

การศึกษาค่าโลหิตวิทยาของปลาน้ำจืดที่ติดเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟีลา

Hematology of Experimental *Aeromonas hydrophila* Infection in Fresh Water Fishes

จรรยา พุกกะเวส และ เสาวนิตย์ ทิพย์เสวก¹

Chanja Pukkavesa and Saowanit Tipayasawek

ABSTRACT

Hematological studies were observed in experimental *Aeromonas hydrophila* infection in walking catfish, snakehead fish and catfish. Marked changes were evident in infected snakehead fish sampled at 48, 72 and 96 hours. The Hb, PCV and RBC decreased following infection with lower values for Hb and PCV being recorded in the 72 and 96 hour samples. But in the walking catfish and catfish, no marked hematological changes were observed.

บทคัดย่อ

การศึกษากครั้งนี้ เป็นการศึกษาค่าโลหิตวิทยาของปลาชุก ปลาช่อน และปลาซวาย โดยแบ่งปลาออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นปลาปกติ กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ทำให้ป่วยด้วยเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟีลา ระดับ 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร

ผลการศึกษาพบว่า ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน จำนวนเม็ดเลือดแดงในปลาปกติมีค่าใกล้เคียงกัน แต่จำนวนเม็ดเลือดขาวของปลาซวายมีจำนวนมากกว่าของปลาชุกและปลาช่อน

จากการเปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยาของปลาปกติ และปลาป่วยด้วยเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟีลาในการศึกษากครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างที่เด่นชัดทั้งในปลาชุกด้านและปลาซวาย ส่วนในปลาช่อนพบวาค่าต่าง ๆ ทางโลหิตวิทยาของปลาป่วย มีความแตกต่างจากปลาปกติโดยมีค่าต่าง ๆ ลดลงอย่างเด่นชัด

คำนำ

การสูญเสียทางเศรษฐกิจของการเลี้ยงปลาในบ่อมีสาเหตุมาจากหลายประการ ซึ่งส่วนใหญ่มีกเนื่องมาจาก

ปัญหาด้านสุขภาพ และการติดเชื้อโรคจากภายใน เช่น แบคทีเรีย ไวรัส และภายนอก เช่น ปรสิต และเชื้อรา จากการขาดอาหาร จกการที่ปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำ เป็นต้น (Eddy, 1977 ; Roberts, 1978) จากปัจจัยดังกล่าวนี้ กระตุ้นให้เกิดความสนใจที่จะทำการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาในปลาน้ำจืดชนิดต่าง ๆ เช่น ปลาชุกด้าน ปลาช่อน และปลาซวาย เพื่อหาคามาตรฐานของปลากลุ่มปกติ และในปลาป่วยด้วยเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟีลา คามาตรฐานนี้คณะผู้วิจัยหวังวาคงจะเป็นมาตรฐานประกอบการวินิจฉัยโรคปลา (Hickley, 1976) ประกอบกับข้อมูลอื่น ๆ ที่มีรายงานในวารสารต่าง ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศให้ได้ผลแม่นยำยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

ปลาทดลอง

ปลาทดลอง ได้แก่ ปลาชุกด้านน้ำหนักตัว 0.4 กิโลกรัม โดยเฉลี่ยจำนวน 50 ตัว ปลาช่อนน้ำหนักตัว 0.5 กิโลกรัม โดยเฉลี่ยจำนวน 50 ตัว และปลาซวาน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมโดยเฉลี่ยจำนวน 50 ตัว ปลาทั้ง 3 ชนิด ทุกตัวมีสุขภาพดี แข็งแรง ปลา

¹ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Dept. of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart Univ.

แต่ละชนิดแยกเลี้ยงในบ่อเลี้ยงปลาแบบกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เมตร สูง 0.5 เมตร มีฝาครอบทำด้วยมุ้งในล่อน โครงไม้ไฟ จำนวนบ่อละ 10 ตัว

ก่อนทำการทดลองได้ทำการเจาะเลือดจาก caudal blood vessel ของปลาแต่ละชนิด ๆ ละ จำนวน 50 ตัว เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม โดยใช้เข็มขนาด 24G ยาว $1\frac{1}{4}$ เพื่อบันทึกค่าโลหิตปกติ

การใส่เชื้อและเจาะเลือด

ใส่เชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟีลา ปริมาณ 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ในปริมาณเชื้อ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร ในน้ำเลี้ยงปลาทั้ง 3 ชนิด ในแต่ละบ่อเลี้ยง

หลังจากใส่เชื้อในน้ำเลี้ยงปลาทุกบ่อแล้ว ทำการเจาะเลือดจาก caudal blood vessel ในขนาด 1 มิลลิลิตร จากปลาครั้งละ 10 ตัว ทุก ๆ 24 ชั่วโมง จากปลาทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว โดยใช้กระบอกฉีดยาและเข็มพลาสติก ชนิด disposable terumo needles, 24G $\times$ $1\frac{1}{4}$ " (0.55 $\times$ 25 mm) ใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 0.1 มิลลิลิตร หลังจากได้เลือดแล้วถอดเข็มออก หยดเลือด 1 หยด ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดเพื่อนำไปทำ thin blood film smear ส่วนเลือดที่เหลือใส่ลงในขวดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด คือ EDTA ขนาด 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 5 หยด เขย่าขวดผสมเลือดและสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดให้เข้ากัน เก็บเลือดที่ได้นี้เพื่อไปหาค่าต่าง ๆ

การตรวจหาค่าโลหิตวิทยา

ทำการตรวจวิเคราะห์หาค่าโลหิตวิทยาดังนี้

1. Differential cell count เพื่อหาจำนวนเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์ว่ามีแต่ละชนิดจำนวนเท่าใด โดย fixed thin blood film smear ด้วย methanol แล้วย้อมด้วยสี Modified Wright Giemsa

2. ค่าฮีโมโกลบิน หาโดยวิธี Acid hematin ของ Sahli อ่านค่าหน่วยเป็นกรัมเปอร์เซ็นต์

3. ค่าฮีมาโตคริต โดยใช้ microhematocrit tube ดูดเลือดให้ได้ประมาณ 3 ใน 4 ของความยาวหลอด ปิดปลายด้านหนึ่งด้วยหินน้ำมัน นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที นาน 5

นาที อ่านค่าโดยเทียบกับค่ามาตรฐาน หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

4. ค่าเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว

นำยาละลายใช้ Shaw's solution (Shaw, 1930; Kingsley, 1935) ทำให้เลือดเจือจางลงเป็น 1 : 200 ส่วน นับจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวด้วย (Neubauer counting chamber แยกชนิดเม็ดเลือดโดยอาศัยความแตกต่างของสีที่ติดขนาดของเม็ดเลือดและลักษณะของนิวเคลียส (Hesser, 1960)

จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดได้จากผลรวมของเม็ดเลือดขาวที่นับได้ใน 4 ช่องคูณด้วย 500

จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดได้จากผลรวมของเม็ดเลือดแดงที่นับได้ใน 5 ช่อง คูณด้วย 10,000

ผลและวิจารณ์

ค่าทางโลหิตวิทยาในปลาอุก ปลาช่อน และปลาสร้อยชนิดละ 50 ตัว ซึ่งเป็นปลากลุ่มปกติแสดงใน Table 1 จากตารางจะเห็นได้ว่า Hemoglobin (Hb) ในปลาน้ำจืดทั้ง 3 ชนิด ที่ทำการศึกษามีค่าใกล้เคียงกัน คือ อยู่ระหว่าง 11.85 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในปลาช่อน 12.2 และ 12.3 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในปลาสร้อยและปลาอุกด้านตามลำดับ เช่นเดียวกับค่า Packed Cell Volume (PCV) ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันคือ 30.89 เปอร์เซ็นต์ 33.17 เปอร์เซ็นต์ และ 30.11 เปอร์เซ็นต์ ในปลาอุกด้าน ปลาช่อน และปลาสร้อย ตามลำดับ สำหรับจำนวนเม็ดเลือดแดง ต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ในปลาอุกด้าน เท่ากับ 2.64 ในปลาช่อน เท่ากับ 2.79 และในปลาสร้อย เท่ากับ 2.04 และจำนวนเม็ดเลือดขาวต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ในปลาอุกด้านและปลาช่อนมีค่าใกล้เคียงกัน คือ 45.95 และ 46.58 ตามลำดับ ส่วนในปลาสร้อยมีค่าเท่ากับ 177.11 ค่า Differential count ที่ทำการศึกษาในการทดลองนี้ คือ Neutrophil, lymphocyte, Monocyte และ Eosinophil ในปลาแต่ละชนิด แสดงใน Table 1 Differential count ในปลาอุกด้านและปลาช่อนมีค่าใกล้เคียงกันทุกค่า ส่วนในปลาสร้อยมีค่าแตกต่างจากปลาอุกด้าน และปลาช่อนเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาของปลาทองที่ถูกฉีดเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟีลา

เข้ากล้ำของ Brendent *et al.* 1986

ปลาที่ป่วยด้วยเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟีลา โดยใช้เชื้อในความเข้มข้น 10 เซลล์/มิลลิลิตร (Kiti *et al.*, 1985) ใส่ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา ด้วยปริมาณเชื้อ 1 มิลลิลิตร ค่อน้ำ 1 ลิตร ปลาที่ใส่เชื้อแสดงอาการผิดปกติโดยพบว่ามึนบาดแผลตามลำตัวและการบวมแดงที่ครีบหูและรอบทวาร (Chanja *et al.*, 1988) ได้ทำการเจาะหาลำทางโลหิตวิทยาเปรียบเทียบกับปลาปกติ โดยการเจาะภายใน 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังจากที่ได้รับเชื้อแล้ว ดังแสดงใน Table 2, 3 and 4 ในปลาอุกค้ำ ปลาช่อนและปลาซิว ตามลำดับ

Table 2

แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยาในปลาอุกค้ำกลุ่มปกติ และกลุ่มที่ได้รับเชื้อ โดยได้ทำการเจาะเลือดปลาป่วยที่ได้รับเชื้อจนถึง 72 ชั่วโมง จากตารางจะเห็นได้ว่าค่าทางโลหิตวิทยา ทั้ง Hb, PCV, RBC และ WBC ในปลาอุกค้ำที่ได้รับเชื้อไม่แตกต่างไปจากกลุ่มปกติมากนัก ทั้งในตัวอย่างเลือดที่เจาะภายใน 24, 48 และ 72 กลับมีค่าเพิ่มขึ้นจากกลุ่มปกติ ส่วนค่า WBC ลดลงในชั่วโมงที่ 24 และ 48 แต่กลับสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 72 หลังจากได้รับเชื้อแล้ว

Table 3

แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยาในปลาช่อนกลุ่มปกติ และกลุ่มที่ได้รับเชื้อ โดยทำการเจาะเลือดปลาป่วยจนถึง 96 ชั่วโมง จากตารางจะเห็นได้ว่าค่าต่าง ๆ ในส่วนประกอบของเลือด คือ Hb, PCV และ RBC มีค่าลดลงจากปลาช่อนกลุ่มปกติ ทั้งในชั่วโมงที่ 24, 48, 72 และ 96 หลังจากได้รับเชื้อ ส่วนค่า WBC มีค่าลดลงในชั่วโมงที่ 24 และ 48 แล้วกลับสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 72 และ 96

Table 4

แสดงการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาในปลา

ซิวกลุ่มปกติและกลุ่มที่ได้รับเชื้อ โดยทำการเจาะเลือดปลาป่วยในชั่วโมงที่ 24 หลังจากได้รับเชื้อ จากตารางจะเห็นได้ว่าค่าต่าง ๆ ในส่วนประกอบของเลือด ที่ทำการศึกษาไม่แตกต่างกันมากนัก ในปลาซิวกลุ่มปกติและปลาที่ได้รับเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง

ผลจากการศึกษานี้ จะเห็นได้ว่าส่วนประกอบต่าง ๆ ของเลือด คือ Hb, PCV และ RBC ในปลาอุกค้ำ ปลาช่อน และปลาซิว กลุ่มปกติมีค่าใกล้เคียงกัน ส่วน WBC ในปลาซิวมีค่าสูงกว่าในปลาอีก 2 ชนิดที่ทำการศึกษา

สำหรับค่าโลหิตวิทยาในปลาป่วยด้วยเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟีลา ขนาดความเข้มข้น 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น บันทึกการเปลี่ยนแปลงภายใน 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าค่าต่าง ๆ ในปลาอุกค้ำและปลาซิวมีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่แน่นอนในกลุ่มปกติและกลุ่มที่ได้รับเชื้อ สอดคล้องกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเลือดและส่วนประกอบไอออนของพลาสมาในปลาอุกค้ำที่เป็นโรคเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟีลา โดย Songsri *et al* 1986 นั้นพบว่าค่าต่าง ๆ เช่น Hb, PCV และจำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงภายใน 96 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ ยกเว้นจำนวนและชนิดของเม็ดเลือดขาวมีความเปลี่ยนแปลงไม่แน่นอน

ส่วนในปลาช่อนที่ป่วย พบการเปลี่ยนแปลงที่ลดลงอย่างเด่นชัด ทั้งในชั่วโมงที่ 24, 48, 72 และ 96 หลังจากได้รับเชื้อแล้ว ปลาช่อนที่ป่วยจะแสดงอาการโลหิตจางให้เห็นอย่างเด่นชัด ทั้งนี้โดยดูจากปริมาณ Hb, PCV และ RBC ที่ลดลง อย่างไรก็ดี ควรจะมีการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาในรายละเอียดเพิ่มเติมอีก เพื่อใช้ประกอบการวินิจฉัยโรคในปลาน้ำจืดต่อไป

คำขอขอบคุณ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณคณะกรรมการการดำเนินการแก้ไขปัญหาโรคระบาดในปลาน้ำจืดที่ได้จัดสรรทุนอุดหนุนการวิจัยนี้

ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ใช้เครื่องมือและบุคลากรการทำการวิจัย

Table 1 Normal values of hematology from healthy walking catfish, Snakehead fish and Catfish

	Hematology				Differential count/100 cells			
	Hb gm%	PCV %	Rbc 10 ⁶ /mm ³	Wbc 10 ³ /mm ³	Neu. (Seg)	Lymph	Mono.	Eos.
Walking catfish (n = 50)	12.3	30.89	2.64	45.95	14.11	73.41	12.26	—
	±2.93	±11.27	±.41	±10.57	±3.50	±4.19	±3.97	—
Snakehead fish (n = 50)	11.85	33.17	2.79	46.58	11.16	34.33	13.67	—
	±1.28	±4.79	±.67	±11.92	±4.83	±7.56	±5.78	—
Catfish (n = 50)	12.22	30.11	2.04	177.11	32.66	56.78	7.22	3.33
	±0.71	±3.72	±.28	±43.82	±9.92	±10.13	±4.10	±3.37

Hb = Hemoglobin
PCV = Packed cell volume
Rbc = Red blood cell
Wbc = White blood cell
Neu = Neutrophil
Lymph = Lymphocyte
Mono = Monocyte
Eos = Eosinophil
n = Number of samples

Table 2 Hematological analyses of blood from infected Walking catfish by A. hydrophila

	Hematology				Differential Count/100 cells		
	Hb gm%	PCV %	Rbc 10 ⁶ /mm ³	Wbc 10 ³ /mm ³	Neu (Seg)	Lymph	Mono.
CONTROL	12.30	30.89	2.64	45.95	14.11	73.41	12.26
(n = 50)	±2.93	±11.27	±.41	±10.57	±3.50	±4.19	±3.97
Infect 24 hr.	10.63	28.03	2.19	39.44	15.63	71.58	12.95
(n = 25)	±3.56	±11.66	±.32	±13.15	±3.51	±6.88	±4.52
Infect 45 hr.	14.93	46.67	2.68	42.33	17.53	72.17	10.83
(n = 10)	±3.13	±5.87	±.37	±5.6	±6.67	±6.77	±2.67
Infect 72 hr.	14.05	47.5	2.75	54.66	11.5	74.75	13.75
(n = 5)	±1.01	±8.29	±.28	±8.37	±3.5	±3.03	±3.03

Table 3 Hematological analyses of blood from infected Snakehead fish by *A. hydrophila*.

	Hematology				Differential count/100 cells		
	Hb gm %	PCV %	Rbc $10^6/\text{mm}^3$	Wbc $10^5/\text{mm}^3$	Neu (Seg)	Lymph	Mono
CONTROL (n = 50)	11.85 ± 1.28	33.17 ± 4.79	2.79 ± 0.67	46.58 ± 11.92	11.16 ± 4.83	74.33 ± 7.56	13.67 ± 5.78
Infect 24 hr. (n = 15)	11.15 ± 1.20	27.75 ± 6.74	2.69 ± 0.47	29.63 ± 14.97	12.63 ± 5.66	74.63 ± 5.41	12.75 ± 5.85
Infect 48 hr. (n = 10)	10.04 ± 1.85	32.25 ± 2.59	2.43 ± 0.74	25.8 ± 8.82	14.0 ± 2.74	75.5 ± 4.97	10.5 ± 3.20
Infect 72 hr. (n = 5)	7.95 ± 1.95	29.5 ± 1.5	2.05 ± 0.62	131.5 ± 26.5	9.5 ± 2.5	83.5 ± 5.5	5.0 ± 3.0
Infect 96 hr. (n = 2)	7.25 ± 2.6	22.0 ± 6.0	1.92 ± 0.21	129.0 ± 64.5	15.0 ± 3.0	72.5 ± 5.5	12.5 ± 2.5

Table 4 Hematological analysed of blood from infected Catfish by *A. hydrophila*

	Hematology				Differential Count/100 cells			
	Hb gm %	PCV %	Rbc $10^6/\text{mm}^3$	Wbc $10^3/\text{mm}^3$	Neu (Seg)	Lymh	Mono	Eos.
CONTROL (n = 50)	12.22 ± 0.71	30.11 ± 3.73	2.04 ± 0.43	177.111 ± 43.85	32.66 ± 9.92	56.77 ± 10.13	7.22 ± 4.1	3.33 ± 1.36
Infect 24 hr. (n = 30)	14.28 ± 2.27	30.28 ± 2.43	2.07 ± 0.54	162.85 ± 58.43	32.14 ± 11.4	39.43 ± 11.83	13.29 ± 4.3	12.14 ± 5.69

เอกสารอ้างอิง

- Brenden, R.A. and H.W. Huizinga. 1986 Pathophysiology of experimental. *Aeromonas hydrophila* in fection in goldfish, *Carassins auratus* (L.). J. of Fish Diseases : 163-167.
- Chanja, P. and R. Suppaluk. 1988: A Pathological Study in Fresh Water Catfish, Snake Head Fish and Cat Fish which Infected with *Aeromonas hydrophila*. Kasetsart J. (Nat. Sci) 22(1) : 32-36.
- Eddy, F.B. 1972. Oxygen Uptake by rainbow traout blood, *Salmo gairdneri*. J. Fish Eirol. 10 : 87-90.
- Hesser, E.F. 1960. Method for Routine Fish Hematology. The Progressive Fish Culturist. Oct. 7 : 164-171.
- Hickley, C.R. 1976. Fish hematology, its uses and significance. N.Y. Fish Game. J. 23 : 170-175.
- Kingsley, D.M. 1935. A new hematological stain : Stain Technology 10(4) : 127-133.
- Kiti, S., L. Ongard, L. Malinee, K. Rungcharoen, S. Samutra and C. Pibul. 1985. Inhibition Effect of Antimicrobial Drug on Growth of *Aeromonas hydrophila* in Pla Duk Dan. Kasetsart J. (Nat. Sci) 19(3) : 226-233.
- Roberts. R.J. 1978. Fish Pathology. London Brilliere Tindall. 1st Edition. 318 p.
- Shaw, A.F. 1930. A direct method for counting the leukocytes, thrombocytes and erythrocytes

- of birds' blood. J. Path. and Bact. 33(2) : 833-835.
- Songsri, M., and M. Chaichan. 1986. Change of hematological effects and Plasma composition in walking catfish, (*Clarius batracus* (Linn.)) exposed to *Aeromonas hydrophila*. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 20(1) : 74-79.
- Takahashi. 1984. Appearance mechanisms of hematological symptoms of the *Aeromonas* disease in carp. J. of Shimonoseki University of Fishery. 32 : 67-74.