

การสำรวจความชุกของปรสิต *Perkinsus olseni* ในหอยลาย (*Paphia undulata*) จากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงครามและสมุทรสาคร

A survey on the prevalence of *Perkinsus olseni*, parasite of undulated surf clam (*Paphia undulata*) in Phetchaburi, Samut Songkhram and Samut Sakhon province.

สุพรรณณี ลิ้มทอชวลิต^{1*}, จันทรจักร วัฒนะโชติ¹ และ นันทิกา คงเจริญพร²

Supannee Leethochavalit^{1*}, Janjarus Watanachote¹ and Nanthika Khongchareonporn²

บทคัดย่อ: การสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *Perkinsus olseni* ในหอยลาย จากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงคราม และสมุทรสาคร ตั้งแต่เดือนมกราคมถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2560 ทำการเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมดหกร้อยตัว (ประมาณ 30 ตัว/เดือน/จังหวัด) เพื่อตรวจหาปรสิต โดยใช้เทคนิค RFTM และเทคนิคภูมิพยาธิวิทยา ผลการศึกษาพบว่า อัตราความชุกของ *P. olseni* ในหอยลายจากจังหวัดเพชรบุรีและจังหวัดสมุทรสงคราม สูงสุด 100% ในเดือนกรกฎาคม โดยหอยลายจากจังหวัดเพชรบุรีมีปริมาณความหนาแน่นสูงสุดอยู่ที่ 361,026±80,400 เซลล์/กรัม (±SE) ในเดือนกรกฎาคม จากการตรวจสอบทางด้านภูมิพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อหอยบริเวณที่เหงือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และแมนเทิล พบปรสิตระยะโทรโฟซอยท์ มีรูปร่างเป็นรูปวงแหวน มีนิวเคลียสอยู่ด้านบน แวคคิวโอลมีขนาดใหญ่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-6 µm พยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อจะพบว่าปรสิตก่อให้เกิดอาการ การรวมกลุ่มของเม็ดเลือด โดยปรสิตจะอยู่ภายในถุงห่อหุ้ม บริเวณรอบๆ จะเกิดอาการเนื่อตาย

ABSTRACT: A survey for prevalence of *Perkinsus olseni* infection in undulated surf clam from Phetchaburi, Samut Songkhram and Samut Sakhon province was carried out from January to July 2017. Six hundred clams (30 clams/month/province) were obtained and examined by using the Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM) assay and histological technique. The results showed that the highest prevalence of *P. olseni* was 100% in July from Phetchaburi and Samut Songkhram province. In July, the highest mean intensity was observed at 361,026±80,400 cell/g (±SE) at Phetchaburi province. Histological technique of clam, within gill filament, connective tissue and mantle tissue showed the developing trophozoites 3-6 µm in diameter. The pathology of *P. olseni* infection in clam tissue showed hemocyte infiltration, encapsulation and necrosis symptom.

¹ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี

Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi

² สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok

* Corresponding author: supannee@buu.ac.th

บทนำ

โรค Perkinsosis เป็นโรคที่เกิดจากโปรโตซัวสกุล *Perkinsus* ที่พบในหอยทะเลหลายชนิดทั่วโลก เป็นหนึ่งในรายชื่อโรคที่ต้องรายงานต่อองค์กร World Organization for Animal Health (OIE) หากพบปรสิตชนิดนี้ในหอยที่เลี้ยง ปรสิต *Perkinsus* ระยะที่พบในเนื้อเยื่อหอย เรียกว่าระยะโทรโฟซอยต์ (Trophozoite) ซึ่งจะมีการสืบพันธุ์ในเนื้อเยื่อหอย ด้วยกระบวนการแบ่งเซลล์แบบ binary division ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดการบวมและฉีกขาดของเนื้อเยื่อหอย นอกจากนี้ปรสิตอาจส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของหอยช้าลง (Villalba et al., 2004) จากรายงานของ Waki et al. (2018) พบว่าหอย Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) ที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น เมื่อมีปรสิตจำนวน 106 เซลล์/กรัม และทำการเลี้ยงต่อไปนาน 1-2 เดือน พบว่าอัตราการรอดต่ำกว่าหอยในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับปรสิต ในประเทศไทยมีรายงานการพบโปรโตซัวสกุลนี้ทั้งในหอยลาย (*P. undulata*) (Leethochavalit et al., 2004) และหอยนางรม (*Saccostrea forskali*) (Taveekijakarn et al., 2008) สำหรับวิธีการตรวจวินิจฉัยปรสิต *Perkinsus* เริ่มแรกค้นพบโดย Ray (1966) จากการนำเนื้อเยื่อหอยไปบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid thioglycollate medium จึงเรียกวินิจฉัยว่า Ray's fluid thioglycollate

assay (RFTM) วิธีการตรวจวินิจฉัยแบบนี้เหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัย ที่ทำเป็นงานประจำ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัด แต่ใช้เวลาบ่มนาน 7-14 วัน แต่วิธีนี้จะไม่สามารถระบุชนิดของปรสิต *Perkinsus* ได้ เนื่องจากขาดความจำเพาะต่อปรสิต วิธีการตรวจวินิจฉัยแบบอื่นที่ไม่ต้องการเทคนิคสูง จะสามารถใช้เทคนิคทางด้านภูมิวิทยาของเนื้อเยื่อ เพื่อดูลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของปรสิตควบคู่กับวิธี RFTM ได้ สำหรับงานวิจัยเรื่องนี้ใช้เทคนิควิธี RFTM เพื่อตรวจหาเปอร์เซ็นต์ความชุก (prevalence) ของปรสิต และความหนาแน่นของปรสิต (infection intensity) ในเนื้อเยื่อหอยและใช้เทคนิคภูมิวิทยาเพื่อบอกสัณฐานวิทยาของปรสิต *Perkinsus olseni* ในหอยลาย (*Paphia undulata*) ที่เก็บจากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงครามและสมุทรสาคร

วิธีการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างหอยลาย (*P. undulata*) จากจังหวัดเพชรบุรี จังหวัดสมุทรสงครามและจังหวัดสมุทรสาคร (Figure 1) จากเรือประมงขนาดเล็กที่ออกไปคราดหอย จำนวนประมาณ 30 ตัว/เดือน/จังหวัด ตั้งแต่เดือนมกราคม-กรกฎาคม พ.ศ. 2560 นำหอยลายที่ได้มาวัดขนาดและชั่งน้ำหนัก และทำการจดบันทึก



Figure 1 Details of the sampling sites of *Paphia undulata* collected from three province during January-July 2017

2. การตรวจหาปรสิตในเนื้อเยื่อหอยลายด้วยวิธี Ray's fluid thioglycollate medium assay (Ray, 1966)

นำหอยลายมาตัดขวางให้ผ่านอวัยวะต่างๆ ตาม Figure 2 นำเนื้อเยื่อส่วนที่ 1 และ 3 ซึ่งน้ำหนักก่อนนำไปใส่ในอาหาร Fluid thioglycollate medium ปริมาตร 30 ml. เติมนยาปฏิชีวนะ Streptomycin 500 µg/ml และ Penicillin G Potassium salt 500 unit/ml บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อมาย่อยด้วย 2 M NaOH ที่

อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อหอยที่ย่อยแล้วมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,500 x g เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลาย NaOH ที่ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 0.01 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 0.15 M เกลือ (PBS) ทำซ้ำจำนวน 3 รอบ ด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิม เก็บตะกอนที่สะอาดในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แช่เย็นไว้เพื่อนำมาดำเนินการในขั้นต่อไป

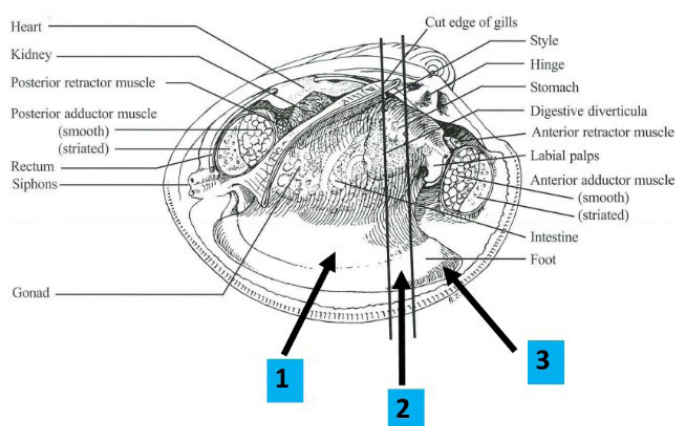


Figure 2 The bold parallel lines show location where cross-section was taken. The 1st and 3rd tissues were used for RFTM assay and the 2nd tissues were used for histological technique. (Howard et al., 2004)

3. การตรวจนับปรสิต *P. olsenii* ระยะฮิพโนสปอร์ (Hypnospore) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำตัวอย่างออกจากตู้เย็น จากนั้นเปิดตัวอย่าง 500 µl ใส่ในสไลด์นับแฟล่งกัตตอน (Sedgewick Rafter Counting Chamber) ย้อมด้วย Lugol's iodine solution 500 µl. เพื่อนับจำนวน ฮิพโนสปอร์ ของ *P. olsenii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 3 ครั้งต่อตัวอย่าง จดบันทึก แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (Leethochavalit et al., 2004)

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรสิตในเนื้อเยื่อหอยด้วยเทคนิคมิวทิวทา

นำเนื้อหอยส่วนที่ 2 (Figure 2) แช่ใน Davidson's fixative นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเนื้อหอยไปผ่านกระบวนการทาง Histological technique (Howard et al., 2004) นำเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการ ดึงน้ำออกมาฝังในบล็อกพาราฟิน และตัดด้วยเครื่อง ไมโครทอม ที่ความหนา 3 µm. วางบนสไลด์ นำไปย้อมสี Hematoxylin และ Eosin เพื่อนำไปตรวจหาปรสิตด้วยกล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

ผลการศึกษา

การตรวจหาปรสิตในเนื้อเยื่อหอยลายด้วยวิธี Ray's fluid thioglycollate medium assay

จากการเก็บตัวอย่างหอยลายจากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงครามและ สมุทรสาคร จำนวน 30 ตัว/เดือน/จังหวัด ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนกรกฎาคม 2560 พบหอยลาย จากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงครามและ สมุทรสาคร มีขนาดเฉลี่ย 3.85 ± 1.00 ซม. 3.48 ± 1.03 ซม. และ 3.97 ± 1.10 ซม. ($\pm$ SD) ตามลำดับ และมีน้ำหนัก (พร้อมเปลือก) เฉลี่ย 7.42 ± 1.82 กรัม 5.77 ± 1.42 กรัม และ 8.38 ± 3.80 กรัม ($\pm$ SD) ตามลำดับ เมื่อนำหอยลายทั้งหมดมาตรวจหาปรสิต ด้วยวิธี RFTM และย้อมด้วย Lugol's iodine solution พบฮิโปสปอร์ ติดสีน้ำตาล-ดำ (Figure 3) จากการนับและหาค่าเฉลี่ยพบความชุกของปรสิตในหอยลายจากทั้ง 3 จังหวัด ดังนี้หอยลายจากจังหวัดเพชรบุรีและสมุทรสงคราม

ความชุกของปรสิตสูงสุด คิดเป็น 100% ในเดือนกรกฎาคม 2560 และต่ำสุด 0% ในเดือนพฤษภาคม ส่วนจังหวัดสมุทรสาครพบความชุกของปรสิตสูงสุด คิดเป็น 26.67% เดือนมกราคม และต่ำสุด 0% ในเดือนเมษายนและมิถุนายน ตามลำดับปริมาณความหนาแน่นสูงสุดของปรสิต *P. olseni* จากจังหวัดเพชรบุรี พบจำนวน $361,026 \pm 80,400$ เซลล์/กรัม (น้ำหนักเนื้อ) ในเดือนมิถุนายน และต่ำสุด 0 เซลล์/กรัม ในเดือนกุมภาพันธ์และพฤษภาคม ปริมาณความหนาแน่นสูงสุดของปรสิตจากจังหวัดสมุทรสงคราม พบ $151,796 \pm 63,881$ เซลล์/กรัม เดือนมิถุนายน และต่ำสุด 0 เซลล์/กรัม เดือนพฤษภาคม ส่วนปริมาณความหนาแน่นสูงสุดของปรสิต *P. olseni* จากจังหวัดสมุทรสาคร พบ $61,974 \pm 20,847$ เซลล์/กรัม เดือนกรกฎาคม และต่ำสุด 0 เซลล์/กรัม เดือนพฤษภาคม และมิถุนายน (Table 1)

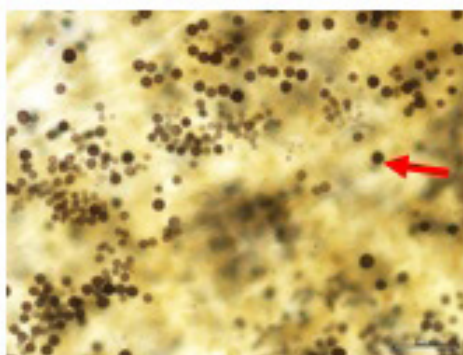


Figure 3 Hypnospores of *P. olseni* from *P. undulata* stained with Lugol's iodine solution.

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรสิตในเนื้อเยื่อหอยด้วยเทคนิคมิถุนวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรสิตในเนื้อเยื่อหอยที่เก็บจากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงครามและสมุทรสาครระหว่างเดือนมกราคม ถึง กรกฎาคม 2560 พบปรสิต *P. olseni* ในเนื้อเยื่อหอย อยู่ในระยะโทรโฟซอยท์ โดยพบเป็นทั้งเซลล์เดี่ยวและที่อยู่รวม

กันเป็นกลุ่ม ตั้งแต่ 2-5 เซลล์ มีรูปร่างคล้ายวงแหวน มีนิวเคลียสอยู่ด้านใดด้านหนึ่ง แนวคิวโกลมีขนาดใหญ่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของปรสิตประมาณ 3 – 6 μ m. พบมากที่เหงือก รองลงมาคือกล้ามเนื้อเกี่ยวพัน บริเวณที่พบปรสิตจะมีเซลล์เม็ดเลือดมารวมกลุ่มกัน กลุ่มของปรสิตจะถูกห่อหุ้มอยู่ภายในถุง บริเวณที่พบปรสิตจะเกิดการตายของเนื้อเยื่อ (Figure 4)

Table 1 *Perkinsus olseni* prevalence (%) and intensity (cell/g) by RFTM assay on *P. undulata* samples collected between January to July 2017 from Phetchaburi, Samut Songkhram and Samut Sakhon province. (N= 30) (NS= no sample)

Month (2017)	Phetchaburi		Samut Songkhram		Samut Sakhon	
	<i>Perkinsus</i> sp. Prevalence (%)	<i>Perkinsus</i> sp. Intensity (cell/g) ($\times 10^3 \pm \text{SE}$)	<i>Perkinsus</i> sp. Prevalence (%)	<i>Perkinsus</i> sp. Intensity (cell/g) ($\times 10^3 \pm \text{SE}$)	<i>Perkinsus</i> sp. Prevalence (%)	<i>Perkinsus</i> sp. Intensity (cell/g) ($\times 10^3 \pm \text{SE}$)
Jan	17+/30=56.67%	0.98 $\pm$ 0.56	6+/30=20%	4.93 $\pm$ 2.24	8+/30=26.67%	0.43 $\pm$ 0.14
Feb	0/30=0%	0	2+/30=6.67%	0.08 $\pm$ 0.007	1+/30=3.33%	1.10
Mar	5+/30=16.67%	0.06 $\pm$ 0.03	2+/30=6.67%	0.17 $\pm$ 0.05	4+/30=13.33%	0.25 $\pm$ 0.12
Apr	1+/30=3.33%	0.40	1+/30=3.33%	0.67	NS	NS
May	0/30=0%	0	0/30=0%	0	0/30=0%	0
Jun	27+/30=90%	361.03 $\pm$ 80.40	16+/30=53.33%	151.80 $\pm$ 63.88	0/30=0%	0
Jul	30+/30=100%	56.71 $\pm$ 11.66	30+/30=100%	74.58 $\pm$ 10.44	5+/30=16.67%	61.97 $\pm$ 20.85

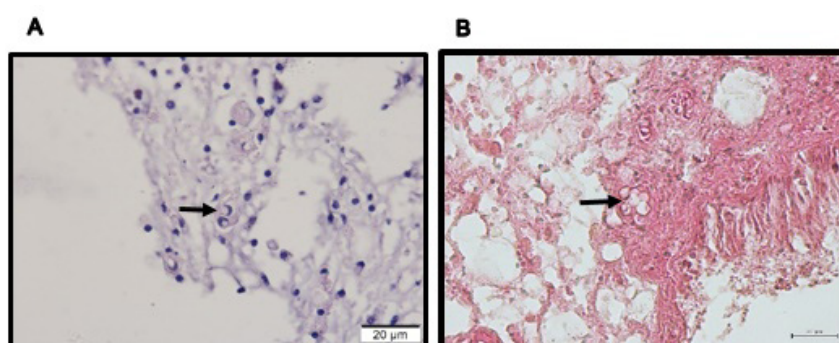


Figure 4 Trophozoites of *Perkinsus olseni* in *Paphia undulata* stained with H&E. A. Gill tissue. B. Connective Tissue

วิจารณ์

จากการสำรวจความชุกของปรสิต *P. olseni* ในหอยลายที่เก็บจากบริเวณจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงครามและสมุทรสาคร ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงเดือนกรกฎาคม 2560 พบว่าความชุกของปรสิต จากจังหวัดเพชรบุรีและสมุทรสงคราม เดือนกรกฎาคม สูงสุด 100% ซึ่งเมื่อเทียบกับการสำรวจปรสิตใน หอยลายที่เก็บจากจังหวัดชลบุรี เมื่อปี 2001 จะพบ ความชุกของปรสิต สูงสุด 100% เป็นเวลา 8 เดือน

ได้แก่ เดือนมกราคม กุมภาพันธ์ เมษายน กรกฎาคม สิงหาคม ตุลาคม พฤศจิกายนและธันวาคม เป็นต้น (Leethochavalit et al., 2004) เมื่อเทียบปริมาณ ความหนาแน่นของปรสิตในเนื้อหอยลายจากการ สำรวจในครั้งนี้ พบปริมาณความหนาแน่นสูงสุดจาก จังหวัดเพชรบุรี เดือนกรกฎาคม พบที่ 361,026 $\pm$ 80,400 เซลล์/กรัม ซึ่งปริมาณปรสิตจากการสำรวจครั้งนี้ มากกว่าที่มีรายงานในประเทศไทย ปี 2004 และปี 2556 ที่พบความหนาแน่นของปรสิตในหอยลายจาก จังหวัดชลบุรี จำนวน 187,759 $\pm$ 18,970 เซลล์/กรัม

และ $207,536 \pm 28,969$ เซลล์/กรัม ตามลำดับ แต่ปริมาณความหนาแน่นนี้จะน้อยกว่าที่พบจากจังหวัดตราด ปี 2556 พบปรสิตจำนวน $528,150 \pm 114,027$ เซลล์/กรัม (สุพรรณิ และคณะ, 2556; Leethochavalit et al., 2004) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป จากรายงานการศึกษาปรสิต *Perkinsus* spp. ที่ผ่านมา ระบุว่าปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิและความเค็ม จะส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของหอย และมีอิทธิพลต่อพลวัตของการติดปรสิต *Perkinsus* (Villalba et al., 2004) จากการศึกษาของ Nam et al. (2018) กล่าวว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของปรสิต *P. olseni* ในเนื้อเยื่อหอย อีกทั้งยังทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในหอย Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) ลดต่ำลง และเป็นสาเหตุให้เกิดการตายเป็นจำนวนมากของหอย สำหรับความเค็มของน้ำทะเลบริเวณจังหวัดสมุทรสงคราม และบริเวณใกล้เคียง พบว่าความเค็มของน้ำทะเล ระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือนมิถุนายน 2560 พบว่าความเค็มต่ำสุดของน้ำอยู่ที่ 20 ppt และสูงสุด 34 ppt และอุณหภูมิน้ำทะเลระหว่างเดือนมกราคม ถึงพฤษภาคม 2560 ต่ำสุด 27 องศาเซลเซียส สูงสุด 31 องศาเซลเซียส (จารุพันธ์ และคณะ, 2561) จากรายงานของ Choi and Park (2010) พบการแพร่ระบาดของ *P. olseni* ในหอย Manila clam (*R. philippinarum*) จากประเทศเกาหลี พบปริมาณความหนาแน่นของปรสิต *P. olseni* ตั้งแต่ 0-870,000 เซลล์/กรัม และที่พบในประเทศจีนพบว่าปริมาณความหนาแน่นสูงถึง 2,271,883 เซลล์/กรัม สำหรับ *P. olseni* ในหอย Japanese short-neck clam พบปรสิต 0-464,000 เซลล์/กรัม จากการศึกษาทางด้านสัตววิทยา พบโทรโฟซอยท์ในเหงือก มากที่สุด เช่นเดียวกับรายงานของ Park and Choi (2001) และ Choi et al. (2002) ที่พบปรสิต *P. olseni* ที่บริเวณเหงือกมากที่สุด แต่ทั้งนี้ยังพบที่แมนเทิลและเท้าของหอยอีกด้วย บริเวณที่พบปรสิตจะก่อให้เกิดการอักเสบ

บวม หรือเป็นตุ่มหนอง ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่าขนาดของปรสิตระยะโทรโฟซอยท์ มีขนาด 3-6 μm ไม่ต่างจากที่มีรายงานเกี่ยวกับปรสิต *P. olseni* ที่พบในหอยลายจากจังหวัดชลบุรี ในปี 2001 (Leethochavalit et al., 2004) แต่จะมีขนาดเล็กกว่า *P. olseni* ในหอย pearl oyster (*Pinctada fucata*) จากประเทศอินเดีย ซึ่งมีขนาด 4.7-7.3 μm (Sanil et al., 2010)

สรุป

ผลการสำรวจความชุกและความหนาแน่นของปรสิต *P. olseni* ในหอยลายจากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงคราม และสมุทรสาคร ระหว่างเดือนมกราคม ถึงกรกฎาคม 2560 พบปริมาณความชุกของปรสิต เดือนกรกฎาคม จากจังหวัดเพชรบุรีและสมุทรสงครามสูงสุด 100% ต่ำสุด 0% เดือนกุมภาพันธ์และพฤษภาคม จากจังหวัดเพชรบุรี เดือนพฤษภาคม จากจังหวัดสมุทรสงคราม เดือนพฤษภาคมและมิถุนายน จากจังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งปริมาณความหนาแน่นสูงสุดพบจำนวน $361,026 \pm 80,400$ เซลล์/กรัม จากจังหวัดเพชรบุรี รองลงมาพบจำนวน $151,796 \pm 63,881$ เซลล์/กรัม จากจังหวัดสมุทรสงคราม ในเดือนมิถุนายนเช่นเดียวกัน ซึ่งประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะนำไปสู่การหากลยุทธ์ในการจำกัดการแพร่ระบาดไปสู่หอยทะเลอื่นที่มีการเพาะเลี้ยงหรือการจัดการพื้นที่ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงหอยในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผ่านงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2560 สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

- จารุนันท์ ประทุมยศ, สุพรรณิ ลิโทชวลิต, ไพฑูรย์ มกกงไผ่, อาวุธ หมั่นหาผล, วันชัย วงศ์สุตา วรณ, วิเชียร พูลสำราญ, วรเดช เขียวเจริญ, ชวันรัตน์ แจ่มใสเจริญสิน, กำจร พวงจันทร์, ภูษิต ฤกษ์ดี, ไสรัช อำพัย, ธเนศ ฤกษ์ดี, ทิพา หล้าหยง, อำนาจ สัมอยู่, อภิชาติ แย้มอยู่, และมนัส แพทย์จะเกร็ง. 2561. โครงการการศึกษาเพื่อเฝ้าระวังการเกิดโรคระบาดและการป้องกันการตายหมู่ (ยกฟาร์ม) ของหอยแครง ตำบลคลองโคนโดยการมีส่วนร่วมของชุมชน. รายงานฉบับสมบูรณ์, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กรุงเทพฯ.
- สุพรรณิ ลิโทชวลิต, จันทรจิรัส วัฒนะโชติ, นันทิกา คงเจริญพร, และนารีรัตน์ ฤทธิธมน์. 2556. โรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย. รายงานฉบับสมบูรณ์มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี.
- Choi, K.-S. and K. Park. 2010. Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis, 1981) infection in Asian waters. *Coast. Environ. Ecos. Issues East China Sea*, 269-281.
- Choi, K.-S., K.-L. Park, K.-W. Lee and K. Matsuoka. 2002. Infection intensity, prevalence and histopathology of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Isahaya Bay, Japan. *J Shellfish Res.* 21: 119-125.
- Howard, D. W., E. J. Lewis, B. J. Keller, and C. S. Smith. 2004. Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5.
- Leethochavalit, S. K. Chalermwat, E. S. Upatham, K.-S. Choi, P. Sawangwong and M. Kruatrachue. 2004. Occurrence of *Perkinsus* sp. in undulated surf clams *Paphia undulata* from the Gulf of Thailand. *Dis Aquat Org.* 60: 165-171.
- Nam, K.-W., H.-D., Jeung, J.-H. Song, K.-H. Park, K.-S. Choi and K.-I. Park. 2018. High parasite burden increases the surfacing and mortality of the manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in intertidal sandy mudflats on the west coast of Korea during hot summer. *Parasit Vectors.* 11:42.
- Park, K.-I. and K.-S. Choi. 2001. Spatial distribution of the protozoan parasite, *Perkinsus* sp., found in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Aquaculture* 203: 9-22.
- Ray, S. M. 1966. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested Modifications and precautions. *Proc Natl Shellfish Assoc.* 54: 55-69.
- Sanil, N. K., K. K. Vijayan, V. Kripa, K. S Mohamed. 2010. Occurrence of the protozoan parasite, *Perkinsus olseni* in the wild and farmed Pearl Oyster, *Pinctada fucata* (Gould) from the Southeast coast of India. *Aquaculture.* 299: 8-14
- Taveekijakarn, P., Somsiri, T., Puttinaowarat, S., Tundavanitj, S., Chinabut. and Nash, G.. 2008. Parasitic fauna of rock oyster (*Saccostrea forskali*) cultured in Thailand. P. 335-342. In M. G. Bondad-Reantaso, C. V. Mohan, M. Crumlish, and R. P. Subasinghe. Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

- Villalba, A., K. S. Reece, M. C. Ordás, S. M. Casas and A. Figueras. 2004. Perkinsosis in molluscs: A review Aquat Living Resour. 17: 411–432.
- Waki, T., M. Takahashi, T. Eki, M. Hiasa, K. Umeda, N. Karakawa and T. Yoshinaga. 2018. Impact of *Perkinsus olseni* infection on a wild population of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Ariake Bay, Japan. J Invertebr Pathol. 153: 134-144.