II. อุปกรณ์และวิธีการ
(MATERIALS AND METHODS)

2.1 แหล่งที่มาของปลาที่ทำการศึกษาหาพยาธิ

2.1.1 ซื้อจากตลาด

ได้ซื้อปลาน้ำจืดชนิดต่าง ๆ จากตลาดสดสามย่าน ประตูน้ำ เทเวศน์ ปากคลองตลาด และบางกระบือ ซึ่งทราบว่าเป็นปลามาจากจังหวัดในภาคกลาง (เช่น พระนคร อยุธยา สมุทรปราการ และปทุมธานี) เป็นส่วนใหญ่ มีปลาบางชนิด (เช่นปลาไหล) ทราบว่าแม่ค้านำมาจากจังหวัดภาคใต้ เช่น สุราษฎร์ธานี

การซื้อนั้นได้เลือกเอาเฉพาะปลาเป็น หรือพึ่งตายใหม่ ๆ โดยไม่เลือกขนาด แต่พยายามให้ได้ปลามากชนิดที่สุดเท่าที่จะทำได้และอย่างน้อยซื้อชนิดละ ๒ ตัว เว้นปลาช่อนซึ่งซื้อเป็นประจำเดือนละประมาณ 10 ตัว เพราะหาง่าย และต้องการศึกษาความมากน้อยของพยาธิที่อาจจะผันแปรไปตามฤดูกาล

2.1.2 จับโดยการทอดแห

ใช้แหทอดในคูข้างถนน (หน้ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) สระน้ำ (บริเวณศึกชีววิทยา จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย) และริมแม่น้ำเจ้าพระยา (บริเวณสามเสนและเทเวศน์) เพื่อประสงค์จะตรวจหาพยาธิที่อาจจะมีแตกต่างไปจากพยาธิที่พบได้ในปลาที่ซื้อมาจากตลาด ภายหลังพบว่าการจับปลาโดยวิธีนี้ได้ปลาจำนวนน้อยมากและเพียงบางชนิดเท่านั้น จึงเลิกจับปลาโดยวิธีนี้เสีย

2.2 ชนิดและจำนวนของปลา

ได้ทำการตรวจหาพยาธิในปลาชนิดต่าง ๆ ตั้งแต่วันที่ 20 มิถุนายน พ.ศ. 2510 ติดต่อกันมาจนถึงวันที่ 8 กันยายน พ.ศ. 2511 รวม 15 เดือน ปลาที่ทำการตรวจพยาธิทั้งหมด 19 ชนิด เป็นจำนวน 250 ตัว ซึ่งมีรายชื่อดังต่อไปนี้

ปลากระดี่	(Trichogaster trichopterus Pallus)	27 ตัว
ปลากระดี่นาง	(Trichogaster leeri Bleeker)	13 ตัว
ปลากระทิง	(Macrognathus aculeatus)	7 ตัว
ปลากระสง	(Channa lucius Curier & Valenciennes)	2 ตัว
ปลากราย	(Notopterus chilala Buchnanan)	9 ตัว

ปลาช่อน	(Ophiocephalus striatus Bloch)	48	ตัว
ปลาซิว	(Rasbora argyrotaenia Bleeker)	21	ตัว
ปลาดุกด้าน	(Clarias batrachus Linnaeus)	6	ตัว
ปลาดุกอุย	(Clarias macrocephalus Gunther)	6	ตัว
ปลาแดง	(Kryptopterus apogon Bleeker)	4	ตัว
ปลาตะเพียน	(Puntius schwanefeldi Bleeker)	17	ตัว
ปลาเนื้ออ่อน	(Kryptopterus cryptropterus Bleeker)	8	ตัว
ปลาบู่	(Acentrogobius atripinnatus Smith)	5	ตัว
ปลาหมอ	(Anabas testudineus Bloch)	13	ตัว
ปลาหมอเทศ	(Tilopia massamblica Peters)	1	ตัว
ปลาไหล	(Fluta alba Zuiew)	6	ตัว
ปลาสลาด	(Notopterus notopterus Pallus)	20	ตัว
ปลาสลิด	(Trichogaster pectoralias Regan)	1	ตัว
ปลาสังกะวาด	(Laides hexanema Bleeker)	36	ตัว

2.3 วิธีการศึกษาพยาธิ

2.3.1 การตรวจหาพยาธิ

ใช้มีดเฉือนตรงรอยต่อระหว่างหัวและกระดูกสันหลังข้อแรก (หลังครีบอก) แล้วใช้มีดหรือกรรไกรผ่าเปิดช่องท้องโดยตลอด (จากคอถึงทวารหนัก) จากนี้ก็นำเอาอวัยวะภายในทั้งหมดออกมาตรวจหาพยาธิตามผิวนอกใต้กล้องจุลทัศน์ชำแหละส่องตา (Stereo - binocular Microscope) อย่างละเอียด รวมทั้งตรวจดูช่องท้องบริเวณเยื่อบุช่องท้องและกล้ามเนื้อ โดยใช้มีดคม ๆ ผ่าออก

ต่อมาทำการผ่าทางเดินอาหารโดยตลอด เพื่อตรวจหาพยาธิ (ภายใน) ใต้กล้องเช่นเดียวกัน

พยาธิต่าง ๆ ที่ตรวจพบใช้ปากคีบ (Original Dumont Forcep No.5., Switzerland) คีบเบา ๆ ลงในน้ำยาริงเกอร์(Ringer's Solution -ดูภาคผนวก) เพื่อตรวจดูลักษณะและ

พฤติกรรมของพยาธิในขณะที่มีชีวิตอยู่ และเป็นการทำความสะอาดไปในตัวด้วย นอกจากนี้พบว่าพยาธิที่มีไข่แก่ ส่วนมากจะบีบไข่ออกมา ซึ่งเป็นผลดีในการตรวจลักษณะภายในจากสไลด์ได้ชัดยิ่งขึ้นกว่าปกติ

ในการตรวจหาพยาธิเป็นช่วงระยะเวลานาน ใช้น้ำยาริงเกอร์ลาดพรมเพื่อทำให้ตัวพยาธิหรืออวัยวะต่าง ๆ เปียกชุ่มอยู่เสมอ

พยาธิที่ศึกษาเป็นพวกพยาธิตัวกลม(Nematodes)พยาธิใบไม้(Trematodes)พยาธิตัวตืด (Cestodes) และพยาธิหัวหนาม (Acanthocephalans)

2.3.2 <u>การเหยียด(Relaxation)</u>

พยาธิตัวกลม(Nematodes) และพยาธิตัวตืด(Cestodes) ไม่จำเป็นต้องเหยียด เพราะว่าการหดตัวในขณะทำให้คงรูป(Fixation) ไม่ทำให้พยาธิเปลี่ยนรูปร่างมากหรือแม้จะเปลี่ยนแปลงไปบ้างก็ยังตรวจลักษณะของมันได้ชัดเจน นอกจากนี้การเขย่าแรง ๆ ขณะเมื่อพยาธิอยู่ในน้ำยาคงรูปจะช่วยลดการหดหรือบิดตัวได้มาก

2.3.2.1 <u>การเหยียดพยาธิใบไม้(Trematodes)</u> นำพยาธิ (ครั้งละประมาณ 4-5 ตัว) ใส่ลงในจานแก้ว (Petri-dish) ที่มีน้ำกลั่น (พอประมาณท่วมตัวพยาธิ) แล้วใส่เกล็ด $MgSO_4$ 4-5 เกล็ด ลงในน้ำ ปล่อยทิ้งไว้นานประมาณ 12 ช.ม. หรือจนพยาธิหยุดเคลื่อนไหว จึงเทสารละลายทิ้งเพื่อจะใส่น้ำยาทำให้คงรูป(Fixative) ต่อไป

2.3.2.2 <u>การเหยียดพยาธิหัวหนาม</u> (Acanthocephalans). นำพยาธิใส่ในน้ำกลั่นทิ้งไว้จนงวง(Proboscis) ยืดออกมาเต็มที่ (ใช้เวลาประมาณ 2-12 ช.ม.) ถ้าต้องการทิ้งค้างคืนควรใส่ไว้ในตู้เย็นเพื่อกันเน่า หลังจากนั้นก็นำไปทำให้คงรูป

2.3.3 <u>การทำให้คงรูป (Fixation)</u>

นำพยาธิที่เหยียดแล้วหรือพวกที่ไม่ต้องเหยียด (พยาธิตัวกลมและตัวตืด) ใส่ในน้ำยา Demke's หรือ Bouin's (ดูภาคผนวกท้ายบท) ทิ้งไว้ 12-24 ช.ม. ถ้าเป็นพยาธิใบไม้ที่มีขนาดใหญ่ (3 ม.ม.ขึ้นไป) ใช้บีบอยู่ระหว่างสไลด์ 2 แผ่น ก่อนที่จะใส่ในน้ำยา เพื่อช่วยให้ตัวแบนดียิ่งขึ้น

2.3.4 การดอง (Preservation)

เพื่อจะเก็บพยาธิไว้ศึกษาได้นาน นำพยาธิที่ทำให้คงรูปแล้วใส่ดองในน้ำยา 5 % glycerine in 70 % Ethyl Alcohol บรรจุขวดแก้ว พร้อมด้วยกระดาษชื่อ (Label) แสดงเลขที่ (Catalog Number) ชนิดของปลาที่เป็นโฮสท์ (Host) ตำแหน่งอวัยวะที่พบ(Habitat or Location)และแหล่งที่มา (Locality) ของปลาที่เป็นโฮสท์

2.3.5 การทำสไลด์ (Slide Preparations)

ลักษณะต่าง ๆ ของพยาธิอาจจะศึกษาได้โดยตรงจากการตรวจใต้กล้องจุลทัศน์ หรือทำสไลด์ชั่วคราว แต่การทำสไลด์ถาวรโดยมีการย้อมสีและตัด (Section) จะช่วยให้ทำการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ได้ดีขึ้น หรือนำมาประกอบในการวินิจฉัยแยกชนิดของมันได้ถูกต้อง

2.3.5.1 การทำสไลด์ทั้งตัว (Whole Mount) นำพยาธิที่ดองไว้ (ใน 5 % glycerine in 70%Alc.มาล้างด้วย 70 % Alc. ประมาณ 2 ครั้ง (ครั้งละ 6 ช.ม.) เพื่อละลาย Glycerine ให้หมด ซึ่งจะช่วยให้ติดสีย้อมได้ดีขึ้น

สำหรับพยาธิหัวหนาม (Acanthocephalan)ก่อนล้างต้องใช้เข็มปักแมลงเล็ก ๆ (Minutennadeln) ค่อย ๆ แทงตามผนังลำตัวบริเวณใกล้ส่วนหัวและหางของพยาธิ (3-5 แห่งตามขนาดเล็กใหญ่ของตัวพยาธิ และต้องระวังไม่ให้ทำลายอวัยวะภายใน) เพื่อให้น้ำยาซึมเข้าไปถึงภายในได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

จากนี้นำพยาธิไปย้อมสี Grenacher's Alcoholic Borax Carmine (ดูภาคผนวก) ทิ้งไว้ประมาณ ½ - 12 ช.ม. (สุดแต่ชนิดและขนาดของพยาธิ) แล้วใช้ล้างสีที่ติดมากเกินไปด้วย Acid Alcohol (1 % HCl in 70 % Alc.) จนสีพยาธิจางลงเป็นสีชมพูอ่อน ทั้งนี้อาจต้องล้างหลายครั้ง ๆ และอาจกินเวลาตั้งแต่ 5 นาทีจนถึง 2 วันก็ได้

ต่อไปนำมาล้างกรดที่ติดอยู่ออกด้วย 85 % Alcohol 3 ครั้ง ๆ ละประมาณ 8 ช.ม. จากนั้นนำไป Dehydrate ใน 95 % Alc. และ N-Buthyl Alcohol (สำหรับพยาธิหัวหนามใช้ 100 % Alcohol) ขั้นละประมาณ 6 - 18 ช.ม. แล้วนำมาทำให้ใส (Clearing) ด้วย N-Buthyl Alcohol + Xylene (อัตราส่วน 1 : 1) และ Xylene ขั้นละ 12 ช.ม.

สำหรับพยาธิหัวหนามใช้ทำให้ใสโดยผ่านขั้น 25 % Terpineol in 100 % Alc., 50 % Terpineol in 100 % Alc.,และ 75 % Terpineol in 100 % Alc. นานขั้นละ 6-18ช.ม. แล้วผ่านไปใน Pure Terpineol 18-24 ช.ม.

นำพยาธิมา Mount ใน Canada Balsum เขียนป้ายชื่อ และเลขที่ (Catalog Number)ด้วยดินสอกากเพชร(Diamond Pencil)แล้วทิ้งไว้ให้แห้งอย่างน้อย 1 สัปดาห์

2.3.5.2 <u>การทำสไลด์ตัด (Serial Section)</u> เพื่อจะศึกษาเนื้อเยื่อและอวัยวะภายในให้ละเอียดได้นำพยาธิชนิดที่ต้องการทั้งตัวหรือบางส่วนจากน้ำยาคงรูป (Fixative solution) ไปล้างด้วย 70 % Alc. 3 ครั้ง ๆ ละประมาณ 6-12 ช.ม. แล้วนำไปทำให้แห้ง (Dehydration)ด้วย 90 % Alc. (6 ช.ม.), 95 % Alc. (2 ครั้ง ๆ ละ 6 ช.ม.) และ N-Buthyl Alc.(1 ช.ม.) ต่อด้วยการทำให้ใส (Clearing)ด้วย Xylene (1 ช.ม.) และการทำ Embedding ให้ชิ้นผึ่งซึมเข้า (Impregnation) ใน Xylene + Molten Paraffin wax(อัตราส่วน 1 : 1) เป็นเวลา ½ ช.ม. ใน Pure Wax (58°C) 2 ครั้ง ๆ ละ ½ ช.ม. จากนี้ก็นำไปทำ Block ในแบบพิมพ์พลาสติก แล้วนำมาเล็ม(Trimming) เลือกแนวตัด (Sectioning Plane) เพื่อติดเข้าหัวเครื่องตัด (Knife-Microtome)ทำเป็น Serial Section หนา 15 μ

นำ sections ที่ตัด มาติดบนสไลด์ (ซึ่งทาด้วย Egg Albumin) หลังจากแห้งดีแล้ว นำไปล้าง Paraffin Wax ออกด้วย Xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนี้ก็นำผ่านขั้นต่าง ๆ จาก 95 % - 90 % Alc. แล้วย้อมด้วยสี Eosin ประมาณ 1 วินาที (จุ่มแล้วยกขึ้นทันที) แล้วนำไปผ่าน 85 %, 70 % Alc. และน้ำกลั่น ครั้งละ 3-5 นาที จากนี้นำไป Counter stain ด้วย Ehrlich's Haematoxylinนานประมาณ 3-5 นาที แล้วนำไปล้างในน้ำกลั่นหรือน้ำประปาประมาณ 15 นาที หากสีจัดเกินไปต้องนำไปผ่าน Acid Alcohol จนได้สีม่วงแดง และล้างด้วย 70 % Alc. แล้วนำ Dehydration & Clearing โดยผ่านขั้นต่าง ๆ คือ 85 % Alc., 95 % Alc., N-Buthyl Alc., N-Buthyl Alc. + Xylene (1 : 1),และ Xylene ขั้นละ 5 นาที จากนี้ Mountด้วย Canada Balsum.

2.4 การวินิจฉัยชนิด (Identification)

2.4.1. การตรวจลักษณะภายนอกและภายใน

ได้ตรวจลักษณะภายนอก(External morphology)และภายใน(Internal anatomy) (โดยอาศัยกล้องจุลทัศน์ของพยาธิที่ดองธรรมดา และที่ย้อมสีทำสไลด์ถาวรไว้แล้วเทียบลักษณะดังกล่าวกับลักษณะของพยาธิชนิดต่าง ๆ ที่มีผู้รายงานและทำ key ไว้ ในหนังสือหรือเอกสาร เท่าที่หาได้ พยาธิชนิดใดที่ไม่ปรากฏในรายงานหรือเอกสารใด ๆ ก็ได้จัดไว้เป็นชนิดใหม่

2.4.2 การนับ

ในพวกพยาธิหัวหนาม (Acanthocephala)ใช้นับจำนวน "ขอหนาม" (Hooks) ที่งวง (Proboscis) และจำนวนหนามตามลำตัว (body or trunk spines)ดูจำนวนวง(Number of circles)จำนวนหนามแต่ละวงหรือแต่ละแถว(Number of hooks in each each circle or each row) และรวมทั้งลักษณะการเรียงตัวของหนาม (Hook arrangement) ในพยาธิตัวกลม (Nematode)ใช้นับจำนวนสันตามยาว(Longitudinal ridges) ในช่องปาก จำนวนตุ่มที่ขวาร(Cloacal papillae) และหนามตามลำตัว (body spines) ในพยาธิตัวตืด (Cestode) ใช้นับจำนวนขอหนามที่ปลายหัว(Apical disc) จำนวนพู (Lobes or branches) ของรังไข่ (Ovary) ของมดลูก (Uterus) และจำนวนปล้อง (Proglottids)

2.4.3 การวัด

ทำการวัดขนาดความยาว (Maximum length) ของหนามตามส่วนต่าง ๆ ดังกล่าว ใน 2.4.2 โดยวัดทุกแถว ๆ ละ 1 หนาม เลือกอันที่ชัดที่สุด วัดความกว้างและความยาว (Dimension) ของงวง คอ ลำตัว อวัยวะภายใน เช่น หลอดคอ(muscular oesophagus)ถุงงวง(Proboscis sheath)หลอดเลมนิสไซ(Lemisci) อวัยวะสืบพันธุ์ตัวผู้ เช่น อัณฑะ(Testis) ต่อมน้ำเลี้ยง(Prostate gland) ถุงน้ำเลี้ยง(Prostatic reservoir) ถุงพักน้ำเชื้อ(Seminal vesicle) อวัยวะยึดในการผสมพันธุ์(Copulatory Bursa) และเดือย(spicule) อวัยวะสืบพันธุ์ตัวเมีย เช่น มดลูก(Uterus) กะเปาะ

มดลูก (Uterine bell) และขนาดของไข่ (egg)

การวัดทั้งหมดนี้ใช้วัดด้วยไมโครมิเตอร์ (Ocular Micrometer)

2.4.4 การวาดภาพและการถ่ายภาพ

รูปวาด (Drawings) ต่าง ๆ วาดด้วย Camera Lucida และวาดจากเครื่องฉาย (Bausch & Lomb Tri-simplex Projector) ส่วนภาพถ่าย (Plates) ใช้ถ่ายจากกล้องจุลทัศน์ และจากเครื่องขยาย (Enlarger)

2.5 การทดลองเกี่ยวกับการเจริญของไข่พยาธิหัวหนามในไรน้ำ

เพื่อตรวจดูลักษณะและการเจริญของตัวอ่อน (จากไข่ที่มีตัวอ่อน Embryonated egg) ระยะต่าง ๆ ในห้องทดลอง ได้นำไข่พยาธิหัวหนาม (Pallisentis nagpurensis ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุดในปลาช่อน (ประมาณ 100 %) มาทำการศึกษา

2.5.1 การเตรียมไรน้ำ

ทำตามวิธีของสุขศรี (1966) โดยใช้กระชอนผ้าตาละเอียดมาก ช้อนไรน้ำ (Mesocyclop leuckarti) ซึ่งพบทั่วไปตามสระหรือคูข้างถนน บริเวณติกชีววิทยา จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย โดยเฉพาะจะมีปริมาณมากตามบริเวณที่มีจอก แหน สาหร่าย หรือใต้ใบบัว

นำไรน้ำซึ่งปนกับพืชและสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ ที่ช้อนติดมา ใส่ในอ่างที่มีน้ำซึ่งนำมาจากสระ (ประมาณครึ่งอ่าง) ใช้กระชอนผ้าตาห่างกรองเศษใบไม้ พืช และแมลงน้ำอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการออกทิ้งเสียครั้งหนึ่งก่อน ไรน้ำ และแมลงน้ำตัวเล็ก ๆ ที่ลอดกระชอนนำไปเทใส่ถ้วยแก้ว (Beaker) จุประมาณ 1,000 ต้องช้อนและกรองเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง (รวมใส่ในถ้วยแก้วดังกล่าว) จนได้ไรน้ำปริมาณมากพอ จากนี้ก็นำไปล้างให้สะอาดโดยวิธีเปิดน้ำประปาจากท่อ (Tap water) ให้ไหลน้อย ๆ เป็นสายลงข้างถ้วยแก้ว ประมาณ 6 ซ.ม. น้ำที่ล้นจากถ้วยแก้วที่ละน้อยจะพาเศษวัตถุและตัวแมลงต่าง ๆ ที่อยู่ตอนบนของน้ำให้ลอยหลุดไป ส่วนพวกไรน้ำซึ่งว่ายทวนน้ำได้ หรือหลบความสะเทือนของน้ำที่ไหลลงมา จะเคลื่อนไปอยู่ตามส่วนล่างของน้ำหรือเกาะอยู่ข้าง ๆ ถ้วยแก้ว

โดยวิธีนี้จะได้ไรน้ำในถ้วยแก้วเกือบ 100 % หากมีพวกสัตว์เล็ก ๆ หรือแมลงน้ำอื่น ๆ ปนอยู่บ้าง ก็ใช้ Dropper ดูดทิ้งไป กรองไรน้ำที่ได้ด้วยกระชอนผ้าตาละเอียด แล้วนำไปใส่ในถ้วยแก้วใส่น้ำจากสระซึ่งกรองด้วยกระดาษกรอง (เพื่อให้ได้น้ำสะอาดปราศจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ปน) ปล่อยทิ้งไว้ 12 ช.ม. ในน้ำนี้เพื่อให้ไรน้ำอดอาหาร

2.5.2 วิธีเพาะไข่พยาธิในไรน้ำ

เลือกพยาธิตัวเมียเป็น ๆ ขนาดใหญ่ (ในการทดลองนี้ใช้พยาธิหัวหนามชนิด Pallisentis nagpurensis ที่ผ่าได้จากปลาช่อนสด ตรวจใต้กล้อง Binocular เพื่อเลือกตัวเมีย (ประมาณ6-7 ตัว) ที่มีไข่แก่และมีปริมาณไข่มากเต็มท้อง เพราะในการทดลองนี้ต้องใช้ไข่เป็นจำนวนมาก

กรองไรน้ำทั้งหมดที่ทิ้งให้อดอาหารจากถ้วยแก้ว ลงใส่ในจานแก้ว (Petri-dish) เล็ก ๆ ซึ่งมีน้ำในสระที่กรองแล้วอยู่ปริมาณพอควร

นำพยาธิที่เลือกไว้ (ตัวเมียที่มีไข่แก่) มาฉีกผนังลำตัวออก (ใช้เข็มหรือปากคีบแหลม ๆ) ระวังมิให้เศษพยาธิส่วนอื่น ๆ นอกจากไข่ตกค้างหรือเหลือทิ้งอยู่ในจานแก้ว เพราะจะทำให้น้ำเน่า

ทิ้งไว้ประมาณ 12 ช.ม. เพื่อให้เวลาไรน้ำกินไข่ได้มากที่สุด จากนั้นกรองไรน้ำที่ infect แล้วไปเลี้ยงไว้ในชามแก้ว (Glass Bowl) ที่มีน้ำในสระซึ่งตักมาใหม่ และกรองด้วยกระชอนผ้าตาละเอียด เพื่อกันมิให้สัตว์น้ำโดยเฉพาะไรน้ำและเศษผงชิ้น ๆ ติดปนอยู่ในน้ำได้ แต่พวกสัตว์เล็ก ๆ เช่น Protozoa, Bacteria อาจลอดปนมาได้ ซึ่งจะทำให้ไรน้ำนี้มีชีวิตอยู่และหากินอาหารตามธรรมชาติ น้ำเลี้ยงนี้ต้องเปลี่ยนใหม่ทุก ๆ สองวัน

โดยวิธีนี้ไรน้ำที่ infect ไว้จะมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 3 สัปดาห์ พอที่จะทำการศึกษาติดตามการเจริญของตัวอ่อนขั้นต่าง ๆ ในโพรงลำตัว (Coelomic cavity) ของไรน้ำได้

2.5.3 การตรวจดูการเจริญของตัวอ่อนพยาธิในไรน้ำ

ดูดไรน้ำ (ใช้ dropper)ที่เลี้ยงมาทำการตรวจบนสไลด์ที่ละตัว ทำทุกวัน ๆ ละ 10 ตัว โดยใช้เข็มเล็ก ๆ ฉีกตัวออก เพื่อตรวจดูตัวอ่อนพยาธิที่เข้ามาเจริญอยู่ในช่องว่างของลำตัว (Body Cavity) แล้ววาดรูประยะต่าง ๆ ไว้