บทความวิจัย

ผลของการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ต่อค่าทางโลหิตวิทยาในปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* × *C. gariepinus*) และการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

เอกพล วังคะฮาต*

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลาดุกลูกผสมโดยการประเมินค่าโลหิตวิทยาและการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าปลาดุกลูกผสมที่ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ และ $1x10^9$ cfu/ml มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวรวม (TWBC) เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกลูกผสมที่ถูกฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.5% (กลุ่มควบคุม) แต่ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงรวม (TRBC) ไม่มีความแตกต่างกันในปลาทั้ง 3 กลุ่มทดลอง นอกจากนี้พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hb) ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (MCV) ค่าปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCH) และค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCHC) ในกลุ่มปลาที่ได้รับเชื้อทั้ง 2 ระดับมีค่าลดลง และผลจากการทดสอบฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งเชื้อพบว่ายาปฏิชีวนะที่มีความไวและสามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ได้ดี ได้แก่ Ceftriaxone, Norfloxacin, Ampicillin, Cloxacillin และ Meticillin

คำสำคัญ : *Aeromonas hydrophila*, ปลาดุกลูกผสม, โลหิตวิทยา, ยาปฏิชีวนะ

สาขาวิชาประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: eakapol.w@msu.ac.th

Effect of *Aeromonas hydrophila* Infection on Hematological Value in Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* × *C. gariepinus*) and Sensitivity Test to Antibiotic Drugs

Eakapol Wangkahart*

ABSTRACT

Effect of *Aeromonas hydrophila* infection on hematological value in hybrid catfish and the sensitivity to antibiotic drugs were studied. Fish infected with *A. hydrophila* ($1x10^8$ and $1x10^9$ cfu/ml) via intraperitoneal injection were compared with control fish injected with 0.5% NaCl. The results found that total white blood cell (TWBC) of both infected groups were increased, while total red blood cell (TRBC) was not different between groups. Pack cell volume (PCV) and the hemoglobin concentration (Hb) of infected fish were decreased. Furthermore, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) of both infected fish were also decreased. This study showed that antibiotic drugs including Ceftriaxone, Norfloxacin, Ampicillin, Cloxacillin and Meticillin could potentially inhibit *A. hydrophila*.

Keywords : *Aermonas hydrophila*, hybrid catfish, hematology, antibiotic drugs

Division of Fisheries, Department of Agricultural Technology, Faculty of Technology, Mahasarakham University
*Corresponding author, e-mail: eakapol.w@msu.ac.th

บทนำ

ปลาดุก เป็นปลาที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย ปลาดุกที่เป็นที่รู้จักโดยทั่วไปคือปลาดุกอุย (*Clarias microcephalus*) และปลาดุกด้าน (*C. batrachus*) [1] นอกจากนี้ยังมีปลาดุกอีกชนิดหนึ่งซึ่งเกิดจากการผสมข้ามระหว่างพ่อพันธุ์ปลาดุกยักษ์ (*C. gariepinus*) และแม่พันธุ์ปลาดุกอุย (*C. microcephalus*) ซึ่งโดยทั่วไปเรียกปลาดุกลูกผสมที่เกิดขึ้นนี้ว่า “ปลาดุกบิ๊กอุย” (*C. macrocephalus* × *C. gariepinus*) ปลาดุกบิ๊กอุยเป็นปลาที่นิยมทำการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลาดุกของไทยมักจะประสบปัญหากับการเกิดโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิด *A. hydrophila* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคกกหูบวม (motile aeromonas septicemia) โดยปลาที่เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ก่อให้เกิดการตายและสร้างความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงอย่างมาก [2] โดยมีอาการเป็นแผลบนลำตัวลึกลงไปใต้ผิวหนังและมีเลือดซึมบริเวณโคนครีบหู นอกจานี้จะมีอาการบวมและมีแผลใหญ่กว่าที่บริเวณอื่นๆ ปลาที่ติดเชื้อส่วนมากจะมีอาการท้องบวม (ascites) ร่วมด้วย ในช่องท้องจะพบว่ามีน้ำสีเหลืองขุ่น ส่วนอวัยวะภายในและลำไส้จะมีอาการตกเลือด (hemorrhage) ม้ามบวมใหญ่กว่าปกติ [3] ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาโรคได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพเพียงพอ

เลือด จัดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในระบบการไหลเวียนของเลือด ซึ่งทำงานร่วมกันอย่างเป็นระบบเพื่อเป็นตัวกลางในการจัดหาปัจจัยพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับเซลล์ในการหล่อเลี้ยงร่างกายของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งเป็นแหล่งทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ [4] เมื่อการเปลี่ยนแปลงหรือมีความผิดปกติเกิดขึ้นก็จะส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบของเลือดโดยตรง [5] โดยทั่วไป ค่าทางโลหิตวิทยา ถูกนำมาใช้ประเมินสภาพทางสรีรวิทยาของปลาทั้งทางกายภาพและชีวภาพ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปตามสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด รวมทั้ง อายุ เพศ สุขภาพ และปัจจัยสิ่งแวดล้อม [6-7] ค่าทางโลหิตวิทยาจึงเป็นอีกพารามิเตอร์หนึ่งที่สำคัญในการตรวจวินิจฉัยสุขภาพของปลา เช่น คุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสมหรือการปนเปื้อนของสารพิษและการติดเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ [8-9] ดังนั้น การศึกษาองค์ประกอบของเลือดจึงเป็นตัวแปรหนึ่งที่สำคัญและสามารถใช้ประเมินสภาพของการเลี้ยง รวมไปถึงการตรวจวินิจฉัยโรคเพื่อหาสาเหตุและแนวทางในการป้องกันรักษาโรคที่ถูกต้อง ปัจจุบันมีการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางเคมีของเลือดในปลาเศรษฐกิจหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่มุ่งเน้นการศึกษาผลของการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคที่จำเพาะต่อปลาชนิดต่าง ๆ ทั้งเชื้อแบคทีเรีย ไวรัสหรือเชื้อปรสิต เช่น ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) [10] ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [11] และปลา amberjack (*Seriola dumerili*) [6, 12] เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบของเลือดในปลาดุกลูกผสมซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจของไทยใน สภาวะของการติดเชื้อยังมีอยู่น้อย ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการติดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในระดับที่ก่อให้เกิดโรคแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังในปลาดุกลูกผสมโดยการประเมินค่าโลหิตวิทยาต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐานขององค์ประกอบของเลือดจากการติดเชื้อแบคทีเรียและเพื่อใช้ประกอบการศึกษาวิจัยในด้านอื่น ๆ นอกจากนี้ยังทดสอบความไวของเชื้อ *A. hydrophila* ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ เพื่อหาแนวทางในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมการระบาดของโรคให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดและเหมาะสมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

การเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila*

เก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียจากปลาดุกลูกผสมที่แสดงอาการของโรคกกหูบวมในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาดุกลูกผสมในจังหวัดมหาสารคามด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ม้าม และไตส่วนหลัง เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) จากนั้นบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{o}C เป็นระยะเวลา 12-14 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ และถ่ายเชื้อลงในอาหาร TSA ใหม่อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น จำแนกชนิดของเชื้อโดยการย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะของรูปร่างและคุณสมบัติของผนังเซลล์ พร้อมทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Catalase และ Oxidase ตามวิธีการของ Wanger และคณะ [13] และจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ API 20E kit (bioMerieux® sa, France) โดยเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ให้ความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 จากนั้นเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร tryptic soy broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 37^{o}C ข้ามคืน ปรับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียให้เท่ากับ 1x10^{9} cfu/ml โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) เท่ากับ 1.7 ที่ความยาวคลื่น 600 nm ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของเชื้อก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (acute infection) [14] และทำการเจือจางเชื้อด้วย 0.5% NaCl ให้ได้ระดับ 1x10^{8} cfu/ml ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic infection) ในปลาดุกลูกผสม [15]

การหาค่าโลหิตวิทยาในปลาดุกลูกผสมภายหลังจากได้รับเชื้อ *A. hydrophila*

เลี้ยงปลาดุกลูกผสมในตู้กระจกและให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปเช้า - เย็น เป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนการทดลอง โดยค่าคุณภาพน้ำตลอดการเลี้ยง ได้แก่ อุณหภูมิเฉลี่ย 27.44±1.20 องศาเซลเซียส ค่า pH 7.54±0.25 ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 5.09±0.21 mg/l แบ่งปลาทดลองเป็น 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มใช้ปลา 10 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 80 กรัม ซึ่งแต่ละกลุ่มจะได้รับสารผสมคนละชนิด โดยจะฉีดสารผสมปริมาตร 0.5 ml/ตัว เข้าไปบริเวณช่องท้อง (intraperitoneal injection) ซึ่งกลุ่มที่ 1 ฉีดน้ำเกลือ 0.5% (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่ 2 ฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ความเข้มข้น 1×10^{8} cfu/ml และกลุ่มที่ 3 ฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ความเข้มข้น 1×10^{9} cfu/ml ภายหลังการฉีดเชื้อเป็นระยะเวลา 3 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ปลาดุกทดลองเริ่มแสดงอาการของโรค motile aeromonas septicemia อย่างชัดเจนภายหลังจากได้รับเชื้อ *A. hydrophila* [15] เจาะเลือดปลาจากบริเวณโคนครีบหางตัวละ 2 ml เก็บไว้ในหลอดเก็บตัวอย่างเลือด (K2 EDTA (spray-dried), 7.2mg; BD Vacutainer®, USA) แช่ในน้ำแข็งแล้วนำไปศึกษาและหาค่าทางโลหิตวิทยาต่าง ๆ ตามวิธีการของ Campbell (1995) [16] ได้แก่ จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวรวม (total white blood cell; TWBC) และเซลล์เม็ดเลือดแดงรวม (total red blood cell; TRBC) โดยการเจือจางเลือดด้วย Natt and Herrick's Solution และ Gower's Solution ตามลำดับ หยดเลือดบนสไลด์และนับเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า หาค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (packed cell volume; PCV) โดยการใช้ capillary tube อุดปลายด้วยดินน้ำมันและปั่นด้วยเครื่องฮีมาโตคริต 1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วอ่านผลด้วยแผ่นเทียบค่า สำหรับค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (hemoglobin concentration; Hb) จะเจือจางเลือดปลาใน Drabkin's solution ในปริมาตรที่เท่ากัน คือ 10 µl ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีแล้ววัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) จากนั้นคำนวณหาค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย mean corpuscular volume (MCV) ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง mean corpuscular hemoglobin (MCH) และค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) ตามสูตร ดังนี้ MCV (fl) = PCV (v/v ratio) x 1000/RBC (x10^{6} cell/µl), MCH (pg) = Hb (g/l)/RBC (x10^{6} cell/µl) และ MCHC (g/dl) = Hb (g/l) x 10/PCV (v/v ratio) ทำการนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยการหยดเลือดลงบนสไลด์สเมียร์เลือดและ

ย้อมสีด้วย Giemsa-Wright stain solution ตั้งทิ้งไว้นาน 3-5 นาที แล้วหยดสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 6.6 ให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นับเซลล์เม็ดเลือดขาวทีละเซลล์จนครบ 100 เซลล์ จำนวน 3 ชนิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ได้แก่ ลิมไฟไซต์ (lymphocyte) โมโนไซต์ (monocyte) และนิวโทรฟิล (neutrophil) โดยแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดออกเป็นร้อยละ

การทดสอบความไวของเชื้อ *A. hydrophila* ต่อยาปฏิชีวนะ

เจือจางเชื้อ *A. hydrophila* ที่เตรียมไว้ข้างต้นโดยวิธี disk-diffusion method [17] ในสารละลาย 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเทียบเท่ากับความขุ่นของสารละลาย McFarland standard scale 0.5 ใช้ก้านพันสำลี (cotton swap) ปลอดเชื้อจุ่มลงไปในสารละลายของเชื้อที่เจือจางแล้ว กดและหมุน cotton swap ที่ข้างหลอดเพื่อกำจัดสารละลายเชื้อส่วนเกินออกแล้วกวาดเชื้อ (spread plate) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Müeller Hinton agar (MHA) ให้เชื้อกระจายอย่างสม่ำเสมอ ทิ้งให้แห้งประมาณ 5-15 นาที นำแผ่นยาปฏิชีวนะ จำนวน 8 ชนิด (Oxoid, UK) ได้แก่ Ceftriaxone (CRO), Cephalothin (KF), Norfloxacin (NOR), Penicillin (P), Ampicillin (AMP), Rifampicin (RD), Cloxacillin (OB) และ Methicillin (MET) ซึ่งยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดเหล่านี้ถูกกำหนดระดับความเข้มข้นในปริมาณที่แน่นอนและทดสอบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วในการศึกษาระดับความไวของเชื้อ [18] จากนั้นนำไปวางบนผิวหน้าอาหาร ชนิดละ 3 ซ้ำ แล้วกดแผ่นยาเบา ๆ เพื่อให้แน่ใจว่าแผ่นยาแนบสนิทกับผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C ข้ามคืน (12-14 ชั่วโมง) ตรวจสอบบริเวณยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร ตามวิธีการมาตรฐานของ CLSI standards (2003) [19] ซึ่งเป็นรายงานการวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียตัวแรก (cumulative antibiogram report) ต่อยาปฏิชีวนะในช่วงเวลาที่กำหนดโดยไม่คำนึงถึงชนิดของตัวอย่างหรือตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างเพื่อใช้กำหนดการแปลผลความไวต่อเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งต่อยาทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ และกำหนดค่าการแปลผลของบริเวณยับยั้งของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะเป็น 3 ระดับ คือ ดื้อยา ปานกลางและไวต่อยา

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ค่าองค์ประกอบของเลือดปลาทั้งหมดจะนำเสนอด้วยค่าเฉลี่ย$\pm$ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way-ANOVA) ตามวิธีของ Bonferroni post hoc tests ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

ผลการทดลอง

ค่าทางโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila*

จากการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมต่อเชื้อ *A. hydrophila* ภายหลังจากการฉีดเชื้อเข้าช่องท้องในปริมาณความเข้มข้น $1x10^8$ และ $1x10^9$ cfu/ml ซึ่งเป็นระดับที่ก่อให้เกิดโรคแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังตามลำดับเป็นเวลา 3 วัน โดยเปรียบเทียบกับปลาดุกลูกผสมที่ถูกฉีดด้วย 0.5% NaCl เข้าช่องท้อง (กลุ่มควบคุม) พบว่าตลอดระยะเวลาการทดลองครั้งนี้แม้ว่าไม่พบปลาที่ตายเกิดขึ้นในทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง แต่ในกลุ่มของปลาที่ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น ปลาได้แสดงอาการของโรค motile aeromonas septicemia อย่างชัดเจน และเมื่อทำการตรวจยืนยันหาสาเหตุของการเกิดโรคโดยการแยกเชื้อจากตับและไตส่วนหลังของปลาทดลองพร้อมทั้งย้อมแกรมและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นพบว่ามีลักษณะคล้ายกับเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในส่วนของการทดสอบหาค่าทางโลหิตวิทยาพบว่า ค่าโลหิตวิทยาของปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเชื้อทั้ง 2 ระดับ มีค่าโลหิตวิทยาที่สำคัญและมีความแตกต่างกันชัดเจน ได้แก่ จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวรวม (TWBC) ในกลุ่มของปลาที่ฉีดเชื้อทั้งสองระดับความเข้มข้นมีค่าสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยปลาที่ฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ cfu/ml มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 18.54 ± 6.92 $x10^4$ cell/μl รองลงมาคือกลุ่มที่ฉีดเชื้อในปริมาณความเข้มข้น $1x10^9$ cfu/ml มีค่าเป็น 15.41 ± 3.43 $x10^4$ cell/μl และปลาในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 4.39 ± 0.97 $x10^4$ cell/μl ในขณะที่จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงรวม (TRBC) พบว่าปลาทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน โดยปลาในกลุ่มควบคุมและปลากลุ่มที่ฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ และ $1x10^9$ cfu/ml มีค่าเท่ากับ $2.54\pm0.31x10^4$ cell/μl, $2.57\pm0.38x10^4$ cell/μl และ $2.56\pm0.23x10^4$ cell/μl ตามลำดับ ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) พบว่าปลาในกลุ่มที่ฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ cfu/ml มีค่า PCV เท่ากับ $27.34\pm4.90\%$ โดยไม่มีความแตกต่างจากปลาในกลุ่มควบคุม ($28.17\pm3.42\%$) ในขณะที่ปลาในกลุ่มที่ฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น $1x10^9$ cfu/ml มีค่า PCV เท่ากับ $24.14\pm3.12\%$ และมีความแตกต่างจากปลาในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hb) ให้ผลที่สอดคล้องกับค่า PCV โดยพบว่าปลาในกลุ่มที่ฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ cfu/ml มีค่า Hb เท่ากับ 7.69 ± 1.13 g/dl โดยไม่มีความแตกต่างจากปลาในกลุ่มควบคุม (7.48 ± 1.54 g/dl) ในขณะที่ปลาในกลุ่มที่ฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น $1x10^9$ cfu/ml มีค่า Hb เท่ากับ 5.24 ± 1.33 g/dl และมีความแตกต่างจากปลาในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 1)

เป็นที่น่าสังเกตว่า ค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (MCV) ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCH) และค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCHC) ให้ผลการศึกษาที่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ ปลาในกลุ่มควบคุมมีค่า MCV มากที่สุด (110.91 ± 1.49 fl) รองลงมาเป็นปลาที่ฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ cfu/ml มีค่า MCV เท่ากับ 106.38 ± 2.06 fl โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับปลาในกลุ่มควบคุม ในขณะที่ปลากลุ่มที่ฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น $1x10^9$ cfu/ml มีค่า MCV เท่ากับ 103.36 ± 0.97 fl และมีความแตกต่างจากปลาในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCH) พบว่าปลาในกลุ่มที่ฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ cfu/ml และกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเป็น 29.92 ± 4.75 pg และ 29.45 ± 6.67 pg ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกลุ่มของปลาที่ฉีดเชื้อในปริมาณความเข้มข้น $1x10^9$ cfu/ml ซึ่งมีค่า MCH เท่ากับ 20.47 ± 4.12 pg ส่วนค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCHC) พบว่า ระหว่างปลาในกลุ่มที่ฉีดเชื้อในปริมาณความเข้มข้น $1x10^8$ cfu/ml และกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่า MCHC เป็น 28.13 ± 2.31 g/dl และ 26.55 ± 4.50 g/dl ตามลำดับ แต่ปลาทั้ง

สองกลุ่มนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับปลาในกลุ่มที่ฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น $1x10^9$ cfu/ml ซึ่งมีค่า MCHC เท่ากับ 15.35±4.26 g/dl (ตารางที่ 1)

ผลจากการนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และนิวโทรฟิล จากการศึกษาพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และนิวโทรฟิล ของปลาทั้ง 3 กลุ่มให้ผลเป็นไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ ปลาในกลุ่มควบคุมมีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และนิวโทรฟิลมากที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 21.00±1.83%, 25.20±1.55% และ 20.40±1.42% ตามลำดับ รองลงมาเป็นกลุ่มปลาที่ได้รับเชื้อที่ความเข้มข้น $1x10^8$ cfu/ml ซึ่งมีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และนิวโทรฟิล เท่ากับ 19.40±1.35%, 14.20±1.23% และ 11.70±1.83% ตามลำดับ ในขณะที่ปลาในกลุ่มที่ได้รับเชื้อที่ความเข้มข้น $1x10^9$ cfu/ml มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และนิวโทรฟิล ต่ำที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 17.90±1.10%, 12.30±1.64% และ 9.10±0.88% ตามลำดับ โดยปลาทั้ง 3 กลุ่มมีความแตกต่างกันของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 3 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 1)

การทดสอบความไวของเชื้อ *A. hydrophila* ต่อยาปฏิชีวนะ

จากการตรวจสอบบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* โดยวิธี disk-diffusion method (ภาพที่ 2) ซึ่งทดสอบความไวกับยาปฏิชีวนะจำนวน 8 ชนิด จำนวน 3 ซ้ำ มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยแปรผลบริเวณยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) ระหว่างยาแต่ละชนิดตามวิธีมาตรฐาน CLSI standards [19] (ตารางที่ 2) พบว่าเชื้อ *A. hydrophila* มีความไวต่อยาจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Ceftriaxone (CRO), Norfloxacin (NOR), Ampicillin (AMP), Cloxacillin (OB) และ Methicillin (MET) โดยมีบริเวณยับยั้งเชื้อเท่ากับ 27.76±0.58, 26.00±1.73, 18.67±1.15, 14.00±0.00 และ 16.67±0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ยาอีก 2 ชนิด คือ Cephalothin (KF) และ Penicillin (P) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อในระดับปานกลางซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.67±0.58 และ28.67±0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อ *A. hydrophila* ดื้อต่อยา Rifampicin (RD) โดยมีบริเวณยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 21.67±0.58 มิลลิเมตร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ค่าทางโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมที่ติดเชื้อ *A. hydrophila*

ค่าทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม (0.5% NaCl)	กลุ่มทดลอง ความเข้มข้นของเชื้อ *A. hydrophila*	
		$1x10^8$ cfu/ml	$1x10^9$ cfu/ml
Total White Blood Cell (TWBC; $x10^4$ cell/ul)	4.39 ± 0.97^c	18.54 ± 6.92^a	15.41 ± 3.43^b
Total Red Blood Cell (TRBC; $x10^6$ cell/ul)	2.54 ± 0.31^a	2.57 ± 0.38^a	2.56 ± 0.23^a
Pack Cell Volumn (PCV; %)	28.17 ± 3.42^a	27.34 ± 4.90^a	24.14 ± 3.12^b
Hemoglobin concentration (Hb; g/dl)	7.48 ± 1.54^a	7.69 ± 1.13^a	5.24 ± 1.33^b
MCV (fl)	110.91 ± 1.49^a	106.38 ± 2.06^a	103.36 ± 0.97^b
MCH (pg)	29.45 ± 6.67^a	29.92 ± 4.75^a	20.47 ± 4.12^b
MCHC (g/dl)	26.55 ± 4.50^a	28.13 ± 2.31^a	15.35 ± 4.26^b
Lymphocyte (%)	21.00 ± 1.83^a	19.40 ± 1.35^b	17.90 ± 1.10^c
Monocyte (%)	25.20 ± 1.55^a	14.20 ± 1.23^b	12.30 ± 1.64^c
Neutrophil (%)	20.40 ± 1.42^a	11.70 ± 1.83^b	9.10 ± 0.88^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยอักษร ^{a,b,c} แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 2 ค่าการทดสอบความไวของเชื้อ *A. hydrophila* ต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion method

ชนิดของยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น (µg/disk)	ระดับความไวต่อยาปฏิชีวนะ			ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)	การแปรผล
		ดื้อยา	ปานกลาง	ไวต่อยา		
Ceftriaxone (CRO)	30	≤13	14-20	≥21	27.76±0.58	ไวต่อยา
Cephalothin (KF)	30	≤14	15-17	≥18	14.67±0.58	ปานกลาง
Norfloxacin (NOR)	10	≤12	13-16	≥17	26.00±1.73	ไวต่อยา
Penicillin (P)	10	≤28	-	≥29	28.67±0.58	ปานกลาง
Ampicillin (AMP)	10	≤13	14-16	≥17	28.67±1.15	ไวต่อยา
Rifampicin (RD)	5	≤23	24-25	≥26	21.67±0.58	ดื้อยา
Cloxacillin (OB)	5	≤10	11-12	≥13	14.00±0.00	ไวต่อยา
Methicillin (MET)	5	≤9	10-13	≥14	16.67±0.58	ไวต่อยา

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการตรวจความสมบูรณ์ของเลือดโดยทั่วไปจะอาศัยค่าที่เรียกว่า “complete blood count; CBC” ซึ่งค่าเหล่านี้จะใช้ในการประเมินสุขภาพของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ การตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cell count) และเม็ดเลือดขาว (white blood cell count) การตรวจหาปริมาณความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน การตรวจหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และการนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นต้น ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงสภาวะของสุขภาพ รวมทั้งการตรวจเลือดเพื่อวินิจฉัยโรค [20] จากการประเมินค่าทางโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุมพบว่า ค่าทางโลหิตวิทยามีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวรวม (TWBC) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม กลุ่มปลาที่ได้รับเชื้อจะมีค่า TWBC เพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 1) ในส่วนของปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงรวม (TRBC) ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hb) พบว่าปลาในกลุ่มที่ฉีดเชื้อทั้ง 2 ระดับมีค่าลดลง นอกจากนี้ ค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (MCV) ค่าปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCH) และค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCHC) ยังให้ค่าที่เป็นไปในทิศทางเดียวกันโดยมีค่าที่ลดลงในกลุ่มปลาที่ได้รับเชื้อทั้ง 2 ระดับ (ตารางที่ 1)

ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) เป็นส่วนประกอบหนึ่งที่สำคัญในเซลล์เม็ดเลือดแดงทำหน้าที่ในการนำออกซิเจนไปยังเซลล์ต่างๆ ทั่วร่างกาย จะมีความสัมพันธ์กับค่าปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) และสามารถใช้เป็นดัชนีในการวัดความสมบูรณ์ของสภาพร่างกายได้ ซึ่งค่า PCV นี้เป็นอัตราส่วนของปริมาณของเม็ดเลือดแดงต่อปริมาณของเลือดทั้งหมด จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าปลาดุกลูกผสมที่ได้รับเชื้อส่งผลทำให้ค่า PCV ลดลง โดยทั่วไปคุณสมบัติทางชีวเคมีของฮีโมโกลบินของปลานั้น ค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นจะแสดงถึงสุขภาพของปลาและการนำออกซิเจนไปเลี้ยงเซลล์ทั่วร่างกาย ถ้าหากพบว่ามีค่าต่ำสามารถบ่งบอกได้ว่าปลาอาจอยู่ในภาวะผิดปกติหรือเป็นโรคได้ เช่น โรคโลหิตจาง หรืออาจเกิดจากภาวะการติดเชื้อหรือผลกระทบจากสารเคมีที่เป็นพิษบางชนิด [21] ในการพิจารณาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินนั้น องค์ประกอบของเลือดทั้ง 2 ค่าจะมีความสัมพันธ์กัน กล่าวคือ ถ้าวิเคราะห์ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าสูงค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินก็จะสูง ในทางกลับกันถ้าวิเคราะห์ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นได้ต่ำความเข้มข้นของฮีโมโกลบินก็จะต่ำตามไปด้วย [22] นอกจากนี้ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) และความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hb) ยังมีความสัมพันธ์กันและนิยมนำมาใช้ในการวินิจฉัยสุขภาพของสัตว์ชนิดต่าง ๆ รวมทั้งปลาอีกด้วย จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อทั้งแบบเฉียบพลันและการติดเชื้อแบบเรื้อรังจะส่งผลทำให้ค่า PCV และความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมีแนวโน้มลดลงซึ่งแสดงให้เห็นถึงสภาวะของโลหิตจาง [23] การเกิดโรคแบบเฉียบพลัน เป็นสภาวะของโรคหรือการเจ็บป่วยที่จะเกิดอาการทันที รวดเร็ว อาการของปลาที่พบมักรุนแรงอาจทำให้ปลาตายได้หรือปลาที่ไม่ตายอาจสามารถรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะ [14] ส่วนการเกิดโรคแบบเรื้อรัง ปลาที่เกิดโรคหรือติดเชื้อเริ่มต้นอาจไม่แสดงอาการของโรค แต่อาการจะรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ อาจทำให้ปลาไม่ตายหรืออาจสามารถรักษาได้เช่นเดียวกัน [15] ปลาที่เกิดโรคทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังอาจไม่สามารถทำให้ปลาตายได้ แต่สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคได้ในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ค่าดัชนีเซลล์เม็ดเลือดแดงยังสามารถหาความสัมพันธ์ได้ในรูปของค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (MCV) ซึ่งเป็นค่าที่บอกขนาดเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าค่า MCV มีค่าลดลงในกลุ่มของปลาที่ได้รับเชื้อ ซึ่งโดยทั่วไปหากค่านี้มีค่าต่ำจะบ่งบอกถึงภาวะโลหิตจางซึ่งอาจเกิดจากภาวะของเม็ดเลือดแดงแตกง่าย อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสนใจอีกประการหนึ่ง คือ ทั้งปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCH) และความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCHC) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ จากการศึกษาในครั้งนี้

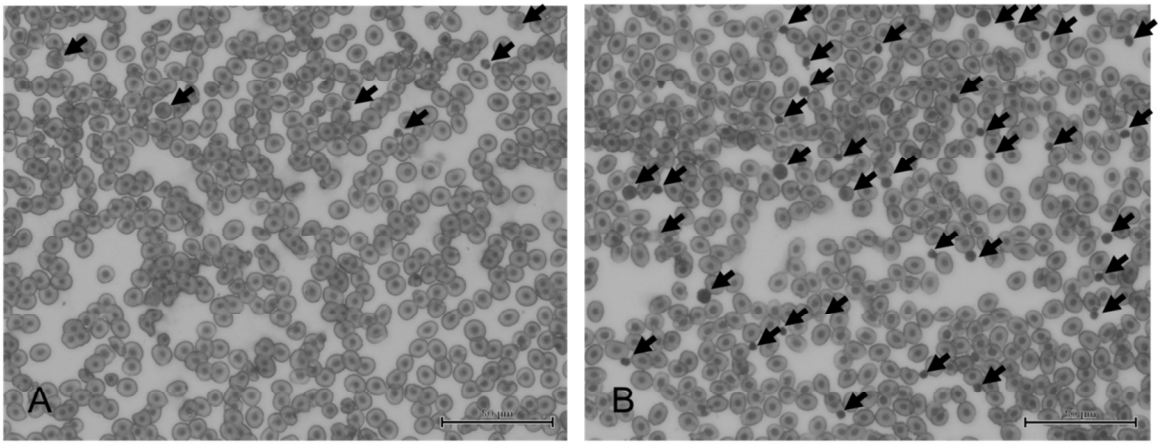
พบว่า ทั้งค่า MCH และค่า MCHC มีค่าลดลงในกลุ่มของปลาที่ได้รับเชื้อเช่นเดียวกัน ซึ่งค่าที่ต่ำกว่าปกติเหล่านี้จะแสดงให้เห็นว่าเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์มีความเข้มข้นของฮีโมโกลบินน้อย (hypochromia) หรือเกิดความผิดปกติของฮีโมโกลบินและบ่งชี้ถึงภาวะของโลหิตจาง [24]

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ เช่น รายงานการศึกษาของ Li และคณะ [25] พบว่า การติดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในปลา grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) ส่งผลให้จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มสูงขึ้น แต่ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดง รวมทั้งค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินและค่า MCV ไม่มีความแตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ จากการศึกษาในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ได้รับเชื้อ *Flavobacterium columnare* พบว่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดง ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน และค่า PCV มีแนวโน้มลดลง ในขณะที่ค่า MCV, MCH และ MCHC มีค่าลดลงเช่นเดียวกันและมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [10] เป็นที่น่าสนใจมากว่า ภาวะของการติดเชื้อไวรัสและปรสิตในปลายังส่งผลให้ค่าทางโลหิตวิทยาที่คล้ายคลึงกับการศึกษาในครั้งนี้ เช่น การติดเชื้อไวรัส Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) ในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [11] และการติดเชื้อไวรัส Eel Virus European X (EVEX) ในปลา European eels (*Anguilla anguilla*) พบว่าปลาทั้งสองชนิดในกลุ่มของปลาที่ติดเชื้อไวรัสเหล่านี้จะส่งผลให้ค่า PCV ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินและค่า MCV ลดลง [26] นอกจากนี้ ผลของการติดเชื้อปรสิต *Neobenedenia girellae* ในปลา amberjack (*Seriola dumerili*) พบว่าค่าโลหิตวิทยาต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมีค่าลดลงและมีความแตกต่างจากปลาในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน [6, 12] ผลจากการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่าการติดเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ ทั้งเชื้อแบคทีเรีย ไวรัสและปรสิตจะส่งผลทำให้ค่าโลหิตวิทยาของปลาเปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจน กล่าวคือ ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ค่า PCV, MCV, MCH และ MCHC มีแนวโน้มลดลง ในขณะที่ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีค่าเพิ่มมากขึ้น

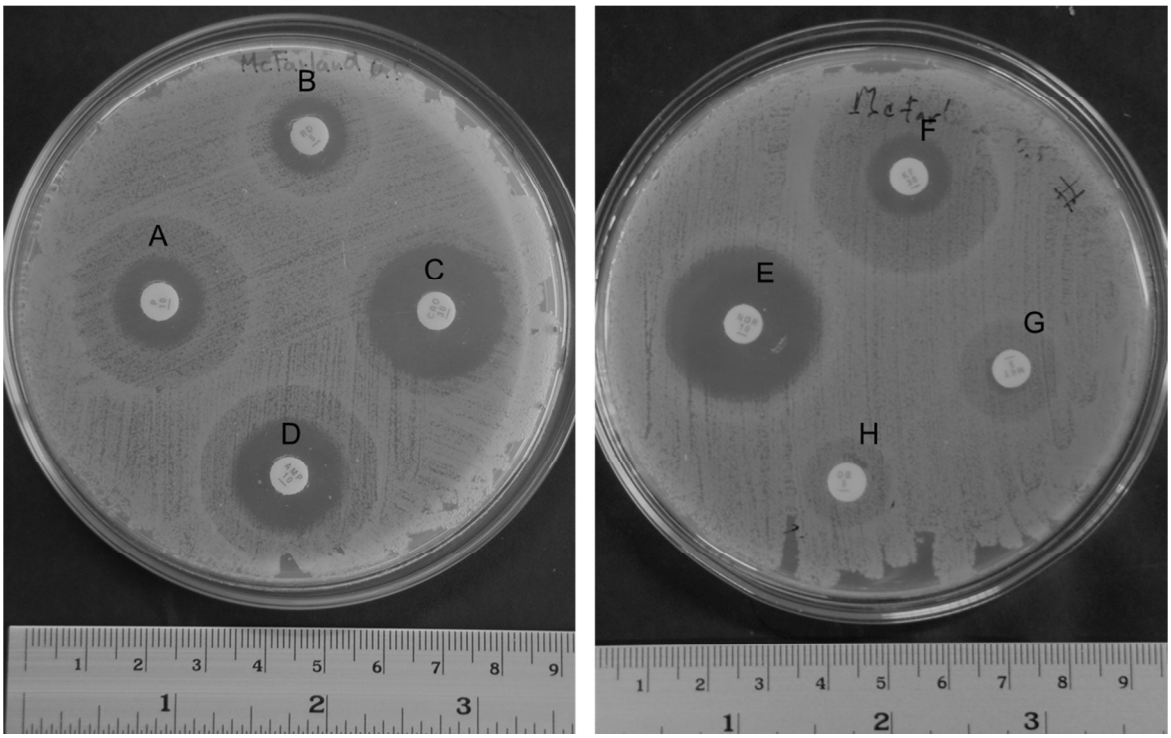
จากการนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวน 3 ชนิด แยกเป็นร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดที่พบ ได้แก่ ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และนิวโทรฟิล พบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 3 ชนิดในปลาทั้ง 3 กลุ่มการทดลองให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องและเป็นไปในทิศทางเดียวกัน (ตารางที่ 1) กล่าวคือ ปลาในกลุ่มได้รับเชื้อที่ความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับจะส่งผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 3 ชนิด มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุมหรือปลาที่มีสุขภาพปกติ (ตารางที่ 1) โดยบทบาทหน้าที่ เซลล์เม็ดเลือดขาวมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันเป็นหลักซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดเหล่านี้ยังมีหน้าที่ที่แตกต่างกัน เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล แม้ว่ายังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจนมากนักในกลไกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของปลา แต่เชื่อว่าเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มแรกที่เข้าต่อต้านเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม [27, 28] โดยถูกสร้างขึ้นที่ไขกระดูกและไหลเวียนเข้าสู่กระแสเลือด [29] เมื่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้จะทำหน้าที่จับกินและย่อยสลายสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้ [30] จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ปลาดุกลูกผสมที่ได้รับเชื้อความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ จะส่งผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลมีความสามารถในการกลืนกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมได้ดี [31] ตลอดทั้งอายุของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้สั้นและจะตอบสนองเพิ่มขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อแบคทีเรียในร่างกาย [32] ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาต่างๆ ที่ผ่านมา เช่น การศึกษาผลของการติดเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ที่มีความเข้มข้นสูงหรือการติดเชื้อในสภาวะเฉียบพลันในปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) [33] รวมทั้งการศึกษาในปลานิลที่ได้รับเชื้อ *Enterococcus* sp. [34] ส่งผลทำให้จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลลดจำนวนลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ผลของการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่า จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ให้ผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยกลุ่มของปลาที่ได้รับเชื้อความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ จะมีปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ชนิดลดจำนวนลง ซึ่งโดยบทบาทหน้าที่แล้ว เซลล์

เม็ดขาวชนิดลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์นี้จะมีหน้าที่อย่างเดียวกัน คือการเก็บกินเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ เช่น แบคทีเรีย โดยในระบบไหลเวียนเลือดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเซลล์แมคโคฟาจ (macrophage) เพื่อทำลายจุลชีพที่อยู่ภายในเซลล์และยังเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มที่มีหน้าที่สำคัญเมื่อเกิดการอักเสบในร่างกาย [35, 36]

จากการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ต่อยาปฏิชีวนะ 8 ชนิด (รูปที่ 2) ด้วยวิธี disk diffusion method ซึ่งเป็นการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากการสังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นและเป็นวิธีที่นิยมเพราะสะดวกและสามารถทดสอบยาได้หลายชนิดพร้อม ๆ กัน [37] โดยทั่วไป การรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ชั้นสูงรวมถึงสัตว์น้ำนั้นจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะที่ไวต่อเชื้อหรือสามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อได้ ดังนั้นการใช้ยาที่ไม่เหมาะสมและไม่ถูกวิธีอาจส่งผลทำให้การรักษาโรคไม่มีประสิทธิภาพและอาจก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้ออีกด้วย [38] การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยการวัดขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อัตราการแพร่ผ่านของยา ปริมาณและความเข้มข้นของเชื้อ อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ และความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด [39] ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีวิธีการทดสอบ และการแปรผลที่เป็นมาตรฐาน และสามารถทำซ้ำได้ ซึ่งวิธีการทดสอบด้วยวิธี disk-diffusion method นี้เป็นการทดสอบเชิงคุณภาพในการหาความไวของยาปฏิชีวนะ วิธีการนี้จึงเหมาะสำหรับการใช้เป็นแนวทางในการหายาปฏิชีวนะที่เหมาะสมเพื่อการใช้ในการรักษาโรค อย่างไรก็ตาม การตอบสนองต่อการรักษาไม่ได้ขึ้นอยู่กับเฉพาะความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรคเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับสรีรวิทยาและชนิดของเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำแต่ละชนิดอีกด้วย รวมทั้งบริเวณที่มีการติดเชื้อและการสัมผัสกันระหว่างยาปฏิชีวนะกับเชื้อก่อโรคที่นำมาทดสอบ [40] ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว ยาปฏิชีวนะมักถูกนำมาใช้ในการรักษาเมื่อปลาเกิดโรคแล้ว ผลของการศึกษาความไวต่อยาแต่ชนิดที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันและความเข้มข้นที่ถูกกำหนดขึ้นนี้เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของยาแต่ละชนิด จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ายาปฏิชีวนะที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ได้ดีคือ Ceftriaxone (CRO), Norfloxacin (NOR), Ampicillin (AMP), Cloxacillin (OB) และ Methicillin (MET) อย่างไรก็ตาม การใช้ยาปฏิชีวนะเหล่านี้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควรตระหนักถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการดื้อยาของเชื้อที่อาจจะส่งผลต่อผู้บริโภคในอนาคต [41] เนื่องจากผลของการศึกษาในครั้งนี้เป็นผลของการตอบสนองของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ในอนาคตหากใช้ระดับของความเข้มข้นของยาที่เท่ากันเพื่อที่จะสามารถเปรียบเทียบฤทธิ์ของยาและทราบถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมตลอดทั้งสามารถนำไปใช้ต่อไปได้ นอกจากนี้การเลือกใช้ยาปฏิชีวนะควรพิจารณายาที่มีการอนุญาตให้ใช้ในสัตว์น้ำได้และควรมีการขึ้นทะเบียนยาอย่างถูกต้องเสียก่อน และเหตุผลที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือปริมาณยาที่ใช้และวิธีการใช้ร่วมด้วยเพื่อลดการตกค้างของยาในสิ่งแวดล้อมรวมไปถึงการป้องกันการกีดกันทางการค้าเนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นอีกข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีการป้องกันโรคอีกทางหนึ่ง เช่น การให้วัคซีนกับปลาเพื่อใช้ป้องกันการเกิดโรคให้มีประสิทธิภาพสูงสุด [42, 43]



รูปที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดปลาดุกลูกผสม (A) กลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.5% และ (B) กลุ่มของปลาที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* ลูกศรชี้แสดงถึงตำแหน่งของเม็ดเลือดขาว



รูปที่ 2 บริเวณยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion method ได้แก่ (A) Penicillin, (B) Rifamicin, (C) Ceftriaxone, (D) Ampicillin, (E) Norfloxacin, (F) Meticillin, (G) Cephalothin และ (H) Cloxacillin

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อการสร้างองค์ความรู้ใหม่ของอาจารย์/นักวิจัย กองส่งเสริมและบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์ทุนวิจัยส่วนหนึ่ง รวมถึงนายภูมิพัฒน์ สุวรรณมูล นายพัฒนพงษ์ แก้ววังชัย และ Ms. Yukari Tomokuni ผู้ช่วยวิจัยในการเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดปลา

เอกสารอ้างอิง

1. Na-Nakorn, U. 1994. Pla Duk: Breeding and Farming. Bangkok: Reo See Keaw Printing p. 132. (in Thai)
2. Suanyuk, N., Rogge, M., Thune, R., Watthanaphiromsakul, M., Champhat, N., and Wiangkum, W. 2014. Mortality and Pathology of Hybrid Catfish, *Clarias macrocephalus* (Gunther) X *Clarias gariepinus* (Burchell), Associated with *Edwardsiella ictaluri* Infection in Southern Thailand. *Journal of Fish Diseases*. 37: 385-395.
3. Zhang, D., Xu, D. H., and Shoemaker, C. 2016. Experimental Induction of Motile Aeromonas Septicemia in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) by Waterborne Challenge with Virulent *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Reports.* 3: 18-23.
4. GÖtting, M., and Nikinma, M. 2017. *In Vitro* Study on the Regulation of Cellular Mrna Levels by Changes in Transcription Rate and Transcript Stability in Fish Red Blood Cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 213: 35-44.
5. Farrell, A. P. 2011. BLOOD : Cellular Composition of The Blood. Encyclopedia of Fish Physiology p. 984-991.
6. Hirazawa, N., Ishizuka, R., and Hagiwara, H. 2016. The Effects of *Neobenedenia girellae* (Monogenea) Infection on Host Amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae): Hematological and Histopathological Analyses. *Aquaculture.* 461: 32-39.
7. Santos, C. R., Cavalcante, A. L. M., Hauser-Davis, R. A., Lopes, R. M., and Mattos, C. O. C. 2016. Effects of Sub-Lethal and Chronic Lead Concentrations on Blood and Liver ALA-D Activity and Hematological Parameters in Nile Tilapia. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 129: 250-256.
8. Chen, C. Y., Woodter, G. A., Getshell, R. G., Bowser, P. R., and Timmon, M.B. 2003. Blood Chemistry Of Healthy, Nephrocalcinosis-Affected And Ozone-Treated Tilapia in a Recirculation System, With Application of Discriminant Analysis. *Aquaculture*. 218(1-4): 89-102.
9. Clauss, T. M., Dove, A. D. M., and Arnold, J. E. 2008. Hematologic Disorders of Fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice.* 11(3): 445-462.
10. Sebastião, F. A., Nomura, D., R. Sakabe, and Pilarski, F. 2011. Hematology and Productive Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Naturally Infected With *Flavobacterium columnare*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42(1): 282-289.
11. Rehulka, J. 2003. Haematological Analyses in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Affected by Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS). *Diseases of Aquatic Organisms*. 56(3): 185-93.

12. Hirayama, T., Hirayama, T., Kawano, F., and Hirazawa, N. 2009. Effect of *Neobenedenia girellae* (Monogenea) Infection On Host Amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae). *Aquaculture*. 288: 159-165.
13. Wanger, A., Chavez, V., Huang, R. S. P., Wahed, A., and Dasgupta, A. 2017a. Chapter 7: Antibiotics, Antimicrobial Resistance, Antibiotic Susceptibility Testing, and Therapeutic Drug Monitoring for Selected Drugs. *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology.* p. 119-153.
14. Sutili, F. J., Silva, L. L., Gressler, L. T., Battisti, E. K., and Heinzmann, B. M. 2015. Plant Essential Oils Against *Aeromonas hydrophila*: *in Vitro* Activity and Their Use in Experimentally Infected Fish. *Journal of Applied Microbiology*. 119: 47-54.
15. Wangkahart, E., and Rattanasena, P. 2012. Efficacy of Injectable Formalin-Killed *Aeromonas hydrophila* Vaccine in Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*). *Journal of Fisheries Technology Research*. 6(1): 53-64. (in Thai)
16. Campbell, T. W. 1995. Avian Hematology and Cytology. Iowa: Iowa state University press p. 108
17. Macfaddin, J. F. 1980. Biochemical Tests for Identification of Bacteria. Williams and Wilkins, New York.
18. Jorgensen, J. H., and Ferraro, M. J. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Medical microbiology*. 49: 1749-1755.
19. CLSI. 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard," 8th Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne.
20. Singh, N. N., and Srivastava, A. K. 2010. Haematological Parameters as Bioindicators of Insecticide Exposure in Teleosts. *Ecotoxicology.* 19(5): 838-854.
21. Saravanan, M., Prabhu, K., Kumar, K., and Ramesh, M. 2011. Haematological and Biochemical Responses of Freshwater Teleost Fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) During Acute and Chronic Sublethal Exposure to Lindane. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 100: 206-211.
22. Sharma, B. B., Saha, R. K., and Saha, H. 2014. Effects of Feeding Detoxified Rubber Seed Meal on Growth Performance and Haematological Indices of *Labeo rohita* (Hamilton) Fingerlings. *Animal Feed Science and Technology*. 193: 84-92.
23. Kumar, S., Raman, R. P., Pandey, P. K., Mohanty, S., Kumar, A., and Kumar, K. 2013. Effect of Orally Administered Azadirachtin on Non-Specific Immune Parameters of Goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and Resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*. 34(2): 564-573.
24. Grant, K. R. 2015. Fish Hematology and Associated Disorders. *Clinics in Laboratory Medicine.* 35(3): 681-701.

25. Li, L., Dang, Y., Shen, Y., Xu, X., Huang, W., and Li, J. 2016. Hematological and Immunological Plasma Assays for Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Infected with *Aeromonas hydrophila* as an Immune Model in Carp Aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*.55: 647-653.
26. Ginneken, V. B., Ballieux, R., Willemze, K., Coldenhoff, G., and Thillart, V.D. 2005. Hematology Patterns Of Migrating European Eels and the Role of EVEX Virus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology.* 140(1): 97-102.
27. Harvie, E. A., and Huttenlocher, A. 2015. Neutrophils in Host Defense: New Insights from Zebrafish. *Journal of Leukocyte Biology.* 98(4): 523-37.
28. Havixbeck, J. J., Rieger, A. M., Churchill, L. J., and Barreda, D. R. 2017. Neutrophils Exert Protection in Early *Aeromonas veronii* Infections through the Clearance of Both Bacteria ฟnd Dying Macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*. 63: 18-30.
29. Sharp, G. J. E., and Secombes, C. J. 1993. The Role of Reactive Oxygen Species in the Killing of the Bacterial Fish Pathogen *Aeromonas salmonicida* by Rainbow Trout Macrophages. *Fish and Shellfish Immunology.* 3: 119-129.
30. Serhan, C. N., Chiang, N., and Van Dyke, T. E. 2008. Resolving Inflammation: Dual Anti-Inflammatory and Pro-Resolution Lipid Mediators. *Nature Reviews Immunology*. 8(5): 349-361.
31. Havixbeck, J. J., Rieger, A. M., Wong, M. E., Hodgkinson, J. W., and Barreda, D. R. 2015. Neutrophil Contributions to the Induction and Regulation of the Acute Inflammatory Response in Teleost Fish. *Journal of Leukocyte Biology.* 99(2): 241-52.
32. Katzenback, B. A., and Belosevic, M. 2009. Isolation and Functional Characterization of Neutrophil-Like Cells, from Goldfish (*Carassius auratus* L.) Kidney. *Developmental and Comparative Immunology.* 33(4): 601-611.
33. Chi, H., and Sun, L. 2016. Neutrophils of *Scophthalmus maximus* Produce Extracellular Traps That Capture Bacteria and Inhibit Bacterial Infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 56: 7-12.
34. Martins, M. L., Mouriño, J. L. P., Amaral, G. V., Vieira, F. N., Dotta, G., Jatobá, A. M. B., Pedrotti, F. S., JerÔnimo, G. T., Buglione-Neto, C. C., and Pereira-Jr, G. 2008. Haematological Changes in Nile Tilapia Experimentally Infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology*. 68(3): 657-661.
35. Scapigliati, G. 2013. Functional Aspects of Fish Lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology*. 41(2): 200-208.
36. Sha, Z., Wang, L., Sun, L., Chen, Y., and Chen, S. 2017. Isolation and Characterization of Monocyte/Macrophage from Peripheral Blood of Half Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish and Shellfish Immunology*. 65: 256-266.
37. Capita, R., and Alonso-Calleja, C. 2013. Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53(1): 11-48.

38. Grenni, P., Ancona, V., and Caracciolo, A. B. 2018. Ecological Effects of Antibiotics on Natural Ecosystems: A Review. *Microchemical Journal.* 136: 25-39.
39. Wanger, A., Chavez, V., Huang, R. S. P., Wahed, A., Actor, J. K., and Dasgupta, A. 2017b. Chapter 5: Biochemical Tests and Staining Techniques for Microbial Identification. *Book chapter Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology.* p. 61-73.
40. Liao, H. M., Chao, C. C., Lei, H., Li, B., and Lo, S. C. 2017. Intraspecies Comparative Genomics of Three Strains of *Orientia tsutsugamushi* with Different Antibiotic Sensitivity. *Genomics Data*. 12: 84-88.
41. Defoirdt, T., Sorgeloos, P. and Bossier, P. 2011. Alternatives to Antibiotics for the Control of Bacterial Disease in Aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*. 14(3): 251-258.
42. Wangkahart, E. 2013. Application of Vaccine for Preventing Infectious Diseases in Fish. *Srinakharinwirot Science Journal*. 29(2): 275-290. (in Thai)

ได้รับบทความวันที่ 27 มกราคม 2561
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 1 มิถุนายน 2561