234631


## บทคัดย่อ

การศึกษาโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลานิลแดง (*Oreochromis niloticus x O. mossambicus*) พบปรสิต *Spironucleus* sp. ในกล้ามเนื้อปลานิลป่วยที่เลี้ยงในบ่อดิน โดยปรสิตที่พบมีรูปร่างยาวรี (pyriform) หรือรูปไข่ (oviform) ความยาว 6.8-8.7 ไมโครเมตร ความกว้าง 3.2-4.8 ไมโครเมตร มีนิวเคลียสเป็นรูปตัว S (S-shaped) มีแฟลกเจลลาด้านหน้า (anterior) 6 เส้น และด้านท้าย (posterior) 2 เส้น มีพื้นผิวลำตัวเป็นแบบเรียบ มี Kinetosome อยู่ต่ำกว่าส่วนปลายของนิวเคลียสและมี recurrent flagella ที่หุ้มด้วย flagellar pockets (cytosomal canals) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพพบการเสื่อมสลายของกล้ามเนื้อและการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวในบริเวณที่ติดเชื้อ การทดลองครั้งนี้ไม่ประสบผลสำเร็จในการก่อโรคปรสิตโดยการฉีดปรสิตเข้าปลานิลปกติ หรือการเลี้ยงปลาป่วยร่วมกับปลาปกติจึงไม่สามารถสรุปกลไกการติดปรสิตในปลานิลได้

การศึกษาโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาสวยงามสี่ชนิด คือปลาเทวดา (*Pterophyllum scalare*) ปลาออสการ์ (*Astronotus ocellatus*) ปลาหมอสี (*Symphysodon discus*) และปลากัด (*Betta splendens*) พบปรสิตในปลา 3 ชนิด คือปลาเทวดา ปลาออสการ์และปลาหมอสี โดยอัตราการติดเชื้อในปลาเทวดา คิดเป็น ร้อยละ 90 ปลาออสการ์ ร้อยละ 74.5 และปลาหมอสี ร้อยละ 61 โดยปรสิต *Spironucleus* sp. ที่พบเคลื่อนที่เร็ว มีรูปร่างยาวรีหรือรูปไข่ มีแฟลกเจลลา 8 เส้น ด้านหน้า 6 เส้น และด้านท้าย 2 เส้น ภายในเซลล์มีนิวเคลียสเป็นรูปตัว S 2 อัน โทรโฟซอยท์มีความยาว 9.0 - 16.0 ไมโครเมตร ความกว้าง 5.0-8.0 ไมโครเมตร การศึกษาลักษณะโครงสร้างของปรสิตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดพบว่าปรสิตมีผิวลำตัวเรียบ มีเส้นข้างลำตัว (lateral ridge) ทั้งสองด้าน ส่วนปลายสุดของเซลล์โค้ง (swirled) ส่วนของแฟลกเจลลา 6 เส้นที่อยู่ด้านบน พบอยู่บริเวณกึ่งกลางค่อนไปทางด้านล่างของด้านเปิดของ cytostome และแฟลกเจลลาอีก 2 เส้นที่อยู่ด้านล่างจะยื่นพ้นออกมาจากส่วนปลายสุดของด้านล่างของลำตัวโดยมีลักษณะเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว (cresent-shaped) บริเวณปลายสุดของลำตัวมี papillum และช่องเปิดของ flagellar pockets การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านพบว่าปรสิตมีนิวเคลียสเป็นรูปตัว S เซลล์แวคคิวโอล (vacuolated cell) มีขนาดใหญ่ Kinetosomes อยู่ในตำแหน่งกึ่งกลางจากส่วนยอดของนิวเคลียส recurrent flagella อยู่ในตำแหน่งระหว่างนิวเคลียสทั้ง 2 อัน และยาวไปจนถึงส่วนท้ายของลำตัว มี supra และ infra nuclear microtubular บริเวณส่วนหัวของลำตัว ส่วนของ recurrent flagella ที่หุ้มด้วย flagellar pocket ยาวไปจนถึงส่วนท้ายของลำตัว จากลักษณะทั้งหมดจึงสามารถจำแนกชนิดได้เป็น *Spironucleus vortens*

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาเทวดาที่ติดปรสิต พบการเกิดกรานูโลมาในตับ เกิดเมลาโนแมคโครฟาจเป็นจำนวนมากในม้าม และพบการอักเสบของลำไส้ในปลา การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของปรสิตในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่า *S. vortens* ที่แยกจากปลาเทวดาสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่าง 7.0 นอกจากนี้ปรสิตสามารถ

เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 7-9 แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส ที่ทุกระดับความเป็นกรด-ด่าง และยังพบระยะซีสต์ของปรสิตในระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส การทดสอบความรุนแรงของปรสิตในปลาเทวดา พบว่าปริมาณปรสิตที่ทำให้ปลาเทวดาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 14 วัน มีค่าเท่ากับ $6.42x10^3$ เซลล์ การทดสอบการยอมรับปรสิตในปลาทอง (*Carassius auratus*) ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) และปลาแพลทตี้ (*Xiphophorus maculatus*) พบว่าปลาทั้งสามชนิดไม่ยอมรับ *S. vortens* ที่แยกจากปลาเทวดา

การทดสอบประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งการเจริญของ *S. vortens* ในหลอดทดลอง พบว่ายาไดเมทริดาโซล (dimetridazole) มีประสิทธิภาพดีที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังได้รับยานาน 48 ชั่วโมง ยาเมโทรนิดาโซล (metronidazole) มีประสิทธิภาพดีที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังได้รับยานาน 48 ชั่วโมง และแมกนีเซียมซัลเฟต มีประสิทธิภาพดีที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังได้รับยานาน 72 ชั่วโมง การทดสอบประสิทธิภาพของยาไดเมทริดาโซลในปลาเทวดาที่ติดปรสิต *S. vortens* ตามธรรมชาติ พบว่ายาไดเมทริดาโซลความเข้มข้นมากกว่า 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* หลังได้รับยานาน 24 ชั่วโมง ชี้ให้เห็นว่ายาไดเมทริดาโซลเป็นยาที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดและสามารถใช้ในการป้องกันโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาเทวดาได้

234631

Abstract

A *Spironucleus* sp. was found in the muscle abscesses of red tilapia (*Oreochromis niloticus x O. mossambicus*) cultured in earthen ponds. Morphological studies indicated that the live trophozoite is pyriform to oviform, 6.8-8.7 µm long and 3.2-4.8 µm wide, with 6 anterior and 2 posterior flagella, smooth and unadorned body surface. Kinetosome below the apex of s-shape nuclei and recurrent flagella ensheathed with flagellar pockets (cytosomal canals). Histopathological changes revealed degeneration and leucocytic infiltration peripheral to the infected areas. Experimental transmission to healthy fish was attempted by intraperitoneal and intramuscular injections of parasitic suspension, or co-habitation with infected fish, however, no methods were successful. Therefore, the mode of infection of this parasite was still undetermined.

The study of spironucleosis in ornamental fishes i.e., angelfish (*Pterophyllum scalare*), oscar (*Astronotus ocellatus*), discus (*Symphysodon discus*) and Siamese fighting fish (*Betta splendens*) were also taken and found that the *Spironucleus* sp. infected in 3 fish species, angelfish, oscar and discus. The highest infection was recorded in angelfish (90%) followed by oscar (75.4%) and discus (61%), respectively. The parasites were typically highly motile and rotation around their longitudinal axis. The live trophozoites showed pyriform to ovoid shape with 6 anterior flagella and 2 posterior flagella, 2 nuclei, sized 11.0-17.0 µm long and 5.0-11.0 µm wide. Scanning electron microscopy of trophozoite bear to compound a smooth adorned body surface, lateral longitudinal ridges, posterior end swirled. The six anterior flagella emerged posterior-medially from the cytostome opening. Two recurrent flagella protruded from the posterior end of the body surrounded by a crescent-shaped ridge. The posterior end of the body bear two papillae and opening of flagellar pockets. Transmission electron microscopy showed the compound S-shape of nuclei. The parasites consisted of a highly vacuolated cell with prominent recurrent flagella, kinetosomes just below the apex of the S-shape of nuclei, lateral ridge are support by microtubules, recurrent flagellar between 2 nuclei and long to posterior end. The parasite have a supra and infra nuclear microtubular. Recurrent flagella with flagellar pockets (cytosomal canals) passing posteriorly through the cell. Identification by means of morphological studies under light and electron microscopes indicated that the parasite was *Spironucleus vortens*.

Histopathological changes of infected angelfish revealed granulomatous liver, numerous numbers of melanomacrophage in the spleen and inflammation of the intestine. *In vitro* study of the optimal growth conditions of *S. vortens* isolated from angelfish in culture medium showed that the maximum growth of parasite was at 25 $^{0}$C and pH 7. In addition, *S. vortens* growth at 20 $^{0}$C and 30 $^{0}$C and pH 7 to 9 but not growth at 5 $^{0}$C and 10 $^{0}$C at all pH levels. Moreover, the cyst stage of parasite was recorded at 20 $^{0}$C and 25 $^{0}$C. Pathogenicity study of *S. vortens* in angel fish showed 14 days-$LD_{50}$ of 6.42 x $10^{3}$ cells. Susceptibility study of *S. vortens* to some others fish species i.e., golden fish (*Carassius auratus*), guppy (*Poecilia reticulata*) and platy (*Xiphophorus maculatus*) indicated that these experimental fish were resistance to artificial infection.

The growth inhibition assay of *S. vortens* was examined *in vitro*. The result showed that dimetridazole and metronidazole were effective in inhibition of the parasite's growth after 48 h exposure at concentration of 4.0 µg/ml or higher and 6.0 µg/ml or higher, respectively. Magnesium sulfate inhibited the growth of the parasites at concentration of 60 mg/ml or higher after 72 h exposure. In order to treat spironucleosis of naturally infected angelfish, dimetridazole was chosen and examined *in vivo*. The results showed that dimetridazole was effective in inhibition of the parasite at concentration of 4.0 µg/ml or higher after 24 h exposure. This study indicates that dimetridazole is the most effective chemotherapeutic agent which can be used for treatment of spironucleosis of angelfish.