นิพนธ์ต้นฉบับ

โรค Trypanosome ในปลาดุกบิ๊กอุยและปลาน้ำจืดบางชนิด

กิจการ ศุภมาตย์[1] จรีพร เรืองศรี[2] รังสัญ รักกมล[3] อภิญญา ส่งประดิษฐ์[4]
สุทธินี ภูวนาถ[5] และ วุฒิพร พรหมขุนทอง[6]

Abstract

Supamattaya, K.[1], Ruangsri, J.[1], Ruggamol, R.[1], Songpradit, A.[1], Bhuvanath, S.[2] and Promkhunthong, W.[1]

Trypanosomiasis in hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) and other freshwater fishes

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1) : 321-332

The infestation of *Trypanosoma* sp. (Kinetoplastida) in the hybrid catfish and some fresh water fish was studied showing such parasitic infestation was specific only in catfish. The virulence as determined by LD_{50} for 5 days was 2.28×10^{10} cell in a fish sample. The parasitic infestation caused hematological changes by the reduction of red as well as white blood cells. The reductions were highly significant as compared to the healthy sample ($p<0.05$) as noted by the red and white blood cell count which dropped from $2.14 \pm 0.48 \times 10^6$ to $1.62 \pm 0.27 \times 10^6$ cells/ml and from $1.45 \pm 3.76 \times 10^5$ to $2.42 \pm 0.78 \times 10^4$ cells/ml blood in the infested samples, respectively. Similar trend was noted for hemoglobin and hematocrit which dropped significantly ($p<0.05$).

---

[1]Aquatic Animal Health Research Center, Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, [2]Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

---

[1]Dr. rer. nat. (Aquatic Animal Disease) รองศาสตราจารย์ [2]วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) [3]วท.ม. (วาริชศาสตร์) [4]วท.ม. (จุลชีววิทยา) นักวิชาการประมง ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ [6]Dr. rer. Nat. (Fish Nutrition) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ [5]Dr. Sc. Hum. (Parasitology) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail : kidchakan.s@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 14 มิถุนายน 2547 รับลงพิมพ์ 25 สิงหาคม 2547

The hemoglobin in healthy fish is 7.075±0.929g/100g, which dropped to 6.268±0.697g/100g in the samples with infestation. The percentage of hematocrit in healthy sample is 25.275±3.318%, which dropped to 21.722±3.068% in the samples with infestation. The reverse trend was recognized for serum protein and leukocrit which increased in the samples with *Trypanosoma* sp. infestation. The density gradient centrifugation technique was employed in the isolation of parasites in which 50% Percoll solution in 0.85% final preparation of saline solution was capable of removing *Trypanosoma* sp. from the blood. The study of antibody levels in serum showed that the infested hybrid catfish could develop the antibody which reached a peak 14 days after the infestation. *Trypanosoma* sp. was unable to cause histological changes in the tissues of gill, liver, kidney, spleen, stomach and intestine. Minor inflammations were observed, even the cases that large number of parasites were found in the tissues, blood streams and sinuses. Marked reductions were recorded for mature red blood cells while there were the formation of immature red blood and phagocytotic cells at higher rates as compared to the healthy individual.

Key words : trypanosome, kinetoplastida, blood parasite, catfish, antibody

บทคัดย่อ

กิจการ ศุภมาตย์ จรีพร เรืองศรี รังสัญ รักกมล อภิญญา ส่งประดิษฐ์ สุทธินี ภูวนาถ และ วุฒิพร พรหมขุนทอง

โรค Trypanosome ในปลาดุกบิ๊กอุยและปลาน้ำจืดบางชนิด

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1) : 321-332

การศึกษาการเกิดโรคติดเชื้อ *Trypanosoma* sp. (Kinetoplastida) ในปลาดุกบิ๊กอุยและปลาน้ำจืดบางชนิด พบว่าเชื้อปรสิตดังกล่าวมีความจำเพาะในการเกิดโรคกับปลาดุกบิ๊กอุยเท่านั้น ความรุนแรงของเชื้อมีค่า LD_{50} ที่เวลา 5 วัน เท่ากับ $2.28x10^{10}$ ตัว/ตัวปลา การติดปรสิตมีผลทำให้องค์ประกอบเลือดเปลี่ยนแปลง ปลาที่ติดปรสิตมีปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวลดลงแตกต่างจากปลาปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวในปลาปกติมีค่า $2.14±0.48x10^6$ และ $1.45±3.76x10^5$ เซลล์/มล. ลดลงเหลือ $1.62±0.27x10^6$ และ $2.42±0.78x10^4$ เซลล์/มล. ในปลาที่พบปรสิต เช่นเดียวกับปริมาณฮีโมโกลบินและปริมาตรเม็ดเลือดแดงในเลือดที่ลดลงอย่างมีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) ปริมาณฮีโมโกลบินในปลาปกติมีค่า 7.075±0.929 กรัม/100 กรัม ลดลงเหลือ 6.268±0.697 กรัม/100 กรัม ในปลาที่พบปรสิต ปริมาตรเม็ดเลือดแดงในเลือดปลาปกติมีค่า 25.275±3.318% ลดลงเหลือ 21.722±3.068% เมื่อปลามีปรสิตเข้าอยู่อาศัย ส่วนปริมาณโปรตีนในซีรัมและปริมาตรเม็ดเลือดขาวในเลือดมีค่าเพิ่มขึ้นในปลาที่พบปรสิต *Trypanosoma* sp. การใช้วิธี density gradient centrifugation เพื่อแยกปรสิต พบว่าสารละลาย Percoll 50% ในสารละลายเกลือเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.85% สามารถแยกปรสิตจากเลือดปลาได้ การศึกษาปริมาณแอนติบอดี้ในซีรัมปลา พบว่าปลาดุกบิ๊กอุยที่มีปรสิตอาศัยอยู่สามารถสร้างแอนติบอดี้ได้เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 14 วันหลังการติดโรค จากการศึกษาพบว่าปรสิต *Trypanosoma* sp. ชนิดนี้ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต ม้าม กระเพาะอาหาร และลำไส้ มากนัก พบการอักเสบเล็กน้อย แต่พบปรสิตจำนวนมากในกระแสเลือดและแอ่งเลือด ปริมาณเม็ดเลือดแดงเต็มวัยลดลงอย่างชัดเจน มีการสร้างเม็ดเลือดแดงวัยอ่อน และเซลล์กำจัดสิ่งแปลกปลอมเพิ่มมากขึ้นกว่าปลาปกติอย่างชัดเจน

ปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) และปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) เคยเป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงกันมากในประเทศไทยและจัดเป็นปลาเศรษฐกิจตัวหนึ่งที่มีการบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศและส่งออกไปยังประเทศเพื่อนบ้านใกล้เคียง เช่น มาเลเซีย อินโดนีเซีย ลาว พม่า และอินเดีย (สรรค์, 2543) แต่ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา

ได้มีการนำเข้าปลาดุกอัฟริกัน (*C. gariepinus*) ซึ่งมีขนาดใหญ่มาผสมกับปลากดุกอุย ได้ปลาลูกผสมที่มีขนาดใหญ่ เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีสีและรสชาติของเนื้อคล้ายปลาดุกอุย (ประสิทธิ์, 2539) ทำให้เป็นที่นิยมเลี้ยงของเกษตรกรเป็นอย่างมาก โดยเรียกปลาดุกลูกผสมนี้ว่า ปลาดุกบิ๊กอุย (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) แม้ว่าปลาดุกบิ๊กอุยเลี้ยงง่ายและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่เนื่องจากพ่อพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่นำมาจากต่างประเทศ (exotic species) จึงอาจก่อให้เกิดปัญหาเรื่องนิเวศวิทยาของการเกิดโรค โดยเชื้อโรคบางชนิดอาจจะเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ของปลาสายพันธุ์พื้นเมือง (local strain) โดยไม่ก่อให้เกิดโรค เนื่องจากปลาท้องถิ่นสามารถต้านทานโรคได้ดี แต่เมื่อมีการนำปลาต่างถิ่นเข้ามาอาจก่อให้เกิดการระบาดของโรคที่รุนแรงได้

ดังเช่นกรณีของการตรวจพบปรสิตในกระแสเลือด (blood parasite) กลุ่ม *Trypanosoma* sp. ในปลาดุกบิ๊กอุย โดยศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ซึ่งไม่เคยมีรายงานว่าปรสิตชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรคในปลาดุกบิ๊กอุย ดุกด้าน ดุกอุย หรือชนิดใกล้เคียงอื่นๆ เช่น ปลากดในประเทศไทยมาก่อน แต่มีรายงานว่าพบปรสิตกลุ่มดังกล่าวในปลาที่มีอยู่ทั่วไปในประเทศไทย เช่น พบ *T. danilewskyi* ในปลาตะเพียน ปลาไน ปลาคาร์พ (*Cypinus* sp.) (ประไพสิริ, 2538) *T. striate* ในปลาช่อน (*Ophiocephalus striatus*) (Qadri, 1955) *T. granulosum* ในปลาตูหนา (*Anguillu vulgaris*) (ประไพสิริ, 2538) เป็นต้น จึงเป็นไปได้ว่าปรสิตที่ตรวจพบในปลาดุกบิ๊กอุยครั้งนี้เป็นปรสิตที่มีอยู่แล้วในปลาชนิดท้องถิ่นของไทย เมื่อนำปลาดุกลูกผสมมาเลี้ยง ปรสิตเข้าอยู่อาศัยเพิ่มจำนวนได้มาก ปลาดุกบิ๊กอุยจึงกลายเจ้าบ้านชนิดที่เหมาะสม ดังนั้นการวิจัยเพื่อศึกษาความรุนแรงของโรค ผลของการเข้าอยู่อาศัยของปรสิตต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดและเนื้อเยื่อวิทยาของปลาดุกบิ๊กอุย ศึกษาวิธีการแยกปรสิตโดยใช้เทคนิค density gradient centrifugation และศึกษาการสร้างภูมิต้านทานของปลาต่อปรสิตดังกล่าวเพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลเบื้องในการเฝ้าระวังควบคุมปรสิตและเป็นข้อมูลพื้นฐานการศึกษาในรายละเอียดต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลองและสภาวะการเลี้ยง

สัตว์ทดลองในที่นี้คือ ปลาดุกพันธุ์ผสมบิ๊กอุย (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ปลากดเหลือง (*Mytus nemurus*) ปลาช่อน (*Channa striatus*) และปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) โดยปลาแต่ละชนิดซื้อจากฟาร์มเลี้ยงและคัดเลือกให้มีขนาดใกล้เคียงกัน ประมาณตัวละ 100-130 กรัม นำมาเลี้ยงในกระชังของบ่อปลาภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ เพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 7 วัน ก่อนเริ่มการทดลอง โดยให้อาหารเม็ดลอยน้ำวันละ 2 มื้อ

ปรสิต

นำปลาที่เป็นโรคจากปรสิต *Trypanosoma* sp. มาเจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดโคนหาง (caudal vein) และนับจำนวนปรสิตในเลือดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer) ปรับปริมาณปรสิตให้ได้ $1x10^7$ ตัว/มล. แล้วนำไปฉีดเข้าตัวปลาดุกบิ๊กอุยปกติตัวละ 0.1 มล. เพื่อเก็บเป็นแหล่งของปรสิต และทำการถ่ายปรสิตไว้เป็นระยะๆ จนกระทั่งมีการใช้งานในการทดลองต่อไป

การศึกษาการยอมรับเชื้อในปลาดุกบิ๊กอุยและปลาอื่น ๆ

การทดสอบการยอมรับเชื้อปรสิตในปลาดุกบิ๊กอุย ทำได้โดยเตรียมตัวอย่างปรสิตให้ได้ความเข้มข้นสูงในตัวปลา และนำมาฉีดเข้าช่องท้องของปลาดุกบิ๊กอุย โดยกำหนดให้ปลาแต่ละตัวได้รับปรสิตตัวละ 10^6 ตัว ทำการฉีดปรสิตในปลาดุกบิ๊กอุย จำนวน 10 ตัว ส่วนชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ ทำการเจาะเลือดปลาเพื่อตรวจนับจำนวนปรสิตทุกวันเพื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณของปรสิตในปลาชนิดนี้ ดำเนินการเช่นเดียวกับปลาชนิดอื่นคือ ปลาดุกอุย ปลากดเหลือง ปลาช่อน และปลาหมอไทย

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อในปลาดุกบิ๊กอุย

การทดสอบความรุนแรงของปรสิตในปลาดุกบิ๊กอุย ทำได้โดยเตรียมตัวอย่างปรสิตให้ได้ความเข้มข้นสูง 10^8

10^9 และ 10^{10} ตัว/มล. ตามลำดับ แล้วนำมาฉีดเข้าช่องท้องปลาดุกบิ๊กอุย โดยกำหนดให้ปลาแต่ละตัวได้รับปรสิตตัวละ $2x10^7$ ตัว $2x10^8$ ตัว และ $2x10^9$ ตัว ทำการฉีดปรสิตแต่ละความเข้มข้นในปลาดุกบิ๊กอุย ชุดละ 10 ตัว และชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ บันทึกอัตราการตายในแต่ละวัน และนำมาคำนวณหาค่า LD_{50} ตามวิธีการของ Reed และ Muench (1938)

การศึกษาผลของการติดโรคต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือด

แบ่งปลาดุกบิ๊กอุยออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว กลุ่มทดลองทำการฉีดปรสิตเข้าในปลาตัวละจำนวน $1x10^7$ ตัว ในกลุ่มควบคุมทำด้วยน้ำเกลือ หลังจากฉีดปรสิตเป็นเวลา 7 วัน ทำการเจาะเลือดเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ คือ จำนวนเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ปริมาณโปรตีนในซีรัม ค่าฮีโมโกลบิน ปริมาตรเม็ดเลือดแดงในเลือด (haematocrit) และปริมาตรเม็ดเลือดขาวในเลือด (leukocrit) ตามวิธีการที่รายงานใน Wedemeyer และ Yasutake (1977)

การศึกษาผลของการติดเชื้อต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อวิทยา

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (pathological changes) ของปลาที่ได้รับปรสิตโดยนำปลาที่เป็นโรครุนแรงมาเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก อวัยวะภายในคือ ตับ ไต ม้าม และสมอง ดองในน้ำยา Bouin's fixative เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (automatic tissue processor, Technicon) นำมาตัดให้มีความบาง 2-3 ไมครอน และย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซัยลินและอีโอซิน (H&E) (Humason, 1997) แล้วนำมาตรวจสอบผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การแยกปรสิตจากเลือดปลาโดยใช้เทคนิค density gradient centrifugation

จุดประสงค์ของการแยกปรสิตโดยใช้เทคนิคดังกล่าว เพื่อให้ได้ตัวปรสิตที่ไม่มีเม็ดเลือดปลาปะปน แล้วนำปรสิตดังกล่าวมาเตรียมเป็นแอนติเจนในการฉีดเข้าสู่ปลาสำหรับศึกษาการสร้างแอนติบอดี้ หรือนำมาเตรียมเป็นแอนติเจนในการใช้ตรวจหาแอนติบอดี้โดยเทคนิค passive haemagglutination การแยกปรสิตสามารถทำได้โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากกิจการ และคณะ (2543) โดยเตรียมสารละลาย Percoll ให้ได้ความเข้มข้น 50 55 60 และ 70% ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.85% นำไปปั่นที่แรงเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ fixed angle rotor (F1010, Avanti™ 30 Centrifuge, Beckman) และนำเลือดที่เจาะจากปลา ผสมกับสารละลายอีดีทีเอ 1% (ethylene-dinitrilo tetraacetic acid disodium salt dehydrate; EDTA) เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว โดยใช้เลือด 1 ส่วน และสารละลายอีดีทีเอ 1 ส่วน แล้วนำมาหยอดลงบนสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้น และนำไปปั่นแยกปรสิตโดยใช้แรงเหวี่ยง 3,000 รอบ/นาที (966xg) ที่ 4°C นาน 10 นาที โดยใช้ swing out rotor (S0410, Avanti™ 30 Centrifuge, Beckman) เมื่อเม็ดเลือดปลาแยกชั้นจากปรสิตใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดปรสิตออกมาใส่หลอดใหม่แล้วปั่นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ (PBS, pH 7.2) (ในกรณีที่ยังมีเม็ดเลือดปะปนกับปรสิตจะแยกซ้ำด้วยวิธีการเดียวกัน 1-2 ครั้ง) ก่อนเก็บปรสิตในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ในตู้แช่เย็น -70°C เพื่อนำไปใช้งานต่อไป

การตรวจหาแอนติบอดี้ของปลาต่อปรสิตโดยใช้วิธี Passive Haemagglutination

เตรียมแอนติเจน (antigen) สำหรับเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะ (SRbc) โดยนำปรสิตที่แยกเก็บไว้ที่ -70°C ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์มาวางให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำให้ปรสิตแตกโดยใช้เครื่องสั่นความถี่สูง (Vibra Cell™, Sonics & Meterials Inc. Danbury, Coniticut U.S.A.) ที่กำลัง 200 วัตต์ นาน 2 นาที แล้วนำไปปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 20,000 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมง แล้วแยกส่วนใสเก็บไว้เพื่อเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะ

การเคลือบแอนติเจน โดยอาศัยหลักการเคลือบ Hbs-Ag (Hepatitis B surface antigen) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Vyas และ Shulman (1970) และบริษัท Green Cross Corporation (1982) โดยนำเม็ดเลือดแดงแกะที่เก็บไว้ในสารละลาย Alsever's ที่ 4°C มาปั่นล้าง

ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 3 ครั้ง โดยใช้แรงเหวี่ยง 2,500 รอบ/นาที นานครั้งละ 5 นาที และนำเม็ดเลือดแดงแกะมา 0.1 มล. ผสมกับแอนติเจนที่เตรียมไว้ข้างต้น 1.25 มล. หลังจากนั้นจึงเติมกลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) 0.25% ที่เตรียมในสารละลายนอร์มอลซาลีน (0.85% NaCl) 0.25 มล. ส่วนผสมที่ได้นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง นำเซลล์เม็ดเลือดที่เคลือบด้วยแอนติเจนแล้วมาปั่นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 3 ครั้ง แล้วนำมาเตรียมเป็น 0.5% แอนติเจน (0.5% cell suspension ด้วยสารละลาย BSA 0.5% ที่เตรียมในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่มี NaN_3 อยู่ 0.1%)

นำแอนติเจนที่เตรียมไว้ไปตรวจหาแอนติบอดี้ของปลาที่มีปรสิตอาศัยอยู่ โดยเจาะเลือดจากตัวอย่างปลาแล้วนำมาแยกซีรัม แล้วเจือจางซีรัมที่ได้ด้วยสารละลายนอร์มอลซาลีนเป็น 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 และ 1:64 ไปเรื่อยๆ ใน 96 micro well plate ที่มีพื้นหลุมเป็นรูปตัวยู (U-shaped) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงแกะที่เตรียมไว้ข้างต้นในอัตราส่วน 1:1 ตรวจปฏิกิริยาการจับกลุ่มภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และบันทึกค่าไตเตอร์ที่ได้ในปลาแต่ละตัว

ผลการทดลอง

การแยกชนิดปรสิต

ในการศึกษาครั้งนี้ ปรสิตที่ตรวจพบในปลาดุกบิ๊กอุยที่ขายอยู่ในท้องตลาด ซึ่งมีแหล่งเลี้ยงจากจังหวัดพัทลุงเป็นปรสิตที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Trypanosoma* sp. (Kinetoplastida) พบได้ในกระแสเลือดของปลาที่มีอาการของโรคคืออ่อนแอ ตัวผอม สีซีด กินอาหารน้อยลง แสดงอาการขาดออกซิเจน บางครั้งปรสิตจะไปอุดตันบริเวณเส้นเลือดฝอย ทำให้เห็นเป็นตุ่มพองบริเวณครีบและผิวหนัง ลักษณะของปรสิตจากการศึกษาโดยวิธีเกลี่ยบนสไลด์แก้วและย้อมด้วยสีจิมซ่า (Giemsa's stained) พบว่าปรสิตมีลักษณะหัวท้ายเรียว มีความยาว 23-24 ไมครอน ความกว้างปรสิตรวมอวัยวะที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (undulating membrane) 1 2-2.3 ไมครอน บริเวณปลายส่วนหัวมี kinetoplast 1 อัน บริเวณส่วนกลางตัวมีนิวเคลียส 1 อัน และมีแฟลกเจลลาคล้ายส่วนหาง (tail-like) 1 อัน ยาว 17-18 ไมครอน (Figure 1 and 2)

ผลการยอมรับปรสิตในปลาดุกบิ๊กอุยและปลาอื่น ๆ

ศึกษาการยอมรับปรสิตในปลาดุกบิ๊กอุยโดยการฉีด

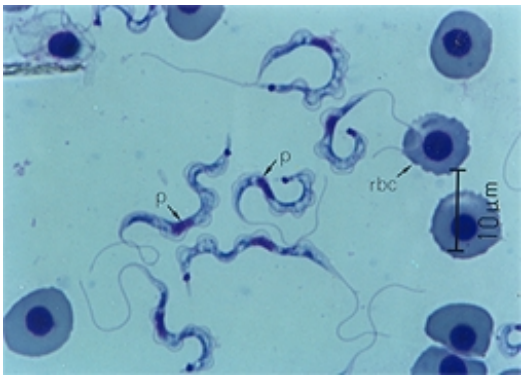

Figure 1. Blood smear of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) showed *Trypanosoma* sp. (Kinetoplastida) (p = parasites; rbc = red blood cell)(Giemsa's stained; bar = 10 µm).

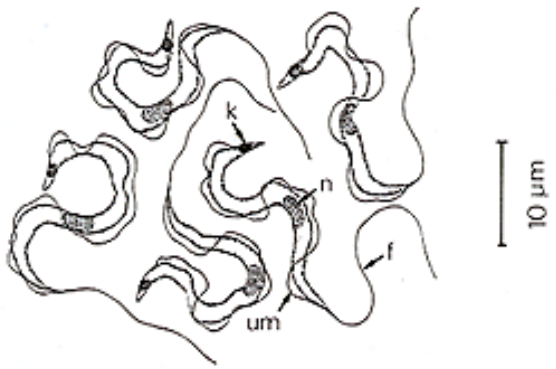

Figure 2. Diagrammatic featured of *Trypanosoma* sp. (Kinetoplastida) in hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) (f = flagella; K = kinetoplast; n = nucleus; um = undulating membrane; bar = 10 µm).

ปรสิตที่แยกไว้จากปลาที่เป็นโรคเข้าปลาดุกทดลองปกติ ตัวละ 10^6 ตัว พบว่าปริมาณปรสิตชนิดดังกล่าวเริ่มเพิ่มจำนวนขึ้นในวันที่ 2 หลังจากฉีดเชื้อ โดยปลาแต่ละตัวมีปรสิตเพิ่มขึ้นในปริมาณที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ปริมาณปรสิตในตัวปลาส่วนใหญ่เพิ่มสูงสุดหลังทำการฉีดปรสิต 5 วัน แล้วลดลงหลังจากนั้น (Table 1, Figure 3)

ส่วนการทดลองการยอมรับเชื้อในปลาชนิดอื่นๆ อีก 4 ชนิดคือ ปลาดุกอุย ปลากดเหลือง ปลาช่อน และปลาหมอ พบว่า ปลาดุกอุย ปลากดเหลือง และปลาช่อนไม่ยอมรับปรสิต *Trypanosoma* sp. ที่แยกได้จากปลาดุกบิ๊กอุย ส่วนการทดลองในปลาหมอไทยพบว่าในช่วงเวลา 3-4 วันหลังการติดเชื้อ สามารถตรวจพบปรสิตในเลือด แต่ปลาหมอไทยสามารถกำจัดปรสิตดังกล่าวได้หมดภายใน 7 วัน (Table 2)

ผลความรุนแรงของปรสิตในปลาดุกบิ๊กอุย

หลังทำการฉีดปรสิตที่รู้จำนวนเข้าปลาดุกปกติขนาดเฉลี่ย 125 กรัม และทำการบันทึกอัตราการตายตามระยะเวลาที่กำหนดแล้วคำนวณหาค่า LD_{50} โดยวิธีการของ Reed และ Muench (1938) พบว่าปริมาณปรสิตที่สามารถทำให้ปลาดุกทดลองตาย 50% เมื่อได้รับปรสิตนาน 5 วันมีค่าเท่ากับ 2.68×10^{10} ตัว/ตัวปลา

Table 1. Number of parasites in hybrid catfish during 7 days period of injection.

Samples	Time after infestation (day)						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0	2.0×10^2	6.0×10^2	2.0×10^2	0	0	0
2	2.0×10^2	3.7×10^3	3.7×10^3	2.8×10^4	5.48×10^4	1.1×10^4	3.4×10^4
3	0	1.2×10^3	0	0	2.2×10^3	6.0×10^2	-
4	0	2.0×10^3	1.8×10^3	1.6×10^3	5.0×10^3	8.0×10^2	-
5	2.0×10^2	4.0×10^2	1.0×10^3	1.6×10^3	7.4×10^3	2.4×10^3	-
6	0	8.0×10^2	3.2×10^3	6.4×10^3	6.4×10^3	1.6×10^3	-
7	0	4.0×10^2	1.3×10^3	4.2×10^3	5.6×10^3	1.6×10^3	-
8	0	1.0×10^3	7.8×10^3	5.2×10^4	6.5×10^4	5.1×10^4	-

N.B. - number not determined

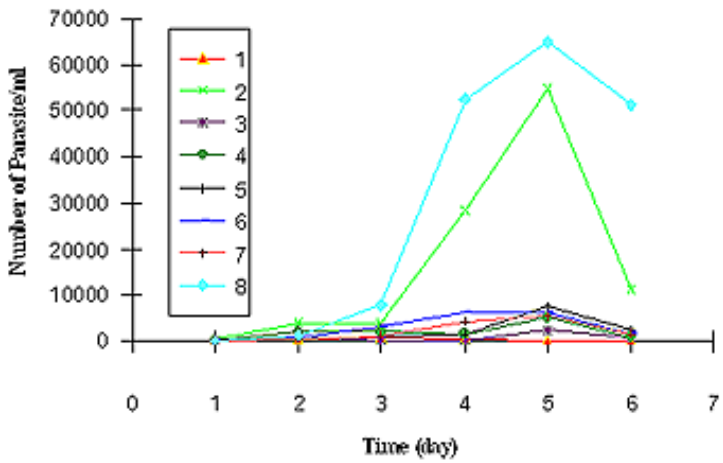

Figure 3. Variation in the number of *Trypanosoma* sp. in hybrid catfish blood samples were collected over a 6 days period of injection.

Table 2. Susceptibility of freshwater fishes within 7 day period of *Trypanosoma* sp. infection.

Fish species	No. of test fish	No. of *Trypanosoma* sp. infected fish
Clarias macrocephalus	15	0
Mytus nemurus	15	0
Channa striatus	10	0
Anabas testudineus	10	4*

*** *Trypanosoma* sp. was observed within 3-4 day post injection and non-detectable within 7 day period of injection.**

ผลของการติดเชื้อปรสิตต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือด

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของปลาดุกบิ๊กอุยที่ติดเชื้อปรสิตต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือด พบว่าเมื่อปลาดุกได้รับปรสิตจะส่งผลให้องค์ประกอบเลือดหลายๆ ประการเปลี่ยนแปลง โดยปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวลดลงอย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) ในขณะที่ปริมาณฮีโมโกลบินและปริมาตรเม็ดเลือดแดงในเลือดก็ลดลงอย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) ส่วนปริมาณโปรตีนในซีรัม และปริมาตรเม็ดเลือดขาวในเลือดมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังรายละเอียดที่แสดงใน Table 3

ผลการแยกปรสิตจากเลือดปลาโดยใช้เทคนิค density gradient centrifugation

ผลการทดลองแยกปรสิตในเลือดปลาโดยเตรียมสารละลาย Percoll ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีความเข้มข้นของเกลือสุดท้ายเท่ากับ 0.85% แล้วนำมาปั่นแยกปรสิต พบว่าความเข้มข้นของ Percoll 50% สามารถแยกปรสิตออกจากเลือดได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่นๆ และเมื่อนำปรสิตที่แยกได้จากความเข้มดังกล่าวครั้งแรกมาแยกซ้ำในความเข้มข้นเดิมอีกครั้งพบสามารถแยกปรสิตได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ (Table 4)

ผลการตรวจหาแอนติบอดี้ของปลาต่อเชื้อปรสิตโดยวิธี Passive Haemagglutination

จากการตรวจหาแอนติบอดี้ของปลาดุกบิ๊กอุยที่ไม่พบปรสิตในห้องปฏิบัติการ พบว่าปลาทดลองดังกล่าวมีแอนติบอดี้อยู่เฉลี่ย 182.86 เมื่อทำให้ปลาได้รับปรสิต *Trypanosoma* sp. ในห้องปฏิบัติการแล้วเจาะเลือดตรวจหาแอนติบอดี้ พบว่าปลาที่ได้รับปรสิตสามารถสร้างแอนติบอดี้ได้เพิ่มขึ้น โดยที่เวลา 7 วัน ปริมาณแอนติบอดี้มีค่า 342.86 ที่ 14 วันหลังติดเชื้อปลามีค่าแอนติบอดี้สูงสุดเฉลี่ย

Table 3. Blood parameters of *Trypanosoma* sp. infected hybrid catfish.

Blood parameters	Control	Treatment
RBC ($x10^6$cell/mm^3)	2.14 ± 0.48^a	1.62 ± 0.27^b
WBC ($x10^4$cell/mm^3)	10.45 ± 3.76^a	2.42 ± 0.78^b
Serum protein (g%)	7.52 ± 0.70^a	8.34 ± 0.78^b
Hemoglobin (g%)	7.075 ± 0.929^a	6.268 ± 0.697^b
Hematocrit (%)	25.275 ± 3.318^a	21.722 ± 3.068^b
Leukocrit (%)	1.622 ± 0.522^a	8.44 ± 2.472^b

Means±SD in the same row with sharing the common superscript are not statistically different ($p>0.05$), n = 10

Table 4. The separating of *Trypanosoma* sp. from hybrid catfish's blood sample using Percoll solution.

Percoll preparation	Separating results		
	Band 1	Band 2	Band 3
1. 50% Percoll solution in 0.85% NaCl and centrifuged at 10000 rpm for 30 min. at 4ºC	WBC	Large strip of parasites	RBC
2. 55% Percoll solution and in 0.85% NaCl centrifuged at 10000 rpm for 30 min. at 4ºC	WBC and Parasites	Small strip of parasites	RBC
3. 60% Percoll solution in 0.85% NaCl and centrifuged at 10000 rpm for 30 min.at 4ºC	Blood cell and parasites were not separated		
4. 70% Percoll solution in 0.85% NaCl and centrifuged at 10000 rpm for 30 min. at 4ºC	Blood cell and parasites were not separated		

560 และมีค่าลดลงเมื่อเวลา 28 วัน โดยมีค่าเฉลี่ย 434.29 (Figure 4)

การศึกษาผลของปรสิตต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อวิทยา

การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาที่ติดเชื้อปรสิตอย่างรุนแรง พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในระบบหมุนเวียนเลือด คือเม็ดเลือดแดงระยะเต็มวัยถูกทำลาย และมีการสร้างเม็ดเลือดแดงระยะวัยอ่อน รวมทั้งเซลล์กำจัดสิ่งแปลกปลอมขึ้นมาแทนที่ปะปนกับปรสิตอยู่ในระบบหมุนเวียน (Figure 5 and 6) ขณะที่เนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต ม้าม กระเพาะอาหาร ลำไส้ และสมองไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน แต่พบการอักเสบบ้างเล็กน้อย

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบว่าปรสิตที่แยกได้เป็นปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคในปลาดุกบิ๊กอุยเท่านั้น เมื่อพิจารณาจากลักษณะ ขนาดและรูปร่างแล้ว ปรสิตดังกล่าวน่าจะจัดให้อยู่ในสกุล *Trypanosoma* sp. (Kinetoplastida)

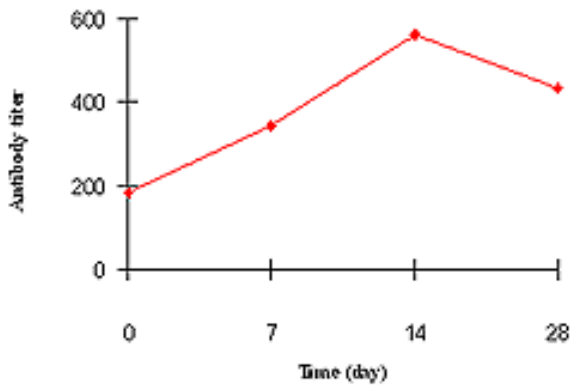

Figure 4. Antibody development in serum of *Trypanosoma* sp. infected hybrid catfish during 28 days period of infestation.

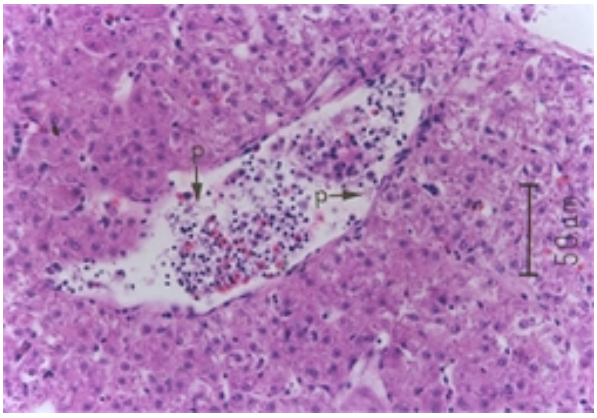

Figure 5. Liver of hybrid catfish infected with *Trypanosoma* sp., demonstrated numerous of parasites in the central vein (p) (H & E stained; bar = 50 µm).

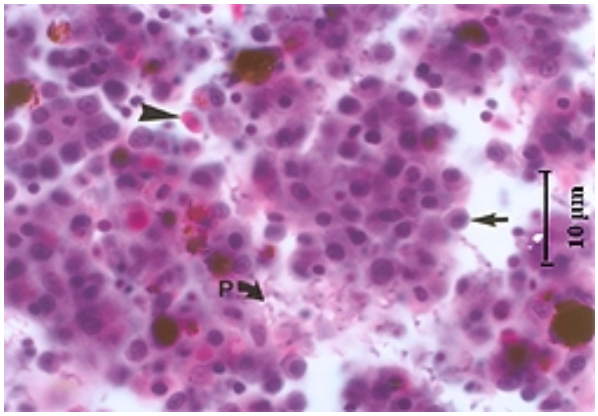

Figure 6. Magnified view of the hepatic vein with numerous of erythroblast (arrow) distributed among the parasites (p) and RBCs (arrow head) (H&E stained; bar = 10 µm).

ซึ่งไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับโรคที่เกิดจากปรสิตชนิดนี้ในปลาดุกบิ๊กอุยมาก่อน ลักษณะทั่วไปของปรสิตเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปรสิตที่มีรายงานการแพร่ระบาดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ชนิดอื่นๆ เช่น *Trypanosoma ophiocephali* ในปลาช่อน *T. trichogasterae* ในปลากระดี่ และ *T. carassi* ในปลาทอง (Kabata, 1985; Lom and Dykova, 1992) พบว่ามีลักษณะและขนาดแตกต่างกันมาก ซึ่งคาดว่าปรสิตที่พบในครั้งนี้อาจเป็นชนิดใหม่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในรายละเอียดทางชีววิทยา โครงสร้างทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของปรสิต รายละเอียดทางชีวเคมี โครงสร้างของสารพันธุกรรม วงจรชีวิต รวมทั้งชนิดของพาหะที่ทำให้ปรสิตแพร่กระจายในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามในครั้งนี้เมื่อได้ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของปรสิตต่อเจ้าบ้าน ทำให้ทราบชัดเจนว่า *Tsypanosoma* sp. ที่แยกได้มีความจำเพาะเจาะจงกับปลาดุกบิ๊กอุยเท่านั้น เนื่องจากปรสิตสามารถเพิ่มปริมาณในตัวปลาได้มากขึ้นจนก่อให้ปลาแสดงอาการของโรคชัดเจนและตายได้เมื่อปรสิตมีจำนวนมากๆ ในขณะที่การทดลองทำให้เกิดโรคในปลาท้องถิ่นคือ ปลาดุกอุย ปลากดเหลือง ปลาช่อน ตรวจไม่พบปรสิตในเลือดและไม่ก่อให้เกิดอาการของโรค แม้ว่าการทดลองติดเชื้อในปลาหมอไทยจะสามารถตรวจพบปรสิตได้ในช่วงแรกๆ แต่เมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้นก็ตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าว ปลากินอาหารได้ปกติ ไม่แสดงอาการของโรคและไม่ตาย จึงอาจเป็นไปได้ว่าปรสิตชนิดนี้เป็นเชื้อประจำถิ่นที่มีอยู่แล้วในปลาน้ำจืดบางชนิดในธรรมชาติใกล้บริเวณที่เลี้ยงปลาดุกบิ๊กอุยที่ทำการศึกษา เนื่องจากเคยมีรายงานพบปรสิตกลุ่มเดียวกันมาก่อนในปลาตูหนา ปลาตะเพียน ปลาช่อน (ประไพสิริ, 2538; Qadri,1955) แสดงให้เห็นว่าปรสิตดังกล่าวก่อให้เกิดโรคในปลาดุกลูกผสมที่อาจอ่อนแอกว่าปลาในสายพันธุ์ท้องถิ่นในธรรมชาติ เช่น ปลาดุกอุย หรือดุกด้าน ที่ไม่เคยมีรายงานพบเชื้อดังกล่าวมาก่อน รวมทั้งการทดลองนี้พบปรสิตเดียวกันไม่ก่อให้เกิดโรคในปลาดุกด้าน ดังนั้นการวิจัยเพื่อตรวจสอบปรสิตกลุ่มนี้ในปลาธรรมชาติใกล้เคียงบริเวณเลี้ยงปลาดุกบิ๊กอุยที่ทำการเก็บตัวอย่างศึกษา จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการหาแนวทางป้องกันการเกิดโรคในปลาดุกบิ๊กอุยได้ในอนาคต รวมทั้งสามารถพิสูจน์สมมุติฐานว่าเชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อประจำถิ่นของปลาในธรรมชาติหรือไม่ต่อไป

การศึกษาความรุนแรงของเชื้อแม้ว่าปริมาณปรสิตที่ส่งผลให้เกิดการตายของปลาดุก 50% มีค่าค่อนข้างสูง (2.68×10^{10} ตัว/มล.) ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าเชื้อปรสิตไม่ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงนักเมื่อเทียบกับชนิดที่ทำให้เกิดโรคในปลาทอง เพราะเมื่อปลาทองได้รับปรสิต *T. denilewskyi*

$2x10^5$ ตัว ปลาทองมีอัตราการตายถึง 68.8% (Wang and Belosevic, 1994) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่าปลาดุกใกล้ตายซึ่งปรสิตมีการเพิ่มจำนวนมากในกระแสเลือด แสดงอาการอ่อนแอ ตัวผอมซีด กินอาหารน้อยลง แสดงอาการขาดออกซิเจนโดยการลอยขึ้นมาผิวน้ำและแผ่นปิดเหงือกมีการปิดเปิดเร็วกว่าปลาปกติ ซึ่งอาการดังกล่าวเป็นไปได้ว่าปรสิตที่มีจำนวนมากเข้าทำลายเม็ดเลือดแดง สอดคล้องกับปริมาตรเม็ดเลือดแดงในเลือดที่ลดลงในปลากลุ่มที่มีปรสิตเข้าอยู่อาศัยจนทำให้การลำเลียงออกซิเจนไปเลี้ยงร่างกายไม่พอ นอกจากนี้การทดลองพบปลาบางตัวเป็นตุ่มพองบริเวณครีบและผิวหนังเนื่องจากปรสิตจะไปอุดตันบริเวณเส้นเลือดฝอย จากลักษณะอาการที่เกิดดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับรายงานของ Lom และ Dykova (1992) ที่ว่าอาการทั่วไปของปลาที่เป็นโรคจากปรสิตในกลุ่ม Trypanosome คือ ปลามีเหงือกซีด ว่ายน้ำเสียการทรงตัว หรือพยายามลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำเนื่องจากปริมาณออกซิเจนในเลือดต่ำ นอกจากนั้นยังพบว่าปรสิตมีผลทำให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือดฝอย ดังนั้นปลาอาจตายได้เนื่องจากเส้นเลือดอุดตันและเกิดโรคโลหิตจาง ซึ่งสนับสนุนผลการศึกษานี้ที่พบองค์ประกอบเลือดปลาหลายประการมีการเปลี่ยนแปลงอย่างแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งบ่งชี้ว่าผลของเชื้อโรคดังกล่าวทำให้ปลามีอาการโลหิตจางดูได้จากปริมาณเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และปริมาตรเม็ดเลือดแดงในเลือดมีค่าลดลงแตกต่างจากปลาปกติอย่างชัดเจน ส่วนองค์-ประกอบเลือดอื่นๆ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดขาวในปลาที่ติดเชื้อลดลงอย่างชัดเจน ซึ่ง Ellis (1978) กล่าวไว้ว่าเม็ดเลือดขาวในปลามีบทบาทในการควบคุมกระบวนการภูมิคุ้มกัน ถ้าปริมาณเม็ดเลือดขาวลดลงจะทำให้ภูมิต้านทานโรคลดลงด้วยเช่นกัน ซึ่งในกรณีการติดปรสิตชนิดนี้ปริมาณเม็ดเลือดขาวลดลงจึงเป็นโอกาสให้ปลาเกิดโรคแทรกอื่นๆ เช่น แบคทีเรียได้ง่ายขึ้น ส่วนปริมาณโปรตีนในซีรัมที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าปลาปกติ บ่งชี้ถึงสภาวะของปลาที่เกิดความเครียด เพราะปลาที่เกิดความเครียดจากสาเหตุใดก็ตามสามารถตรวจสอบได้จากปริมาณโปรตีนในซีรัมที่สูงขึ้น นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่าปลาป่วยมีปริมาตรเม็ดเลือดขาวในเลือดสูงกว่าปลาปกติอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าปลาป่วยอาจจะมีเซลล์มาโครฟาจก์ที่ใหญ่ผิดปกติ หรือมีการบวมพองจึงทำให้มีปริมาตรเม็ดเลือดขาวในเลือดสูงได้ แม้ว่าปริมาณเม็ดเลือดขาวจะลดลงก็ตาม ซึ่งเยาวนิตย์ และคณะ (2540) รายงานว่าลักษณะเซลล์มาโครฟาจก์ที่บวมพองผิดปกติสามารถตรวจพบได้จากปลากะพงที่ติดเชื้อไวรัสแต่ตรวจไม่พบในปลาปกติ ดังนั้นลักษณะของเซลล์มาโครฟาจก์ที่ผิดปกติ หรือปริมาตรเม็ดเลือดขาวในเลือดสูงก็น่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้อาการป่วยของปลาได้

ส่วนการศึกษาเทคนิคการแยกปรสิตด้วยวิธี density gradient centrifugation ในครั้งนี้พบว่า Percoll 50% ในสารละลายเกลือเข้มข้นสุดท้าย 0.85% สามารถแยกปรสิตให้ออกจากเม็ดเลือดได้ โดยเฉพาะถ้าทำการแยกซ้ำ 2-3 ครั้ง สามารถแยกปรสิตออกจากเม็ดเลือดได้สมบูรณ์ เช่นเดียวกับการศึกษาของกิจการ และคณะ (2543) ที่พบว่าสารละลาย Percoll สามารถใช้แยกเม็ดเลือดกุ้งแต่ละชนิดออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ Percoll เกลือและแรงเหวี่ยงที่ใช้ต้องปรับให้มีความเหมาะสมกับตัวอย่างแต่ละชนิดที่ทำการแยก ซึ่งวิธีดังกล่าวน่าจะเป็นประโยชน์ในการแยกเซลล์เม็ดเลือดหรือปรสิตออกจากส่วนผสมให้บริสุทธิ์เพื่อการศึกษาในรายละเอียดต่างๆ เช่น การศึกษาโครงสร้างทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน หรือชีวโมเลกุลต่อไป

การศึกษาแอนติบอดี้ของปลาดุกที่ติดเชื้อเปรียบเทียบกับปลาดุกปกติ ในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าปลาดุกบิ๊กอุยสามารถผลิตแอนติบอดี้ได้เมื่อมีปรสิตในร่างกายปริมาณไม่สูงนัก และปริมาณแอนติบอดี้จะสูงที่สุดที่ระยะเวลาประมาณ 14 วัน หลังจากได้รับปรสิต แล้วจะลดลงหลังจากนั้น ซึ่งผลดังกล่าวนี้ก็สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบการใช้วัคซีนหรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแก่ปลาเพื่อเพิ่มภูมิต้านทานโรคได้ ส่วนการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาที่เป็นโรคปรสิต พบว่าเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต ม้าม กระเพาะอาหาร ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนนัก แต่อาจพบลักษณะการอักเสบเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dykova และ Lom (1978) (อ้างโดย Lom and Dykova, 1992) แสดงให้เห็นว่าอวัยวะต่างๆ ดังกล่าวไม่ใช้อวัยวะเป้าหมายของเชื้อชนิดนี้ แตกต่างจากการเปลี่ยนแปลงในกระแสเลือดที่พบปริมาณเม็ดเลือดแดงอยู่น้อยมาก ซึ่งอาจเป็นเพราะปรสิตสร้างสารฮีโมไลซิน

(hemolysin) ที่มีผลสลายเม็ดเลือดแดงจึงทำให้เจ้าบ้านพยายามสร้างเม็ดเลือดแดงวัยอ่อน รวมทั้งเซลล์กำจัดสิ่งแปลกปลอมเข้ามาในระบบหมุนเวียนเลือดทดแทนส่วนที่ถูกทำลายไป ซึ่งพบลักษณะเซลล์ดังกล่าวมากขึ้นเมื่อเทียบกับปลาปกติ

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบแน่ชัดแล้วว่าปรสิตดังกล่าวก่อให้เกิดโรคในปลาดุกบิ๊กอุยที่เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจในประเทศไทย และเป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่าปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคและอาศัยอยู่ภายในตัวปลานั้น การใช้ยาหรือสารเคมีในการรักษามีประสิทธิภาพน้อยมาก ดังนั้นแนวทางการป้องกันรักษาสามารถทำได้โดยการแยกปลาตัวที่เป็นโรคออกไปทำลายด้วยวิธีการเผาหรือฝัง และควรมีการทำลายตัวนำเชื้อ (vector) ซึ่งมีรายงานว่าพาหะส่วนใหญ่ของปรสิตกลุ่มนี้คือ ปลิง (Martin and Desser, 1991; Jones and Woo, 1992) จะดูดเลือดจากเจ้าบ้านที่มีปรสิตอยู่แล้วนำปรสิตไปสู่ปลาอีกตัวหนึ่งในการดูดเลือดครั้งต่อไป โดยที่ปรสิตสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบย่อยอาหารของพาหะได้เป็นอย่างดี การกำจัดพาหะอาจใช้วิธีทางกายภาพคือ ก่อนเลี้ยงปลาควรตากบ่อฆ่าเชื้อ กรองน้ำก่อนนำเข้าบ่อ ส่วนการใช้สารเคมีเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ให้ผลดี โดยสารเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ เกลือแกง (sodium chloride) จุนสี (copper sulphate) ไดล็อค (dylox) ฟอร์มาลิน ด่างทับทิม ดิพเตอร์เร็กซ์ มาลาไคท์กรีน (กรรณิการ์, 2538; สรรค์, 2543; Kabata, 1985) อย่างไรก็ตามผู้วิจัยจะทำการศึกษาถึงรายละเอียดของตัวปรสิตรวมทั้งวิธีการควบคุมที่มีประสิทธิภาพต่อไป เช่น การประยุกต์ใช้วัคซีนหรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มต่างๆ ซึ่งจะรายงานให้ทราบต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์ อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์ Toshiaki Itami และจิราพร เกษรจันทร์. 2543. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ ฉบับ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580.

กรรณิการ์ กาญจนชาตรี. 2538. การศึกษาโรคในปลาดุกบิ๊กอุยและคุณสมบัติของน้ำในบ่อคอนกรีตกลมจังหวัดภูเก็ต. ว. การประมง. 48: 131-137.

ประไพสิริ สิริกาญจน. 2538. ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นนทบุรี.

ประสิทธิ์ พันธุ์นิลกุล. 2539. การเลี้ยงปลาดุก. อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

สรรค์ นาตะสุวรรณ. 2543. เทคนิคและประสบการณ์เลี้ยงปลาดุก. พิมพ์ครั้งที่ 3, เทพพิทักษ์การพิมพ์, กรุงเทพฯ, 79 หน้า.

เยาวนิตย์ ดลยดล สถาพร ดิเรกบุษราคม ลิลา เรืองแป้น และวินัย กระจายวงศ์. 2540. ความเป็นไปได้ในการนำองค์ประกอบเลือดบางประการมาใช้วินิจฉัยโรคติดเชื้อ iridovirus ในปลากะพงขาวอย่างรวดเร็ว. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 16/2540, สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ.สงขลา. 10 หน้า.

Ellis, A.E. 1978. The immunology of teleosts. **In**: Fish Pathology (Ronald J. Roberts, ed.), Biliere Tindall, London. 92-94.

Green Cross Corporation. 1982. Leaflet of the Green Cross Corporation, HBs-Ag and anti-HBs hemagglutination screening kit. Green Cross Corporation, Osaka, Japan.

Humason, G. 1979. Animal Tissue Techniques. Freeman, W.H. and Company, San Francisco. 661 p.

Jones, S.R.M. and Woo, P.T.K. 1992. Vector specificity of *Trypanosoma catostomi* and its infectivity to freshwater fishes. J. Parasitol. 78: 87-92.

Kabata, Z. 1985. Parasites and diseases of fish culture in the tropic. Taylor & Francis Ltd., London. 318 p.

Lom, J. and Dykova, I. 1992. Protozoan parasites of fish. Elsevier, Amsterdam. 315 p.

Martin, D.S. and Desser, S.S. 1991. Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and *in vitro*. Parasitol. Res. 77: 18-26.

Qadri, S.S. 1955. Themorphology of *Trypanosoma striate* n. sp. from Indian freshwater fish. J. Parasitol. 45: 79-85.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493-497.

Vyas, G.N. and Shulman, N.R. 1970. Hemagglutination assay for antigen and antibody associated with viral hepatitis. Science. 170: 332-333.

Wang, R. and Belosevic, M. 1994. Cultivation of *Trypanosoma danilewskyi* in serum free medium and assessment of the course of infection in goldfish, *Carassius auratus*. J. Fish Dis. 17: 47-56.

Wedemeyer, G.A. and Yasutake, W.T. 1977. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. U.S. Fish Wildl. Ser. Tech. Pap. 89: 1-18.