ด้านท้าย (posterior) ของลำตัวมีขนาดกว้างกว่าด้านหน้า (anterior) ปล้องใหญ่บริเวณกลางลำตัวประกอบด้วยสามปล้องย่อย ด้านท้ายสุดของลำตัวมีแว่นดูดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ใน 6 ของความยาวลำตัวขณะเกาะพัก ไม่มีขากรรไกรแต่มีโพรบอสซีสจำนวน 1 อันที่ยืดหดได้อยู่ในปาก แว่นดูดส่วนท้ายมีรูขับถ่ายอยู่ตรงกลาง ตามี 3 คู่ โดยตาคู่แรกจากทางด้านหน้ามีระยะระหว่างตาทั้งสองที่ใกล้ชิดกันมากกว่าอีกสองคู่ถัดไป รูเปิดทางออกของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเพศอยู่ติดกันในปล้องย่อยเดียวกัน พื้นผิวลำตัวด้านหลังค่อนข้างเรียบ ลำตัวแบ่งเป็นปล้อง (segment) จำนวน 32 ปล้อง ปล้องบริเวณกลางลำตัวประกอบด้วย 3 ปล้องเล็ก (annulus) ในแต่ละปล้องเล็กมีปุ่มขนาดเล็ก (papillae) จำนวน 7 ปุ่มเรียงเป็นแถวตามแนวยาวของลำตัวและมีจุดสีดำ (dark spot) ขนาดเล็กเรียงตามแนวยาวของลำตัวจำนวน 5 แถว (ภาพที่4-2)

ลักษณะทางกายวิภาค : จากการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคโดยการผ่าตัดตัวอย่างปลิงบนแผ่นสไลด์และศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าปลิงชนิด *A. weberi* นี้มีต่อมน้ำลาย (diffuse salivary gland) อยู่ที่บริเวณโคนของโพรบอสซีส มีอวัยวะพิเศษที่ติดกับหลอดอาหารหรือที่เรียกว่าไมซีโตม (mycetome) ลักษณะเป็นถุงอยู่ติดกับหลอดอาหารถัดจากต่อมน้ำลายไปทางด้านท้าย กระเพาะอาหาร (crop caeca) จำนวน 7 คู่ โดยหกคู่แรกไม่มีกิ่งแยกในขณะที่คู่ที่เจ็ดจะแตกออกเป็นกิ่งแยก อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (testis) อยู่ในถุงเทสทิแซก (testisac) จำนวน 6 คู่ อยู่ระหว่างกระเพาะอาหารแต่ละคู่ อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียหรือรังไข่ (ovary) จำนวน 1 คู่ อยู่ในถุงโอวิแซก (ovisac) มีลักษณะยาวเรียวขนานกับด้านยาวของลำตัว ทั้งเทสทิแซกและโอวิแซกอยู่ในช่องว่างลำตัว (ภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4-2 รูปวาดแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาทางด้านหลังของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ตัวเต็มวัย



ภาพที่ 4-3 รูปวาดแสดงลักษณะทางกายวิภาคของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ตัวเต็มวัย

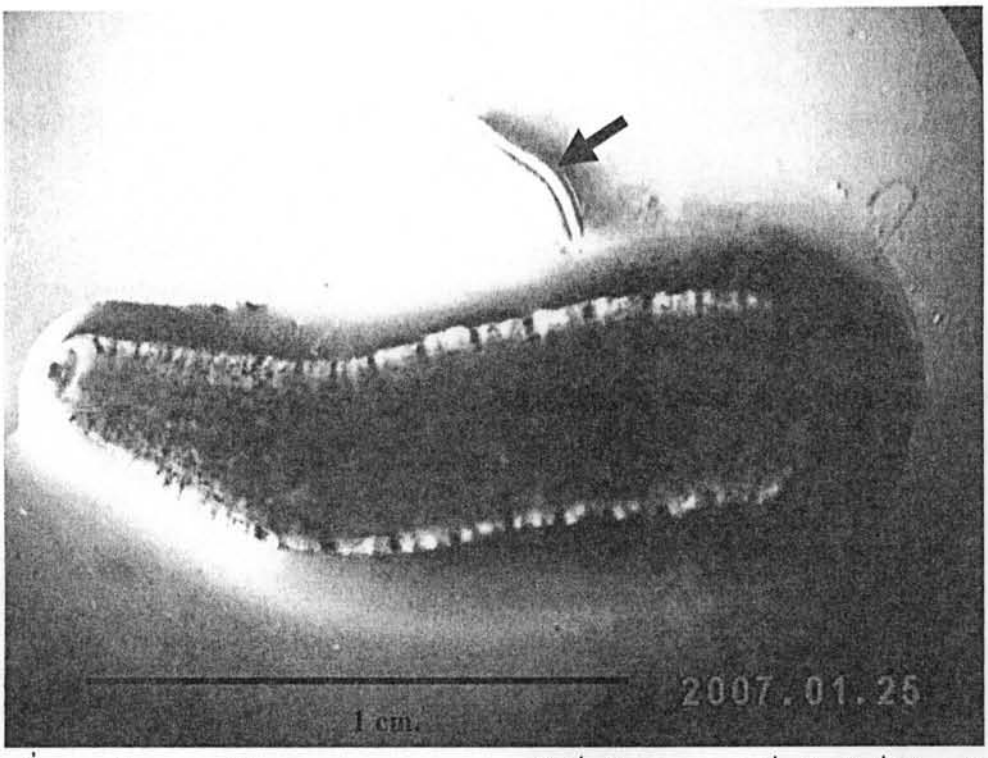
4.2.4 การสังเกตการเจริญและชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปลิง

จากการนำตัวอย่างปลิง *Alboglossiphonia weberi* จากธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25-30 °C โดยการให้ดูดเลือดกบนาจากฟาร์มเลี้ยงในจังหวัดเชียงใหม่ที่ตรวจไม่พบเชื้อปรสิตในเลือดเป็นอาหารและเลี้ยงในภาชนะใส่น้ำกรอง สังเกตการเจริญและชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปลิงจนกระทั่งปลิงขยายพันธุ์เพิ่มจำนวน ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4-5 ต่อไปนี้

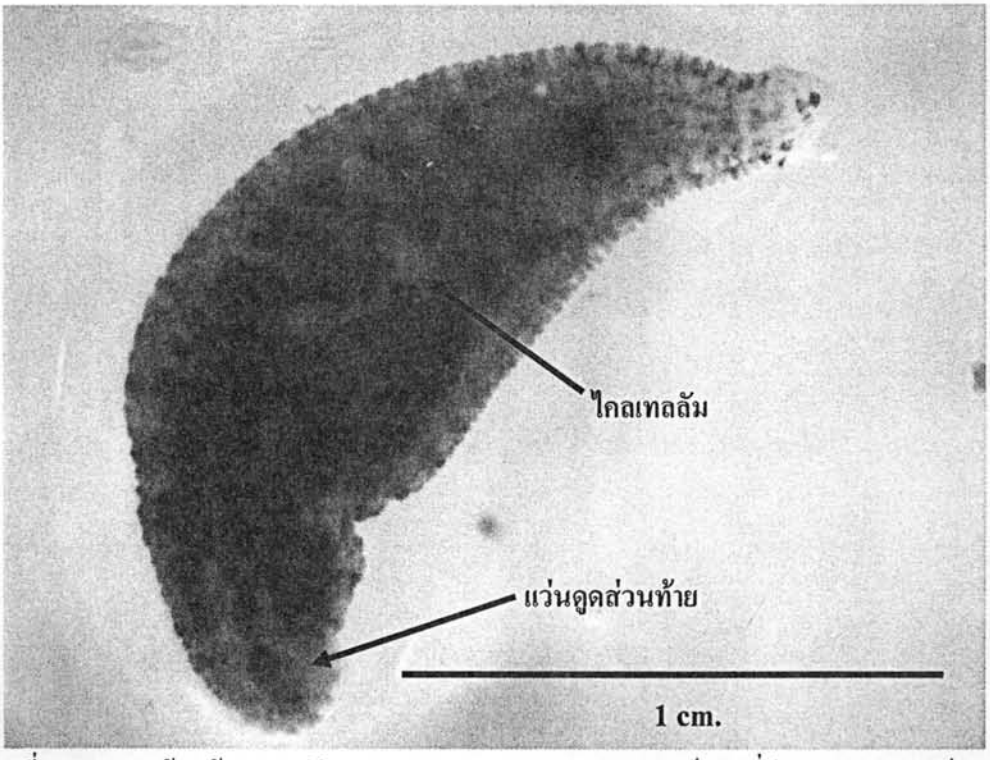
ตารางที่ 4-5 แสดงข้อมูลการเจริญและชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปลิง *Alboglossiphonia weberi*

สิ่งที่สังเกต	รายละเอียด
จำนวนไข่ต่อหนึ่งแพไข่	ประมาณ 120 – 180 ฟอง
จำนวนแพไข่	1 แพไข่ต่อแม่ปลิง 1 ตัว
ตำแหน่งที่วางไข่	ใต้ลำตัวของแม่ปลิง
รูปร่างของไข่	รูปร่างกลมสีขาวขุ่นอมเขียวหรือเหลือง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4-0.5 มิลลิเมตร
ระยะเวลาการฟักไข่	4-5 วัน
การเจริญจากระยะเอคโตบลาสท์จนถึงฟัก	ระยะเอคโตบลาสท์อยู่ใต้ลำตัวแม่ปลิงใช้เวลา 3-4 วัน
ลักษณะตัวอ่อน	รูปร่างเหมือนปลิงตัวเต็มวัยอยู่ใต้ท้องแม่ปลิง
จำนวนตัวอ่อนที่อยู่รอดจากแม่ปลิง 1 ตัว	50 - 100 ตัว
ระยะเวลาการเลี้ยงดูตัวอ่อน	1-5 วัน
ระยะเวลาการเติบโตจากตัวอ่อนไปเป็นตัวเต็มวัยที่มีการผสมพันธุ์	40 - 50 วัน
ระยะเวลาตลอดวงชีวิต	55 - 65 วัน

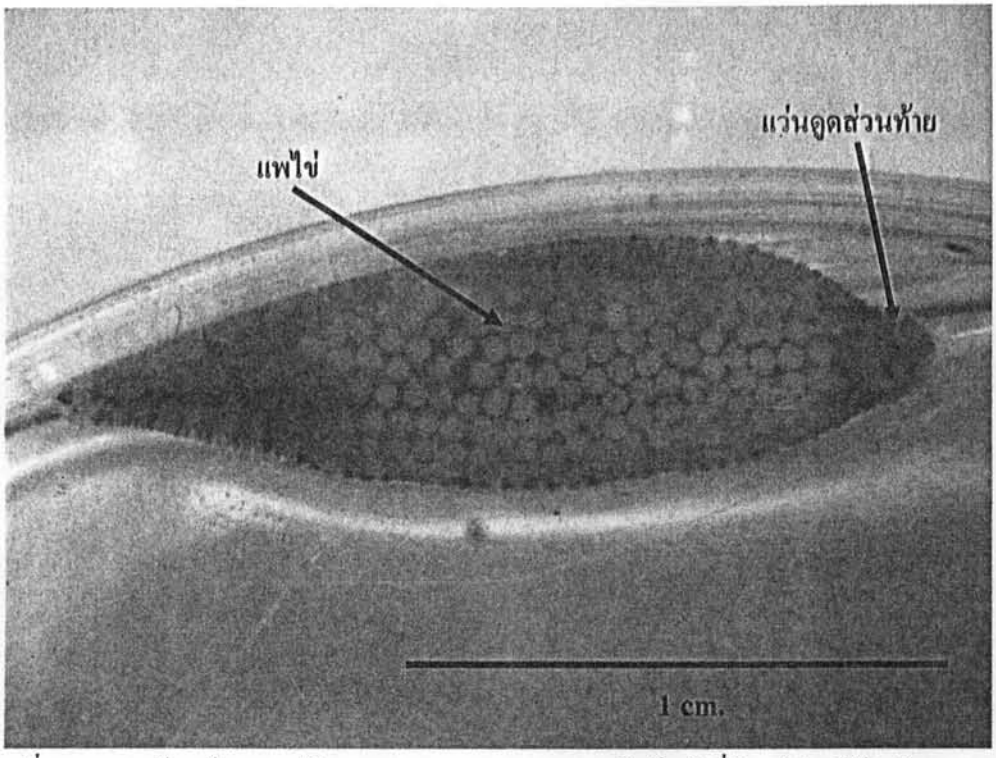
ข้อมูลชีววิทยาการสืบพันธุ์ : เมื่อปลิง *A. weberi* โตเต็มวัยจะผสมพันธุ์โดยใช้วิธีการผสมข้ามตัว (cross-fertilizing) ระหว่างปลิงสองตัวที่ปล่อยสเปอร์มาโทฟอร์ (spermatophore) ที่ภายในบรรจุสเปิร์มจำนวนมากออกมาทางรูเปิดอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ มาติดไว้กับลำตัวและทะลุไปยังชั้นเนื้อเยื่อภายในช่องว่างลำตัวของอีกตัวหนึ่ง (ภาพที่ 4-4) เมื่อส่วนปลายของสเปอร์มาโทฟอร์แตกออก สเปิร์มจะเข้าไปผสมกับไข่ในรังไข่ที่อยู่ในโอวิแซกซึ่งจัดเป็นการปฏิสนธิภายใน หลังจากนั้นจะสังเกตเห็นการเจริญของไคลเทลลัมในบริเวณปล้องที่ X-XII ที่มีรูเปิดอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย เพื่อช่วยสร้างสารที่เป็นส่วนประกอบของแพไข่ในการวางไข่ของปลิง (ภาพที่ 4-5) ไข่ที่ผ่านการปฏิสนธิหรือไซโกต (zygote) จะออกมาทางรูเปิดอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย วางไข่ได้ลำตัวของแม่ปลิงโดยไข่อยู่ในแพไข่หรือโคคูน (cocoon) ที่ประกอบด้วยของเหลวข้นที่มีหน้าที่ยึดไข่ไม่ให้หลุดออกจากลำตัวของแม่ปลิง (ภาพที่ 4-6) ต่อมาไซโกตจะเจริญเป็นเอ็มบริโอและมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเอ็มบริโอระยะเอคโตบลาสต์ (ectoblast)ที่ยังไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (ภาพที่ 4-7) จนกระทั่งมีการเจริญของอวัยวะต่างๆจนสมบูรณ์กลายเป็นลูกปลิงที่เคลื่อนที่ได้อยู่ใต้ลำตัวของแม่ปลิง การเลี้ยงดูตัวอ่อนของปลิงชนิดนี้มีการดูแลตัวอ่อนทั้งในระยะเอ็มบริโอที่มีลักษณะภายนอกไม่แตกต่างจากไข่และระยะเอคโตบลาสต์จนกระทั่งเจริญเป็นลูกปลิงที่พร้อมจะดูดเลือดกบแล้ว (ภาพที่ 4-8) จึงจะทิ้งตัวแยกออกจากแม่ปลิง ซึ่งถ้ามีกบให้ปลิงดูดเลือดอย่างพอเพียง ลูกปลิงจะสามารถเติบโตไปเป็นปลิงตัวเต็มวัยที่ผสมพันธุ์ได้ ซึ่งมีขนาดความยาวลำตัวมากกว่า 1.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4-9) ได้ภายในระยะเวลา 2 เดือน วงชีวิตของปลิง *A. weberi* ที่สรุปได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงในภาพที่ 4-10



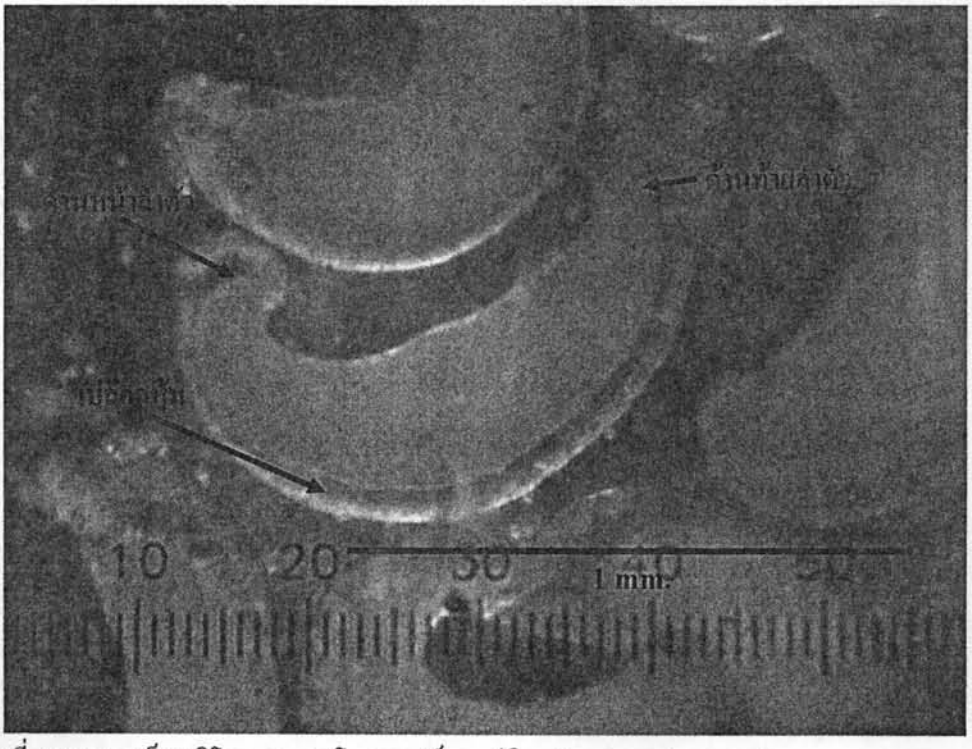
ภาพที่ 4-4 รูปถ่ายแสดงปลิง *Alboglossiphoni weberi* ตัวเต็มวัยและถุงสเปอร์มาโทฟอร์ (ปลายหัวลูกศร)



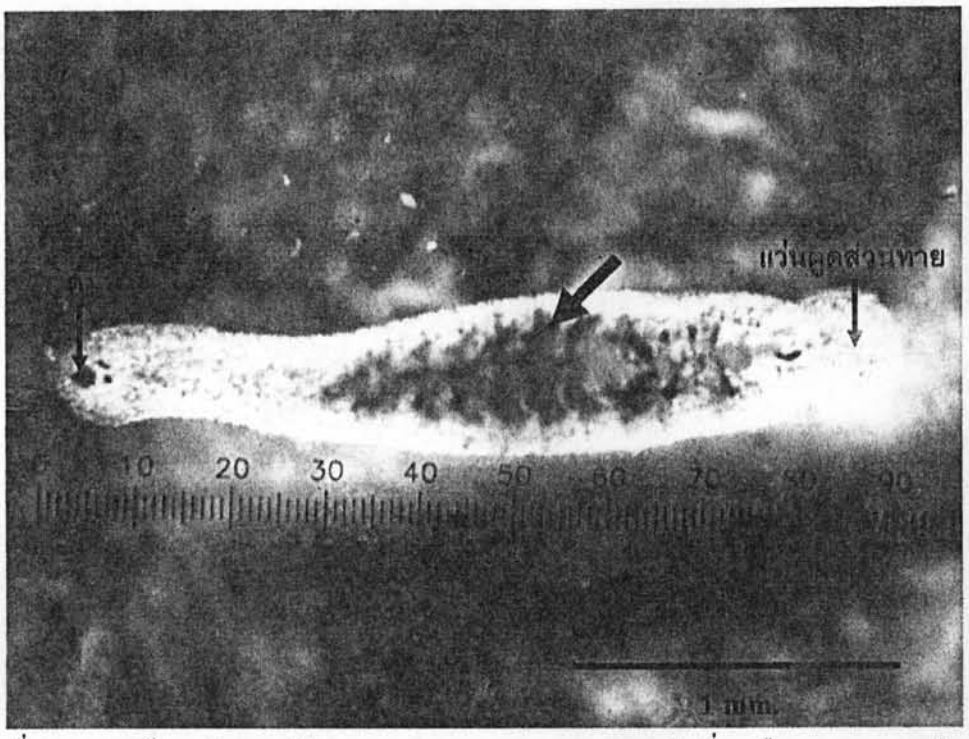
ภาพที่ 4-5 แสดงด้านท้องของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ตัวเต็มวัยที่ผ่านการผสมพันธุ์และมีการเจริญของไคลเทลลัม



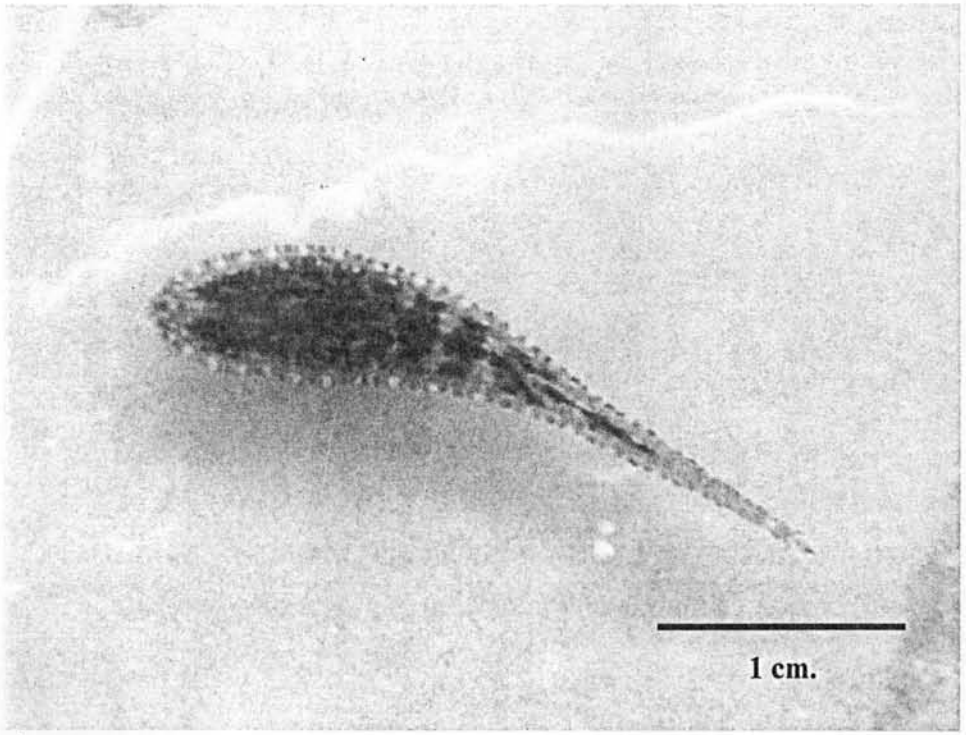
ภาพที่ 4-6 แสดงด้านท้องของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ตัวเต็มวัยที่มีแพไข่อยู่ใต้ลำตัว



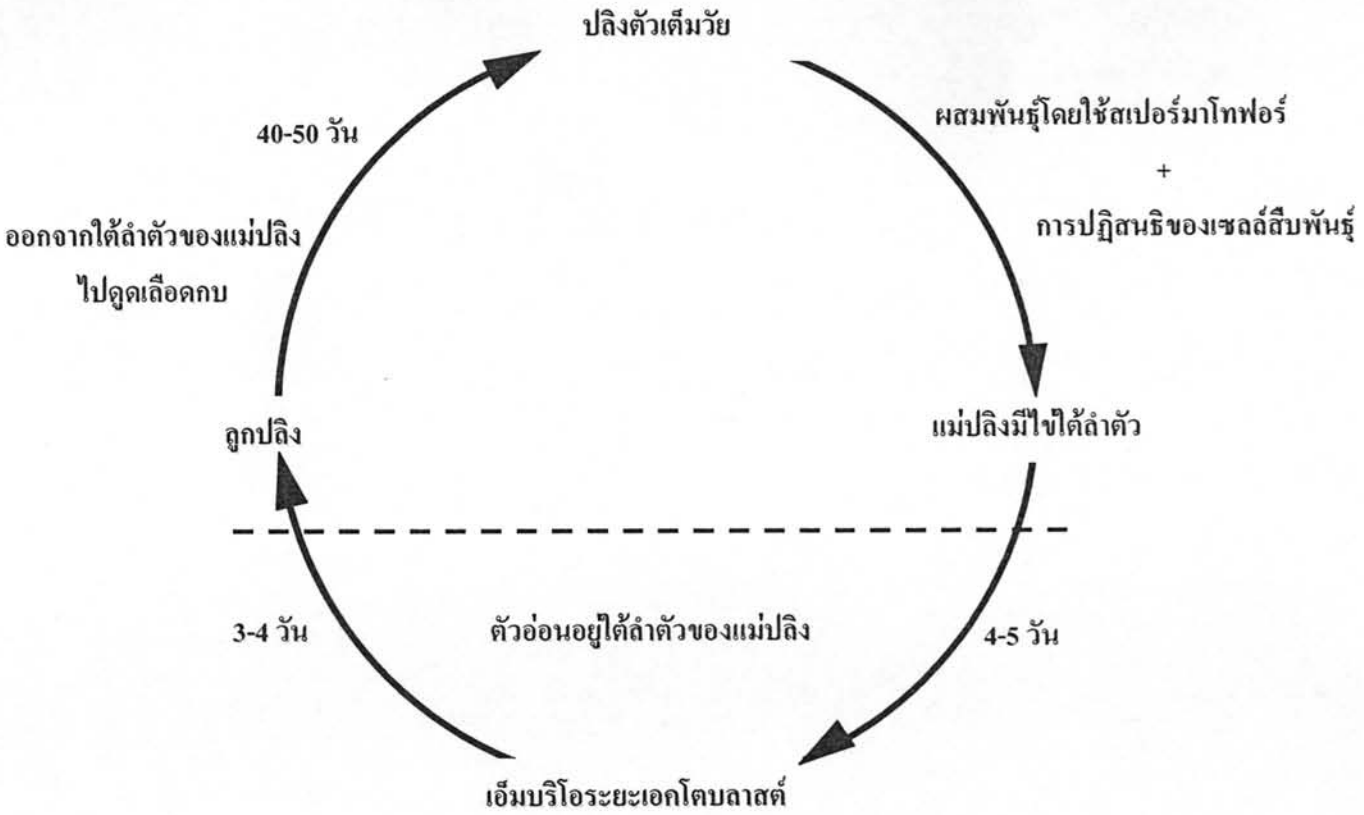
ภาพที่ 4-7 แสดงเอ็มบริโอระยะเอคโตบลาสต์ของปลิง *Alboglossiphonia weberi*



ภาพที่ 4-8 แสดงด้านหลังของปลิง *Alboglossiphonia weberi* อายุ 2 วันที่ดูดเลือดกบและแยกตัวออกมาจากแม่ปลิง ลำตัวลูกปลิงมีความใสสามารถสังเกตเลือดกบในกระเพาะอาหาร (ปลายหัวลูกศรใหญ่)



ภาพที่ 4-9 แสดงด้านหลังของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ตัวเต็มวัย



ภาพที่ 4-10 แสดงวงชีวิตของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่สรุปได้จากการศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปลิง

4.2.6 การเพาะเลี้ยงปลิงเพื่อการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp.

เพาะเลี้ยงปลิง *Alboglossiphonia weberi* ในภาชนะใส่น้ำกรองที่อุณหภูมิ 25- 30 °C โดยให้ปลิงดูดเลือดกบนาที่ตรวจไม่พบเชื้อชนิดใดในเลือดเป็นอาหาร จนกระทั่งปลิงสืบพันธุ์และวางไข่ ลูกปลิงที่เกิดใหม่ให้ดูดเลือดกบนาที่ตรวจไม่พบเชื้อใดๆ ในเลือดเป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำทุกวัน นำลูกปลิงที่เติบโตจนมีขนาดความยาวลำตัวขณะเกาะพักประมาณ 0.5 เซนติเมตรไปใช้สำหรับการทดลองดังต่อไปนี้

- ชุดที่ 1 ใช้ลูกปลิงจำนวน 20 ตัว สำหรับการทดลองแพร่เชื้อในปลิงและตรวจผลโดยวิธีผ่าตัดและย้อมด้วยสี Giemsa
- ชุดที่ 2 ใช้ลูกปลิงจำนวน 12 ตัว สำหรับการทดลองแพร่เชื้อในปลิงและตรวจผลโดยตัดชิ้นเนื้อเยื่อมาทำสไลด์ถาวรและย้อมด้วยสี toluidine blue
- ชุดที่ 3 ใช้ลูกปลิงจำนวน 110 ตัว สำหรับการทดลองแพร่เชื้อในกบนาโดยปลิงพาหะ

ลูกปลิงจะเติบโตจนกระทั่งได้ขนาดสำหรับการทดลองนั้นใช้เวลาประมาณ 10 วัน เหลือปลิงอยู่รอดประมาณ 30 - 50 ตัวต่อจากแม่ปลิงหนึ่งตัว ดังนั้นการเพาะเลี้ยงปลิงเพื่อให้ได้จำนวนเพียงพอต่อการทดลอง ใช้แม่ปลิงจำนวน 5 ตัวที่มีขนาดความยาวลำตัวขณะเกาะพักประมาณ 1.5-1.8 เซนติเมตร ซึ่งเป็นขนาดของปลิงตัวเต็มวัยที่มีขนาดใหญ่และสามารถวางไข่ได้

4.3 การทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิง

4.3.1 การทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิง ตรวจผลโดยวิธีผ่าตัดและย้อมด้วยสี Giemsa

ในการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิงตรวจผลโดยวิธีผ่าและย้อมด้วยสี Giemsa นั้นแบ่งปลิงเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมดังต่อไปนี้

- กลุ่มทดลองใช้ปลิง *A. weberi* ที่มีขนาดความยาวลำตัวประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 15 ตัวมาดูดเลือดกบบนาธรรมชาติที่ติดเชื้อ เมื่อปลิงดูดเลือดกบแล้วจึงแยกปลิงออกมาเลี้ยงไว้ในภาชนะใส่น้ำกรอง นำปลิงมาตรวจผลการติดเชื้อหลังจากดูดเลือดกบ 14, 28, 35 และ 42 วัน วันละ 3 ตัว โดยวิธีผ่าตัดแยกทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายของปลิงลงบนสไลด์แล้วย้อมด้วยสี Giemsa

- กลุ่มควบคุมใช้ปลิง *A. weberi* ที่ที่มีขนาดความยาวลำตัวประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 5 ตัวมาดูดเลือดกบบนาที่ปลอดเชื้อ นำปลิงมาตรวจผลการติดเชื้อในทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายของปลิงเช่นเดียว กับกลุ่มทดลอง แต่นำปลิงมาตรวจผลวันละ 1 ตัว

ผลการตรวจเชื้อในทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายของปลิงแสดงในตารางที่ 4-6 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4-6 แสดงผลการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิงกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ตรวจผลโดยวิธีผ่าตัดและย้อมด้วยสี Giemsa

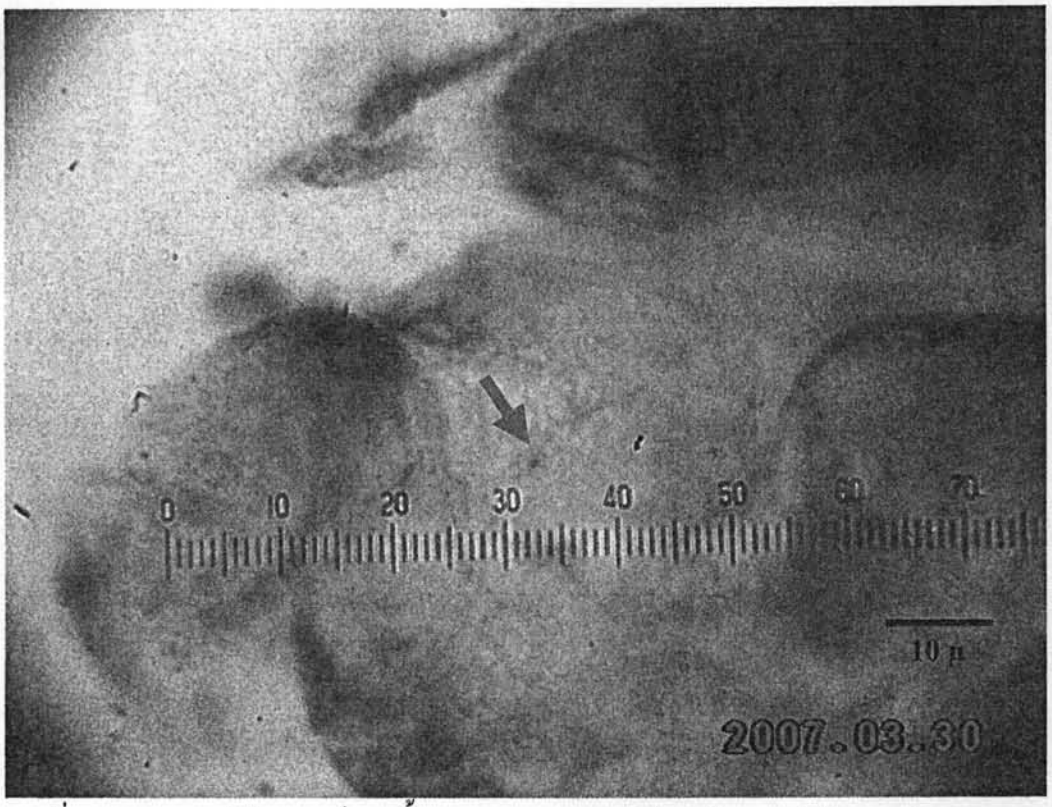
PE (วัน)	ปลิงกลุ่มทดลอง			ปลิงกลุ่มควบคุม		
	จำนวน (ตัว)	จำนวนปลิงที่พบเชื้อในอวัยวะ		จำนวน (ตัว)	จำนวนปลิงที่พบเชื้อในอวัยวะ	
		ทางเดินอาหาร	ต่อมน้ำลาย		ทางเดินอาหาร	ต่อมน้ำลาย
14	3	2 (66.67%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)
21	3	2 (66.67%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)
28	3	1 (33.33%)	2 (66.67%)	1	0 (0%)	0 (0%)
35	3	3 (100.00%)	3 (100.00%)	1	0 (0%)	0 (0%)
42	3	3 (100.00%)	1 (33.33%)	1	0 (0%)	0 (0%)

หมายเหตุ

PE = post exposure day คือจำนวนวันระหว่างวันที่ปลิงดูดเลือดกบไปถึงวันที่ผ่าปลิงเพื่อทำการตรวจเชื้อในทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายของปลิง

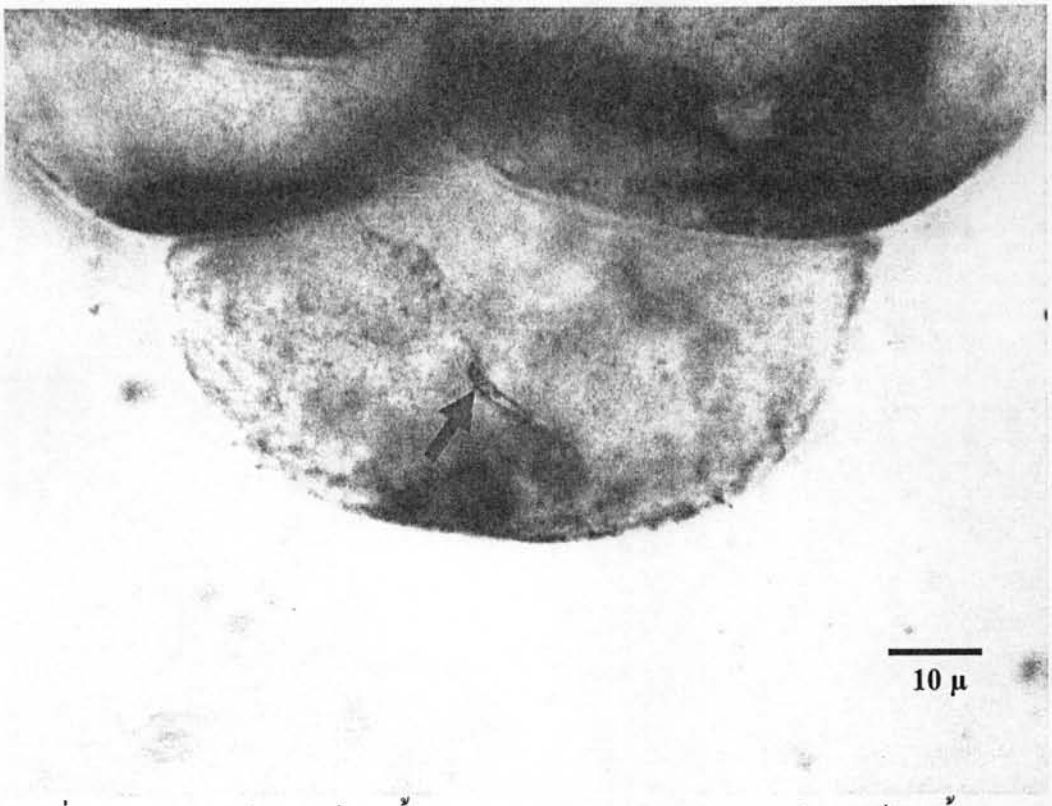
ในกลุ่มทดลองพบเชื้อ *Lankesterella* sp. ในทางเดินอาหารของปลิงหลังจากปลิงดูดเลือดกบที่ติดเชื้อ 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน และพบเชื้อในต่อมน้ำลายของปลิงหลังจากปลิงดูดเลือดกบที่ติดเชื้อ 28, 35 และ 42 วัน แสดงว่าเชื้อใช้เวลาอย่างน้อย 28 วัน ในการเคลื่อนที่จากทางเดินอาหารมายังต่อมน้ำลาย สำหรับในกลุ่มควบคุมนั้นไม่พบการติดเชื้อทั้งในทางเดินอาหารและต่อมน้ำลาย

จากการสังเกตเชื้อ *Lankesterella* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าสปอโรซอยท์ที่พบในทางเดินอาหารของปลิงมีลักษณะยาวเรียว และสังเกตเห็นนิวเคลียสอยู่กลางเซลล์ ลักษณะโดยทั่วไปไม่แตกต่างจากสปอโรซอยท์ที่พบในเลือดของกบ สปอโรซอยท์ที่พบมีทั้งอยู่ในชั้นเนื้อเยื่อผนังบุทางเดินอาหารของปลิงบริเวณกระเพาะอาหารและหลอดอาหาร นอกจากนี้ยังพบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ถัดจากชั้นเนื้อเยื่อผนังบุทางเดินอาหาร (ภาพที่ 4-11)



ภาพที่ 4-11 แสดงสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. (ปลายหัวลูกศร) ในทางเดินอาหารของปลิง *Alboglossiphonia weberi* หลังจากปลิงดูดเลือดกบติดเชื้อมาแล้ว 14 วัน ตรวจผลโดยวิธีนำปลิงมาผ่าตัดและย้อมด้วยสี Giemsa

จากการสังเกตเชื้อ *Lankesterella* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าสปอโรซอยท์ที่พบในต่อมน้ำลายของปลิงมีลักษณะยาวเรียว และสังเกตเห็นนิวเคลียสอยู่กลางเซลล์ ลักษณะโดยทั่วไปไม่แตกต่างจากสปอโรซอยท์ที่พบในเลือดกบและทางเดินอาหารของปลิง (ภาพที่ 4-12)



ภาพที่ 4-12 แสดงสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. (ปลายหัวลูกศร) ในเซลล์ต่อมน้ำลายของปลิง *Alboglossiphonia weberi* หลังจากปลิงดูดเลือดกบติดเชื้อมาแล้ว 42 วัน ตรวจผลโดยวิธีนำปลิงมาผ่าตัดและย้อมด้วยสี Giemsa

4.3.2 การทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิง ตรวจผลโดยวิธีตัดชิ้นเนื้อเยื่อทำสไลด์ถาวรและย้อมด้วยสี toluidine blue

แบ่งปลิงเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมดังต่อไปนี้

- กลุ่มทดลองใช้ปลิง *A. weberi* ที่มีขนาดความยาวลำตัวประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 8 ตัวมาดูดเลือดกบนาธรรมชาติที่ติดเชื้อ เมื่อปลิงดูดเลือดกบแล้วจึงแยกปลิงออกมาเลี้ยงไว้ในภาชนะใส่น้ำกรอง นำปลิงมาตรวจผลการติดเชื้อหลังจากปลิงดูดเลือดกบที่ติดเชื้อ 28, 35, 42 และ 49 วัน วันละ 2 ตัว ตรวจเชื้อในปลิงโดยวิธีตัดชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายของปลิงด้วยเครื่องไมโครโตม นำชิ้นเนื้อเยื่อมาติดลงบนสไลด์ ผ่านเทคนิคการทำสไลด์ถาวรและย้อมด้วยสี toluidine blue

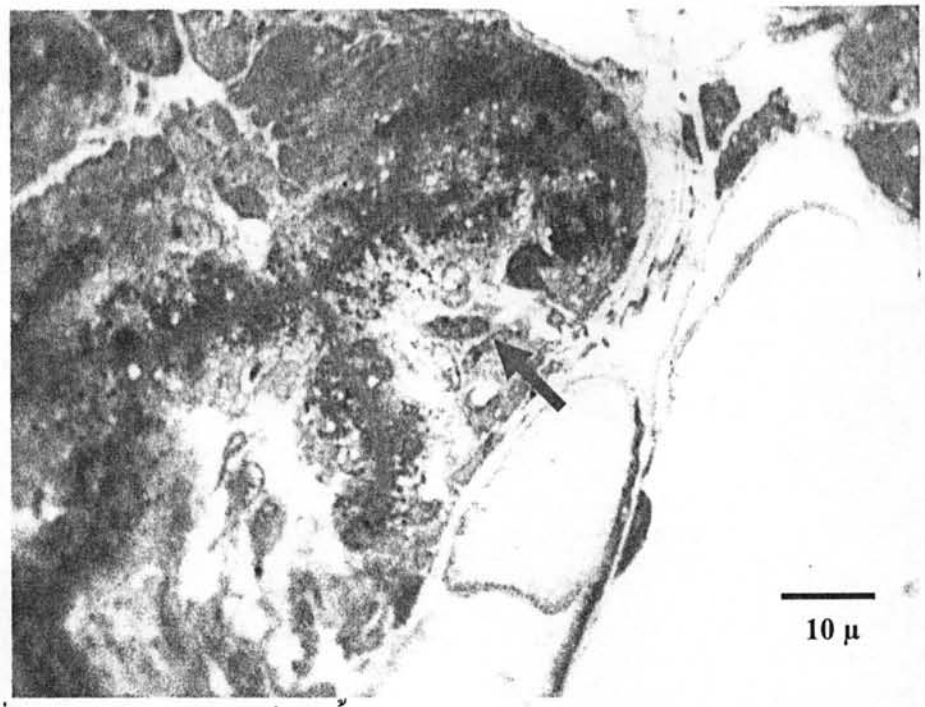
- กลุ่มควบคุมใช้ปลิง *A. weberi* ที่มีขนาดความยาวลำตัวประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 ตัวมาดูดเลือดกบนาปลอดเชื้อและตรวจหาเชื้อในทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายของปลิงเช่นเดียวกับปลิงในกลุ่มทดลอง แต่นำปลิงมาตรวจผลวันละ 1 ตัว

ผลการตรวจเชื้อในทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายของปลิงแสดงในตารางที่ 4-7 ดังต่อไปนี้

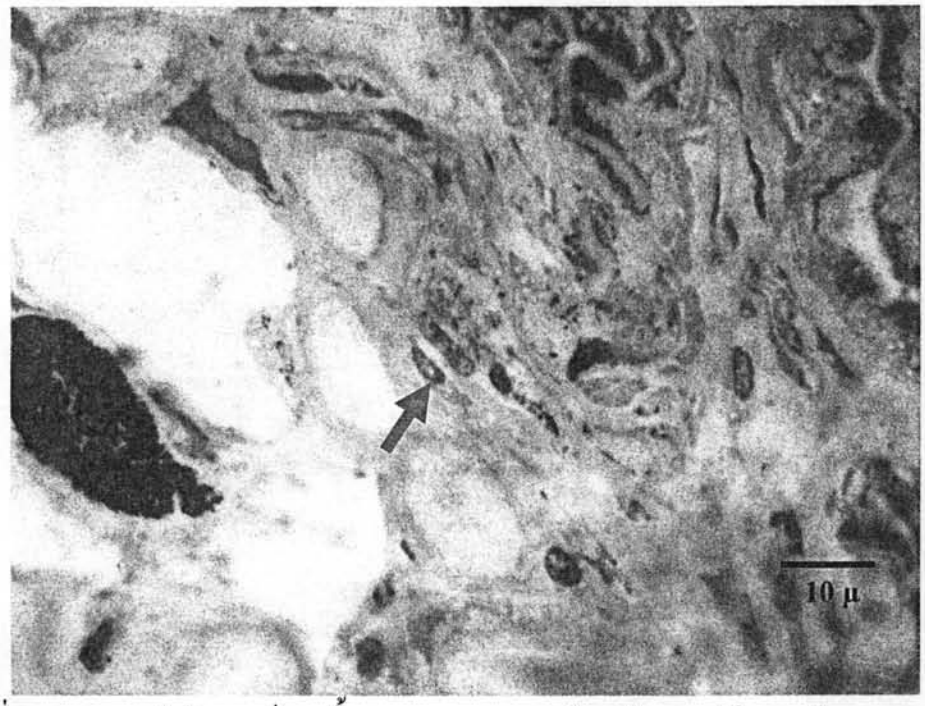
ตารางที่ 4-7 แสดงผลการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิงกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ตรวจผลตรวจผลโดยวิธีตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อทำสไลด์ถาวรและย้อมด้วยสี toluidine blue

PE (วัน)	ปลิงกลุ่มทดลอง			ปลิงกลุ่มควบคุม		
	จำนวน (ตัว)	จำนวนปลิงที่พบเชื้อในอวัยวะ		จำนวน (ตัว)	จำนวนปลิงที่พบเชื้อในอวัยวะ	
		ทางเดินอาหาร	ต่อมน้ำลาย		ทางเดินอาหาร	ต่อมน้ำลาย
28	2	2 (100.00%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)
35	2	2 (100.00%)	2 (100.00%)	1	0 (0%)	0 (0%)
42	2	2 (100.00%)	2 (100.00%)	1	0 (0%)	0 (0%)
49	2	2 (100.00%)	2 (100.00%)	1	0 (0%)	0 (0%)

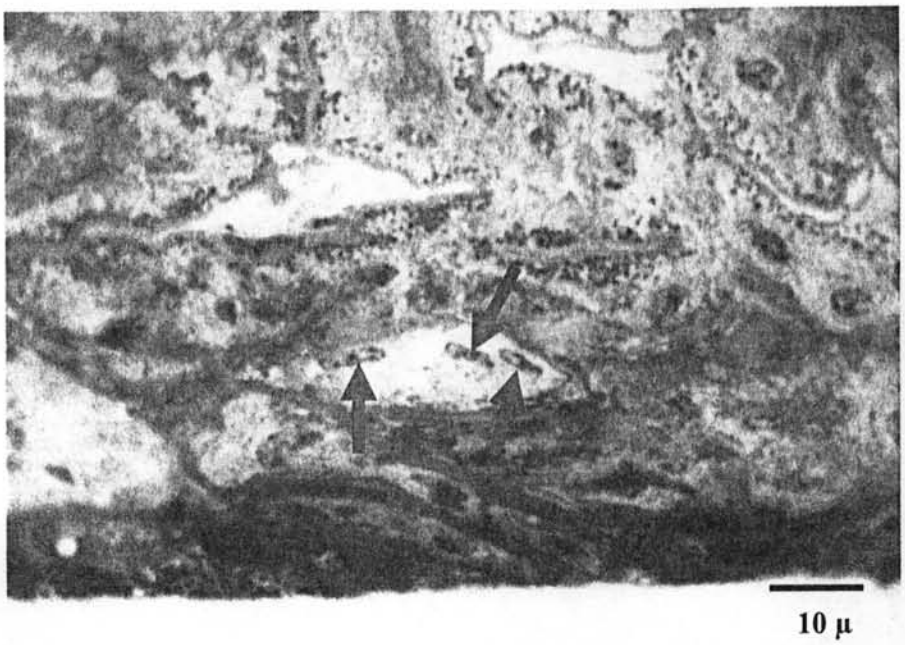
ในกลุ่มทดลองพบเชื้อในทางเดินอาหารในวันที่ 28, 35, 42 และ 49 หลังจากที่ปลิงดูดเลือดกบที่ติดเชื้อ และพบเชื้อในต่อมน้ำลายในวันที่ 35, 42 และ 49 หลังจากที่ปลิงดูดเลือดกบที่ติดเชื้อ แสดงว่าเชื้อ *Lankesterella* sp.ใช้เวลาอย่างน้อย 35 วันในการเคลื่อนที่จากทางเดินอาหารมายังต่อมน้ำลาย สำหรับในกลุ่มควบคุมนั้นไม่พบการติดเชื้อทั้งในทางเดินอาหารและต่อมน้ำลาย



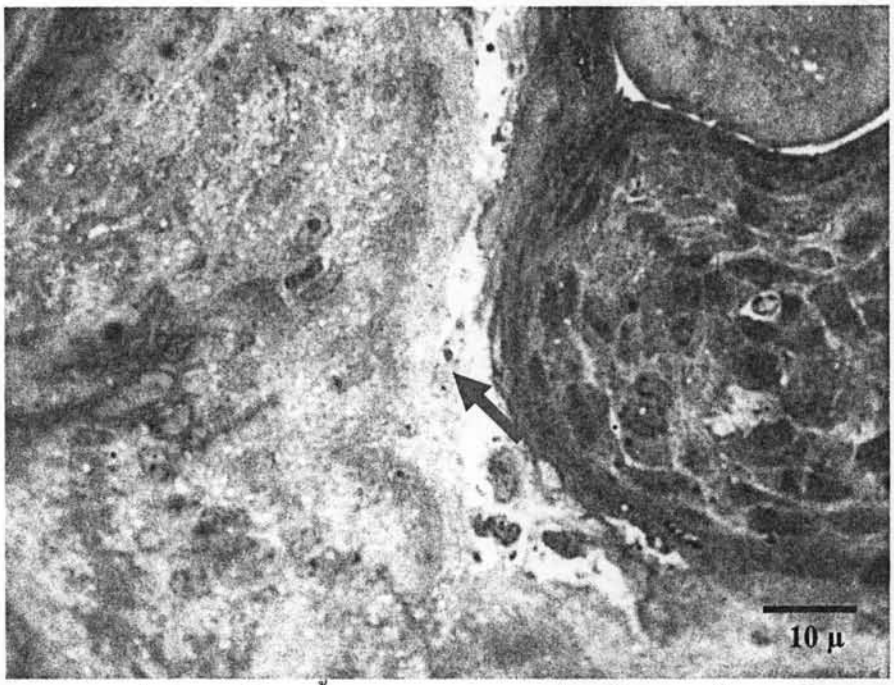
ภาพที่ 4-13 แสดงสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. (ปลายหัวลูกศร) ในทางเดินอาหารของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่ดูดเลือดกบติดเชื้อมาแล้ว 28 วัน ตรวจผลโดยวิธีตัดชิ้นเนื้อเยื่อทำสไลด์ถาวรและย้อมด้วยสี toluidine blue



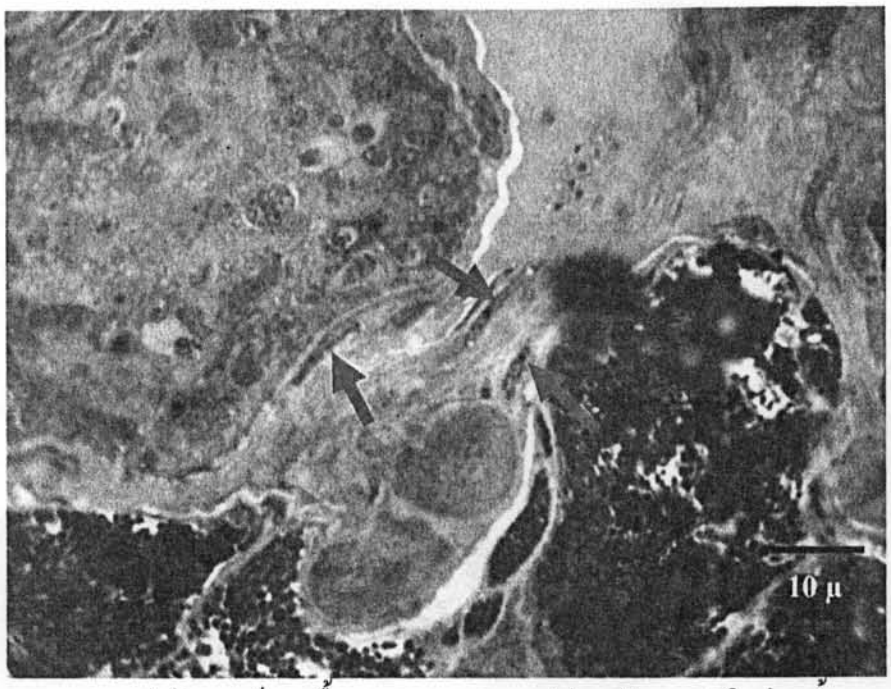
ภาพที่ 4-14 แสดงสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. (ปลายหัวลูกศร) ในทางเดินอาหารของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่ดูดเลือดกบติดเชื้อมาแล้ว 35 วัน ตรวจผลโดยวิธีตัดชิ้นเนื้อเยื่อทำสไลด์ถาวรและย้อมด้วยสี toluidine blue



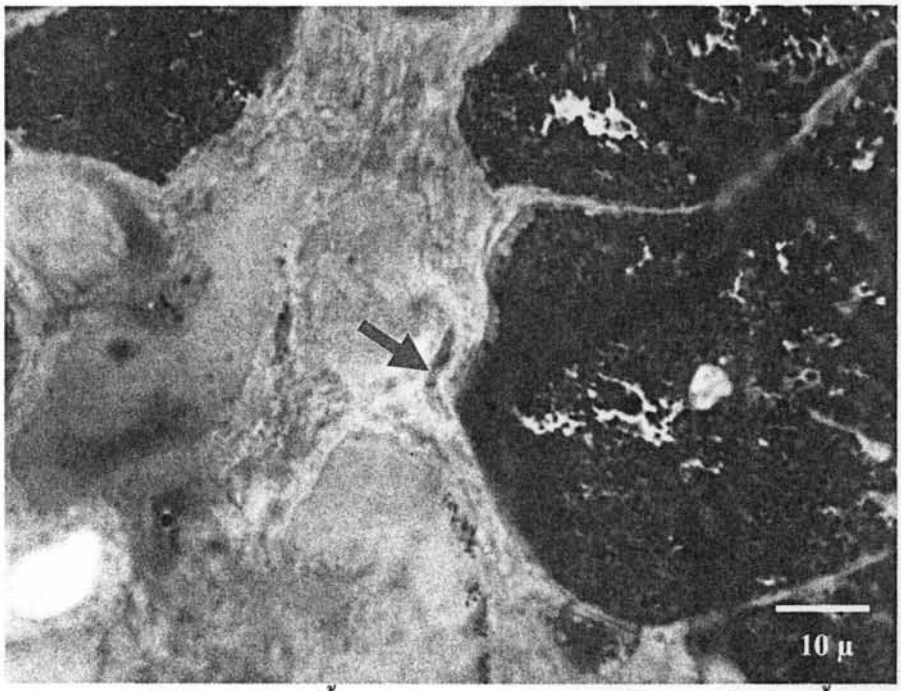
ภาพที่ 4-15 แสดงสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. (ปลายหัวลูกศร) ในทางเดินอาหารของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่ดูดเลือดกบติดเชื้อมาแล้ว 42 วัน ตรวจผลโดยวิธีตัดชิ้นเนื้อเยื่อทำสไลด์ถาวรและย้อมด้วยสี toluidine blue



ภาพที่ 4-16 แสดงสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. (ปลายหัวลูกศร) ในทางเดินอาหารของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่ดูดเลือดกบติดเชื้อมาแล้ว 49 วัน ตรวจผลโดยวิธีตัดชิ้นเนื้อเยื่อทำสไลด์ถาวรและย้อมด้วยสี toluidine blue



ภาพที่ 4-17 แสดงสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. (ปลายหัวลูกศร) ในต่อมน้ำลายของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่ดูดเลือดกบติดเชื้อมาแล้ว 35 วัน ตรวจผลโดยวิธีตัดชิ้นเนื้อเยื่อทำสไลด์ถาวรและย้อมด้วยสี toluidine blue



ภาพที่ 4-18 แสดงสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. (ปลายหัวลูกศร) ในต่อมน้ำลายของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่ดูดเลือดกบติดเชื้อมาแล้ว 42 วัน ตรวจผลโดยวิธีตัดชิ้นเนื้อเยื่อทำสไลด์ถาวรและย้อมด้วยสี toluidine blue

ภาพที่ 4-19 แสดงสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. (ปลายหัวลูกศร) ในต่อมน้ำลายของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่ดูดเลือดกบติดเชื้อมาแล้ว 49 วัน ตรวจผลโดยวิธีตัดชิ้นเนื้อเยื่อทำสไลด์ถาวรและย้อมด้วยสี toluidine blue

4.3.3 การทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิงตรวจผลโดยใช้เทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

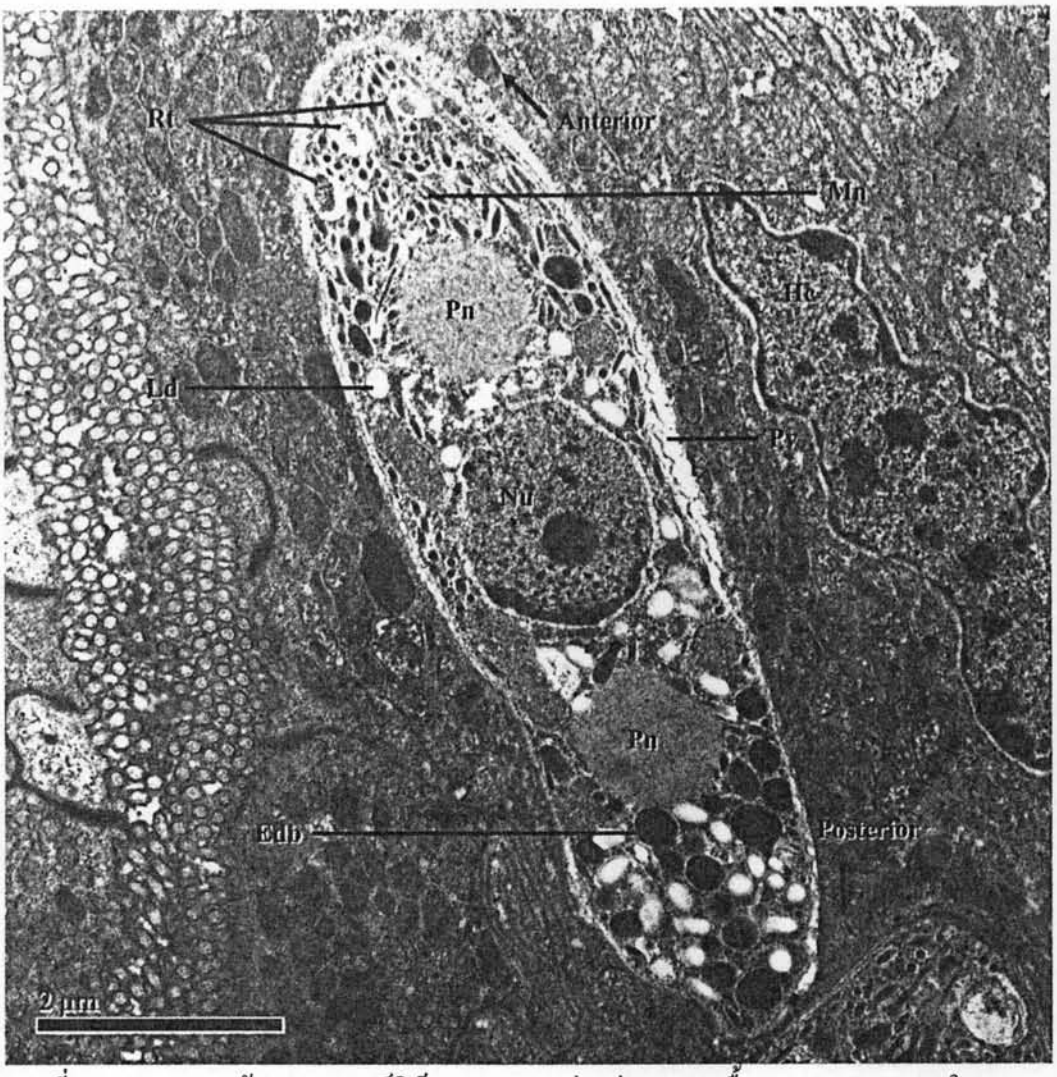
ในการตรวจผลการติดเชื้อในปลิงโดยใช้เทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านนั้นใช้ปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่มีขนาดความยาวลำตัวประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 ตัวมาดูดเลือดกบนาที่ติดเชื้อเป็นเวลา 1 วัน เมื่อปลิงดูดเลือดกบแล้วจึงแยกปลิงออกมาเลี้ยงไว้ในภาชนะใส่น้ำกรอง หลังจากวันที่ปลิงดูดเลือดกบไป 28, 35, 42 และ 49 วัน นำปลิงมาผ่าตัดแยกชิ้นเนื้อเยื่อทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายวันละ 1 ตัว นำเนื้อเยื่อของปลิงมาผ่านเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อติดตามผลการติดเชื้อโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ผลการติดเชื้อในทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายของปลิงแสดงในตารางที่ 4-8 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4-8 แสดงผลการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิง ตรวจผลด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

PE (วัน)	ปลิงกลุ่มทดลอง		
	จำนวน (ตัว)	จำนวนปลิงที่พบเชื้อในอวัยวะ	
		ทางเดินอาหาร	ต่อมน้ำลาย
28	1	1	0
35	1	1	0
42	1	1	1
49	1	1	1

ผลการศึกษาพบการติดเชื้อในทางเดินอาหารของปลิงหลังจากปลิงดูดเลือดกบที่ติดเชื้อ 28, 35, 42 และ 49 วันและพบการติดเชื้อในต่อมน้ำลายของปลิงหลังจากปลิงดูดเลือดกบที่ติดเชื้อ 42 และ 49 วัน เชื้อ *Lankesterella* sp. ที่พบในทางเดินอาหารเป็นเชื้อระยะสปอโรซอยท์อยู่ในชั้นเนื้อเยื่อรอบทางเดินอาหาร ภาพสปอโรซอยท์ที่ตัดผ่านตามแนวยาวของเซลล์ (ภาพที่ 4-20) แสดงให้เห็นนิวเคลียสมีรูปร่างกลมอยู่กลางเซลล์ พารานิวเคลียร์บอดีอยู่ทางบริเวณด้านหน้าและด้านท้ายของนิวเคลียสด้านละ 1 อัน อิเล็กตรอนเดนส์บอดีเป็นเม็ดสีดำอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม โดยเฉพาะด้านท้ายเซลล์ถัดจากพารานิวเคลียร์บอดี หยดไขมันพบอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม

ยกเว้นบริเวณปลายด้านหน้าของเซลล์ที่มีกลุ่มออร์กาเนลล์เอพิคัลคอมเพลกซ์อันเป็นลักษณะเฉพาะของโพรโทซัวในกลุ่ม apicomplexans กลุ่มออร์กาเนลล์เอพิคัลคอมเพลกซ์ที่พบได้แก่ ไมโครนีมมีลักษณะเป็นแท่งเล็กๆ หัวท้ายแหลมปรากฏทั่วไปในบริเวณปลายด้านหน้าของเซลล์ และรอพทรีมีลักษณะเป็นถุงดังในภาพที่ 4- 20 แสดงรอพทรีจำนวน 3 อันอยู่บริเวณปลายด้านหน้าของเซลล์



ภาพที่ 4-20 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงเชื้อ *Lankesterella* sp. ในทางเดินอาหารของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่ดูดเลือดกบนาติดเชื้อมาแล้ว 42 วัน

Pv = พาราซิโตฟอรัสแวคิวโอล
Mn = ไมโครนีม
Rt = รอพทรี
Ld = หยดไขมัน
Edb = อิเล็กตรอนเดนส์บอดี
Pn = พารานิวเคลียร์บอดี

เชื้อ *Lankesterella* sp. ที่พบในต่อมน้ำลายของปลิง *A. weberi* เป็นเชื้อระยะสปอโรซอยท์ ปรากฏอยู่ภายในเซลล์ต่อมน้ำลายแบบหลั่งสารโปรตีน (proteinaceous secretion salivary cell type) สปอโรซอยท์รูปร่างโค้งงอล้อมรอบด้วยพาราซิโทฟอรัสแวคิวโอล ขอบเซลล์เรียบ มีเสษชิ้นส่วนเล็กๆ กระจายอยู่ในพาราซิโตฟอรัสแวคิวโอล นิวเคลียสอยู่เกือบกึ่งกลางเซลล์ค่อนไปทางด้านหน้าเล็กน้อย ปรากฏพารานิวเคลียร์บอดีจำนวน 1 อันอยู่ทางด้านหน้าของนิวเคลียส ปลายด้านหน้าของสปอโรซอยท์มีไมโครนีมและรอพทรี ในไซโตพลาสซึมมีอิเล็กตรอนเดนส์บอดีและหยดไขมันอยู่ทั้งบริเวณด้านหน้าและด้านท้ายของนิวเคลียส (ภาพที่ 4-21)

ภาพที่ 4-21 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงเชื้อ *Lankesterella* sp. ในต่อมน้ำลายของปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่ดูดเลือดกบนาติดเชื้อมาแล้ว 49 วัน

Pv = พาราซิโตฟอรัสแวคิวโอล Mn = ไมโครนีม

Rt = รอพทรี Ld = หยดไขมัน

Edb = อิเล็กตรอนเดนส์บอดี Pn = พารานิวเคลียร์บอดี

จากการตรวจผลการติดเชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิงโดยวิธีผ่าตัดและย้อมด้วยสีGiemsa ในข้อ 4.3 แสดงให้เห็นว่าเชื้อใช้เวลาการเคลื่อนที่จากทางเดินอาหารมายังต่อมน้ำลายของปลิงอย่างน้อย 28 วัน โดยพบการติดเชื้อ 66.67% และพบการติดเชื้อ 100% ในต่อมน้ำลายของปลิงหลังจากปลิงดูดเลือดกบที่ติดเชื้อ 35 วัน จากจำนวนวันดังกล่าว ยืนยันด้วยผลจากการตรวจผลการติดเชื้อในปลิงโดยวิธีตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อแบบ ultra-thin และย้อมด้วยสี toluidine blue ในข้อ 4.4 ซึ่งพบการติดเชื้อ 100% ในวันที่ 35 หลังจากดูดเลือดกบเช่นเดียวกับเทคนิคการย้อมด้วยสี Giemsa นอกจากนั้น การศึกษา ผลการติดเชื้อ *Lankesterella* sp. ในปลิงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในข้อ 4.5 ก็ช่วยยืนยันว่าเชื้อ *Lankesterella* sp. ใช้เวลา 35 วัน ในเคลื่อนที่จากทางเดินอาหารมายังต่อมน้ำลายของปลิง ดังนั้นจึงกำหนดให้เวลา 35 วัน เป็นจำนวนวันที่เหมาะสมที่เชื้อ *Lankesterella* sp. เคลื่อนที่ทางจากทางเดินอาหารมายังต่อมน้ำลายของปลิง ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบนาต่อไป

4.4 การทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบนาโดยผ่านปลิงพาหะ

ในการทดลองแพร่เชื้อ *Lankesterella* sp. จากกบนาธรรมชาติที่ติดเชื้อไปสู่กบนาที่ปลอดเชื้อจากฟาร์มเลี้ยงโดยผ่านปลิงพาหะได้ทำการแบ่งกบเป็นกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมดังต่อไปนี้

- กลุ่มทดลอง นำปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่มีขนาดความยาวลำตัวประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 90 ตัวมาดูดเลือดกบนาธรรมชาติที่ติดเชื้อเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นแยกปลิงออกไปเลี้ยงในภาชนะใส่น้ำกรองเป็นเวลา 35 วัน แล้วจึงนำปลิงไปผ่านวิธีการแพร่เชื้อจากปลิงสู่กบ 2 วิธีคือวิธีการให้ปลิงดูดเลือดกบและให้กบกินปลิง โดยในแต่ละวิธีใช้กบนาปลอดเชื้อจากฟาร์มเลี้ยงจำนวน 45 ตัว นำกบมาตรวจผลการติดเชื้อหลังจากที่กบถูกปลิงที่ติดเชื้อมาดูดเลือดหรือกินปลิงที่ติดเชื้อไปแล้ว 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56 และ 60 วัน วันละ 3 ตัว ตรวจผลการติดเชื้อในเลือดโดยวิธีทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางและย้อมด้วยสี Giemsa และตรวจผลการติดเชื้อในอวัยวะภายในได้แก่ ตับ ไต ม้าม ลำไส้เล็ก ปอดและหัวใจ โดยวิธีทำแผ่นฟิล์มเนื้อเยื่อและตรวจผลการติดเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

- กลุ่มควบคุม นำปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่มีขนาดความยาวลำตัวประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 30 ตัวมาดูดเลือดกบนาปลอดเชื้อจากฟาร์มเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นดำเนินการเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง แต่ตรวจผลการติดเชื้อในปลิงวันละ 1 ตัว

4.4.1 ผลการตรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบที่ถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อ

ในกลุ่มทดลองพบเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบ 13 ตัวจาก 45 ตัวดังต่อไปนี้

- เชื้อระยะเมอโรซอยท์ พบในเลือดในวันที่ 20, 24, 28 และ 32 หลังจากกบถูกปลิงดูดเลือด

- เชื้อระยะโอโอซีสต์ พบในตับของกบในวันที่ 36 และ 40 หลังจากกบถูกปลิงดูดเลือด

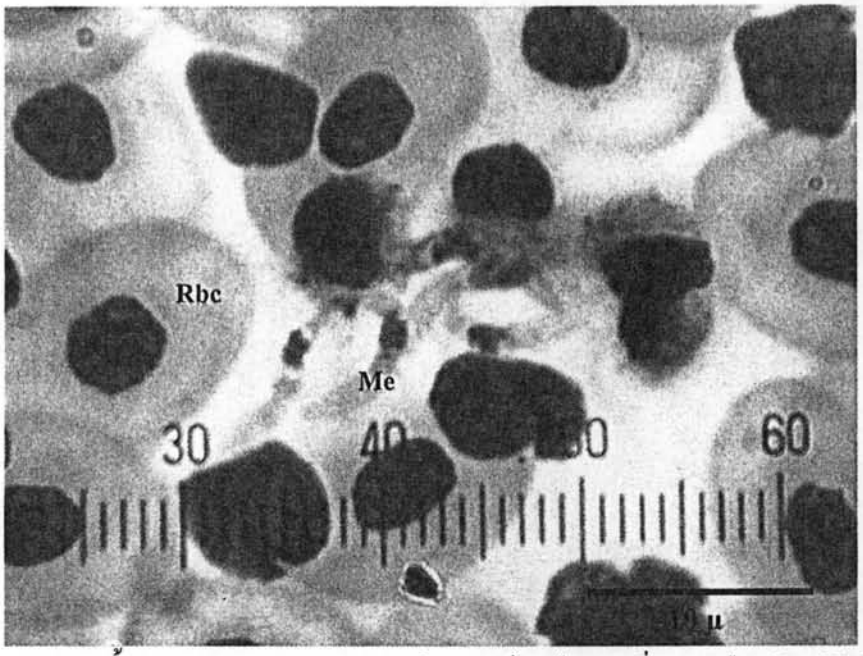
- เชื้อระยะสปอโรซอยท์ พบในเลือดในวันที่ 40, 44, 48 52, 56และ 60 หลังจากกบถูกปลิงดูดเลือด

สำหรับกลุ่มควบคุม ไม่พบการติดเชื้อในเลือดและอวัยวะต่างๆ ผลการตรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. แสดงในตารางที่ 4-9 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4-9 แสดงผลการตรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบกลุ่มที่ผ่านวิธีการถูกดูดเลือดโดยปลิง

PE (วัน)	กลุ่มทดลอง					กลุ่มควบคุม				
	กบ		เชื้อ *Lankesterella* sp.			กบ		เชื้อ *Lankesterella* sp.		
	จำนวนกบ	จำนวนกบที่ติดเชื้อ	ระยะเชื้อ	อวัยวะของกบที่พบเชื้อ	ค่าความหนาแน่นเชื้อ (%)	จำนวนกบ	จำนวนกบที่ติดเชื้อ	ระยะเชื้อ	อวัยวะของกบที่พบเชื้อ	ค่าความหนาแน่นเชื้อ (%)
4	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
8	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
12	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
16	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
20	3	1	เมอโรซอยท์	เลือด	0.01	1	-	-	-	-
24	3	1	เมอโรซอยท์	เลือด	0.01	1	-	-	-	-
28	3	2	เมอโรซอยท์	เลือด	0.02	1	-	-	-	-
32	3	1	เมอโรซอยท์	เลือด	0.02	1	-	-	-	-
36	3	1	โอโอซีสต์	ตับ	-	1	-	-	-	-
40	3	1	โอโอซีสต์	ตับ	-	1	-	-	-	-
			สปอโรซอยท์	เลือด	0.01	1	-	-	-	-
44	3	2	สปอโรซอยท์	เลือด	0.11	1	-	-	-	-
48	3	1	สปอโรซอยท์	เลือด	0.23	1	-	-	-	-
52	3	1	สปอโรซอยท์	เลือด	0.07	1	-	-	-	-
56	3	1	สปอโรซอยท์	เลือด	0.29	1	-	-	-	-
60	3	1	สปอโรซอยท์	เลือด	0.12	1	-	-	-	-
รวม	45	13 (28.89%)				15	0			

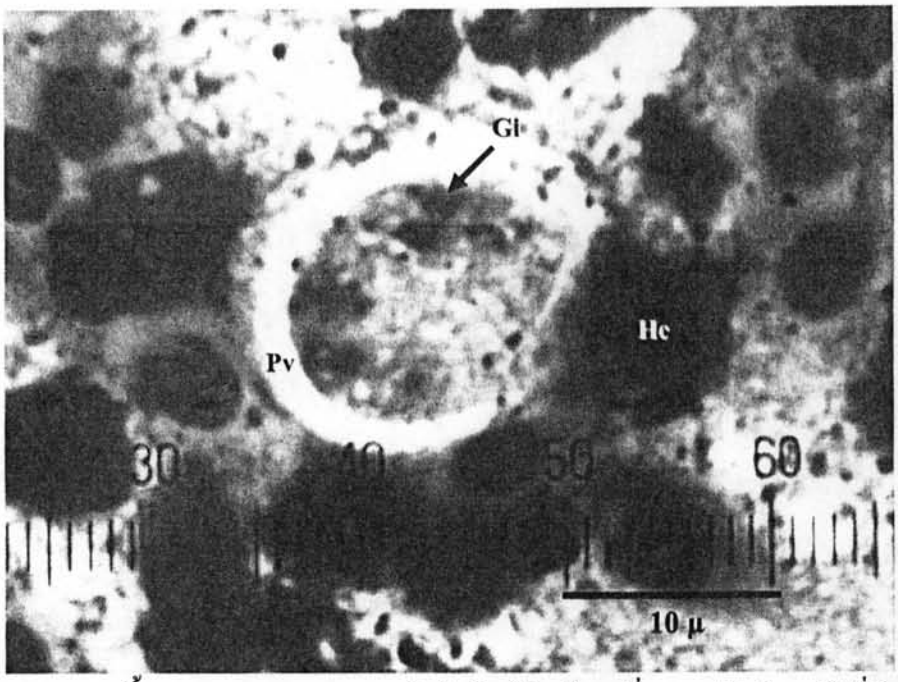
เชื้อระยะเมอโรซอยท์พบในเลือดของกบที่ถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อมาแล้ว 20, 24, 28 และ 32 วัน มีรูปร่างใกล้เคียงกับสปอโรซอยท์ที่พบในเลือดกบธรรมชาติ คือมีลักษณะยาวเรียว ไซโตพลาสซึมใส นิวเคลียสติดสีม่วงอยู่กลางเซลล์ แต่แตกต่างจากสปอโรซอยท์ที่พบในเลือดของกบคือเมอโรซอยท์มีขนาดเล็กกว่า วัดขนาดได้เท่ากับ 9.1 μ (n=5) พบรวมกันเป็นกลุ่มอยู่นอกเม็ดเลือดแดง ดังแสดงในภาพที่ 4-22



ภาพที่ 4-22 แสดงเชื้อ *Lankesterella* sp.ระยะเมอโรซอยท์ในเลือดกบที่ถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อมาแล้ว 20 วัน

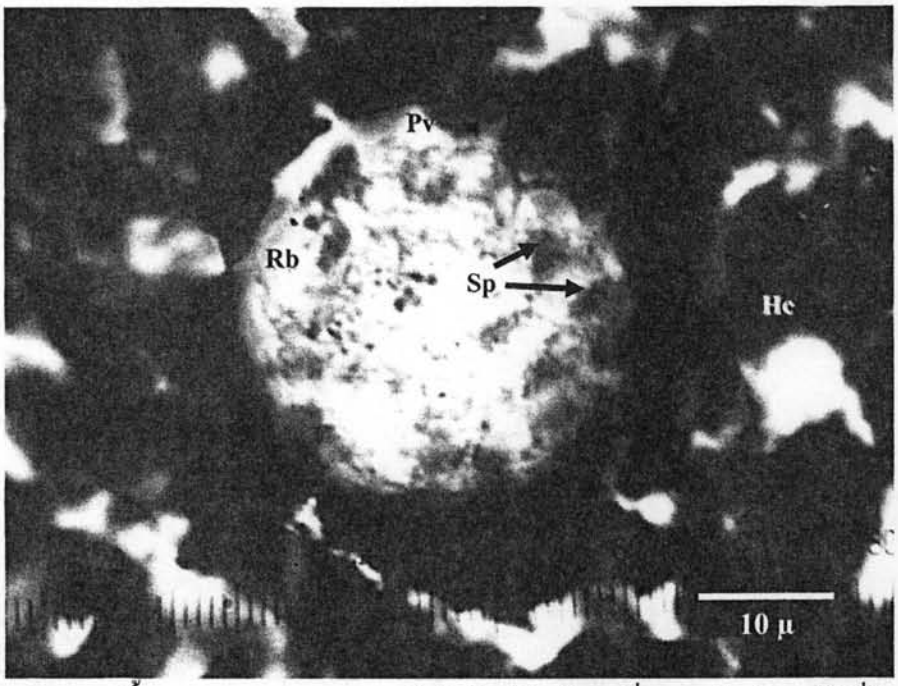
Me: เมอโรซอยท์ Rbc: เซลล์เม็ดเลือดแดง

เชื้อ *Lankesterella* sp. ระยะโอโอซีสต์พบในตับของกบที่ถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อมาแล้ว 36 และ 40 วัน โอโอซีสต์ที่พบอยู่ในแถวเซลล์ไซนูซอยด์ของตับ โอโอซีสต์มีรูปร่างกลมล้อมรอบด้วยพาราซิโตฟอรัสแวคิวโอล โอโอซีสต์ที่พบในตับของกบที่ถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อมาแล้ว 36 วันมีขนาด 10 -15 ไมครอน ภายในมีนิวเคลียสไม่ติดสีและแกรนูลาร์อินคลูชันจำนวน 3-4 อันติดสีม่วงเห็นชัดเจนอยู่ในไซโตพลาสซึมดังแสดงในภาพที่ 4-23 ส่วนโอโอซีสต์ที่พบในตับของกบที่ถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อมาแล้ว 40 วันนั้นมีขนาด 20 – 23 ไมครอน ภายในโอโอซีสต์ปรากฏสปอโรซอยท์จำนวนมากและมีเรซิดูอัลบอดี จำนวน 1 อันอยู่ที่ขั้วของโอโอซีสต์ ดังแสดงในภาพที่ 4-23



ภาพที่ 4-23 แสดงเชื้อ *Lankesterella* sp. ระยะโอโอซีสต์ ในตับกบที่ถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อมาแล้ว 36 วัน ภายในมีแกรนูลาร์อินคลูชัน (Gi) ติดสีม่วงเห็นได้ชัด

Pv: พาราซิโตฟอรัสแวคิวโอล Hc: เซลล์ของผู้ให้อาศัย



ภาพที่ 4-24 แสดงเชื้อ *Lankesterella* sp. ระยะโอโอซีสต์ ในตับกบที่ถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อมาแล้ว 40 วัน ภายในมีเรซิดูอัลบอดี (Rb) 1 อันอยู่ที่ขั้วของโอโอซีสต์ และปรากฏสปอโรซอยท์ (Sp) จำนวนมากติดสีจาง

Pv: พาราซิโตฟอรัสแวคิวโอล Hc: เซลล์ของผู้ให้อาศัย

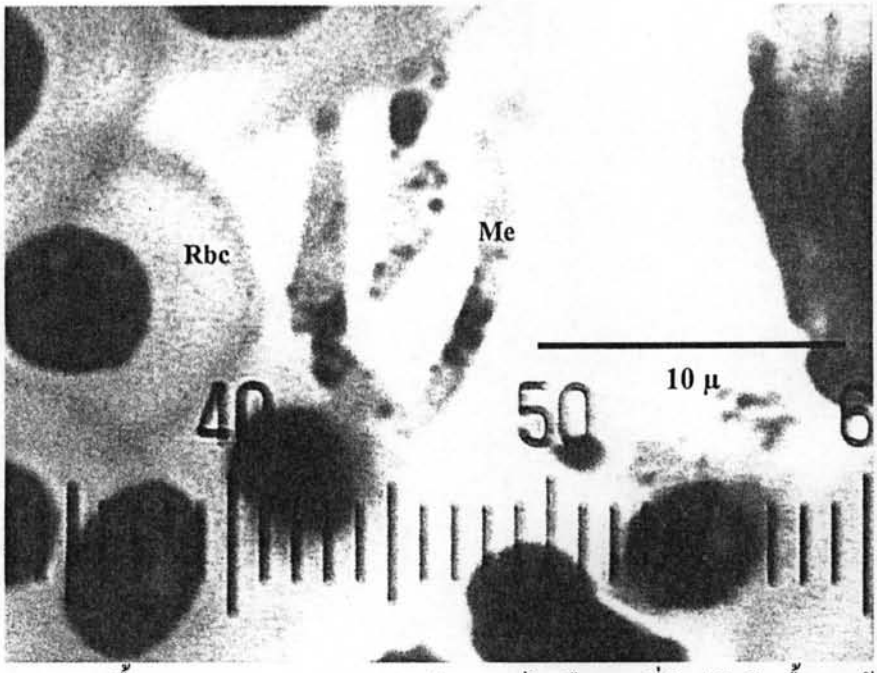
4.4.2 ผลการตรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบที่กินปลิงที่ติดเชื้อ

ในกลุ่มทดลองพบเชื้อ *Lankesterella* sp. ระยะเมอโรซอยท์ในกบที่กินปลิงที่ติดเชื้อมาแล้ว 32, 40, 44, 48, 56 และ 60 วัน ไม่พบการติดเชื้อในกบกลุ่มควบคุม ผลการตรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. แสดงในตารางที่ 4-10 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4-10 แสดงผลการตรวจเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบกลุ่มที่ผ่านวิธีการกินปลิง

PE (วัน)	กลุ่มทดลอง					กลุ่มควบคุม				
	กบ		เชื้อ *Lankesterella* sp.			กบ		เชื้อ *Lankesterella* sp.		
	จำนวนซ้ำ	จำนวนกบติดเชื้อ	ระยะเชื้อ	อวัยวะของกบที่พบเชื้อ	ค่าความหนาแน่นเชื้อ (%)	จำนวนซ้ำ	จำนวนกบติดเชื้อ	ระยะเชื้อ	อวัยวะของกบที่พบ	ค่าความหนาแน่นเชื้อ
4	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
8	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
12	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
16	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
20	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
24	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
28	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
32	3	1	เมอโรซอยท์	เลือด	0.01	1	-	-	-	-
36	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
40	3	1	เมอโรซอยท์	เลือด	0.01	1	-	-	-	-
		1	เมอโรซอยท์	เลือด	0.03	1	-	-	-	-
44	3	1	เมอโรซอยท์	เลือด	0.01	1	-	-	-	-
48	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
52	3	1	เมอโรซอยท์	เลือด	0.02	1	-	-	-	-
56	3	1	เมอโรซอยท์	เลือด	0.04	1	-	-	-	-
60	3	1	เมอโรซอยท์	เลือด	0.01	1	-	-	-	-
รวม	45	6 (13.33%)				15	0			

เชื้อ *Lankesterella* sp. ระยะเมอโรซอยท์ในเลือดของกบที่กินปลิงที่ติดเชื้อมีรูปร่างใกล้เคียงกับเมอโรซอยท์ที่พบในเลือดของกบกลุ่มทดลองที่ให้ปลิงดูดเลือดดังกล่าวมาแล้วคือมีลักษณะยาวเรียว ไซโตพลาสซึมใส นิวเคลียสติดสีม่วงอยู่กลางเซลล์ แต่แตกต่างจากสปอโรซอยท์ที่พบในเลือดกบ คือเมอโรซอยท์มีขนาดเล็กกว่า วัดขนาดได้เท่ากับ 9.8 μ (n=5) พบรวมกันเป็นกลุ่มอยู่นอกเม็ดเลือดแดง ดังแสดงในภาพที่ 4-25



ภาพที่ 4-25 แสดงเชื้อ *Lankesterella* sp. ระยะเมอโรซอยท์ในเลือดกบที่กินปลิงติดเชื้อมาแล้ว 32 วัน
Me: เมอโรซอยท์ Rbc: เซลล์เม็ดเลือดแดง

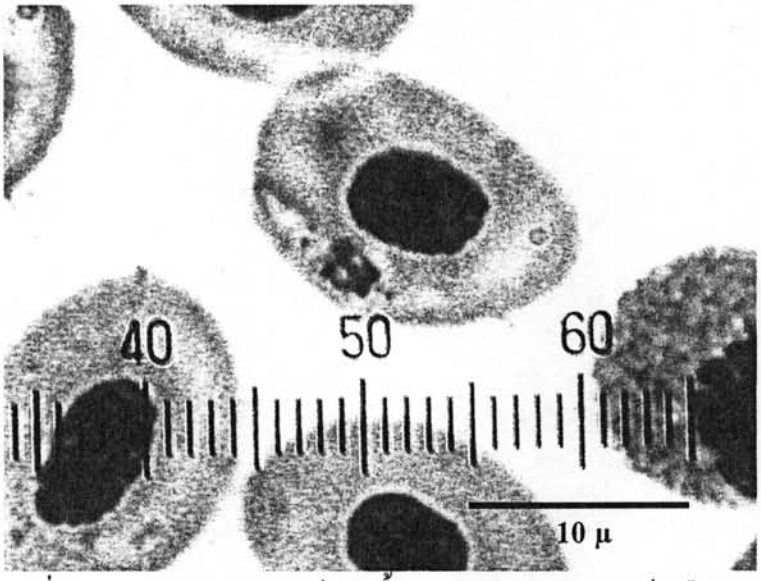
จากการพบเชื้อ *Lankesterella* sp. ในกบทั้งกบกลุ่มทดลองที่ถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อและกบกลุ่มทดลองที่กินปลิงที่ติดเชื้อแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Lankesterella* sp. ชนิดนี้สามารถแพร่ผ่านปลิง *Alboglossiphonia weberi* ที่เป็นผู้ให้อาศัยกึ่งกลางหรือพาหะเข้าสู่กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ซึ่งเป็นผู้ให้อาศัยสุดท้ายโดยกลไกการแพร่เชื้อทั้งสองวิธีคือการที่กบถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อและการที่กบกินปลิงที่ติดเชื้อ แต่ระยะเวลาการแพร่เชื้อในกบทั้งสองกลไกนั้นแตกต่างกัน โดยผลจากกบกลุ่มทดลองที่ถูกดูดเลือดโดยปลิงที่ติดเชื้อมีระยะเวลาการติดเชื้อ (prepatency) คือ 20 วัน โดยเริ่มจากพบเชื้อระยะเมอโรซอยท์ในเลือด โอโอซีสต์ในตับและสปอโรซอยท์ในเลือด ในขณะที่กบกลุ่มทดลองที่กินปลิงที่ติดเชื้อมีระยะเวลาการติดเชื้อคือ 32 วัน โดยพบแต่เชื้อระยะเมอโรซอยท์ในเลือด ไม่พบการเจริญในระยะโอโอซีสต์ถึงแม้ว่าจะมีการตรวจเชื้อในกบที่กินปลิงที่ติดเชื้อมาแล้ว 60 วัน

4.7 การตรวจสอบชื่อชนิดทางวิทยาศาสตร์ของเชื้อ *Lankesterella* sp.

การตรวจสอบชื่อชนิดทางวิทยาศาสตร์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. ที่พบในเลือดกบนาธรรมชาติโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แสดงค่าการติดเชื้อในผลการศึกษาข้อ 4.1 นั้น ได้ทำการสังเกตและบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อพบว่าเชื้อระยะสปอโรซอยท์แบ่งเป็น 2 รูปแบบคือ รูปแบบที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (blood form) และรูปแบบ ที่อยู่เป็นอิสระ (free form) โดยสังเกตว่าพบรูปแบบที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงมีจำนวนมากกว่ารูปแบบที่อยู่เป็นอิสระ

- สปอโรซอยท์รูปแบบที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (แสดงในภาพที่ 4-26)

สปอโรซอยท์อยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง ไม่มีการเบียดนิวเคลียสให้เอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่ง สปอโรซอยท์มีขนาดความยาวและความกว้างเซลล์โดยเฉลี่ย 10.1 และ 2.1 ไมครอนตามลำดับ รูปร่างโค้งเล็กน้อยคล้ายพระจันทร์เสี้ยว ปรากฏเยื่อหุ้มเซลล์ที่บริเวณด้านหน้าชัดเจนและเข้มกว่าด้านท้าย นิวเคลียสรูปไข่ติดสีชมพูเข้มหรือม่วงอยู่กลางเซลล์ ไซโตพลาสซึมใส พาราโซมเคลียร์บอดีติดสีชมพูอ่อนอยู่ทางด้านหน้าและทางด้านท้ายของนิวเคลียสด้านละ 1 อัน ความกว้างของเซลล์โดยเฉลี่ยมากกว่ารูปแบบที่อยู่เป็นอิสระ

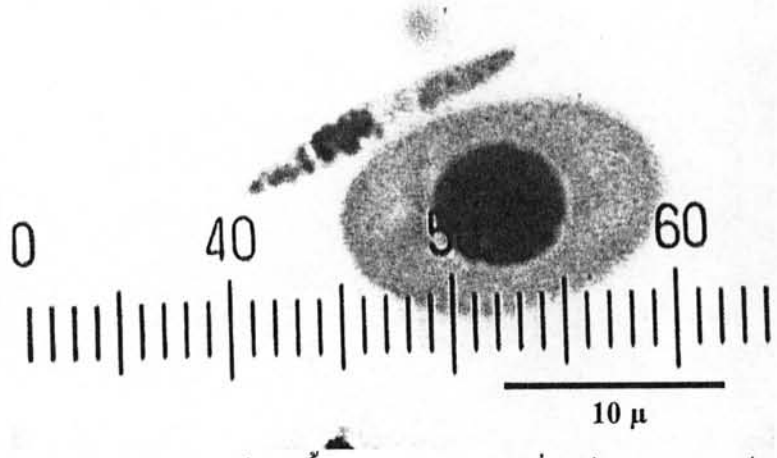


ภาพที่ 4-26 แสดงสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. ในเม็ดเลือดแดง

- สปอโรซอยท์รูปแบบที่อยู่เป็นอิสระ (แสดงในภาพที่ 4-27)

สปอโรซอยท์อยู่เป็นอิสระในพลาสมานอกเม็ดเลือดแดง มีขนาดความยาวและความกว้างเซลล์โดยเฉลี่ย 11.0 และ 1.7 ไมครอนตามลำดับ ลักษณะสปอโรซอยโดยทั่วไป

คล้ายกับสปอโรซอยท์ที่พบอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงแต่มีความกว้างของเซลล์น้อยกว่าและมีความยาวของเซลล์มากกว่าสปอโรซอยท์ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง



ภาพที่ 4-27 แสดงสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. ที่อยู่เป็นอิสระนอกเม็ดเลือดแดง

จากการสังเกตลักษณะสปอโรซอยท์ของเชื้อ *Lankesterella* sp. ที่พบทั้งในและนอกเม็ดเลือดแดงของกบนาพบว่ามีลักษณะที่ใช้ในการตรวจสอบชื่อชนิดทางวิทยาศษสตร์ของเชื้อคือลักษณะของการมีพารานิวเคลียร์บอดีอยู่ทางด้านหน้าและทางด้านท้ายของนิวเคลียสด้านละ 1 อัน ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อโพรโทซัวสกุล *Lankesterella* เพียง 2 ชนิดคือ *L. minima* และ *L. dicroglossi*