



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความชุกชุมของปรสิต *Lernanthropus* sp. ในปลากะพงขาว
การเปลี่ยนแปลงลักษณะพยาธิสภาพของเหงือกและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน
ของปลาต่อเชื้อปรสิต

The abundance of parasite *Lernanthropus* sp. in Asian sea bass (*Lates calcarifer*): gill histopathological changes and the immune responses of fish against parasite

มลฤดี สนิธิ

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความชุกชุมของปรสิต *Lernanthropus* sp. ในปลากะพงขาว
การเปลี่ยนแปลงลักษณะพยาธิสภาพของเหงือกและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน
ของปลาต่อเชื้อปรสิต

The abundance of parasite *Lernanthropus* sp. in Asian sea bass (*Lates calcarifer*): gill histopathological changes and the immune responses of fish against parasite

มลฤดี สอนธิ

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

คณะเทคโนโลยีทางทะเล

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล

หน่วยวิจัยเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยโรคและภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ

มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน 2562

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 141/2561

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อรายงานความสัมพันธ์ของปัจจัยคุณภาพน้ำและปรสิตภายนอกต่อองค์ประกอบเลือดในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เลี้ยงในกระชังบริเวณปากแม่น้ำบ้านท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างปลาที่เลี้ยงในกระชัง จำนวน 3 จุดเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 จำนวนปลาทั้งหมด 481 ตัว จากผลการทดลอง พบว่าพาราไซท์ *Lernanthropus* sp. มีความชุกมากที่สุดในเดือนกุมภาพันธ์ รองลงมาเดือนมีนาคม เมษายน มกราคม พฤษภาคม ธันวาคม มิถุนายน พฤศจิกายน และตุลาคม โดยมีค่าความชุกเท่ากับ 93.33, 92.31%, 86.11%, 78.26%, 59.46%, 55.00%, 40.00%, 28.89% และ 14.89% ตามลำดับ และค่าความหนาแน่นเฉลี่ย (mean intensity) มากที่สุดคือเดือนมีนาคม รองลงมาคือเดือนเมษายน พฤษภาคม กุมภาพันธ์ มกราคม ธันวาคม ตุลาคม พฤศจิกายน และมีถุนายน โดยมีค่าเท่ากับ 6.75 ± 0.94 , 4.94 ± 0.72 , 3.41 ± 0.40 , 3.32 ± 0.40 , 2.67 ± 0.34 , 1.85 ± 0.15 , 1.43 ± 0.09 , 1.38 ± 0.11 และ 1.00 ± 0.24 พาราไซท์ต่อปลา ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ Correlation analysis พบว่าความหนาแน่นเฉลี่ยของพาราไซท์มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ ฟอสเฟต ($R=0.40$) อุณหภูมิน้ำ (0.28) และความเค็ม ($R=0.39$) ความหนาแน่นเฉลี่ยของพาราไซท์มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ($R=0.63$) เม็ดเลือดขาวชนิด Monocyte (0.86) และ Neutrophil (0.15) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณแอมโมเนีย ออกซิเจนละลายในน้ำ และความเค็ม สำหรับการแสดงออกของยีน พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ มีการแสดงออกในระดับสูงในปลาที่มีการติดเชื้อปรสิต *Lernanthropus* sp.

Abstract

The objective of this study was to report the relationship of water quality parameters and external parasite, *Lernanthropus* sp. on blood components of cage cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) in Ban Tha-Chalap estuary, Chanthaburi Province. The total of 481 fishes were randomly collected from 3 rearing sites during January to December 2018. The highest prevalence of *Lernanthropus* sp. showed in February, followed by March, April, January, May, December, June, November and October with the value of 93.33, 92.31%, 86.11%, 78.26%, 59.46%, 55.00%, 40.00%, 28.89% and 14.89%, respectively. The highest of mean intensity was found in March, followed by April, May, February, January, December, October, November and June with the value of 6.75 ± 0.94 , 4.94 ± 0.72 , 3.41 ± 0.40 , 3.32 ± 0.40 , 2.67 ± 0.34 , 1.85 ± 0.15 , 1.43 ± 0.09 , 1.38 ± 0.11 and 1.00 ± 0.24 parasite/ fish, respectively. From the correlation analysis showed positive correlation between mean intensity of *Lernanthropus* sp. and level of phosphate ($R=0.40$), water temperature (0.28) and salinity ($R=0.39$). In addition, mean intensity of *Lernanthropus* sp. has positive correlation with hematocrit value, monocyte and neutrophil. Furthermore, the hematocrit value has positive correlation with level of ammonia, dissolve oxygen and salinity in water. Additionally, inflammatory related gene has high up-regulated expression in infected fish with *Lernanthropus* sp.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ซ
บทที่	
1. บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย.....	2
2. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ประวัติ <i>Lernanthropus</i> sp.....	4
2.2 วงจรชีวิตของปรสิต <i>Lernanthropus</i> sp.....	6
2.3 เลือดปลา.....	7
2.4 ระบบภูมิคุ้มกันปลา.....	8
2.5 ผลของคุณภาพน้ำต่อระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ.....	10
2.6 การเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเหงือกปลา.....	12
2.7 ไฮโดรโค่น.....	14
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	20
3. วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การปรากฏของ <i>Lernanthropus</i> sp. บริเวณปากแม่น้ำบ้านท่าแลบ	23
3.2 การศึกษาองค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาว.....	25
3.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนในปลากะพงขาว.....	25
3.4 จุดเก็บตัวอย่าง.....	26
3.5 สถานที่ทำวิจัย.....	27
3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลองเชิงสถิติ.....	27
4. ผลการวิจัย	
4.1 ความยาวและน้ำหนักปลากะพงขาว	28
4.2 ความชุก (prevalence) และความหนาแน่นเฉลี่ย (mean intensity) ของ ปรสิต <i>Lernanthropus</i> sp.	29
4.3 ปัจจัยคุณภาพน้ำ.....	30
4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อมกับความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิต <i>Lernanthropus</i> sp.....	32
4.5 ค่าองค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาว.....	34

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปรสิตที่พบในเหงือก กับองค์ประกอบเลือด ของปลาเกะพงขาว.....	36
4.7 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อมกับองค์ประกอบเลือดของปลา เกะพงขาว.....	37
4.8 การศึกษาการแสดงออกของยีนในปลาเกะพงขาวที่มีการเกาะติดของปรสิตที่ บริเวณเหงือก.....	43
5 อภิปรายและสรุปผล	
5.1 อภิปราย.....	45
5.2 สรุปผล.....	48
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	49
เอกสารอ้างอิง.....	50
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	57

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	เปรียบเทียบลักษณะพยาธิสภาพเหงือกของปลากระพงขาวที่ได้รับผลกระทบจากปรสิตและสารเคมี.....	12
3-1	ตารางแสดงโปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยา Real time PCR.....	26
3-2	พิกัดจุดเก็บตัวอย่าง.....	26
4-1	ค่าความยาว น้ำหนัก และจำนวนปรสิตของตัวอย่างปลากระพงขาว.....	28
4-2	เปอร์เซ็นต์ความชุก (prevalence) และค่าความหนาแน่นเฉลี่ย (mean intensity) ของปรสิต <i>Lernanthropus</i> sp. ที่พบในปลากระพงขาว.....	31
4-3	คุณภาพน้ำในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง.....	28
4-4	ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อมกับความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิต.....	32
4-5	ค่าองค์ประกอบเลือดของปลากระพงขาว.....	34
4-6	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปรสิตกับองค์ประกอบเลือดปลา.....	36
4-7	ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าองค์ประกอบเลือดและคุณภาพน้ำ.....	37
4-8	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าองค์ประกอบเลือดและคุณภาพน้ำ.....	38

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ส่วนประกอบของ <i>Lernanthropus</i> sp.	4
2-2	ส่วนประกอบของ <i>Lernanthropus</i> sp. เพศเมียตัวเต็มวัย. (มีถุงไข่).....	5
2-3	ส่วนประกอบของ <i>Lernanthropus</i> sp. เพศเมียตัวเต็มวัย. (ไม่มีถุงไข่).....	5
2-4	วงจรชีวิตของโคพีพอด <i>Lernanthropus</i> sp.	6
3-1	พิกัดจุดเก็บตัวอย่าง.....	27
4-1	เปอร์เซ็นต์ความชุก (prevalence) และความหนาแน่นเฉลี่ย (mean intensity) ของปรสิต <i>Lernanthropus</i> sp. ที่พบในปลากะพงขาว.....	30
4-2	ความสัมพันธ์ระหว่างปรสิตกับอุณหภูมิน้ำ (Water_temp) ความเค็ม (Salinity) ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO).	33
4-3	ความสัมพันธ์ระหว่างพาราไซท์กับความโปร่งใสของน้ำ (Turbidity) แอมโมเนีย (Ammonia) ไนไตรท์ (Nitrite) ไนเตรท (Nitrate) และฟอสเฟต (Phosphate)	33
4-4	ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นกับจำนวนปรสิต.....	35
4-5	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวแต่ละชนิดและจำนวนปรสิต.....	35
4-6	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปรสิตกับองค์ประกอบเลือด.....	36
4-7	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดในปลากะพงขาวที่มีการเกาะของปรสิตที่เหงือก.....	37
4-8	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นกับอุณหภูมิน้ำ (Water_temp) ความเค็ม (Salinity) ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO)	38
4-9	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นกับความโปร่งใสของน้ำ (Turbidity) แอมโมเนีย (Ammonia) ไนไตรท์ (Nitrite) ไนเตรท (Nitrate) และฟอสเฟต (Phosphate)	39
4-10	ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte กับอุณหภูมิน้ำ (Water temp) ความเค็ม (Salinity) ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO)	40
4-11	ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ความโปร่งใสของน้ำ (Turbidity) แอมโมเนีย (Ammonia) ไนไตรท์ (Nitrite) ไนเตรท (Nitrate) และฟอสเฟต (Phosphate)	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-12	ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil กับอุณหภูมิน้ำ (Water temp) ความเค็ม (Salinity) ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO)	41
4-13	ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil ความโปร่งใสของน้ำ (Turbidity) แอมโมเนีย (Ammonia) ไนไตรท์ (Nitrite) ไนเตรท (Nitrate) และฟอสเฟต (Phosphase).....	41
4-14	ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด Monocyte กับอุณหภูมิน้ำ (Watertemp) ความเค็ม (Salinity) ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO)	42
4-15	ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด Monocyte ความโปร่งใสของน้ำ (Turbidity) แอมโมเนีย (Ammonia) ไนไตรท์ (Nitrite) ไนเตรท (Nitrate) และฟอสเฟต (Phosphase)	42
4-16	กราฟวิเคราะห์การแสดงออกของยีน MHC II.....	43
4-17	กราฟวิเคราะห์การแสดงออกของยีน TGF beta.....	44

1. บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญและของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปลากระพงขาว เป็นปลาเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะจังหวัดที่มีชายฝั่งติดกับทะเล จะมีการเลี้ยงกันมาก สำหรับในจังหวัดจันทบุรี มีการเลี้ยงปลากระพงขาวในหลายรูปแบบ ได้แก่ การเลี้ยงในกระชัง และการเลี้ยงในบ่อดิน ปัญหาที่เกษตรกรพบอยู่เสมอคือ ปัญหาเรื่องโรค จากการเข้าพื้นที่เพื่อสอบถามเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาในกระชังพบว่าปัญหาหลักของการตาย คือโรคที่เกิดจากเชื้อปรสิต โดยเฉพาะในปลาเล็ก จะมีการตายในอัตราสูง ในปี 2550 มีรายงานการติดตามปรสิตในปลากระพงขาว และปลากะรังที่เลี้ยงในกระชังบริเวณปากแม่น้ำท่าฉลอม พบปรสิตภายนอกเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ ปลิงใส *Diplectanum* sp. ที่บริเวณเหงือกปลา และเห็บประมง *Trichodina* sp. ที่บริเวณผิวหนัง ต่อมาในปี 2556 มีการติดตามปรสิตภายนอกของปลากระพงขาวที่เลี้ยงในกระชังบริเวณนี้อีกครั้ง จากการสำรวจพบ ปลิงใส *Diplectanum* sp. ที่มีความชุก 100 % ในทุกเดือน และพบโคพีพอด *Lernanthropus* sp. ในช่วงฤดูร้อน (มฤตติ สนธิ และคณะ, 2559) ซึ่งสอดคล้องกับการสัมภาษณ์เกษตรกรที่ว่าในปีนี้มี การตายของปลาเพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะปลาขนาดเล็กเนื่องจากโคพีพอดตัวใหญ่ พื้นที่ในการทำลายเหงือกจึงมีบริเวณกว้าง จึงเป็นไปได้ว่าโคพีพอดชนิดนี้ เมื่อมีการติดเชื้อร่วมกับปลิงใส จึงส่งผลให้ปลาจึงมีการตายเพิ่มขึ้น สำหรับการรักษาอาจให้ผลที่ไม่ดีนัก เพราะปรสิตอาจมากับน้ำ เข้าเกาะได้ตลอด หรือเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิ ความเค็ม หรือปัจจัยอื่น ๆ การติดตาม dynamic population ของปรสิตจะมีประโยชน์มากกว่า และจากการรายงานของ Kabata (1979) พบว่าอาการของปลาที่มีการเกาะของโคพีพอด ชนิดนี้ มากๆ จะส่งผลต่อการกินอาหาร การแลกเปลี่ยนก๊าซ เหงือกซีด ปริมาณเม็ดเลือดลดลง และตายในที่สุด

จากการทบทวนเอกสารยังไม่พบรายงานทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับโคพีพอดชนิดนี้ในปลาที่เลี้ยงในกระชังและบ่อดินในประเทศไทย ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับปรสิตชนิดนี้เพิ่มเติม ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการปรากฏของปรสิตตลอดปี ในพื้นที่เลี้ยงที่ต่างกัน รวมทั้งศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่อาจส่งเสริมการปรากฏของปรสิตชนิดนี้ รวมทั้งเก็บข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อปรสิต ได้แก่ ลักษณะพยาธิสภาพของเหงือกปลาที่มีการเกาะติดของปรสิต และพารามิเตอร์ทางภูมิคุ้มกัน และการอักเสบ ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะ เป็นประโยชน์กับเกษตรกรในการวางแผนการจัดการสุขภาพปลา และเป็นข้อมูลช่วยในการวางแผนในการปล่อยปลาเลี้ยงในกระชังตามช่วงเดือน ในแหล่งต่าง ๆ เพื่อเพิ่มอัตราการรอดของปลาให้สูงขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความชุกและความหนาแน่น ของปรสิต *Lernanthropus* sp. ในเหงือกปลากระพงที่เลี้ยงในสถานที่ต่าง ๆ

1.2.2 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะพยาธิสภาพของเหงือกที่ติดเชื้อปรสิต *Lernanthropus* sp.

1.2.3 เพื่อติดตามพารามิเตอร์ทางภูมิคุ้มกันในซีรัมของปลาที่ติดเชื้อ *Lernanthropus* sp.

1.2.4 วิเคราะห์ปัจจัยคุณภาพน้ำที่อาจส่งเสริมการปรากฏของปรสิต *Lernanthropus* sp. ในเหงือกปลากระพงในรอบปี

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

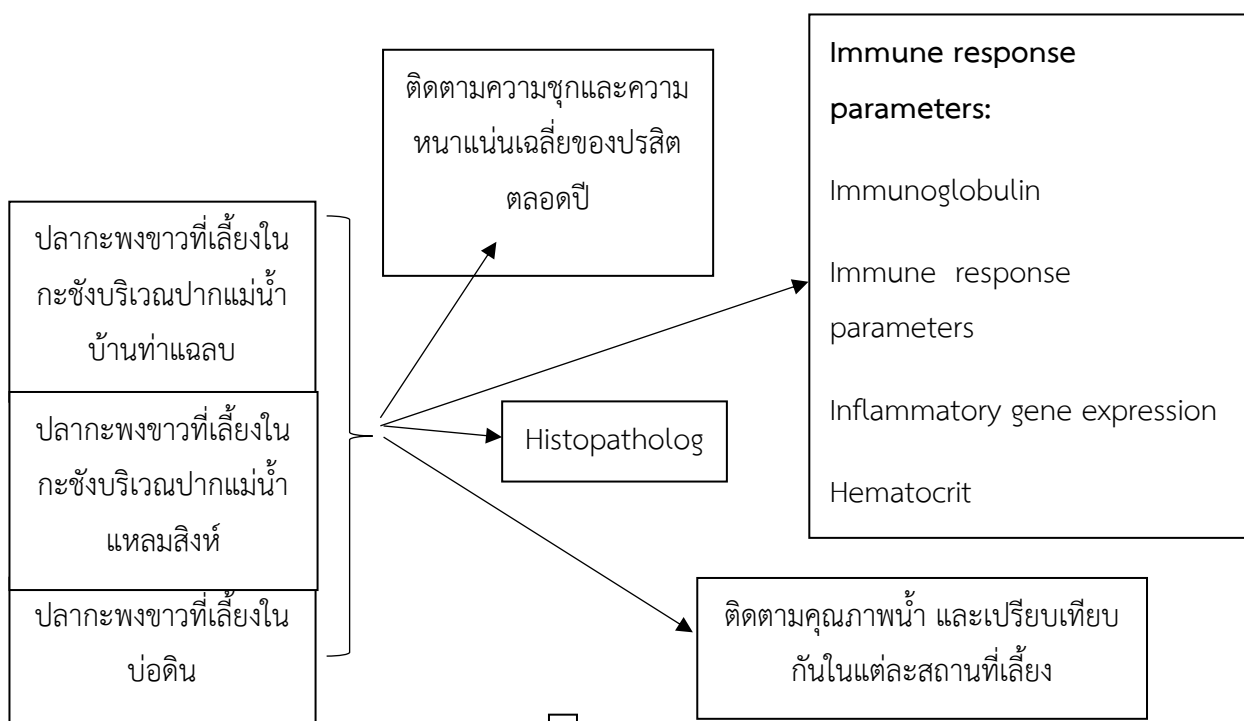
1.3.1 ศึกษาความชุกและความหนาแน่น ของปรสิต *Lernanthropus* sp. ในเหงือกปลากระพงที่เลี้ยงในสถานที่ ต่าง ๆ ได้แก่ ปลากระพงขาวที่เลี้ยงในบ่อดิน เลี้ยงในกระชังบริเวณปากแม่น้ำท่าฉลอม และปากแม่น้ำแหลมสิงห์เป็นเวลา 1 ปี

1.3.2 ศึกษาลักษณะพยาธิสภาพของเหงือกปลาที่มีการเกาะติดของปรสิต *Lernanthropus* sp.

1.3.3 ติดตามพารามิเตอร์องค์ประกอบของเลือด การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในเลือดของปลาที่ติดเชื้อปรสิต *Lernanthropus* sp. ได้แก่ ระดับอิมมูโนโกลบูลิน กิจกรรมไลโซไซม์ โปรตีนรวมในน้ำเลือด

1.3.4 ติดตามคุณภาพน้ำในสถานที่เลี้ยง และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยคุณภาพน้ำกับการปรากฏของปรสิตและค่าองค์ประกอบเลือดของปลา

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



- นำข้อมูลจากการวิจัยวิเคราะห์
1. ความสัมพันธ์ของความหนาแน่นของปรสิตต่อการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ในระบบภูมิคุ้มกัน
 2. ความสัมพันธ์ของความหนาแน่นของปรสิตต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ
 3. ความสัมพันธ์ของแหล่งที่เลี้ยงปลากับความชุกของปรสิต

เป้าหมาย คือ การวางแผนการเลี้ยงปลา การควบคุมคุณภาพน้ำ และการจัดการสุขภาพใน
ขณะที่เลี้ยง

มีรายละเอียดดังนี้

1) ติดตามความชุกและความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิตตลอดปี

เป้าหมาย:

- ข้อมูลการปรากฏของปรสิตชนิดนี้ตลอดปี
- ข้อมูลการเปรียบเทียบจำนวนของปรสิตที่พบกับแหล่งที่เลี้ยง
- เกษตรกรทราบข้อมูลการระบาดของปรสิตชนิดนี้ในรายปี ในแต่ละแห่ง ซึ่งจะ
ช่วยเตรียมความพร้อมในช่วงการปล่อยเลี้ยง และการจัดการสุขภาพในขณะที่
เลี้ยง

2) การศึกษาลักษณะพยาธิสภาพของเหงือกปลา

เป้าหมาย:

- ผลที่ได้นี้ใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่แสดงให้เห็นถึงการถูกทำลายของเหงือก
ในปลากระพงขาวที่ถูกปรสิตชนิดนี้เกาะติด

3) การติดตามพารามิเตอร์บางประการในเลือดปลา และการแสดงออกของ Inflammatory
gene

เป้าหมาย:

- ทราบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณปรสิตและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันตาม
พารามิเตอร์ต่าง ๆ ซึ่งในอนาคตอาจมีการนำไปใช้เป็น biomarker ที่จำเพาะต่อ
การติดเชื้อปรสิตชนิดนี้ได้
- ได้ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่าง Host and Parasite

4) การติดตามข้อมูลคุณภาพน้ำบริเวณกระชังเลี้ยงปลา

เป้าหมาย:

- เนื่องจากคุณภาพน้ำเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการพบปรสิตการที่เกษตรกรได้ทราบถึง
คุณภาพน้ำในแหล่งนั้น ๆ กับการพบปรสิตชนิดนี้ในรอบปี จะนำไปสู่การ
ส่งเสริมสุขภาพ และการตัดสินใจปล่อยปลาที่เลี้ยงในกระชังตามช่วงเดือนต่าง ๆ

2. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปรสิต *Lernanthropus* sp.

ปรสิต *Lernanthropus* sp. อยู่ในอาณาจักรสัตว์ ดำรงชีวิตแบบปรสิตภายนอก (Parasitism: +,-) *Lernanthropus* sp. สามารถจัดลำดับหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตได้ ดังนี้ (อริรุทธ์ ทัศนากกร, 2557)

Kingdom : Animalia

Phylum : Arthropoda

Class : Maxillopoda

Family : Lernathopidea

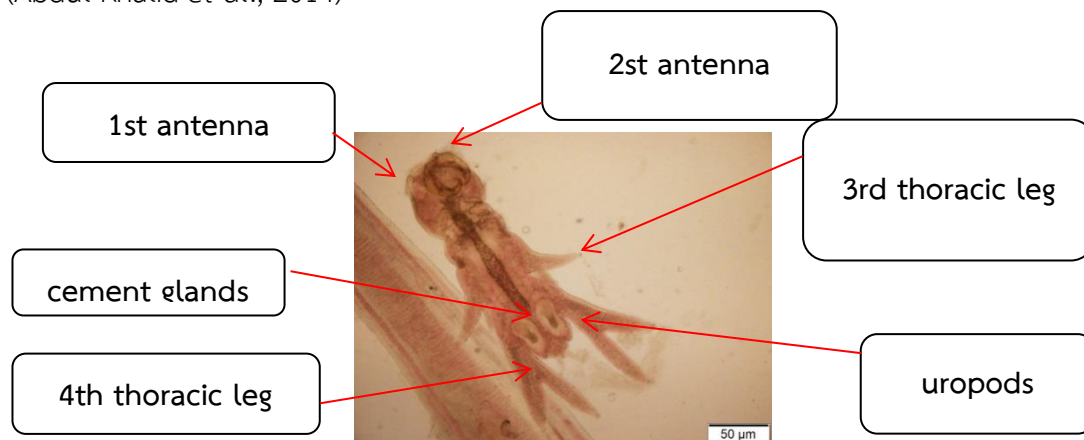
Genus : *Lernanthropus*

Species : *Lernanthropus* sp.

2.1.1 การจำแนกเพศของ *Lernanthropus* sp.

2.1.1.1 เพศผู้ตัวเต็มวัย

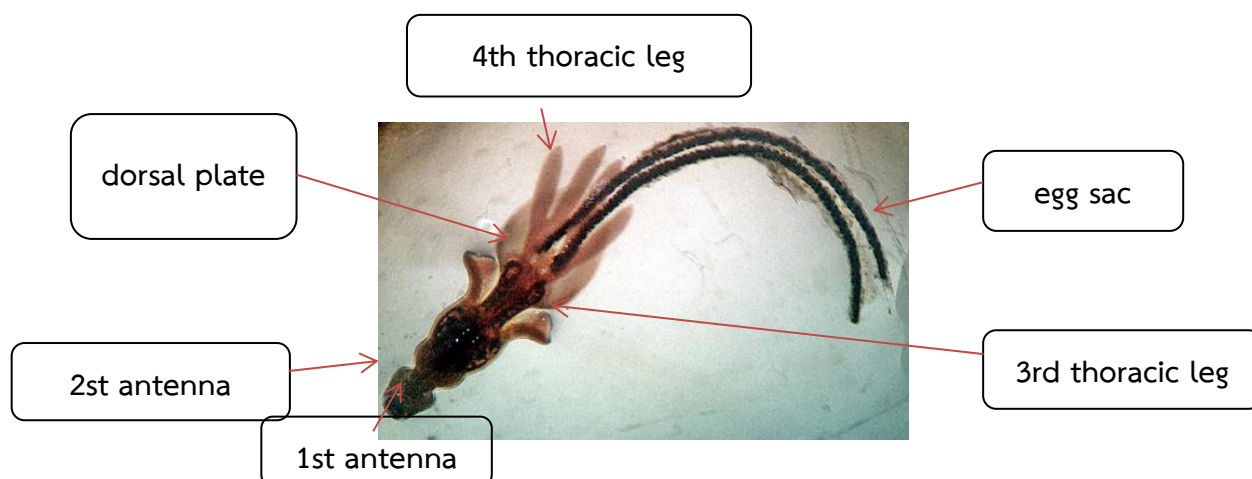
เพศผู้ตัวเต็มวัยจะสร้างสเปิร์มที่ต่อมสร้างน้ำเชื้อ (cement glands) จากนั้นสเปิร์มที่สร้างขึ้นมาจะถูกนำมาเก็บไว้ในถุงอันทะ เพื่อรอที่จะปล่อยน้ำเชื้อเข้าสู่ถุงเก็บสเปิร์มของเพศเมีย (Abdul Khalid *et al.*, 2014)



ภาพที่ 2-1 ส่วนประกอบของ *Lernanthropus* sp. เพศผู้ตัวเต็มวัย
ที่มา : สุชาติดา ขำชะจิต (2555)

2.1.1.2 เพศเมียตัวเต็มวัย (มีถุงไข่)

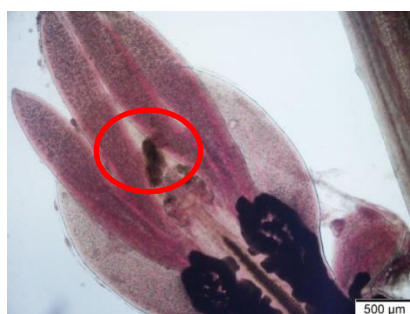
เพศเมียตัวเต็มวัยจะมี dorsal plate ที่มีลักษณะคล้ายกระโปรงอยู่ระหว่างขาเกาะคู่ที่ 3 (3th thoracic leg) และขาเกาะคู่ที่ 4 (4th thoracic leg) มีถุงไข่ 2 ถุงที่ประกอบด้วยไข่ 150 ถึง 200 ไข่จำนวนมากถูกจัดเรียงตามแนวยาว โดยเพศผู้จะปล่อยสเปิร์มเก็บไว้ในถุงเก็บสเปิร์มของเพศเมีย เมื่อถึงระยะเวลาที่เหมาะสมจะดึงสเปิร์มมาผสมกับไข่ จากนั้นไข่เริ่มฟักจะขยายและผลัดตัวเองจากเยื่อถุงไข่ของเพศเมีย (Abdul Khalid *et al.*, 2014)



ภาพที่ 2-2 ส่วนประกอบของ *Lernanthropus* sp. เพศเมียตัวเต็มวัย (มีถุงไข่)
ที่มา : มลฤดี สนธิ และคณะ (2559)

2.1.1.3 เพศเมียตัวเต็มวัย (ไม่มีถุงไข่)

เพศเมียตัวเต็มวัยแบบไม่มีถุงไข่ เกิดจากการผสมกันระหว่างสเปิร์มกับไข่ไม่สำเร็จ ทำให้ไข่ฟ่อและหลุดออกไป (Abdul Khalid *et al.*, 2014)



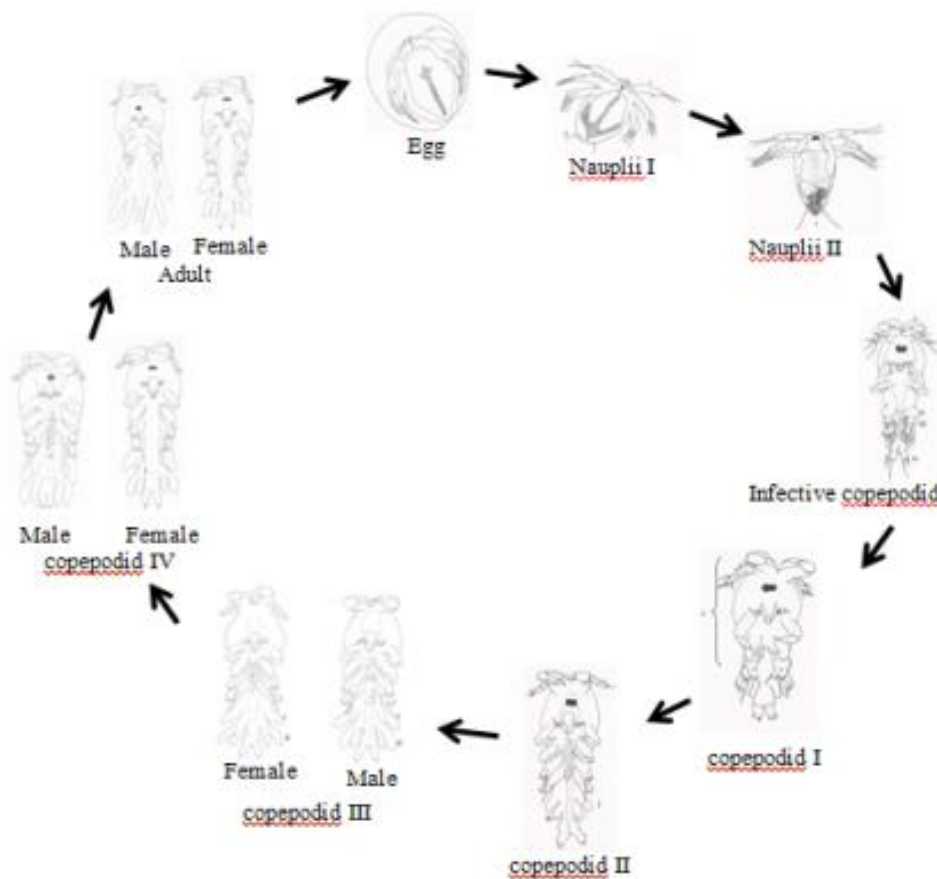
ภาพที่ 2-3 ส่วนประกอบของ *Lernanthropus* sp. เพศเมียตัวเต็มวัย (ไม่มีถุงไข่)
ที่มา : มนสิชา มีมณี (2559)

2.1.2 ผลกระทบของ *Lernanthropus* sp. ต่อปลากะพงขาว

เหงือกของปลาถือว่าเป็นอวัยวะที่สำคัญที่สุดของปลา แต่เมื่อมีพาราไซต์ภายนอก หรือ *Lernanthropus* sp. เข้าไปเกาะ กัดกินเนื้อเยื่อ ดูดเลือด ทำให้เกิดความเสียหายบริเวณเหงือก และผลของความเสียหายคือ เหงือกเกิดการตกเลือด เกิดซีสต์ที่ซี้เหงือก ซี้เหงือกขาด หรือหลุดออกจาก Gill arch เหงือกไม่สามารถหลังเมือกได้ ส่งผลให้เหงือกของปลากะพงขาวไม่สามารถแลกเปลี่ยนออกซิเจนได้ ในกรณีที่ยังไม่ร้ายแรงอาจทำให้ปลากะพงขาวเกิดอาการเครียด อ่อนแอ ส่งผลทำให้ปลาเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อนหรือติดไวรัสอื่นเพิ่มขึ้น ส่วนในกรณีที่ร้ายแรง อาจทำให้ปลากะพงขาวขาดออกซิเจนและตายในที่สุด (Chu *et al.*, 2012)

2.2 วงจรชีวิตของปรสิต

ปรสิตกลุ่มโคพีพอด (*Lernanthropus* sp.) มีวงจรชีวิตที่ซับซ้อน ไข่เมื่อเข้าสู่ช่วงฟักตัวอ่อนจะขยายตัวและดันตัวเองออกจากถุงไข่ เข้าสู่ระยะ Nauplii I มีขนาดลำตัว 1.43-1.84 มิลลิเมตร จากนั้น 15 ชั่วโมง ต่อมาเป็นระยะ Nauplii II มีขนาดลำตัว 1.78-2.07 มิลลิเมตร จากนั้นที่ 26-37 ชั่วโมงเริ่มเข้าสู่ระยะ Infective copepodid มีขนาดลำตัว 2.18-2.65 มิลลิเมตร ต่อมาที่ 72 ชั่วโมงหลังจากการฟักเข้าสู่ระยะ Copepodid I มีขนาดลำตัว 2.65-2.72 มิลลิเมตร ระยะ Copepodid II หลังจากจากการฟัก 82 ชั่วโมง มีขนาดลำตัว 2.72-2.80 มิลลิเมตร ระยะ Copepodid III ที่ 95 ชั่วโมงหลังการฟัก จะมีการสร้างเซลล์เพศผู้และเพศเมีย มีขนาดลำตัว 2.97-3.74 มิลลิเมตร ระยะเวลา 109 ชั่วโมงหลังการฟัก เป็นระยะ Copepodid IV มีขนาดลำตัว 3.90-7.44 มิลลิเมตร สุดท้ายเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย มีขนาดลำตัว 8.30-8.78 มิลลิเมตร ใช้เวลาในการเจริญเติบโตทั้งสิ้น 207-483 ชั่วโมง โดยระยะนี้จะเป็นระยะที่เริ่มทำการหาเจ้าบ้านหรือโฮสต์ (host) และสืบพันธุ์ (Abdul Khalid *et al.*, 2014)



ภาพที่ 2-4 วงจรชีวิตของปรสิต *Lernanthropus* sp.

ที่มา : Abdul Khalid *et al.* (2014)

2.3 เลือดปลา

เลือดปลาเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เป็นตัวกลางในการลำเลียง มีหน้าที่ดังนี้

1. ลำเลียงสารต่างๆเข้าและออกจากเส้นเลือดฝอย
2. ป้องกันเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย
3. ควบคุมอุณหภูมิภายในร่างกาย
4. การแข็งตัวของเลือดเป็นกลไกในการป้องกันการสูญเสียเลือด

2.3.1 องค์ประกอบเลือดของปลา

องค์ประกอบเลือดของปลา มีอยู่ 2 ส่วน คือ

1. ส่วนที่เป็นของเหลว หรือว่า น้ำเลือด ประกอบด้วยโมเลกุลต่างๆรวมทั้ง สารอาหาร ของเสีย และโปรตีน น้ำเลือดเป็นของเหลวใสที่มีสีเหลืองอ่อน ทำหน้าที่ ละลายก๊าซ แกลือแร่ สารอาหารที่ย่อยแล้วเอนไซม์ แอนติบอดี รวมทั้งรับของเสียและสิ่งขับถ่ายจากเนื้อเยื่อและสิ่งต่างๆ ที่ละลายอยู่ในอวัยวะที่ต้องการแร่ธาตุในน้ำเลือดได้แก่ โซเดียม (Na) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมงกานีส (Mg) ฟอสฟอรัส (P) เป็นต้น

2. ส่วนที่เป็นเซลล์ เม็ดเลือดต่างๆ และเกร็ดเลือดได้แก่

2.1 เม็ดเลือดแดง (red blood cell) ทำหน้าที่ลำเลียงออกซิเจน เม็ดเลือดแดงมีลักษณะเป็นวงรี มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง

2.2 เม็ดเลือดขาว (white blood cell) ทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมและภูมิคุ้มกัน เซลล์เม็ดเลือดขาวแตกต่างกันไป ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ

- Monocyte เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีพื้นที่ของไซโตพลาสซึมมากกว่า Lymphocytes อาจพบแกรนูลภายในไซโตพลาสซึม

- Lymphocyte เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีปริมาณมากที่สุด นิวเคลียสมีรูปร่างกลมขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ ไม่แบ่งเป็นพู (mononuclear cell) มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ พบว่าปลาที่ติดเชื้อ และอยู่ในภาวะเครียด จะมีปริมาณ lymphocytes ต่ำ

- Neutrophil เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีนิวเคลียสหลายพู (multilobed nucleus) มีแกรนูล (granules) ขนาดเล็ก รูปร่างเป็นแท่งภายในไซโตพลาสซึม มีบทบาทในการจับกินสิ่งแปลกปลอม

2.3.2 เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit)

Hematocrit เป็นเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเทียบกับปริมาตรของเลือดทั้งหมด คำนี้อธิบายภาวะโลหิตจาง หรือ ความข้นของเลือด โดยค่านี้จะขึ้นอยู่กับจำนวนและขนาดของเม็ดเลือดแดง แสดงค่าออกมาในรูปแบบเปอร์เซ็นต์ เช่น หากได้ค่า Hct = 40% หมายความว่า มีจำนวนเม็ดเลือด

แดง 40 มิลลิลิตรเทียบกับปริมาตรเลือด 100 มิลลิลิตรโดยค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลากระพงขาวอยู่ในช่วง 16.0-35.08% (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2530)

2.4 ระบบภูมิคุ้มกันของปลา

ระบบภูมิคุ้มกันในปลาประกอบด้วยอวัยวะที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างและพัฒนาของเซลล์เม็ดเลือดขาว อวัยวะที่สำคัญได้แก่ ไต ส่วนหน้า (anterior kidney) ม้าม (spleen) และต่อมไทมัส (thymus) (Workenhe *et al.*, 2010; Zapata *et al.*, 2006) ไตส่วนหน้าทำหน้าที่คล้ายกับไขกระดูกในสัตว์ชั้นสูงคือ เป็นอวัยวะที่รองรับ การพัฒนาของ B lymphocytes คอยดักจับ แอนติเจนในเลือด และเป็นแหล่งสร้างแอนติบอดี ม้ามเป็นแหล่งสร้างเม็ดเลือดในลูกปลาและทำหน้าที่ดักจับแอนติเจนในเลือด ส่วนต่อมไทมัสเป็น อวัยวะที่รองรับการพัฒนาของ T lymphocytes นอกจากอวัยวะที่กล่าวแล้ว ตับ (liver) ของปลา ยัง ทำหน้าที่ผลิตสารน้ำที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โพรตีนเฉียบพลัน (acute phase proteins) ซีรัมโพรตีนและส่วนประกอบต่างๆ ของระบบคอมพลีเมนต์ (complement proteins) (Huttenhuis *et al.*, 2006) อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันอีกกลุ่ม คือ ภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อทางเดินอาหาร (gut associated lymphoid tissue; GALT) ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มของเซลล์ได้แก่ lymphocytes macrophages และ granulocytes (Rombout *et al.*, 2011) ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลา สามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ 1) ผิวหนังและเยื่อต่างๆ ซึ่งเป็นด่านแรกที่สัมผัสกับสิ่งแปลกปลอม บริเวณผิวหนังของปลามีการสร้างเมือก (mucus) ซึ่งประกอบด้วยสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย หรือปรสิต ได้แก่ อิมมูโนโกลบูลิน สารเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) และไลโซไซม์ (lysozyme) (Ellis, 2001) สารกลุ่มนี้จะสร้างออกมาเพิ่มขึ้นเมื่อปลาเกิดการติดเชื้อ โดยจะสังเกตได้จากสีของลำตัวปลามีสีขุ่น และเมื่อเอามือลูบ ตามผิวหนังหรือเกล็ด จะพบลื่นกว่าปกติ 2) สารน้ำต่างๆ (innate humoral immune response) ได้แก่ ระบบคอมพลีเมนต์ซึ่งทำหน้าที่ทำลายเชื้อโรคด้วยการทำให้เกิดรูบนผิวเซลล์เป้าหมาย โพรตีน lectins ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการ opsonization และ agglutination โพรตีนกลุ่ม C-reactive proteins และ serum amyloid P ซึ่งช่วยในกระบวนการ รับรู้ การติดเชื้อ สารเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และสารไซโตคัยนกลุ่ม interferon ที่ทำหน้าที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส (Alvarez Pellitero, 2008; Ellis, 2001; Magnadottir, 2006) 3) เซลล์ (innate cellular immune response) แบ่งเป็นเซลล์กลุ่มที่ทำหน้าที่เก็บ กินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic cells) ได้แก่ macrophages และ neutrophils การทำลายสิ่งแปลกปลอมอาศัยสารในกลุ่ม reactive oxygen species และการทำงานของเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ ย่อยทำลายเซลล์เชื้อโรค เซลล์อีกชนิดที่พบในปลา คือกลุ่ม non-specific cytotoxic cells ซึ่งทำหน้าที่คล้ายกับ natural killer cells คือทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและเซลล์มะเร็ง (Esteban *et al.*, 2008) นอกจากเซลล์ที่กล่าวไปแล้ว ปลา ยังมีเซลล์ที่ เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ได้แก่ eosinophils, dendritic cells และ thrombocytes สำหรับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในปลา ประกอบด้วย 1) สารน้ำ ได้แก่ อิมมูโน

กลอบูลิน หรือแอนติบอดี ทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อในซีรัมและบริเวณเยื่อต่างๆ อิมมูโนกลอบูลิน ในพลาสมาสร้างมาจาก B cells และ plasma cells ในปัจจุบันพบว่า พลาสมาแอนติบอดี 3 ประเภท คือ IgM, IgD และ IgT โดย IgM เป็น แอนติบอดีที่มีบทบาทสำคัญในเลือด IgD พบบนผิว ของ B cells ส่วน IgT ทำหน้าที่คล้ายกับ IgA ในสัตว์ เลี้ยงลูกด้วยนมโดยเกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันบริเวณ เยื่อ (Fillatreau *et al.*, 2013) 2) เซลล์ลิมโฟไซต์ แบ่งออกเป็น 2 ชนิดสำคัญคือ B และ T cells โดย T cells แบ่งออกเป็น CD⁴⁺ และ CD⁸⁺ T cells (Lainig and Hansen, 2011) หน้าที่ของ T cells ทั้ง 2 กลุ่มคล้ายกับในสัตว์ชั้นสูง คือ CD⁴⁺ T cells ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่น (Toda *et al.*, 2011) และ CD⁸⁺ T cells คอยตรวจและทำลาย เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (Somamoto *et al.*, 2009) การตอบสนองของ T cells อาศัยการนำเสนอแอนติเจนบนโมเลกุลเรียก major histocompatibility complex (MHC) ทั้ง class I และ II โดยที่ dendritic cells เป็น เซลล์สำคัญในการนำเสนอแอนติเจนต่อ T cells (Lugo-Villarino *et al.*, 2010) นอกจากเซลล์และ สารชนิดต่างๆ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และการกระตุ้นกระบวนการอักเสบในปลา ยังถูก ควบคุมผ่านไซโตไคน์หลายชนิด

การตอบสนองการอักเสบ

การทำลายของเนื้อเยื่อซึ่งเกิดจากบาดแผลหรือการรุกรานของจุลินทรีย์ สามารถชักนำให้เกิดลำดับขั้นการตอบสนองแบบไม่จำเพาะ เรียกว่าการตอบสนองโดยการอักเสบ (inflammatory response) ซึ่งมีอาการบวมแดง อุณหภูมิสูงขึ้น และการเจ็บปวดในบริเวณนั้น ซึ่งเกิดจากขั้นตอนการทำงาน 3 ประการ คือ (1) การขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) (2) การเพิ่มการไหลของของเหลวออกนอกหลอดเลือดฝอย (capillary permeability) (3) การเดินทางของเม็ดเลือดขาวเข้าสู่บริเวณที่อักเสบ การขยายตัวของหลอดเลือดทำให้เลือดสะสมในบริเวณนั้นมากขึ้น ในขณะที่หลอดเลือดส่วนที่นำเลือดออกจากบริเวณนั้นหดตัว จึงเป็นผลให้เลือดคั่ง ทำให้มีอาการแดงและอุณหภูมิสูงขึ้นการเพิ่มการไหลออกของของเหลวออกจากหลอดเลือดฝอย ก่อให้เกิดอาการบวม (edema) ซึ่งช่วยให้มีการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวออกนอกหลอดเลือด (diapedesis or extravasation) เนื่องจากการตอบสนองต่อสารดึงดูด (chemotaxia) ต่างๆ ซึ่งปล่อยจากจุลินทรีย์ เช่น F-met-phe และ F-met-leu-phe ซึ่งพบทั่วไปในจุลินทรีย์ เม็ดเลือดขาวที่เข้ามาสะสมนี้จะทำหน้าที่หลั่งเอนไซม์ออกย่อยสลายเนื้อเยื่อที่บาดเจ็บซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อปกติข้างเคียง การสะสมของเม็ดเลือดขาวและเซลล์ที่ตายอยู่ในรูปที่เรียกว่าหนอง (pus)

2.5 ผลของคุณภาพน้ำต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ

เนื่องจากปลาเป็นสัตว์ที่อาศัยอยู่ในน้ำตลอดเวลา และเป็นสัตว์เลือดเย็น ทำให้อุณหภูมิร่างกายขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำและสิ่งแวดล้อม การศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยเรื่องคุณภาพน้ำ และผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลาส่วนใหญ่ทำในปลาเศรษฐกิจ ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน ความเค็ม และค่าเคมีต่าง ๆ ของน้ำ โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำมีผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมากที่สุด จากการศึกษาพบว่า การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของอุณหภูมิทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาว กระบวนการ respiratory burst และ phagocytic activity ลดลง และส่งผลให้ปลาติดเชื้อแบคทีเรียมากขึ้น (Cheng *et al.*, 2009; Ndong *et al.*, 2007) การลดลงของอุณหภูมิน้ำยังทำให้การทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ (Nikoskelainen *et al.*, 2004) และการสร้างไซโตไคน์ interferon ที่มีบทบาทสำคัญต่อการติดเชื้อไวรัสลดลง (Dios *et al.*, 2010) โดยอุณหภูมิน้ำเหมาะสมสำหรับกาเลี้ยงปลาเขตร้อนควรอยู่ในระดับ 25-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของปลาปกติจะใกล้เคียงกับอุณหภูมิของน้ำที่อยู่รอบตัว การเจริญของเชื้อโรคจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิลดลง เช่นเดียวกัน ดังนั้นปลาที่อาศัยอยู่ในน้ำเย็นที่น้อยกว่า 7 องศาเซลเซียส ไม่จำเป็นต้องมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดี เนื่องจากเชื้อโรคจะเจริญช้าและไม่สามารถทำอันตรายต่อปลาได้ มีงานวิจัยเกี่ยวกับปลาไหล พบว่า ปลาชนิดนี้จะไม่ผลิตแอนติบอดีในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 11 องศาเซลเซียส แต่จะผลิตแอนติบอดีเมื่ออุณหภูมิอยู่ระหว่าง 16-19 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่า ปลาน้ำจืดจะมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันที่ดีกว่าน้ำเย็น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของแหล่งน้ำเป็นปรากฏการณ์ธรรมชาติ อัตราการตายของปลาจากการติดเชื้อโรคจะเกี่ยวข้องกับฤดูกาล เช่นกัน ซึ่งสาเหตุนี้อาจจะมาจากอุณหภูมิมิมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของปลานอกจากสภาพแวดล้อมจะมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในปลาแล้ว ความเครียดที่เกิดจากการเลี้ยงที่หนาแน่น การขนส่ง ช่วงฤดูการผสมพันธุ์ และวางไข่ สามารถส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และทำให้ปลาติดเชื้อต่าง ๆ ได้ง่ายเช่นกัน (Noga *et al.*, 1998) ความเครียดจะทำให้ปลาสร้างฮอร์โมนคอร์ติซอล (cortisol) มากขึ้น ซึ่งจะไปกดการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ทั้งในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะ จากการศึกษาในปลาคาร์ฟ พบว่าฮอร์โมนคอร์ติซอลที่ระดับความเครียดสามารถยับยั้งการสร้างสารไซโตไคน์ TNF- α , IL-12 และเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Stolte *et al.*, 2008) ฮอร์โมนคอร์ติซอลยังเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ทั้งควบคุมการตายของเซลล์ ลิมโฟไซต์และการสร้าง แอนติบอดีชนิด IgM จาก B cells (Saha *et al.*, 2004) นอกจากนี้การเลี้ยงปลาในสภาวะหนาแน่น ยังส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ และส่วนประกอบของคอมพลีเมนต์ (C3 factor) ลดลง (Mauri *et al.*, 2011) และทำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียด เช่น โพรตีนในกลุ่ม heatshock proteins มีการแสดงออกมากขึ้นทั้งในระดับและสมอง (Gornati *et al.*, 2004) ดังนั้นการรักษาสมดุลของสิ่งแวดล้อม ที่ใช้เลี้ยงปลาร่วมกับการลดความเครียด เช่น ไม่เลี้ยงปลาหนาแน่นเกินไป หรือลดการเคลื่อนย้าย ปลาโดยไม่จำเป็น จะช่วยลดผลกระทบต่าง ๆ ที่เกิดกับระบบภูมิคุ้มกัน ในปัจจุบันการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants)

เพื่อช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเป็นหัวข้อที่มีการศึกษา และมีการประยุกต์ใช้มากขึ้นในสัตว์น้ำ ทั้งนี้การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน นอกจากจะทำให้สัตว์แข็งแรง มีความต้านทานต่อโรคแล้ว ยังช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะที่เป็นสาเหตุสำคัญของการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำ และลดการปนเปื้อนของเชื้อดื้อยาในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันนิยมทำโดยผสมอาหารให้ปลากินซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเป็นหลัก ในปัจจุบันการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) เพื่อช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเป็นหัวข้อที่มีการศึกษาและมีการประยุกต์ใช้มากขึ้นในสัตว์น้ำ ทั้งนี้การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน นอกจากจะทำให้สัตว์แข็งแรง มีความต้านทานต่อโรคแล้ว ยังช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะที่เป็นสาเหตุสำคัญของการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำ และลดการปนเปื้อนของเชื้อดื้อยาในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันนิยม ทำโดยผสมอาหารให้ปลา กิน ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเป็นหลัก สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่นิยมใช้จะเป็นกลุ่มเบต้ากลูแคน (β -glucans) และ polysaccharide ที่แยกได้จากสาหร่ายหรือยีสต์ ซึ่งหลักการทำงานของสารกลุ่มนี้จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันผ่านทางตัวรับต่าง ๆ บนผิวเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะกลุ่ม Toll-like receptors (TLRs) ทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทำงานมากขึ้น (Bricknell and Dalmo, 2005) ตัวอย่างของการใช้สารกลุ่มนี้ต่อระบบภูมิคุ้มกันในปลา เช่น การผสม 1,3 β -glucans จากผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารปลาทอง สามารถกระตุ้นกระบวนการ phagocytic และ respiratory burst activity และ ช่วยลดอัตราการตายจากการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (Selvaraj *et al.*, 2006) การใช้ 1,3 β -glucans, chitosan หรือ raffinose ช่วยลดความรุนแรงของการติดเชื้อ *Aeromonas veronii* ในปลา คาร์ฟ (Lin *et al.*, 2011) นอกจากการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาแล้ว สารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิดก็มีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรีย (Galina *et al.*, 2009) พืชสมุนไพรที่พบในประเทศไทยและมีรายงานการศึกษาถึงผลต่อ ระบบภูมิคุ้มกันในปลาสวยงาม ได้แก่ขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) (Nyaand Austin, 2009) หนุ่ยพันธุ์ขาว (*Achyranthes aspera*) (Vasudeva *et al.*, 2006) สารสกัดจากใบสะเดา (*Azadirachta indica*) (Kumar *et al.*, 2013) กะเพรา (*Oscimum sanctum*) และขมิ้น (*Curcuma longa*) (Harikrishnan *et al.*, 2010) การทดลองผสมพืชสมุนไพรเหล่านี้ในอาหาร ปลาช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลาหลายชนิด และช่วยให้ปลามีอัตราการรอดตายสูงขึ้น ภายหลังการฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* อย่างไรก็ตามสิ่งที่ควรคำนึงถึงเวลา กระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่าง ต่อเนื่องและเป็นระยะเวลาานาน อาจทำให้ระบบภูมิคุ้มกันอ่อนล้า (immune fatigue) ได้ (Lin *et al.*, 2011) ดังนั้นการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือสมุนไพรจึงต้องดูความเหมาะสมทั้งเรื่องระยะเวลาและชนิดของปลา โดยอาจประยุกต์ใช้โดยการผสมในอาหารเป็นระยะเวลา หนึ่งสัปดาห์กับการให้อาหารปกติ เช่น สัปดาห์เว้น สัปดาห์หรือใช้ในเวลาที่ปลาจะเกิดความเครียด เช่น ก่อนการขนย้ายหรือเปลี่ยนถ่ายบ่อ

ระบบภูมิคุ้มกันในปลาเป็นกลไก สำคัญในการป้องกันการติดเชื้อต่าง ๆ โดยอาศัย การทำงานร่วมกันของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะ ซึ่งทั้งสองระบบประกอบ ด้วยสารน้ำและ

เซลล์ที่ทำงานประสานกันอย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำและความเครียด สามารถส่งผลโดยตรงต่อการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นการจัดการเพื่อลดผลกระทบเหล่านี้จะช่วยทำให้ปลาที่มีสุขภาพแข็งแรงมีความทนทานต่อโรคมามากขึ้น รวมทั้งยังช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะ และลดผลจากการติดยาของเชื้อในสิ่งแวดล้อมด้วย การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และสมุนไพรเพื่อช่วยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในปลาสวยงามจึงเป็นหัวข้อที่น่าสนใจ และควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในอนาคต (วิน สุรเชษฐพงษ์, 2556)

2.6 การเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเหงือกของปลา

ปัจจัยคุณภาพน้ำ สารพิษ สารกำจัดศัตรูพืช ที่ละลายในน้ำ รวมทั้งการเกาะติดของปรสิต มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเหงือกปลา ซึ่งสรุปไว้ในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 เปรียบเทียบลักษณะพยาธิสภาพเหงือกของปลากะพงขาว ที่ได้รับผลกระทบจากปรสิตและสารเคมี

ปรสิต/สารเคมี	ลักษณะพยาธิสภาพเหงือกของปลากะพงขาว
ปรสิต <i>Diplectanum latesi</i> และ <i>D. papaverensis</i>	การบวมน้ำ (edema), การเพิ่มจำนวนเซลล์ (hyperplasia), การเพิ่มขนาดของเซลล์ (hypertrophy) ที่ฐานของซี่เหงือก, การตกเลือด (haemorrhage), การรวมกันของ ซี่เหงือก (lamellar fusion) และเนื้อเยื่อของเหงือกบางส่วนเกิดการฉีกขาดเมื่อตัวพยาธิไชตัวแทรกเข้าไปในส่วนระหว่าง Gill lamellae (นิรัตติศัย เพชรสุภา และ สุวิมล นิรัตน์, 2551)
ปรสิตกลุ่มโมโนจีเนีย (<i>Diplectanum</i> sp.) และ กลุ่มโคพีพอด (<i>Lernanthropus</i> sp.)	การฉีกขาดของเนื้อเยื่อเหงือก, ปริมาณ Chloride cell ลดลง, ลักษณะอาการของการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Hyperplasia), การรวมกันของซี่เหงือก (Lamellar fusion), การบวมน้ำ (Edema), การตกเลือด (Haemorrhage), ในบริเวณอื่นๆ พบการเกิดหลอดเลือดโป่งพอง (Aneurism), การแยกตัวของ Epithelium cell (Epithelial lifting), Secondary

ปรสิตกลุ่มโคพีพอด <i>Lernanthropus latis</i>	<p>Lamellae สิ้น, พบลักษณะความผิดปกติคล้าย ซีสต์ (Cyst) ที่บริเวณเหงือกของปลา (สุชาติดา ข้าชะจิต, 2555)</p> <p>การสึกกร่อน (Erosion), การตกเลือด (Haemorrhage), การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Hyperplasia), การตายเฉพาะส่วน (Necrosis) ของเซลล์ บริเวณ Secondary lamellae (Chu et al., 2012)</p>
ความเป็นพิษของ Cu ในปลากระพงขาว	<p>การเกิดหลอดเลือดโป่งพอง (Aneurism), การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Hyperplasia) ของ Lamellar epithelia, การรวมกันของซี่เหงือก (Lamellar fusion) และซี่เหงือกสั้น (Díaz-de-Alba et al., 2017)</p>
สารกำจัดศัตรูพืช	<p>การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Hyperplasia), การรวมกันของซี่เหงือก (Lamellar fusion), การสลายตัว (Disintegration) ของ Epithelium cell และการเกิด lifting ของ Epithelium cell การขยายตัวมากเกินไป (Hypertrophy) ของเหงือก, การเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (Proliferation) ของ Chloride cell</p>
โลหะหนัก	<p>การตายเฉพาะส่วน (Necrosis), การสลายตัว (Disintegration) ของเยื่อบุผิว, การหลุดออก (Desquamated) ของ Epithelium, การตกเลือด (Haemorrhage) และความเสียหายที่สมบูรณ์ของเซลล์เยื่อบุผิวของ Lamellae (Ezhilmathy et al., 2014)</p>
ยาฆ่าแมลงผสมโลหะ	<p>ภาวะโลหิตจาง (Anemia), เมื่อกสีขาวที่เกิดจากการอักเสบแบบมีหนอง, การบวมน้ำ (Edema) ที่ Lamellary, การรวมกันของ Secondary lamellae และการตายเฉพาะส่วนของเนื้อเยื่อ (Necrosis) (Yardimci and Pekmezci, 2012)</p>
ติดเชื้อพาราไซต์ <i>Diplectanum aequans</i> และ <i>Lernanthropus kroyeri</i>	<p>ภาวะโลหิตจาง (Anemia), เมื่อกสีขาวที่เกิดจากการอักเสบแบบมีหนอง, การบวมน้ำ (Edema) ที่ Lamellary, การรวมกันของ Secondary lamellae และการตายเฉพาะส่วนของเนื้อเยื่อ (Necrosis) (Yardimci and Pekmezci, 2012)</p>

ได้รับทองแดงได้ดวงตา

เหงือกมีการขยายตัวมากเกินไป (Hypertrophy), การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Hyperplasia), เหงือกมีอาการบวมน้ำ (Edema) อย่างรุนแรง, เหงือกมีภาวะหลอดเลือดฝอยโป่งพอง (Telangiectasia), การรวมกัน (Lamellar fusion) ของซีเหงือกที่ Secondary lamellar, การขยายตัว (Vasodilation) ของหลอดเลือดที่มีการยืด (Stretching) และการตายเฉพะาส่วน (Necrosis) ของเนื้อเยื่อ (Paruruckumani et al., 2015)

2.7 ไซโตไคน์ (cytokines)

Cytokine เป็น polypeptide ซึ่งเป็นสารน้ำต่างๆ ที่สร้างและหลั่งโดยเซลล์ของร่างกาย มีบทบาทในภูมิคุ้มกันทั้ง non-specific immunity และ specific immunity cytokine ที่ช่วยใน specific immunity ส่วนใหญ่หลั่งมาจาก T lymphocyte และ cytokine ที่ช่วยใน non-specific immunity ส่วนใหญ่หลั่งมาจาก mononuclear phagocyte ที่พบสิ่งแปลกปลอม แต่ก็ได้รับการกระตุ้นจาก T lymphocyte ด้วยเช่นกัน

คุณสมบัติโดยทั่วไปของ cytokine

1. สร้างขึ้นในระหว่างที่มีการสร้าง non-specific immunity และ specific immunity ทำหน้าที่ควบคุมการเกิดภูมิคุ้มกันดังกล่าว
2. หลั่งออกมาจากเซลล์ที่สร้างเพียงชั่วระยะหนึ่งแล้วจะหยุดไปเอง cytokine ที่สร้างขึ้นจะหลั่งออกมาจนหมดสิ้นโดยมาเหลือเก็บไว้ในเซลล์
3. cytokine ชนิดหนึ่งๆ อาจสร้างขึ้นได้โดยเซลล์หลายชนิด และสามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์หลายชนิด (Pleotropism)
4. cytokine ชนิดหนึ่งอาจมีบทบาทเพิ่มหรือลดการสร้าง cytokine ชนิดอื่นๆ
5. cytokine ชนิดหนึ่งๆ มีฤทธิ์มากมาย ฤทธิ์บางอย่างอาจซ้ำซ้อนกับฤทธิ์ของ cytokine อื่นๆ (Redundancy)
6. cytokine อาจมีฤทธิ์เสริม (additive effect/ synergistic effect) หรือต้าน (antagonistic effect) กับ cytokine อื่นๆ
7. cytokine อาจมีฤทธิ์ต่อเซลล์ที่เป็นผู้สร้างมัน (autocrine action), ต่อเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงกับเซลล์ผู้สร้าง (paracrine action), หรือเข้าสู่กระแสเลือดไปออกฤทธิ์ต่อเซลล์ที่อยู่ห่างไกล (endocrine action) cytokine ออกฤทธิ์ผ่านทาง receptor จำเพาะบนผิวของ target organ Rp. ดังกล่าวส่วนใหญ่สามารถจับกับ cytokine จำเพาะได้ดีมาก

8. การปรากฏตัวของ receptor บนผิว target organ ควบคุมโดย cytokine อื่น หรือ cytokine นั้นๆ เอง
9. target organ ส่วนใหญ่ใช้เวลาหลายชั่วโมงกว่าจะตอบสนองต่อ cytokine
10. cytokine อาจมีฤทธิ์ทำให้ target organ แบ่งตัวได้

ชนิดของ cytokine

Cytokine ที่มีบทบาทใน Innate immunity สร้างจาก macrophage กับ NK cell Type I IFN ประกอบด้วย IFN 2 พวก คือ IFN- α และ IFN- β ซึ่งมี antigenic determinant ต่างกัน แต่มี receptor เหมือนกัน type I IFN ส่วนใหญ่ใหญ่ร่างกายสร้างขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังสร้างเมื่อมีการตอบสนองจำเพาะ โดย T lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นจะไปกระตุ้นให้ mononuclear phagocyte สร้าง type I IFN หน้าที่หลักของ type I IFN มีดังนี้

- ชัดขวางการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์ร่างกาย โดยการกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง enzyme ขึ้นมาหลายชนิด ซึ่งทำให้ RNA หรือ DNA ของไวรัสไม่เพิ่มจำนวน การทำงานของ type I IFN มักเป็นแบบ paracrine
- เพิ่มความสามารถของ NK cell ในการทำลายเซลล์แปลกปลอม โดยการออกฤทธิ์กระตุ้นให้ pre-NK cell แบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงเป็น NK cell
- เพิ่มการปรากฏของ class I MHC บนเซลล์แปลกปลอม รวมทั้งเซลล์ร่างกายที่ติดเชื้อไวรัสด้วย เป็นผลให้ cytotoxic T lymphocyte ทำงานได้ดี แต่พบว่า type I IFN จะลดการปรากฏของ class II MHC จึงทำให้การกระตุ้น helper T lymphocyte เกิดขึ้นได้ไม่ดี
- ชัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์ต่างๆ ไป

Interleukin-1 (IL-1) มีรูปแบบที่สำคัญคือ IL-1 α ซึ่งพบอยู่บนผิวของเซลล์ผู้สร้าง และ IL-1 β ซึ่งพบอยู่ในสารน้ำของร่างกาย เซลล์สำคัญที่ทำหน้าที่สร้าง IL-1 คือ mononuclear phagocyte ที่ถูกกระตุ้นด้วยผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีเซลล์อื่นๆ สร้างด้วย คาดว่าเซลล์ทุกชนิดในร่างกายที่ทำหน้าที่เป็น APC จะสามารถสร้าง IL-1 ได้ ฤทธิ์ของ IL-1 มีดังนี้

1. กระตุ้น hypothalamus ให้สร้าง Prostaglandin E2 แล้วก่อให้เกิดไข้
2. กระตุ้น hepatocyte ให้สร้างสารกลุ่ม acute phase protein ซึ่งช่วยทำลายสารพิษและกำจัดจุลชีพ แต่อาจก่อให้เกิดโรค secondary amyloidosis ได้
3. เพิ่มความสามารถของ NK cell ในการสลายเนื้องอก โดยมี synergistic action กับ IL-2 และ Interferon
4. เป็น co-factor ของ IL-6 ในการส่งเสริมการแบ่งตัวของ thymocyte ที่กระตุ้นด้วย mitogen ชักนำให้ T lymphocyte หลั่ง IL-2, IL-4 และ IL-6
5. เป็น co-factor ของ IL-4 หรือ IL-6 ในการส่งเสริมการพัฒนาการจาก B lymphocyte ไปเป็น plasma cell
6. ชักนำให้สร้าง และส่งเสริมการทำงานของ colony stimulating factor (CSF) และป้องกันไม่ให้ hematopoietic stem cell ถูกทำลายโดยสารพิษ

- มีฤทธิ์ต่อเซลล์หลายชนิดและอาจเป็นสาเหตุของโรคได้ เช่น มีฤทธิ์ต่อ synovial cell, osteoclast, osteoblast และ chondrocyte ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิด arthritis และ bone resorption ฤทธิ์ต่อ islet of Langerhans อาจนำไปสู่การเกิดเบาหวานชนิดที่ 1 มีฤทธิ์ต่อไต อาจเกิด lupus nephritis และ immune complex glomerulonephritis มีฤทธิ์สลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ ทำให้เกิด negative nitrogen balance ฤทธิ์ต่อ endothelial cell อาจก่อ vasculitis และ atherosclerosis

IL-1 receptor antagonist (IL-1 ra) มีโครงสร้างคล้าย IL-1 ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ IL-1 ด้วยการแย่งจับกับ IL-1 receptor ถูกสร้างและหลั่งโดย mononuclear phagocyte ที่ถูกกระตุ้นโดย Ag-Ab complex Interleukin-6 (IL-6) เซลล์ที่มีบทบาทมากที่สุดในการสร้าง คือ macrophage มีฤทธิ์ ดังนี้

- ชักนำให้มีการสร้าง acute phase protein โดย hepatocyte ซึ่งจะปรากฏในร่างกายพร้อมๆ กับที่มี acute inflammation
- ส่งเสริมการสร้าง Ab โดยออกฤทธิ์ในระยะท้ายของการเปลี่ยนแปลงจาก B lymphocyte ไปเป็น plasma cell
- ส่งเสริมการสร้าง cytotoxic T lymphocyte เพื่อตอบสนองต่อ alloantigen
- มีบทบาทในการสร้างเม็ดเลือดหลายชนิด เช่น เสริมฤทธิ์ของ IL-3 ให้ hematopoietic stem cell แบ่งตัว เสริม M-CSF ในการสร้าง macrophage พบว่า IL-6 ชักนำให้ myeloid leukemic cell เปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น granulocyte ปกติ จึงอาจใช้รักษา myeloid leukemia ได้

Interleukin-8 (IL-8) มีฤทธิ์ ดังนี้

- ทำให้ Neutrophil เกาะติดกับ endothelial cell ของเส้นเลือด และส่งเสริม degranulation
- เป็น chemotactic factor ของ basophil และ T lymphocyte

Interleukin-10 (IL-10) สร้างโดย Activated macrophage มีฤทธิ์ ดังนี้

- เป็น negative feedback ของ macrophage
- ยับยั้ง IL-12 และ TNF- α
- ยับยั้ง co-stimulator และ MHC class II

Interleukin-12 (IL-12) สร้างโดย macrophage มีฤทธิ์ ดังนี้

- กระตุ้นการสร้าง TNF- γ จาก T lymphocyte และ NK cell
- เปลี่ยน naïve T lymphocyte เป็น TH1 คือ เกี่ยวข้องกับ CMIR
- กระตุ้น NK cell และ cytotoxic T lymphocyte ถูกยับยั้งโดย IL-10

Tumor necrosis factor (TNF) มี 2 ชนิด คือ TNF- α สร้างโดย mononuclear phagocyte และ TNF- β สร้างโดย T lymphocyte มีฤทธิ์ ดังนี้

1. ส่งเสริมการเดินทางออกจากเส้นเลือดของเม็ดเลือดขาว นั่นคือ TNF ส่งเสริม inflammatory response
2. ส่งเสริม phagocytosis ของ polymorphonuclear cell และส่งเสริมการสร้าง hydrogen peroxide ใน macrophage
3. เพิ่มการปรากฏของ MHC ทั้ง 2 class
4. กระตุ้นเซลล์ต่างๆ ให้หลั่ง IL-1, IL-6, IL-8 และ TNF เอง
5. ทำลายเซลล์เนื้องอก
6. ทำให้เกิดอาการไข้ และมีการสร้าง acute phase protein จึงเกี่ยวกับ inflammation
7. ทำให้เกิด cachexia (การมีสุขภาพเสื่อมโทรม และอยู่ในภาวะขาดอาหารอย่างมาก)
8. ทำให้เกิด toxic (septic) shock syndrome
9. กัดการสร้างเม็ดเลือดในไขกระดูก

Chemokine มี CC chemokine สร้างจาก Neutrophil และ CXC chemokine สร้างจาก lymphocyte Cytokine ที่มีบทบาทใน Adaptive immunity

Interleukin-2 (IL-2) ส่วนใหญ่ผลิตโดย CD4+ helper T lymphocyte ฤทธิ์ที่สำคัญ มีดังนี้

1. ทำให้ helper T lymphocyte แบ่งตัว แล้วสร้างและหลั่ง IL-2 และ cytokine อื่นๆ
2. ทำให้ B lymphocyte แบ่งตัวและกระตุ้นการสร้าง Ab ถ้าขาด IL-2 จะเกิดภาวะ immunological tolerance
3. ทำให้ NK cell แบ่งตัวและมีความสามารถในการสลายเซลล์แปลกปลอมสูงขึ้น
4. ทำให้ monocyte สร้าง IL-1 และมีความสามารถในการสลายเซลล์แปลกปลอมสูงขึ้น

Interleukin-4 (IL-4) เซลล์ที่สร้างคือ T lymphocyte มีฤทธิ์ดังนี้

1. มีฤทธิ์ต่อ B lymphocyte ต่างๆ คือ เพิ่ม IgM บนผิว ซึ่งเพิ่มความสามารถใน กระบวนการ antigen recognition, เพิ่มจำนวน MHC class II presentation ทำให้ antigen presentation เพิ่มขึ้น, ส่งเสริมการปรากฏตัวของ IgE receptor ชักนำให้สร้างและหลั่ง IL-6 และ TNF และส่งเสริมการสร้าง IgG1 และ IgE แต่กีดการสร้าง IgM, IgG2 และ IgG3
2. กระตุ้นให้ thymocyte แบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่แก่ขึ้น
3. กระตุ้น T lymphocyte เองให้แบ่งตัว และกระตุ้น pre-cytotoxic T lymphocyte แบ่งตัว และเปลี่ยนเป็น cytotoxic T lymphocyte
4. กระตุ้นให้ NK cell แบ่งตัว และลดความสามารถในการหลั่ง TNF

5. ส่งเสริมการปรากฏของ MHC class II บน phagocyte แต่ลดจำนวน IgG receptor ส่งเสริมการหลั่ง G-CSF, M-CSF และ C2 แต่ขัดขวางการหลั่ง IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α และ PGE2 ของ monocyte และ macrophage
6. ชักนำให้เกิดการสร้าง mast cell, basophil และ Eosinophil
7. ทำให้ T lymphocyte เกาะติดกับผนังเส้นเลือดเพิ่มขึ้น
8. ขัดขวางการเจริญเติบโตของเนื้องอกบางชนิด

Interleukin-5 (IL-5) เซลล์ที่สร้างคือ helper T lymphocyte มีฤทธิ์ ดังนี้

1. ทำให้ B lymphocyte แบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงเป็น plasma cell
2. ส่งเสริม IL-2 ในการสร้าง LAK cell
3. เป็น chemotactic factor สำหรับ Eosinophil
4. กระตุ้น hematopoietic stem cell ให้แบ่งตัวและเปลี่ยนเป็น Eosinophil

Type II IFN หรือ IFN- γ ส่วนใหญ่สร้างโดย CD4+ T lymphocyte และ CD8+ T lymphocyte เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ดังกล่าวพบกับ Ag การสร้างนี้ได้รับการส่งเสริมจาก IL-2 มีหน้าที่ดังนี้

- ขัดขวางการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์ และขัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์
- กระตุ้นการทำงานของ monocyte/ macrophage IFN- γ เป็น cytokine ชนิดหนึ่งที่เป็น macrophage activating factor (MAF) โดยออกฤทธิ์ชักนำให้มีการสร้าง enzyme ที่ทำให้เกิด respiratory burst

cytokine ที่เป็น MAF ได้แก่ GM-CSF, IL-1 และ TNF

- ส่งเสริมการทำงานของ NK cell ซึ่งมีฤทธิ์แรงกว่า type I IFN
- เพิ่มการปรากฏของ class I MHC บนเซลล์แปลกปลอม รวมทั้งเซลล์ร่างกายที่ติดเชื้อไวรัสด้วย เป็นผลให้ cytotoxic T lymphocyte ทำงานได้ดี และเพิ่มการปรากฏของ class II MHC บน APC
- มีฤทธิ์โดยตรงต่อ cellular immunity และ humoral immunity
- ขัดขวางการสร้างเม็ดเลือดในร่างกาย Cytokine ที่เกี่ยวกับ hematopoiesis

Interleukin-3 (IL-3) สร้างโดย T lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นด้วย Ag จำเพาะ และ mast cell ที่มี IgE จำเพาะบนผิวเซลล์ที่ถูกกระตุ้น มีฤทธิ์ ดังนี้

1. กระตุ้น hematopoietic stem cell แล้วทำให้เกิดการสร้างเม็ดเลือดทุกชนิด ยกเว้น T lymphocyte และ B lymphocyte ทำให้เกิดการสร้าง phagocyte มาทำลายสิ่งแปลกปลอม
2. มีฤทธิ์ต่อ macrophage คือ กระตุ้นการแบ่งตัว เพิ่มความสามารถในการ phagocytosis และทำให้เกิดการสร้าง class II MHC, LFA-1, IL-1, IL-6 และ TNF- α
3. ทำให้ eosinophil มีชีวิต และเพิ่มความสามารถในการ phagocytosis และ ADCC
4. ทำให้ mast cell มีชีวิตอยู่ได้

5. ทำให้ basophil ที่ถูกกระตุ้นด้วย C5a หลั่ง histamine และ leukotriene เพิ่มขึ้น

Interleukin-7 (IL-7) สร้างโดย stromal cell ในไขกระดูก มีฤทธิ์ คือ

1. ทำให้ pro-B lymphocyte และ pre-B lymphocyte แบ่งตัว
2. ส่งเสริมการเกิด cytotoxic T lymphocyte

Interleukin-9 (IL-9) สร้างโดย helper T lymphocyte มีฤทธิ์ส่งเสริมการสร้างเม็ดเลือดแดง Migration inhibitory factor (MIF) ยับยั้งการเดินทางของ macrophage

Transforming growth factor- β (TGF- β) มีฤทธิ์ ดังนี้

1. เป็น chemotactic factor ของ monocyte และกระตุ้น monocyte ให้หลั่ง IL-1, IL-6, TNF- α และ TNF- β
2. ขัดขวางการสร้าง lymphocyte, monocyte และ Neutrophil
3. ขัดขวางการเพิ่มจำนวนและการทำหน้าที่ของ NK cell
4. ขัดขวางการหลั่ง Ig หลายชนิด แต่ส่งเสริมการสร้าง IgA

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการสร้าง คือ macrophage, endothelial cell และ T lymphocyte มีฤทธิ์ คือ

1. กระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดหลายชนิดให้แบ่งตัวและเปลี่ยนแปลง ซึ่งอาจช่วยรักษาและป้องกันภาวะ pancytopenia ในผู้ป่วยหลังได้รับยาฆ่ามะเร็งได้
2. กระตุ้นหรือขัดขวางการสร้าง cytokine ของเซลล์หลายชนิด

Granulocyte - colony stimulating factor (G-CSF) เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการสร้าง คือ macrophage, endothelial cell, fibroblast และ T lymphocyte มีฤทธิ์ คือ

1. กระตุ้นให้มีการสร้าง Neutrophil จึงอาจใช้รักษาภาวะ neutropenia
2. กระตุ้นให้เกิด respiratory burst ใน Neutrophil และทำให้ Neutrophil มีชีวิต
3. เป็น chemotactic ของ monocyte

Macrophage - colony stimulating factor (M-CSF) มีฤทธิ์ ดังนี้

1. กระตุ้นให้มีการสร้าง macrophage
2. กระตุ้น macrophage ให้หลั่ง cytokine เช่น IL-1, G-CSF และ M-CSF เอง

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เดือนฉาย เจริญเรืองสกุล และคณะ (2560) ศึกษาความหลากหลายของชนิดปรสิตที่พบในปลา กะพงแดง (*Lutjanus johnii*) และปลากระพงข้างปาด (*Lutjanus russellii*) จากการเก็บตัวอย่างปลา

กะพงแดง และปลากะพงข้างปาน จำนวน 100 ตัว บริเวณอ่าวไทยตอนล่าง บริเวณจังหวัดสุราษฎร์ธานี ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2559 นำมาตรวจหาปรสิตที่อวัยวะต่างๆ ทั้งภายนอกและภายใน พบพยาธิทั้งหมด 3 ไฟลัม ได้แก่ Platyhelminthes, Nematoda และ Arthropoda ปรสิตที่พบในปลากะพงแดง *L.johnii* พบจำนวนชนิดของปรสิต 8 สกุล 15 ชนิดเป็นปรสิตภายนอก 12 ชนิด (*Euryhaliotremajohni*, *E. tenuiaccessorium*, *E. chrysotaeniae*, *E. spirotubiform*, *E. longibaculoides*, *E. lisae*, *Euryhaliotrema* sp., *Euryhaliotrema* larvae, Caligid copepod, *Gnathia* sp., *Hatschekia* sp. และ *Lernanthropus* sp.) และเป็นปรสิตภายใน 3 ชนิด (Unidentified trematode, *Philometra* sp. และ หนอนตัวกลมกลุ่ม Ascaridoid) โดย

E. tenuiaccessorium เป็นชนิดที่พบมากที่สุด รองลงมาได้แก่ *E. johni* ส่วน *E. chrysotaeniae* เป็นพยาธิที่พบน้อยที่สุดในปลากะพงข้างปาน *L. russellii* พบปรสิตทั้งหมด 7 ชนิด เป็นปรสิตภายนอก 6 ชนิด (*Euryhaliotremachrysotaeniae*, *E. spirotubiform*, *Euryhaliotremalvae*, Caligid copepod, *Brachiellalutiani* และ *Gnathia* sp.) และเป็นปรสิตภายใน 1 ชนิด (*Anisakis* larvae) พบ *E. chrysotaeniae* สูงสุด รองลงมาได้แก่ Caligid copepod และ *Brachiellalutiani* เป็นปรสิตที่พบน้อยที่สุด

มฤตติ สนธิ และคณะ (2559) ติดตามความชุก และความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิตภายนอกของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เลี้ยง ในกระชัง บริเวณ ปากแม่น้ำท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี พ.ศ. 2556 โดยการเก็บตัวอย่างปลากะพงที่บริเวณปากแม่น้ำท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรีสุ่มตัวอย่างปลาทั้งหมด 167 ตัว โดยตัดส่วนของซี่เหงือก (gill filament) ทั้งสองข้างออกจาก gill arch มาวางบนเพลทที่มีน้ำเกลือ (ปลา 1 ตัว มี เหงือก 8 อัน ส่องตรวจทุกซี่เหงือก) ในกรณีที่พบปรสิตขนาดใหญ่ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จะใช้แหนบดึง ออกมาวางในเพลทที่มีน้ำเกลือ นำมาแยกชนิด และนับจำนวน จากนั้นวางชิ้นเหงือกลงบนแผ่นสไลด์ หยดน้ำเกลือลง ไป 1 หยด แล้วปิดด้วยแผ่น cover slip ใช้แรงพอเหมาะกดเบา ๆ เพื่อให้ซี่เหงือกแผ่ออก จากนั้นนำไปส่องด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 10-100 เท่า บันทึกชนิดและปริมาณของพยาธิที่พบ ซึ่งจากการศึกษาพบปรสิต 2 ชนิด ที่บริเวณเหงือกเท่านั้น ได้แก่ ปลิงใส *Diplectanum* sp. และโคพีพอด *Lernanthropus* sp. ความชุกของปลิงใสตลอดทั้งปีเท่ากับ 100% โดยเดือนที่มีความหนาแน่นเฉลี่ยสูงอยู่ ในช่วงเดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน (75.07-105.20 parasites/ fish) ปริมาณของปลิงใสที่พบมีความสัมพันธ์ใน ทิศทางตรงกันข้ามกับอุณหภูมิ น้ำ แต่มีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันกับขนาดของปลา สำหรับโคพีพอด *Lernanthropus* sp. พบในเดือนมกราคมถึงมิถุนายนเท่านั้น โดยความชุก และระดับความหนาแน่นเฉลี่ยเท่ากับ 25-100% และ 0.50-4.10 parasites/ fish ตามลำดับ รวมทั้งอุณหภูมิกับความเค็มมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันกับปริมาณของโคพีพอดที่พบ จากการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงการปรากฏของปรสิตภายนอกในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชังในแต่ละเดือน

นิรัตติศัย เพชรสุภา และ สุวิมล นิลรัตน์ (2551) ศึกษาพยาธิสภาพของปลากะพงขาวที่มีปรสิตในจังหวัดปัตตานี ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2548 ถึง เดือนมกราคม 2549 โดยสุ่มตัวอย่างปลากะพงขาวขนาด 300-500 กรัม พบปรสิตในปลาทุกตัวจากตัวอย่างปลาทั้งหมด 30 ตัวโดยพบปรสิต 4 ชนิด คือ *Argulus foliacious*, *Diplectanum latesi*, *D. papaverensis* และ *Terranova* sp. โดย *Diplectanum latesi* เป็นปรสิตที่พบมากที่สุด คือร้อยละ 63.33 *D. papaverensis* และ *Terranova* sp. เป็นพยาธิที่พบบ่อยละ 33.33 และ 26.70 ตามลำดับ ขณะที่ *Argulus foliacious* เป็นชนิดของปรสิตที่พบน้อยที่สุดคือร้อยละ 10.00 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิ สภาพของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อปรสิต

เหล่านี้คือ ตกเลือด บวมน้ำ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การอักเสบ การเสื่อมสภาพและการ ตายของเซลล์ เนื้อเยื่อ

สุรพล และอัจฉราภรณ์ (2527) ศึกษาการกระจายตัวของแพลงก์ตอนสัตว์ชนิดที่สำคัญในอ่าวไทย ตอนใน รายงานว่าความชุกชุมของแพลงก์ตอนสัตว์ กลุ่ม Copepod จะพบมากในฤดูฝนโดยเฉพาะปากแม่น้ำบางปะกง อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของการไหลบ่าจากน้ำจืดถึงแม้จะทำให้ความเค็มของน้ำลดลง แต่เป็นการนำพาธาตุอาหารต่างๆ มาทำให้เป็นแหล่งที่อุดมสมบูรณ์เหมาะแก่การเจริญเติบโตของแพลงก์ตอน สัตว์

ศุภพงษ์ นพพันธ์ (2556) ศึกษาปรสิตภายนอกที่พบในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เลี้ยงใน กระชัง บริเวณปากแม่น้ำท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี ช่วงเวลาที่ทำการศึกษาดังแต่เดือนมีนาคม ถึงเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2556 โดยวิธีการส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยปรสิตได้ถูกระบุว่าเป็นกลุ่มโมโน จิน (*Diplectanum* sp.) และกลุ่มโคฟีพอด (*Lernanthropus* sp.) โดยความชุกของทั้งสองชนิดจะพบ เฉพาะบริเวณเหงือกเท่านั้น กลุ่มโคฟีพอด (*Lernanthropus* sp.) ที่พบมากที่สุดในเดือนเมษายน (41 ตัว) ในช่วงฤดูร้อนปรสิตมีความชุกสูง

Alexander et al. (2013) ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการฟักไข่และวงจรชีวิตของ *Lernanthropus latis* ในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชังทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย โดยนำ ตัวอย่างปลาที่มีความชุกของปรสิตร้อยละ 80-100 มาเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิและความเค็มที่ต่างกัน กำหนดอุณหภูมิของน้ำที่ 22, 30, 32, 34 องศาเซลเซียส และความเค็มที่ 0, 11, 22, 35, 40 ppt พบว่าภายใน 6 ชั่วโมงไข่ฟักที่อุณหภูมิของน้ำทั้งหมด > 95% 30 ชั่วโมงต่อมา ที่อุณหภูมิ 30, 32 และ 34 องศาเซลเซียส และภายใน 60 ชั่วโมงที่ 22 องศาเซลเซียส ไข่ทั้งหมดฟักที่อุณหภูมิ 30 และ 32 องศาเซลเซียส (อัตราการฟักอยู่ที่ 98 และ 92% ตามลำดับ) ความเค็ม 11 ppt (อัตราการฟักอยู่ที่ 1.6%) และความเค็มที่ 0 ppt ไข่ไม่สามารถฟักตัวได้ จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความเค็มที่มีผลต่อ วงจรชีวิตของปรสิตภายนอกในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชังทางตอนเหนือประเทศออสเตรเลีย

Manera and Dezfuli (2003) ศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยาของปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) ที่มี ปรสิต *Lernanthropus* sp. ในประเทศกรีซ โดยสุ่มตัวอย่างปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) 20 ตัว มาตรวจหาปรสิตภายนอก ซึ่งจากการศึกษาพบปรสิต *Lernanthropus* sp. เพศเมีย บริเวณซี่เหงือกของตัวอย่างปลากะพง 7 ตัว ร้อยละ 35 และปริมาณความชุกอยู่ในช่วง 1-24 ปรสิต/โฮสต์ ส่วนที่พบปริมาณ *Lernanthropus* sp. มากที่สุดคือ primary lamellae และ ส่วน secondary lamellae เนื้อเยื่อฉีกขาด เหงือกซีด จากการถูกดูดเลือด และกัดทำลาย

กิจการ ศุภมาตย์และคณะ (2530) ศึกษาองค์ประกอบเลือดบางประการของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) คือ องค์ประกอบของเซลล์เม็ดเลือด ได้แก่ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ค่าฮีมาโต คิต และฮีโมโกลบิน องค์ประกอบทางเคมีของเลือดได้แก่ ปริมาณกลูโคส ปริมาณโปรตีนรวม แคลเซียม ไอออนและอนินทรีย์ฟอสเฟตในน้ำเลือด นอกจากนี้ยังศึกษาเอนไซม์บางชนิด คือ glutamic oxalacetic และ glutamic pyruvic transaminase, lactate dehydrogenase และ alkaline phos phatase พบว่าฮีมาโตคริตมีแนวโน้มสูงขึ้นในปลาที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และปลากะพงขาวที่มีน้ำหนักและมีความยาวอยู่ ในช่วง 41.60-136.22 กรัม และ 13.80-22.00 เซนติเมตร ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันของ องค์ประกอบ

Esteban *et al.*, (2000) ศึกษาเกี่ยวกับเซลล์เม็ดเลือดของปลากะพงขาว ได้จำแนกประเภทของเซลล์เม็ดเลือด โดยวิธี flow cytometry ศึกษาลักษณะผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ และทำการศึกษาลักษณะผ่านทางกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทั้งแบบส่องผ่านและส่องกราด แยกได้ตามคุณสมบัติ FSC (ขนาด) และ SSC (ลักษณะเม็ดเลือด) ซึ่งการศึกษานี้เผยให้เห็นว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวที่แยกได้โดย flow cytometry ประกอบด้วย 2 กลุ่มเซลล์หลัก กลุ่มเซลล์แรกได้แก่เซลล์ขนาดเล็ก (3-5 ไมโครเมตร) มีแกรนูลน้อย ประกอบไปด้วย thrombocytes และ lymphocytes กลุ่มเซลล์ที่สองได้แก่เซลล์ขนาด 6-9 ไมโครเมตร มีแกรนูลมาก ประกอบไปด้วย granulocytes และ monocyte / macrophages การใช้วิธี flow cytometry ร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้สามารถแยกแยะประเภทของเซลล์เม็ดเลือดที่แตกต่างกันออกไปได้ในระดับที่สูงขึ้น ถึงแม้เลือดของปลากะพงขาวจะมีโลหิตวิทยาเหมือนกับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังทั่วไป แต่มีบางอย่างที่ไม่เหมือนกัน เช่น การมีเซลล์อ่อนของเม็ดเลือดแดง พลาสมาเซลล์ monocyte/macrophages ในระบบไหลเวียนเลือด และรูปร่างที่แตกต่างของ thrombocytes

Vectesi *et al.*, (2011) ศึกษาการตอบสนองทางโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว (*Dicentrarchus labrax*) ในระยะสั้นต่อการเพิ่มระดับของไนเตรทในน้ำ ภายใต้การเพาะเลี้ยงที่หนาแน่นที่ส่งผลให้มีแอมโมเนียเพิ่มขึ้น การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนใหญ่มีระดับความเข้มข้นของไนเตรทต่ำกว่า 50 ppm แต่ในระบบเลี้ยงที่หนาแน่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบหมุนเวียนระดับความเข้มข้นไนเตรทมักเกิน 100 ppm ซึ่งจะส่งผลทำให้ปลากะพงขาวมีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องตั้งแต่ระดับความเข้มข้นของไนเตรทที่ 100 ppm

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การปรากฏของ *Lernanthropus sp.* บริเวณปากแม่น้ำบ้านท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี

3.1.1 การสุ่มเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างปลากระพงขาวที่เลี้ยงในกระชังจำนวน 3 กระชัง กระชังละ 15 ตัวพร้อมทั้งเก็บน้ำตัวอย่างบริเวณรอบ ๆ กระชัง กระชังละ 3 จุด บริเวณปากแม่น้ำบ้านท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ.2561 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ.2561 มาทำการศึกษา ณ ห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขต จันทบุรี โดยจะทำการเก็บตัวอย่างเดือนละ 1 ครั้ง เพื่อสำรวจปรสิต *Lernanthropus sp.*

3.1.2 วิจัยเบื้องต้น

1. บันทึกน้ำหนัก และวัดความยาวของปลากระพงขาว
2. ตรวจสอบลักษณะภายนอกเบื้องต้นด้วยตาเปล่า เช่น ผิวหนัง เมือก แผลเปื่อยการตกเลือด เกล็ด และครีบ

3.1.3 การตรวจหาปรสิตภายนอก

1. วางยาสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลู ความเข้มข้น 100 ppm แล้วตรวจหาพยาธิ *Lernanthropus sp.* จดบันทึกจำนวนของปรสิตที่พบในซีเหงือกของปลา
2. เมื่อตรวจพบพยาธิในซีเหงือกของปลากระพงขาว ให้ตัดส่วนของซีเหงือก (gill filament) ให้หมดทั้งสองข้าง มาวางบนหยดน้ำที่อยู่บนสไลด์ และปิดด้วย cover slip นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

3.1.4 การบันทึกผล

1. น้ำหนัก และความยาวของปลากระพงขาว
2. ลักษณะภายนอกตามการวิจัยเบื้องต้น
3. ผลการวิจัย
 - จำนวนปรสิต *Lernanthropus sp.* ที่พบ
4. ค่าความหนาแน่นเฉลี่ย (Mean intensity)

$$\text{Mean intensity} = \frac{\text{จำนวนปรสิต}}{\text{จำนวนปลากระพงขาวที่พบปรสิต}}$$

5. เปอร์เซ็นต์ค่าความชุก (Prevalence %)

$$\text{Prevalence \%} = \frac{\text{จำนวนปลาที่พบปรสิต}}{\text{จำนวนปลากระพงขาวทั้งหมด}} \times 100$$

3.1.5 การเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำ

เก็บข้อมูลคุณภาพน้ำทั้ง 3 กระชัง กระชังละ 3 จุด โดยเก็บแนวรอบของกระชัง และแบ่งการเก็บออกเป็นข้อมูลภาคสนาม และข้อมูลในห้องปฏิบัติการ

1. ข้อมูลภาคสนาม (Field survey data)

1.1 เก็บตัวอย่างน้ำใส่ลงในขวดโพลีเอธิลีน แล้วนำไปแช่ในถังน้ำแข็ง เพื่อนำไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการต่อไป

1.2 ตรวจวัดคุณภาพน้ำบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง

ความเค็ม

อุณหภูมิ

ความเป็นกรดต่าง (pH)

ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO)

ความโปร่งใสของน้ำ (Transparency)

2. ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ (Laboratory data)

2.1 การตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย (Parsons et al., 1984)

นำตัวอย่างน้ำมากรองผ่านกระดาษกรอง GF/C ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร และวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำในหลอดทดลอง โดยใช้ปริมาตรน้ำตัวอย่าง 5 มิลลิเมตร เติมสารละลาย Phenol, Sodium nitroprusside และ Oxidizing reagent ปริมาตร 0.2 0.2 และ 0.5 มิลลิเมตรตามลำดับ ผสมสารให้เข้ากัน นำไปเก็บในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง (ห้ามเกิน 2 ชั่วโมง) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยเครื่อง Spectrophotometer บันทึกผลและนำค่าการดูดกลืนแสง (Absorbent) ไปคำนวณหาความเข้มข้นของแอมโมเนีย (มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) โดยใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานแอมโมเนีย ($Y = mx + c$)

2.2 การตรวจวัดปริมาณไนไตรท์ (Parsons et al., 1984)

นำตัวอย่างน้ำมากรองผ่านกระดาษกรอง GF/C ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร และวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำในหลอดทดลอง โดยใช้ปริมาตรน้ำตัวอย่าง 5 มิลลิเมตร เติมสารละลาย Sulfanilamide solution และ N-NED ปริมาตร 0.1 และ 0.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ ผสมสารให้เข้ากันเก็บไว้นาน 30 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร โดยเครื่อง Spectrophotometer บันทึกผลและนำค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ไปคำนวณหาความเข้มข้นของไนไตรท์ (มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) โดยใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานไนไตรท์ ($Y = mx + c$)

2.3 การตรวจวัดปริมาณไนเตรท (APHA, 1999)

นำตัวอย่างน้ำมากรองผ่านกระดาษกรอง GF/C ขนาด 0.45 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร

จากนั้นคำนวณหาผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากการวัดที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร แล้วจึงนำผลต่างที่ได้ไปหาค่าความเข้มข้นของไนเตรท (มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) โดยใช้สมการเส้นตรง ($Y = ax + b$) จากกราฟมาตรฐานของไนเตรท และนำความเข้มข้นที่ได้มาลบกับความเข้มข้นของไนโตรทในชุดตัวอย่างเดียวกัน

2.4 การตรวจวัดปริมาณออร์โธฟอสเฟต (Parsons et al., 1984)

นำตัวอย่างน้ำมากรองผ่านกระดาษกรอง GF/C ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร และวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำในหลอดทดลอง โดยใช้ปริมาตรน้ำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Mix reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน เก็บไว้นาน 5 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร โดยเครื่อง Spectrophotometer บันทึกผลและนำค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ไปคำนวณหาความเข้มข้นของฟอสเฟต (มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัสต่อลิตร) โดยใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานฟอสเฟต ($Y = mx + c$)

3.1.6 การศึกษาองค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาว

1. การหาเปอร์เซ็นต์ค่าเม็ดเลือดแดงอัตโนมัติ

ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 24G (มีการเปลี่ยนแปลงตามขนาดของปลา) ดูดเลือดปลากะพงขาวใส่หลอด capillary tube ให้เต็มหลอดแล้วนำดินน้ำมันอุดปลายด้านอีกด้านหนึ่ง ต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเลือดที่ได้จากการปั่นมาวัดความยาวของความสูงของเลือดทั้งหมด

2. การจำแนกชนิดเซลล์เม็ดเลือดขาว

หยดเลือดปลากะพงขาวลงบน Slide และ Smear slide ปล่อยให้แห้งให้แห้ง (ห้ามใช้ความร้อน) หยดสี Wright's stain ให้ท่วมจับเวลา 6 นาที จากนั้นหยด Buffer นำลูกยางเป่า Wright's stain และ Buffer ให้ผสมกันจับเวลา 4 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อจำแนกชนิดต่อไป (นับจนครบ 100 เซลล์) แล้วบันทึกผล

3.1.7 การศึกษาการแสดงออกของยีนในปลากะพงขาวที่มีการเกาะติดของปรสิตที่บริเวณเหงือก

1. RNA extraction and cDNA synthesis

นำเนื้อเยื่อไต และเหงือก แบ่งกลุ่มการทดลอง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ (control; $n = 5$) และกลุ่มที่ติดเชื้อ (Infection; $n = 5$) มาสกัด RNA โดยใช้ TRIzol (Invitrogen, USA) แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของ RNA โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำ RNA ที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen, USA) แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของ cDNA โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม เก็บไว้ที่ -20°C

2. Real-time qPCR

วิเคราะห์การแสดงออกของยีน MHCII (Dan et al., 2013) และ TGF- β (Faliex et al., 2008) โดยมี β -actin เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ คือ ไต และเหงือก โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 4 ซ้ำ (4 technical replicates) โดยใช้ Real-time PCR ของ StepOne Plus Real-Time PCR System (ABI, USA) โดยมีปฏิกิริยาต่อ 1 reaction (10 μ l) ดังนี้ 2 μ l น้ำกลั่น, 0.5 μ l (10 uM) ในแต่ละไพรเมอร์ (ตารางที่ 1), 5 μ l PowerUp SYBR Green Master Mix (ABI, USA) และ 2 μ l cDNA template (10 ng) และเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR 40 รอบ ดังนี้ 95°C 15 วินาที 60 °C 20 วินาที 72°C 25 วินาทีและวิเคราะห์ค่า Relative quantification โดยใช้วิธีการคำนวณแบบ $2^{-\Delta\Delta CT}$

ตารางที่ 3-1 ตารางแสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ Real-time qPCR

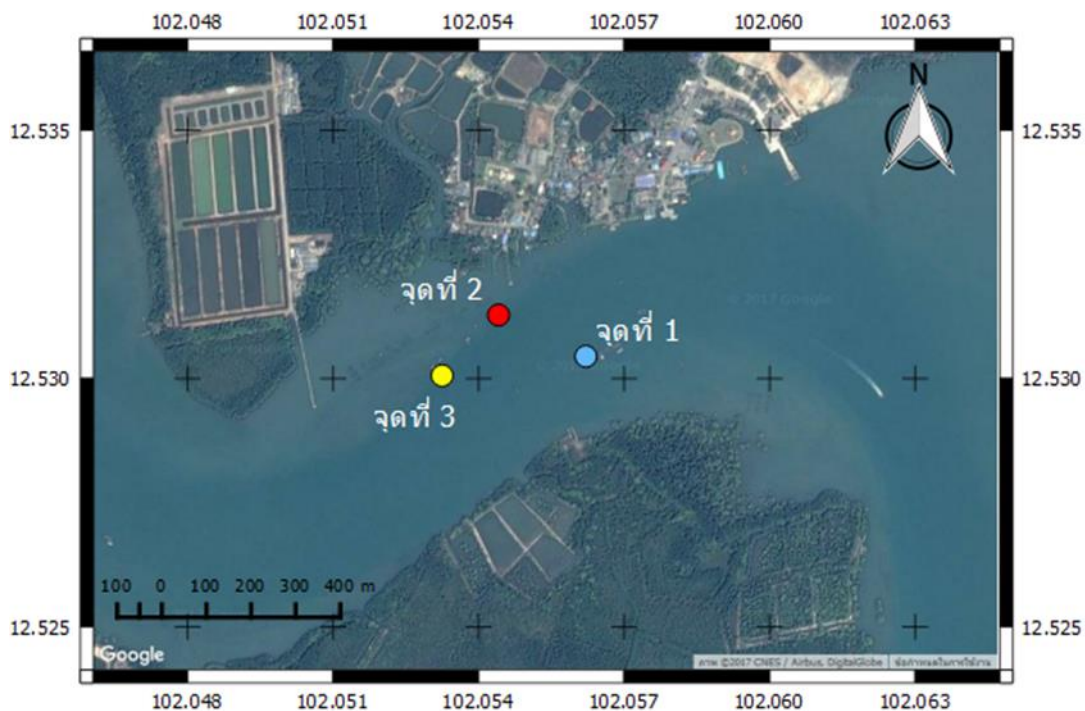
Gene	Primer sequence	GENBANK	Ref.
β -actin	F: TACCACCGGTATCGTCATGGA R: CCACGCTCTGTCAGGATCTTC	GU188683.1	Paria et al. (2016)
TGF- β	F: GACCTGGGATGGAAGTGGAT R: CAGCTGCTCCACCTTGTTG	AF140363	Faliex et al. (2008)
MHCII	F: CACGCCAGCCTGAGAGAAC R: CCAGCCAGAGATAAGACCAGAC	FJ598318	Dan et al. (2013)

3.2 จุดเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาพะพงขาวที่เลี้ยงในกระชังจำนวน 3 กระชัง กระชังละ 15 ตัว พร้อมทั้งเก็บน้ำตัวอย่างบริเวณรอบ ๆ กระชัง กระชังละ 3 จุด บริเวณปากแม่น้ำบ้านท่าแลบ จังหวัดจันทบุรี

ตารางที่ 3-2 พิกัดจุดเก็บตัวอย่าง

จุดเก็บตัวอย่าง	พิกัด	
	Latitude	Longitude
กระชังที่ 1	12°31'52.6"N	102°03'15.9"E
กระชังที่ 2	12°31'48.2"N	102°03'11.7"E
กระชังที่ 3	12°31'49.6"N	102°03'22.4"E



ภาพที่ 3-1 พิกัดจุดเก็บตัวอย่าง

3.3 สถานที่ทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการชั้น 4 อาคารเรียนรวม มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

3.4 การวิเคราะห์ผลการทดลองเชิงสถิติ

วิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าความหนาแน่นเฉลี่ย (mean intensity) ความชุก (prevalence) และค่าองค์ประกอบเลือดในแต่ละเดือน ด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของพาราไซท์ในแต่ละเดือน วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปรสิตกับค่าองค์ประกอบเลือด หาค่าความสัมพันธ์ของปัจจัยสภาพแวดล้อม รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำกับค่าองค์ประกอบเลือด ด้วยสถิติ Correlation analysis โดยใช้ R โปรแกรม (version 2.11.1 or greater)

4. ผลการวิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ของค่าองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น จำนวนเม็ดเลือดขาวจำแนกชนิด กับจำนวนปรสิต ความสัมพันธ์ระหว่างค่าองค์ประกอบเลือดกับคุณภาพน้ำ และการสำรวจปรสิต *Lernanthropus* sp. รวมทั้งค่าความชุก (prevalence) ค่าความหนาแน่นเฉลี่ย (mean intensity) และความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปรสิตกับคุณภาพน้ำ บริเวณกระชังเลี้ยงปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เลี้ยงในกระชังบริเวณบ้านท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี เป็นระยะเวลา 12 เดือน โดยทำการศึกษา 3 สถานี จำนวนปลากะพงขาวทั้งหมด 481 ตัว ตั้งแต่เดือน มกราคม 2561 จนถึง ธันวาคม 2561 สามารถวิเคราะห์ผลการทดลองได้ดังต่อไปนี้

4.1 ความยาวและน้ำหนักปลากะพงขาว

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างปลากะพงขาว ที่เลี้ยงในกระชังบริเวณปากแม่น้ำบ้านท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี ตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 จำนวน 481 ตัว วัดความยาวและชั่งน้ำหนักของปลากะพงขาวทั้ง 3 กระชัง โดยการวัดความยาวเริ่มจากปากถึงปลายหาง (total length) จากการศึกษาตลอดระยะเวลา 12 เดือน ปลากะพงขาวที่สุ่มเก็บตัวอย่าง มีความยาวในช่วง 14.5-50.0 เซนติเมตร มีน้ำหนักในช่วง 33.0-1400.0 กรัม และพบปรสิต *Lernanthropus* sp. มากที่สุดในเดือนมีนาคม รองลงมาคือเดือนเมษายน มกราคม กุมภาพันธ์ พฤษภาคม ธันวาคม พฤศจิกายน ตุลาคม และมีอุยายน ตามลำดับ สำหรับเดือน กรกฎาคม สิงหาคม และกันยายน ไม่พบปรสิต ดังแสดงใน ตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ค่าความยาว น้ำหนัก และจำนวนปรสิตของตัวอย่างปลากะพงขาว

เดือน	ความยาว (เซนติเมตร)	น้ำหนัก (กรัม)	พาราไซท์ (ตัว)
มกราคม N=46	24.6 - 44.0	155.0 - 940.0	96
กุมภาพันธ์ N=30	29.0 - 42.0	230.0 - 899.0	93
มีนาคม N=39	25.5 - 48.5	75.0 - 1200.0	243
เมษายน N=36	27.5 - 50.0	90.0 - 1095.0	153
พฤษภาคม N=37	28.0 - 50.0	200.0 - 1400.0	75
มิถุนายน N=5	14.5 - 27.0	33.0 - 62.0	2
กรกฎาคม N=45	17.0 - 26.0	80.0 - 150.0	0
สิงหาคม N=45	19.0 - 30.0	100.0 - 300.0	0

กันยายน N=46	21.0 – 33.0	110.0 – 400.0	0
ตุลาคม N=47	24.0 – 36.50	170.0 – 575.0	10
พฤศจิกายน N=45	25.00 – 36.50	170.0 – 600.0	18
ธันวาคม N=60	19.80 – 41.00	130.0 – 700.0	61

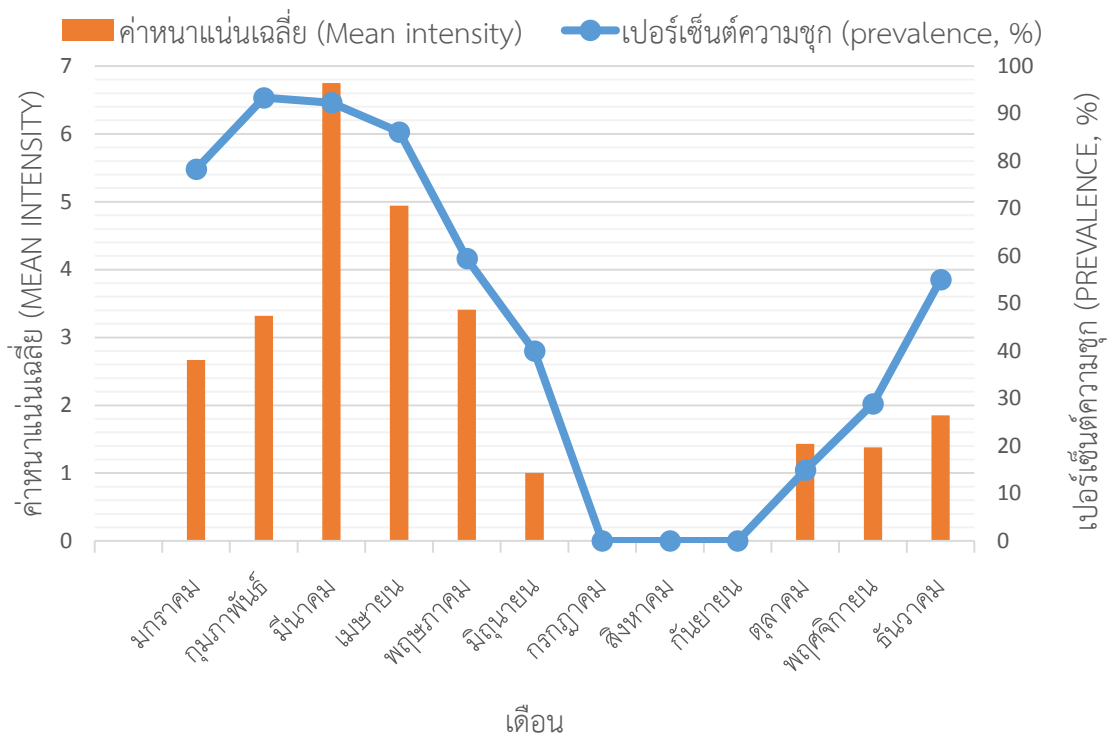
4.2 ความชุก (prevalence) และความหนาแน่นเฉลี่ย (mean intensity) ของปรสิต *Lernanthropus* sp.

จากการศึกษาพบว่าความชุก (prevalence) และความหนาแน่นเฉลี่ย (mean intensity) ของปรสิต *Lernanthropus* sp. ระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 พบว่ามีความชุกมากที่สุดในเดือนกุมภาพันธ์ รองลงมาเดือนมีนาคม เมษายน มกราคม พฤษภาคม ธันวาคม มิถุนายน พฤศจิกายน และตุลาคม ตามลำดับ สำหรับค่าความหนาแน่นเฉลี่ย (mean intensity) พบว่ามีความหนาแน่นเฉลี่ยมากที่สุดคือเดือนมีนาคม รองลงมาคือเดือนเมษายน พฤษภาคม กุมภาพันธ์ มกราคม ธันวาคม ตุลาคม พฤศจิกายน และมิถุนายน ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4-1

ตารางที่ 4-2 เปอร์เซ็นต์ความชุก (prevalence) และค่าความหนาแน่นเฉลี่ย (mean intensity) ของปรสิต *Lernanthropus* sp. ที่พบในปลากะพงขาว

เดือน	จำนวนปลาทั้งหมด	จำนวนปลาที่พบปรสิต	จำนวนปรสิต	เปอร์เซ็นต์ความชุก (prevalence, %)	ค่าหนาแน่นเฉลี่ย (Mean intensity±S.E) Tukey
มกราคม	46	36	96	78.26	2.67±0.34 ^c
กุมภาพันธ์	30	28	93	93.33	3.32±0.40 ^{bc}
มีนาคม	39	36	243	92.31	6.75±0.94 ^a
เมษายน	36	31	153	86.11	4.94±0.72 ^{ab}
พฤษภาคม	37	22	75	59.46	3.41±0.40 ^{bc}
มิถุนายน	5	2	2	40.00	1.00±0.24 ^{acd}
กรกฎาคม	45	0	0	0.00	0 ^d
สิงหาคม	45	0	0	0.00	0 ^d
กันยายน	46	0	0	0.00	0 ^d
ตุลาคม	47	7	10	14.89	1.43±0.09 ^{bcd}
พฤศจิกายน	45	13	18	28.89	1.38±0.11 ^{cd}
ธันวาคม	60	33	61	55.00	1.85±0.15 ^{cd}
รวม	481	208	751		

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4-1 เปอร์เซ็นต์ความชุก (prevalence) และความหนาแน่นเฉลี่ย (mean intensity) ของปรสิต *Lernanthropus* sp. ที่พบในปลากะพงขาว

4.3 ปัจจัยคุณภาพน้ำ

จากการวิเคราะห์ปัจจัยน้ำคุณภาพน้ำได้แก่ อุณหภูมิ น้ำ ความเค็ม ความเป็นกรดต่าง ความโปร่งใสของน้ำ ออกซิเจนละลายน้ำ แอมโมเนีย ไนโตรที่ ไนเตรท และฟอสเฟต ในรอบเดือนพบว่า อุณหภูมิอยู่ในช่วง 28.27-32.92 องศาเซลเซียส ความเค็ม 0-27-67 พีพีที ความเป็นกรดต่าง 6.57-7.82 ออกซิเจนละลายน้ำ 4.39-8.54 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความโปร่งใสของน้ำ 35.68-128.04 เซนติเมตร ค่าแอมโมเนียที่ละลายในน้ำ 0.0021-0.1512 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ค่าไนโตรที่ที่ละลายในน้ำ 0.0003-0.082 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ค่าไนเตรทที่ละลายในน้ำ 0.124-1.4490 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ค่าฟอสเฟตที่ละลายในน้ำ 0.0143 - 0.0512 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 คุณภาพน้ำในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง

คุณภาพน้ำ/ เดือน	มกราคม	กุมภาพันธ์	มีนาคม	เมษายน	พฤษภาคม	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	กันยายน	ตุลาคม	พฤศจิกายน	ธันวาคม
อุณหภูมิน้ำ (°c)	28.27	29.54	30.85	32.15	32.92	31.33	28.47	28.57	29.07	29.01	30.03	29.80
ความเค็ม (ppt) (Salinity)	27.67	25.00	24.14	20.77	17.00	26.00	5.00	0.00	12.00	5.02	13.00	24.00
ค่าความเป็น กรดต่าง(pH)	7.67	7.49	7.51	7.25	7.26	7.72	6.57	6.33	7.28	7.28	7.82	7.56
ปริมาณออก ซิเจนละลายน้ำ (mg/L)	6.06	6.08	6.43	6.05	4.39	5.3	7.48	7.65	8.51	7.21	7.65	8.54
ความโปร่งใส ของน้ำ(cm)	128.04	57.83	45.26	38.89	35.68	100.00	73.3	58.3	66.7	66.5	95.0	70.0
แอมโมเนีย (mg-N/L)	0.0381	0.0399	0.0431	0.0503	0.0305	0.124	0.0834	0.1512	0.0110	0.0349	0.0076	0.0021
ไนไตรท์ (mg-N/L)	0.0003	0.0012	0.0023	0.0036	0.0034	0.082	0.0003	0.0009	0.0007	0.0007	0.0002	0.0011
ไนเตรท (mg-N/L)	0.9002	1.1111	0.7850	0.8450	0.7235	0.124	0.7155	0.6127	0.7469	1.1856	1.0780	1.4490
ฟอสเฟต (mg-P/L)	0.0300	0.0299	0.0512	0.0379	0.0290	0.028	0.0228	0.0216	0.0235	0.0143	0.0183	0.0302

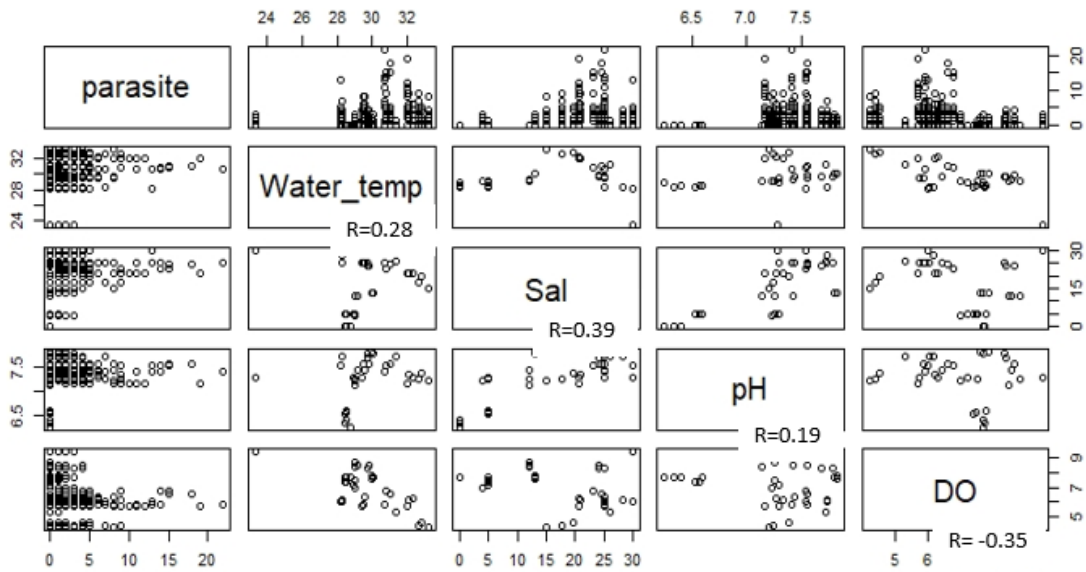
4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อมกับความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิต *Lernanthropus* sp.

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อมกับความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิตที่พบที่บริเวณเหนือของปลากระพงขาว พบว่าฟอสเฟต ความเค็ม อุณหภูมิ น้ำ ความเป็นกรด-ด่างมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปรสิตที่พบ ดังแสดงในตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-2 และ ภาพที่ 4-3

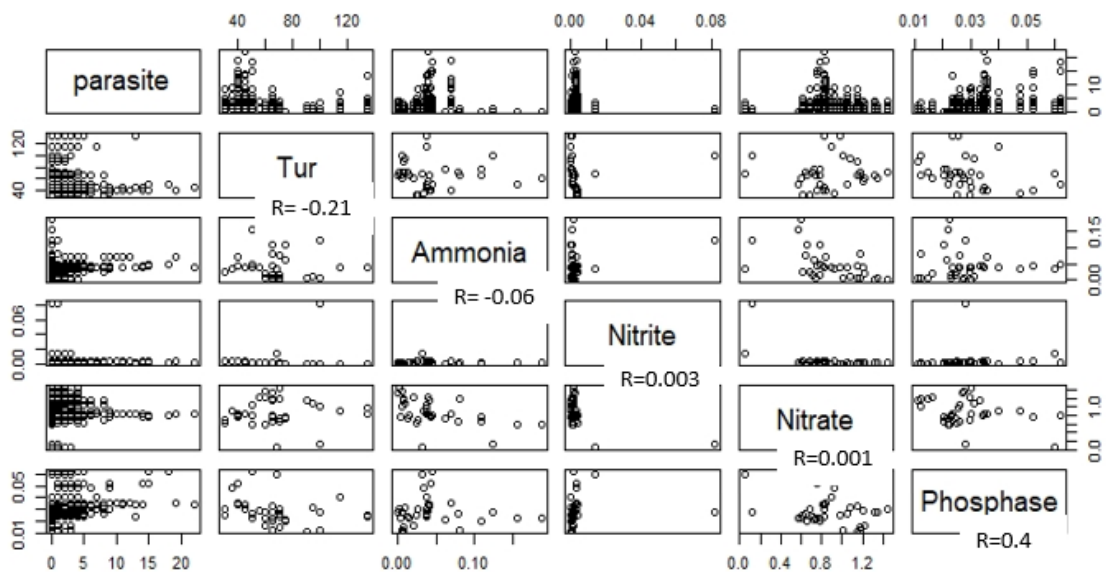
ตารางที่ 4-4 ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อมกับความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิต

คุณภาพน้ำ	ค่า R	ค่า R
อุณหภูมิน้ำ (°c) (Water temperature)	0.28	+
ความเค็ม (ppt) (Salinity)	0.39	+
ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)	0.19	+
ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO, mg/L)	- 0.35	-
ความโปร่งใสของน้ำ (cm) (Turbidity)	- 0.21	-
แอมโมเนีย (NH ₃ , mg-N/L)	- 0.06	-
ไนไตรท์ (NO ₂ , mg-N/L)	0.003	+
ไนเตรท (NO ₃ , mg-N/L)	0.001	+
ฟอสเฟต (PO ₄ ³⁻ , mg-N/L)	0.40	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย + แสดงถึง มีความสัมพันธ์กันเชิงบวกและเครื่องหมาย - แสดงถึง มีความสัมพันธ์กันเชิงลบ โดยความสัมพันธ์เชิงบวกหมายถึงตัวแปรทั้งสองตัวมีความเกี่ยวข้องกันและความสัมพันธ์เชิงลบหมายถึงตัวแปรทั้งสองตัวไม่มีความเกี่ยวข้องกัน



ภาพที่ 4-2 ความสัมพันธ์ระหว่างปรสิตกับอุณหภูมิน้ำ (Water_temp) ความเค็ม (Salinity) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO)



ภาพที่ 4-3 ความสัมพันธ์ระหว่างปรสิตกับความโปร่งใสของน้ำ (Turbidity) แอมโมเนีย (Ammonia) ไนไตรท์ (Nitrite) ไนเตรต (Nitrate) และฟอสเฟต (Phosphate)

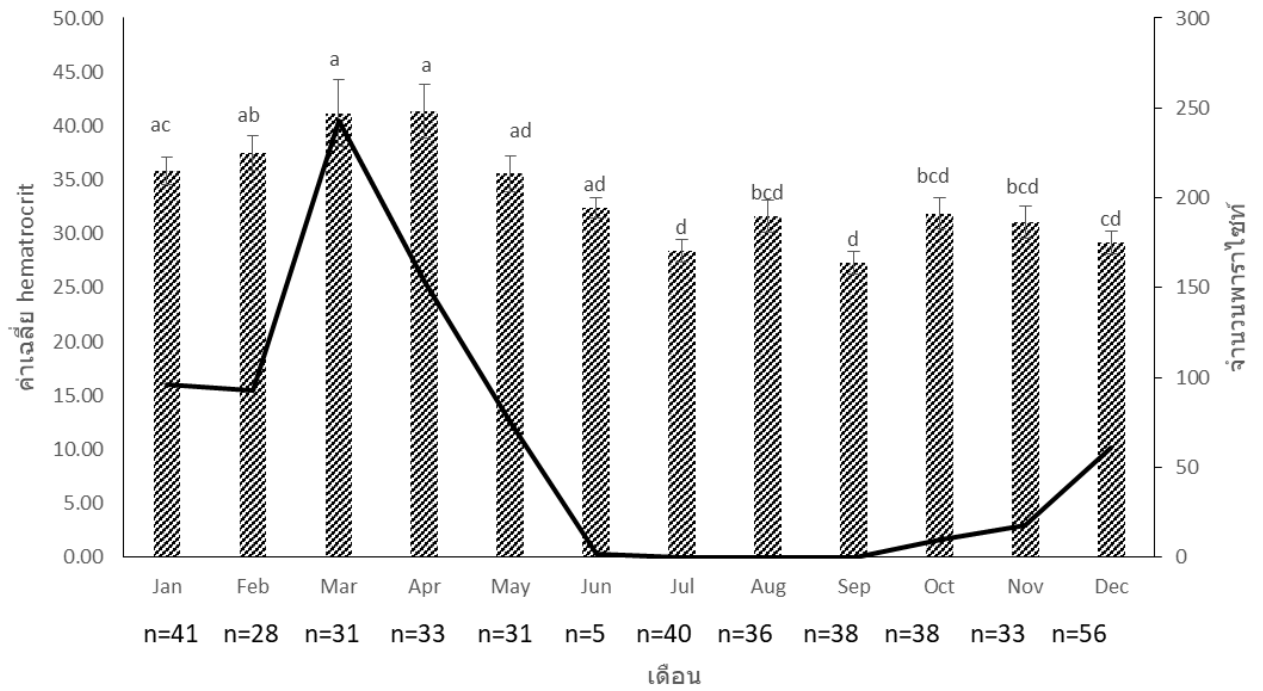
4.5 ค่าองค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาว

จากการวัดค่าองค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาว ได้แก่ ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) lymphocyte, monocyte และ neutrophil ของปลากะพงขาวทั้งหมด 434 ตัว พบว่า เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ยของปลาเพิ่มขึ้นในเดือนมีนาคมและเมษายน ส่วนปริมาณเม็ดเลือดชนิด lymphocyte พบประมาณ 80-90% ลดลงในเดือนมีนาคม และเมษายน เม็ดเลือดชนิด neutrophil พบประมาณ 3-20% และมีปริมาณมากในเดือนมีนาคมและเมษายน สำหรับเม็ดเลือดชนิด monocyte พบประมาณ 1-3% ดังตารางที่ 4-5 ภาพที่ 4-4 และภาพที่ 4-5

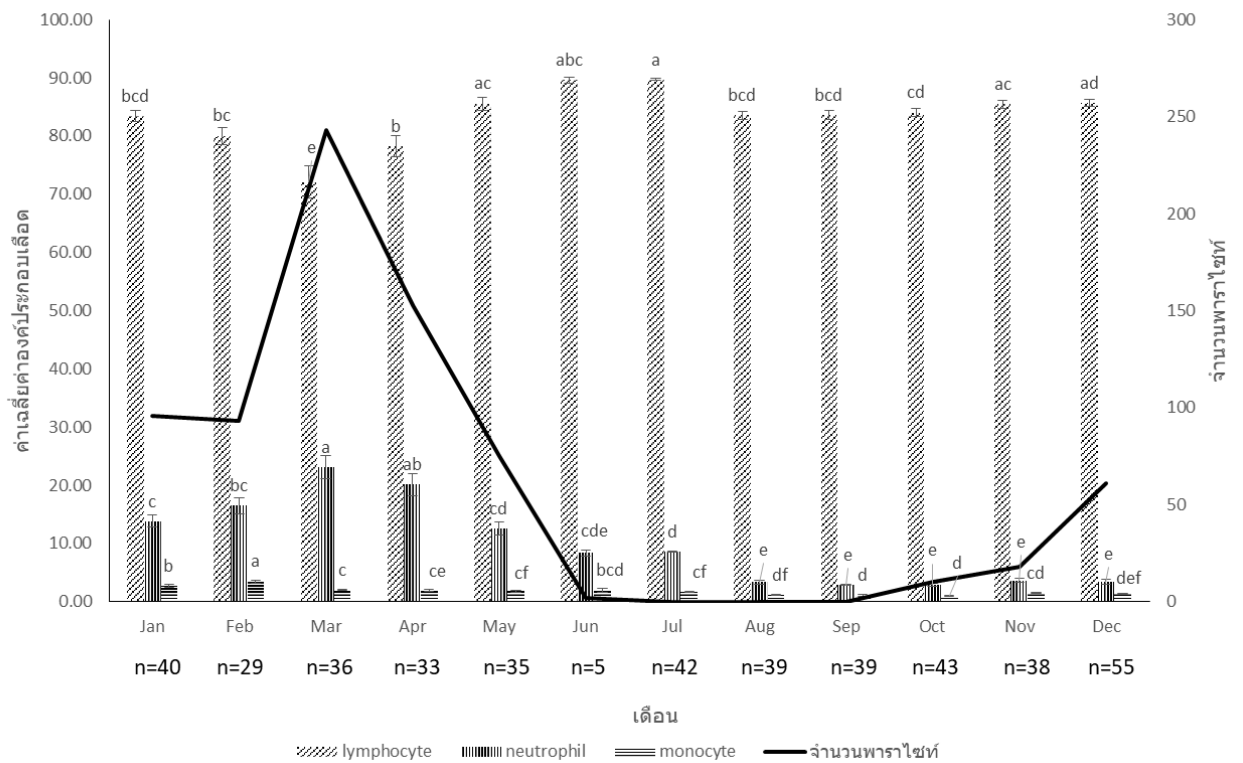
ตารางที่ 4-5 ค่าองค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาว ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561

เดือน	hematocrit (%)±SE	lymphocyte (%)±SE	monocyte (%)±SE	neutrophil (%)±SE
มกราคม	35.80±1.30 ^{ac}	83.43±1.03 ^{bcd}	2.75±0.22 ^b	13.83±1.04 ^c
กุมภาพันธ์	37.50±1.62 ^{ab}	80.03±1.47 ^{bc}	3.48±0.27 ^a	16.48±1.39 ^{bc}
มีนาคม	41.16±3.09 ^a	72.11±2.75 ^e	2.03±0.15 ^c	23.14±1.97 ^a
เมษายน	41.36±2.44 ^a	78.27±1.86 ^b	1.88±0.16 ^{ce}	20.15±1.89 ^{ab}
พฤษภาคม	35.58±1.63 ^{ad}	85.57±1.12 ^{ac}	1.83±0.14 ^{cf}	12.60±1.13 ^{cd}
มิถุนายน	32.40±0.93 ^{ad}	89.60±0.51 ^{abc}	2.00±0.32 ^{bcd}	8.40±0.51 ^{cde}
กรกฎาคม	28.40±1.04 ^d	89.69±0.20 ^a	1.71±0.09 ^{cf}	8.60±0.14 ^d
สิงหาคม	31.64±1.46 ^{bcd}	83.54±0.69 ^{bcd}	1.18±0.11 ^{df}	3.33±0.31 ^e
กันยายน	27.29±1.03 ^d	83.62±0.84 ^{bcd}	1.08±0.10 ^d	2.87±0.12 ^e
ตุลาคม	31.89±1.43 ^{bcd}	84.00±0.71 ^{cd}	1.07±0.09 ^d	2.91±0.25 ^e
พฤศจิกายน	31.09±1.47 ^{bcd}	85.45±0.74 ^{ac}	1.45±0.09 ^{cd}	3.61±0.35 ^e
ธันวาคม	29.20±1.06 ^{cd}	85.67±0.67 ^{ad}	1.31±0.09 ^{def}	3.40±0.40 ^e

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ไม่แตกต่างกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)



ภาพที่ 4-4 ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลากะพงขาว และจำนวนปรสิต
 หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแบ่งตามชนิดของเม็ดเลือดขาวมีความแตกต่างกันอย่างมี
 นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4-5 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดของปลากะพงขาวและจำนวนปรสิต

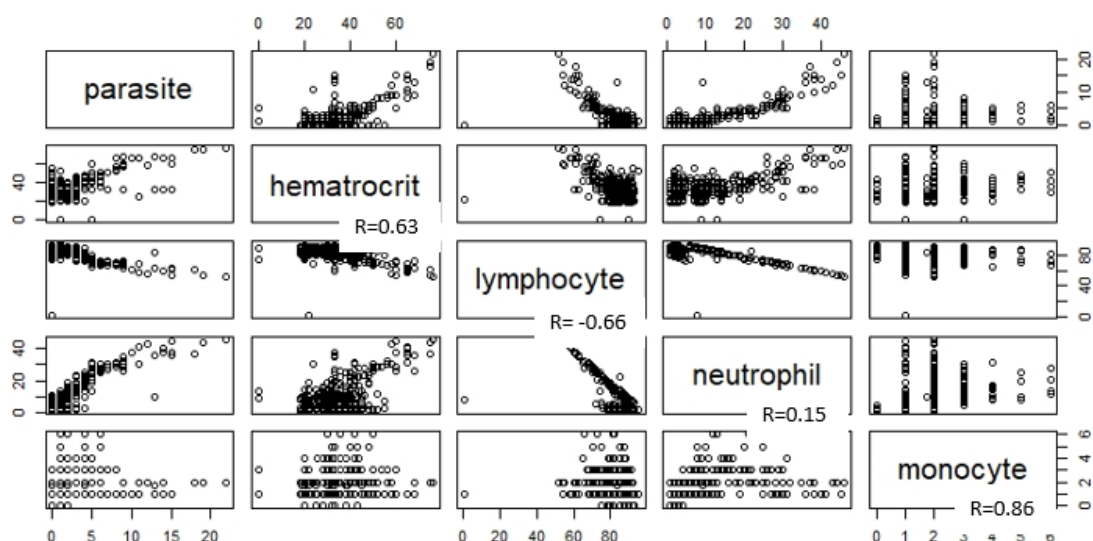
4.6 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปรสิตที่พบในเหงือก กับองค์ประกอบเลือดของปลา กะพงขาว

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และ จำนวนของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดกับจำนวนปรสิตที่พบบริเวณเหงือกปลากระพงขาวทั้งหมด 434 ตัว โดยใช้ correlation analysis พบว่า เพอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นกับจำนวนปรสิตมีความสัมพันธ์เชิงบวก ที่ $R = 0.63$ เม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte กับจำนวนพาราไซท์ความสัมพันธ์เชิงลบ ที่ $R = -0.66$ เม็ดเลือดขาวชนิด Monocyte กับจำนวนปรสิตมีความสัมพันธ์เชิงบวก ที่ $R = 0.86$ และเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil กับจำนวนปรสิตมีความสัมพันธ์เชิงบวก ที่ $R = 0.15$ โดยจำนวนปรสิตที่สูงขึ้นมีแนวโน้มทำให้ เพอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil และ Monocyte สูงขึ้น ในขณะที่เม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ต่ำลง แสดงดังตารางที่ 4-6 และภาพที่ 4-6

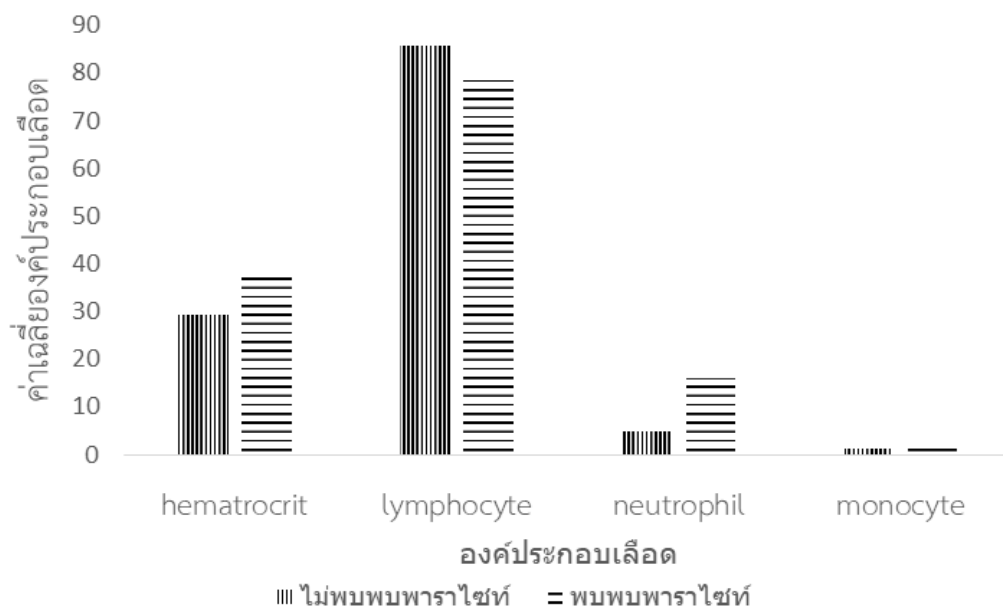
ตาราง 4-6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปรสิตกับองค์ประกอบเลือดปลา

องค์ประกอบเลือด/จำนวนปรสิต	R	R
เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น	0.63	+
lymphocyte	-0.66	-
monocyte	0.86	+
neutrophil	0.15	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย + แสดงถึง มีความสัมพันธ์กันเชิงบวกและเครื่องหมาย - แสดงถึง มีความสัมพันธ์กันเชิงลบ โดยความสัมพันธ์เชิงบวกหมายถึงตัวแปรทั้งสองตัวมีความเกี่ยวข้องกันและความสัมพันธ์เชิงลบ หมายถึงตัวแปรทั้งสองตัวไม่มีความเกี่ยวข้องกัน



ภาพที่ 4-6 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปรสิตกับองค์ประกอบเลือด



ภาพที่ 4-7 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดของปลากะพงขาวที่พบปรสิต (n=208 ตัว) และไม่พบปรสิต (n=274 ตัว)

4.7 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อมกับองค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาว

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ น้ำ ความเค็ม ความเป็นกรดต่าง ความโปร่งใสของน้ำ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ แอมโมเนีย ไนโตรท์ ไนเตรท และฟอสเฟต กับค่าองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและชนิดของเม็ดเลือดขาว โดยใช้วิธี correlation analysis พบว่า ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอุณหภูมิ น้ำ ความเค็ม ความเป็นกรดต่าง ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในน้ำ เม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความโปร่งแสง แอมโมเนีย ไนโตรท์ และไนเตรท เม็ดเลือดขาวชนิด Monocyte ความเค็ม ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในน้ำ ความเป็นกรดต่าง ความโปร่งใสของน้ำ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำและไนเตรท เม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil ความสัมพันธ์เชิงบวกกับความเค็ม อุณหภูมิ น้ำ ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในน้ำ ความเป็นกรดต่าง แสดงดังตารางที่ 4-7 และ 4-8 และภาพที่ 4-8 – 4-15

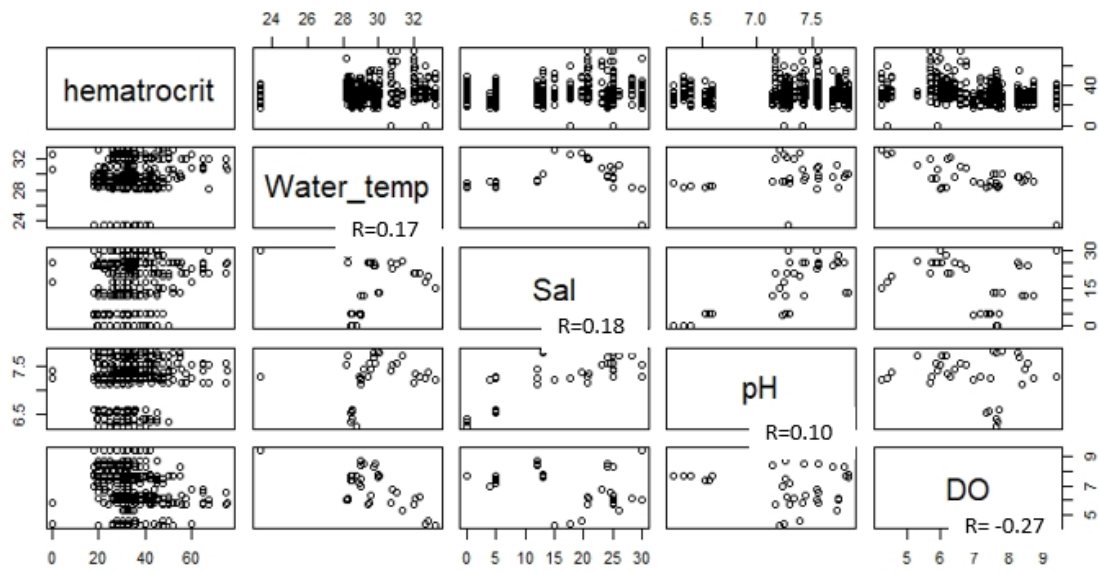
ตารางที่ 4-7 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าองค์ประกอบเลือดและคุณภาพน้ำ

คุณภาพน้ำ/ค่าองค์ประกอบเลือด	% Hematocrit	Lymphocyte	Monocyte	Neutrophil
อุณหภูมิ (°C) (Water temperature)	0.17	-0.13	0.10	0.34
ความเค็ม (ppt) (Salinity)	0.18	-0.20	0.36	0.39
ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)	0.10	-0.11	0.17	0.12
ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ	-0.27	0.16	-0.35	-0.52

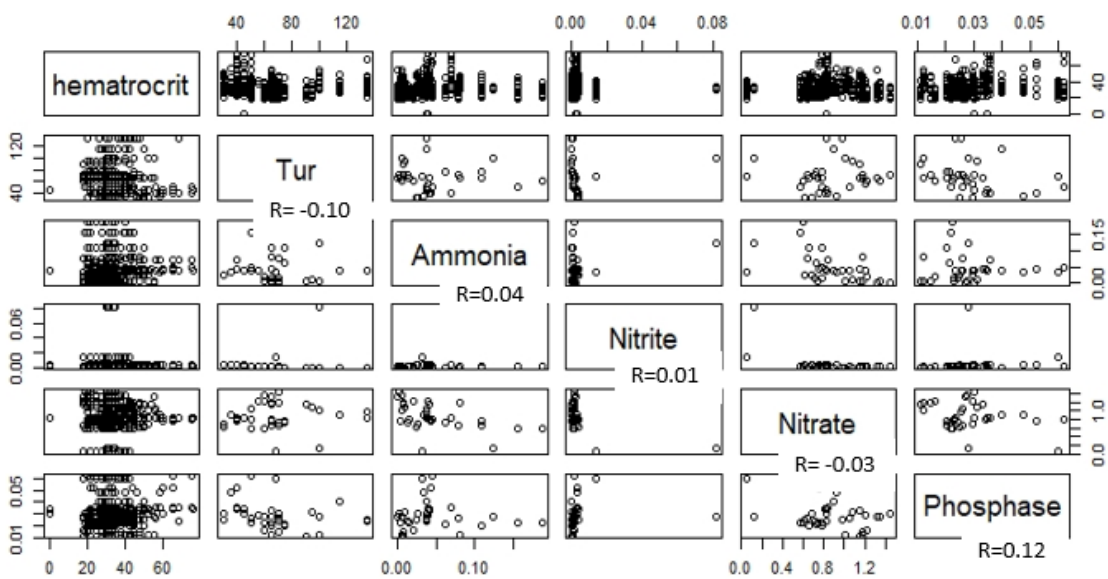
(DO, mg/L)				
ความโปร่งใสของน้ำ (cm) (Turbidity)	-0.10	0.18	0.13	-0.18
แอมโมเนีย (NH ₃ , mg-N/L)	0.04	0.01	-0.02	0.02
ไนไตรท์ (NO ₂ , mg-N/L)	0.01	0.10	0.03	0.02
ไนเตรท (NO ₃ , mg-N/L)	-0.03	0.0004	0.0003	-0.08
ฟอสเฟต (PO ₄ ³⁻ , mg-N/L)	0.12	-0.24	0.21	0.42

ตารางที่ 4-8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าองค์ประกอบเลือดและคุณภาพน้ำ

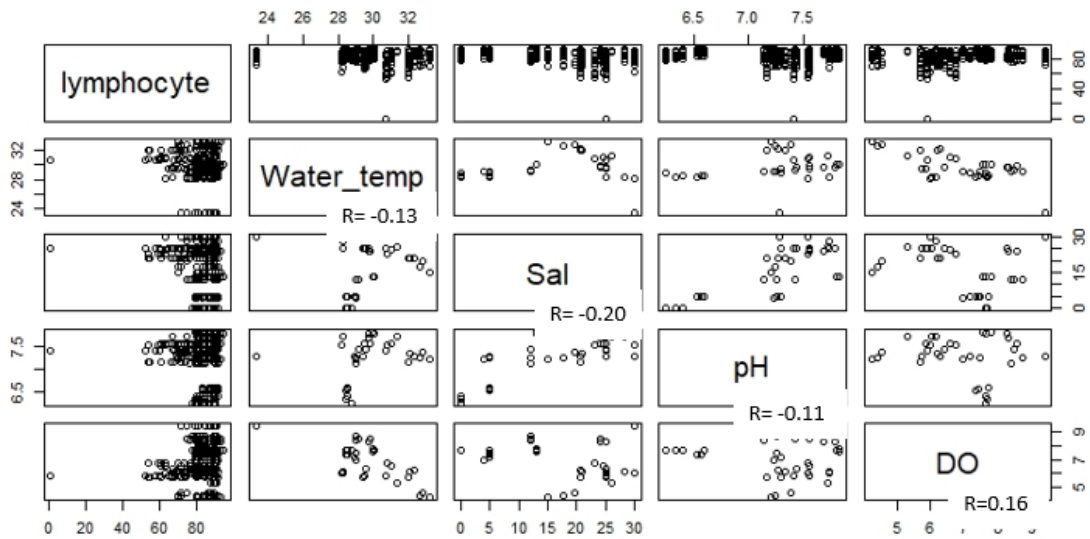
คุณภาพน้ำ/ค่า องค์ประกอบเลือด	% Hematocrit	Lymphocyte	Monocyte	Neutrophil
อุณหภูมิน้ำ (°C) (Water temperature)	+	-	+	+
ความเค็ม (ppt) (Salinity)	+	-	+	+
ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)	+	-	+	+
ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO, mg/L)	-	+	-	-
ความโปร่งใสของน้ำ (cm) (Turbidity)	-	+	+	-
แอมโมเนีย (NH ₃ , mg-N/L)	+	+	-	+
ไนไตรท์ (NO ₂ , mg-N/L)	+	+	+	+
ไนเตรท (NO ₃ , mg-N/L)	-	+	+	-
ฟอสเฟต (PO ₄ ³⁻ , mg-N/L)	+	-	+	+



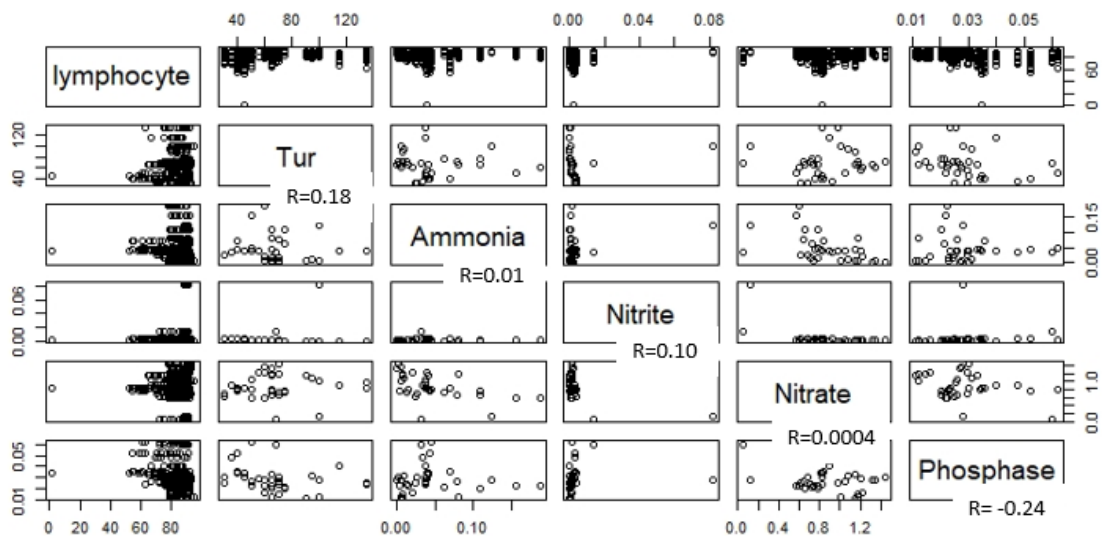
ภาพที่ 4-8 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นกับอุณหภูมิน้ำ (Water_temp) ความเค็ม (Salinity) ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO)



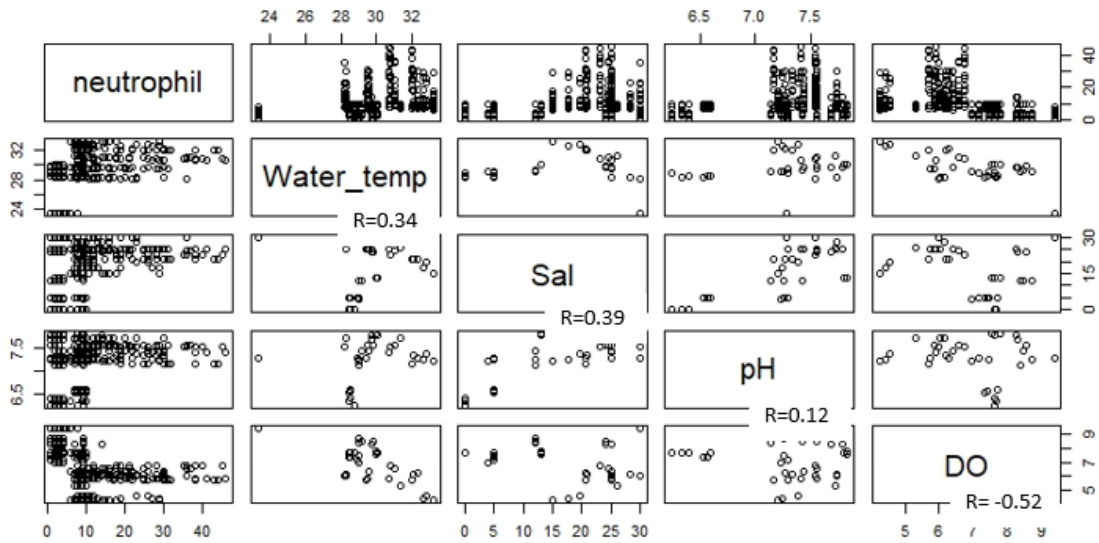
ภาพที่ 4-9 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นกับความโปร่งใสของน้ำ (Turbidity) แอมโมเนีย (Ammonia) ไนไตรท์ (Nitrite) ไนเตรท (Nitrate) และฟอสเฟต (Phosphate)



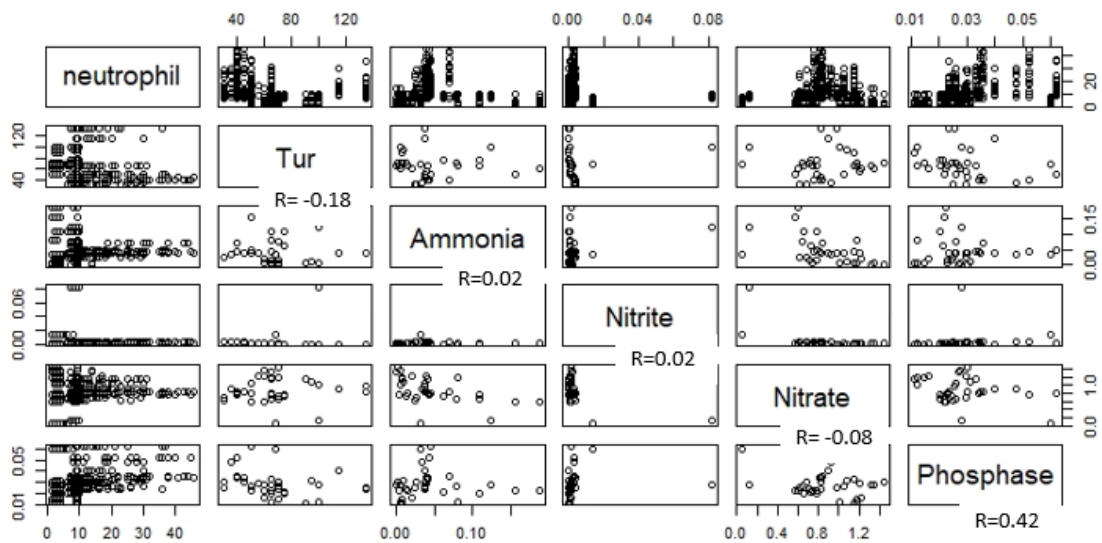
ภาพที่ 4-10 ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte กับอุณหภูมิน้ำ (Water temp) ความเค็ม (Salinity) ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO)



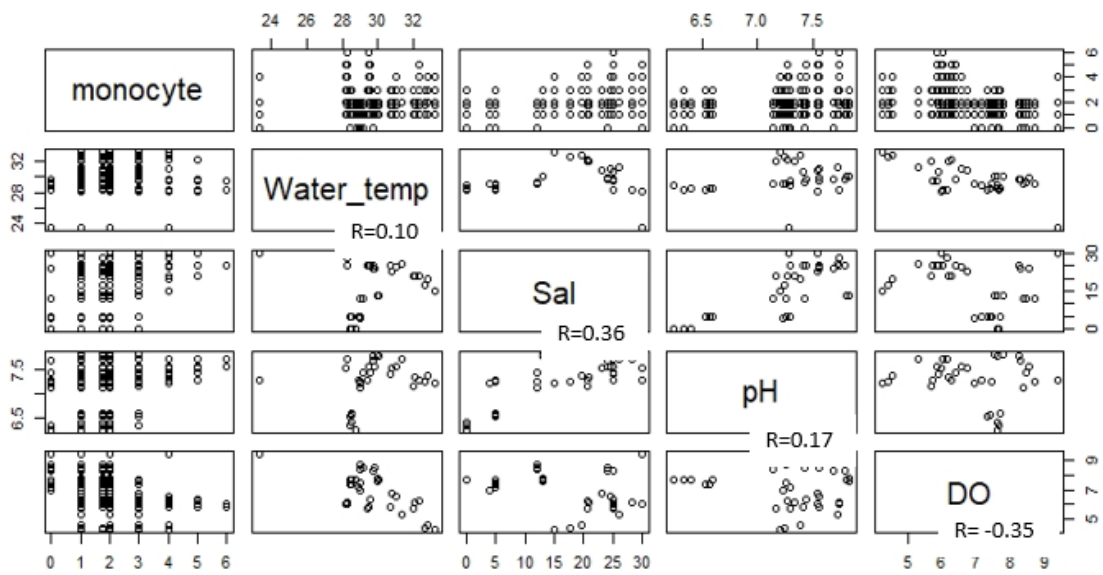
ภาพที่ 4-11 ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte กับความโปร่งใสของน้ำ (Turbidity) แอมโมเนีย (Ammonia) ไนไตรท์ (Nitrite) ไนเตรท (Nitrate) และฟอสเฟต (Phosphate)



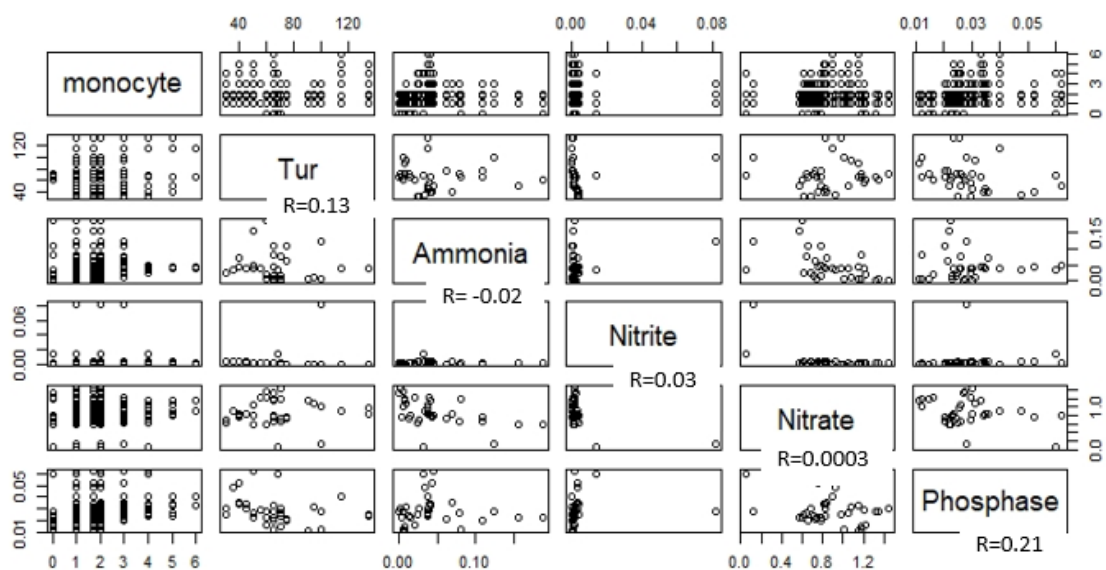
ภาพที่ 4-12 ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil กับอุณหภูมิน้ำ (Water temp) ความเค็ม (Salinity) ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO)



ภาพที่ 4-13 ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil กับความโปร่งใสของน้ำ (Turbidity) แอมโมเนีย (Ammonia) ไนไตรท์ (Nitrite) ไนเตรท (Nitrate) และฟอสเฟต (Phosphate)



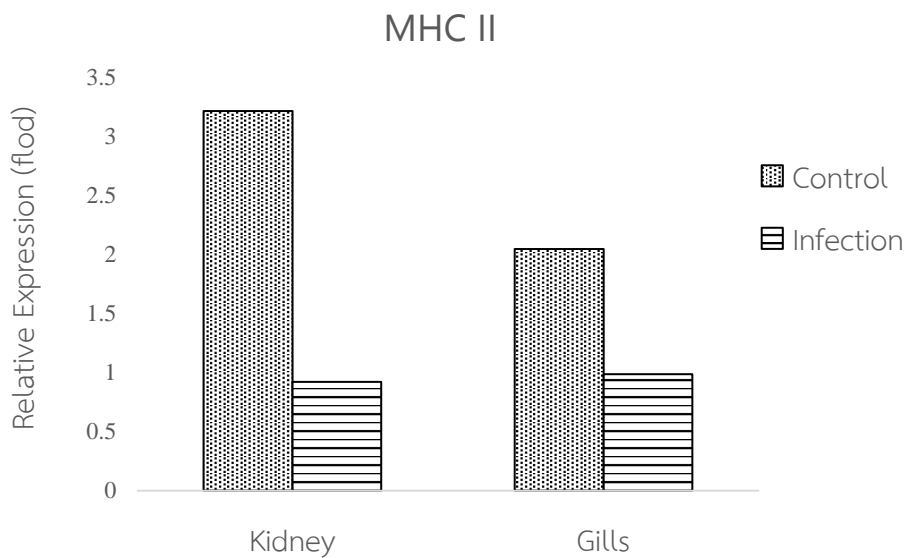
ภาพที่ 4-14 ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte กับอุณหภูมิน้ำ (Water temp) ความเค็ม (Salinity) ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO)



ภาพที่ 4-15 ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด Monocyte กับความโปร่งใสของน้ำ (Turbidity) แอมโมเนีย (Ammonia) ไนไตรท์ (Nitrite) ไนเตรท (Nitrate) และฟอสเฟต (Phosphate)

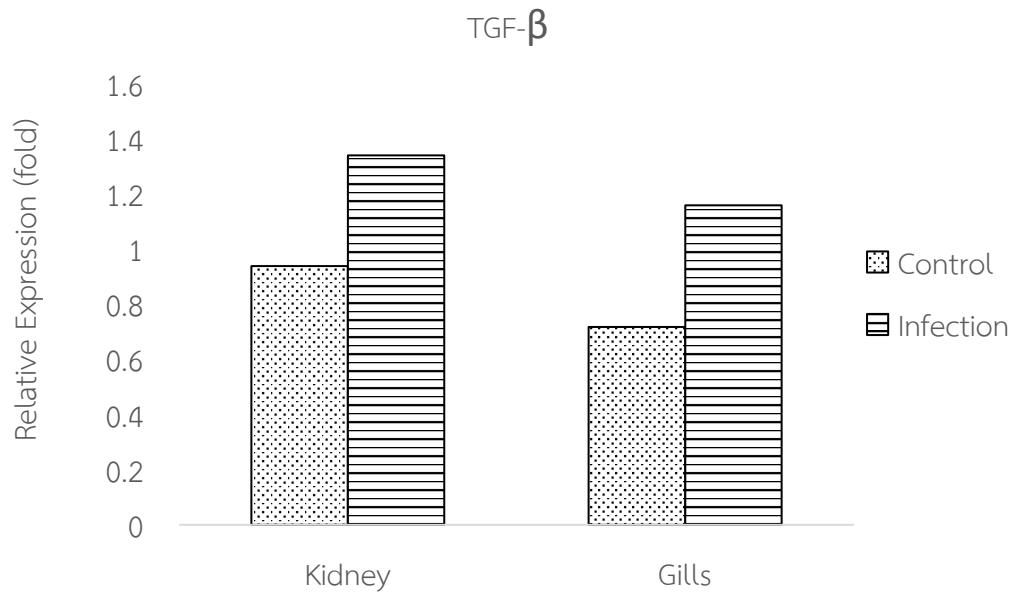
4.8 การศึกษาการแสดงออกของยีนในปลากระพงขาวที่มีการเกาะติดของปรสิตที่บริเวณเหงือก

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีการอักเสบจากการเกาะติดของปรสิต *Lernantropus* sp. โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ (control) และกลุ่มที่ติดเชื้อ (Infection) โดยกลุ่มที่ติดเชื้อจะมี *Lernantropus* sp. เข้าเกาะในบริเวณเหงือกมากกว่า 15 ตัวขึ้นไป จากผลการศึกษาจะเห็นว่า ในสภาวะปกติที่ปลาไม่มีการเกาะติดของปรสิต ยีน MHCII ในอวัยวะต่าง ๆ จะมีการแสดงออกสูง แต่เมื่อปลากระพงขาวมีการเกาะติดของปรสิตชนิดนี้ การแสดงออกของยีน MHCII ในไตและเหงือกปลาจะลดลง (down-regulated) ดังภาพที่ 4-16



ภาพที่ 4-16 กราฟวิเคราะห์การแสดงออกของยีน MHC II

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน TGF- β ในปลาในกลุ่มที่มีการเกาะติดของปรสิต และไม่มีการเกาะติด พบว่าในสภาวะปกติปลากระพงขาวมีการแสดงออกของยีนนี้ไม่สูงมากนัก ในอวัยวะต่าง ๆ แต่เมื่อมีการเกาะติดด้วยปรสิต ยีนนี้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (up-regulated) ดังภาพที่ 4-17



ภาพที่ 4-17 กราฟวิเคราะห์การแสดงออกของยีน TGF- β

5. อภิปรายและสรุปผล

5.1 อภิปรายผล

จากการศึกษาความชุกและความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิต *Lernanthropus* sp. ในเหงือกปลา กะพงขาว ที่เลี้ยงในกระชังบริเวณปากแม่น้ำบ้านท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี ตลอดปี พ.ศ. 2561 พบว่า ในช่วงเดือน มกราคม-มิถุนายน 2561 มีการปรากฏของปรสิตชนิดนี้ค่อนข้างสูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา ในปี 2556 โดย มลฤดี สนิธิ และคณะ (2559) พบปรสิตชนิดนี้ค่อนข้างสูงในช่วง มกราคม-มิถุนายน 2556 และจากการศึกษาของ มลฤดี สนิธิ และจันทร์จรัส วัฒนะโชติ (2560) ที่ศึกษาการปรากฏของปรสิตชนิดนี้ ในปลาที่เลี้ยงในบริเวณปากแม่น้ำแหลมสิงห์ จันทบุรี พบความชุกและความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิต *Lernanthropus* sp. ค่อนข้างสูงในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ มีนาคม พฤษภาคม และมิถุนายน พ.ศ. 2560 จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นว่าการปรากฏของปรสิตชนิดนี้ มีความแปรปรวนในระหว่างเดือน และพื้นที่ที่ทำการศึกษา ซึ่งเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อมกับความหนาแน่นของปรสิตที่พบ ในแต่ละเดือน พบว่าปริมาณของปรสิต *Lernanthropus* sp. ที่บริเวณเหงือกของปลากระพงขาวที่เลี้ยงใน กระชังบริเวณปากแม่น้ำบ้านท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี ตลอดปี พ.ศ. 2561 มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับ อุณหภูมิ น้ำ ความเค็ม และฟอสเฟต ในขณะที่การศึกษาในปี พ.ศ. 2556 พบว่าปริมาณของปรสิต *Lernanthropus* sp. ที่พบบริเวณเหงือกของปลากระพงขาวที่เลี้ยงในกระชังบริเวณปากแม่น้ำบ้านท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรีมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับอุณหภูมิ น้ำและความเค็ม รวมทั้งจากการศึกษาใน บริเวณปากแม่น้ำแหลมสิงห์ จันทบุรี พบว่าปริมาณของปรสิต *Lernanthropus* sp. ที่บริเวณเหงือกของ ปลากระพงขาวมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับ อุณหภูมิ น้ำ แอมโมเนีย และไนไตรท์ จากผลการศึกษาทั้งหมด นี้ แสดงให้เห็นว่าการปรากฏของปรสิตชนิดนี้ มีความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำ โดยปลาที่เลี้ยงในบริเวณปาก แม่น้ำท่าแฉลบที่มีการติดตามใน พ.ศ. 2556 และ 2561 ให้ผลการศึกษาที่ใกล้เคียงกัน และมีความ แตกต่างในพื้นที่ที่ทำการศึกษา แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าอุณหภูมิ น้ำ ความเค็ม เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการปรากฏหรือความชุกของปรสิต *Lernanthropus* sp. สำหรับปริมาณ ฟอสเฟต และแอมโมเนียที่ละลายในน้ำก็มีผลเช่นกัน แต่ให้ผลยังไม่ชัดเจน ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับการ ทดลองของ Braxenor and Hutson (2013) และรายงานไว้ว่า อุณหภูมิและความเค็มมีผลต่อการฟักไข่ ของ *Lernanthropus latis* โดยอุณหภูมิ 30-32 °C และความเค็มที่ 22-40 ppt. มีอัตราการฟักไข่สูง ที่สุด

ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) กับจำนวนพาราไซท์ที่มีความสัมพันธ์กัน ในเชิงบวก ($R=0.63$) เมื่อจำนวนของพาราไซท์เพิ่มขึ้นปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นก็สูงขึ้นเช่นกัน ปรสิต *Lernanthropus latis* จะจับหรือยึดเกาะกับเส้นใยเหงือกหรือตามลำตัวของปลา ส่งผลทำให้เหงือกหรือ ตามลำตัวของปลาได้รับความเสียหาย เช่น เกิดการกัดกร่อน เกิดการตกเลือด และจะพบเนื้อตายมากตาม แผ่นรองของเส้นใยเหงือก และรุนแรงขึ้นในบริเวณที่ยึดเกาะ ในกรณีที่ยังไม่ร้ายแรงอาจทำให้ปลากระพง ขาวเกิดอาการเครียด อ่อนแอ ส่งผลทำให้ปลาเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อน หรือติดเชื้อแบคทีเรีย และ ไวรัสเพิ่มขึ้น (Chu et al., 2012) ความเครียดส่งผลทำให้ปลาให้มีการบวนการเมตาบอลิซึมสูง ซึ่งในภาวะนี้ ต้องการออกซิเจนสูงในการปรับสมดุลของร่างกาย ดังนั้นปลาจึงมีการผลิตเม็ดเลือดแดงเพิ่มมากขึ้นเพื่อ ช่วยในการขนส่งออกซิเจน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นจึงสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Fazio et al., (2015) ที่ได้ ศึกษาผลกระทบของความเครียดขึ้นรุนแรงต่อน้ำตาลในเลือดและแลคเตส ในปลาอีคุด (*Sparus Aurata*)

ซึ่งได้ทำการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกทำการเก็บตัวอย่างเลือดหลังจากจับทันที กลุ่มที่ 2 ทำการเก็บตัวอย่างหลังจากที่ปลาเกิดความเครียด พบว่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของกลุ่มที่ 2 มีค่าสูงกว่ากลุ่มแรก เนื่องจากเกิดภาวะการบีบตัวของม้าม เพื่อปล่อยให้เม็ดเลือดแดงเข้าสู่กระแสเลือด จึงทำให้เลือดมีความเข้มข้นมากขึ้น

การจำแนกชนิดเม็ดเลือดขาวในปลากระพงขาวมีลักษณะแตกต่างกันไป ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ Lymphocyte, Neutrophil และ Monocyte เซลล์เม็ดเลือดขาวในที่นี่จะทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในตัวปลา จากการทดลองนับและแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่พบมากที่สุดคือ Lymphocyte รองลงมาคือ Neutrophil และ Monocyte ตามลำดับ เมื่อมีการติดเชื้อปรสิตชนิดนี้ เม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte จะมีปริมาณลดลง ในขณะที่เม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil และ monocyte มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยปกติปลาจะมีเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte มากที่สุดรองลงมาคือ Neutrophil และ Monocyte ทั้งนี้ปริมาณของเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil ที่มากกว่าเม็ดเลือดขาวชนิด Monocyte อาจเป็นผลมาจากกระบวนการอักเสบ เนื่องจากการพบเม็ดเลือดขาวในรอยโรคจะมีความแตกต่างกัน ตามระยะเวลาของการเกิดการบาดเจ็บ นั่นคือ ในช่วง 6 ถึง 24 ชั่วโมงแรก เซลล์ neutrophils จะเข้ามาในบริเวณรอยโรค หลังจากนั้นจะถูกแทนที่ ด้วยเซลล์ monocytes และ macrophages แทน สาเหตุเนื่องจากเซลล์ neutrophils มีจำนวนมากในกระแสเลือดจึงเข้ามา ในบริเวณที่มีการบาดเจ็บได้รวดเร็วกว่า แต่เซลล์ neutrophils มีอายุค่อนข้างสั้น หลังเข้ามาในรอยโรคแล้วจะเกิด apoptosis ใน 24 ถึง 48 ชั่วโมง ในขณะที่ monocytes มีอายุยาวนานกว่า (พิริยุทธ สิทธิไชยากุล, 2554) ซึ่งสอดคล้องกับ Jamalzadeh et al., (2009) ที่ได้ทำการศึกษาเซลล์เม็ดเลือดขาวในปลาแซลมอนที่มีสุขภาพดีและติดเชื้อรา พบว่าในปลาที่ได้รับการติดเชื้อราเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte มากที่สุด รองลงมาคือ Neutrophil, Eosinophile และ Monocyte ตามลำดับ โดย Lymphocyte และ Monocyte มีปริมาณลดลง Neutrophil และ Eosinophile มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับปลาสุขภาพดี อีกทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวมักจะลดลงในปลาที่มีสุขภาพดีและสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญสำหรับโรคติดเชื้อ

จากการศึกษาความสัมพันธ์องค์ประกอบเลือดกับคุณภาพน้ำโดยมีการวิเคราะห์ปัจจัย คุณภาพน้ำทั้งปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมี ปัจจัยทางกายภาพได้แก่ อุณหภูมิ น้ำ ความขุ่นใส และความเค็ม ส่วนปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ความเป็น กรด-ด่าง แอมโมเนีย ไนโตรเจน ไนเตรท และฟอสเฟต พบว่า คุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของปลา และไม่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบเลือดของปลาเมื่อเทียบกับค่ามาตรฐาน จากการศึกษาวิจัยของ วิจิตร กลิ่นเจริญ (2554) ศึกษาผลของ hypoxia ต่อค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีของโลหิตในปลาฟลาวเวอร์ฮอร์น (*Cichlidae*) โดยจากการทดลองลดปริมาณออกซิเจนในน้ำและมีการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนลงไปในน้ำ ซึ่งส่งผลให้ระดับออกซิเจนลดลงเป็นผลทำให้เกิดปลาความเครียด เมื่อปลาทกอยู่สภาวะที่เครียดเป็นเวลานาน ทำให้ฮอร์โมนในร่างกายเกิดความไม่สมดุล เกิดการยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันและเกิดการติดเชื้อได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าปลาที่มีลักษณะภายนอกมีการอักเสบ บวมแดง และเป็นแผล ปลาจะมีการสร้างเม็ดเลือดขาวมากขึ้น สำหรับค่าออกซิเจนละลายน้ำที่ไม่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบเลือดของปลาอยู่ที่ประมาณ 5.53 mg/L ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้เพราะค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่ได้จากการวิเคราะห์ มีความใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ กิจการ ศุภมาตย์และคณะ (2530) ได้ศึกษาองค์ประกอบเลือดปลากระพงขาวที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการและสภาพเลี้ยงในธรรมชาติ ซึ่งมีปริมาณออกซิเจนโดยเฉลี่ย

5.70 mg/l ค่า ความเค็มโดยเฉลี่ย 34.58 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7.8 อุณหภูมิน้ำ 26.2 °C และ แอมโมเนียที่ตรวจพบว่ามีค่าเพียง 3 µg/l (ppb) และรายงานว่าคุณสมบัติของน้ำดังกล่าวไม่ได้ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบเลือด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ จากงานวิจัยของ Abbas et al., (2011) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ต่างกันที่มีต่อองค์ประกอบเลือดของปลาคาร์พ (*Cyprinus*) โดยทำการทดลองในอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 15, 25 และ 32 องศาเซลเซียส และใช้ชุดควบคุมที่ 22 องศาเซลเซียส พบว่าค่าองค์ประกอบเลือดจะเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส อีกทั้งที่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เซลล์เม็ดเลือดขาวมีการเปลี่ยนแปลงโดย Neutrophil และ Eosinophile มีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่วน Lymphocyte และ Monocyte มีปริมาณลดลง เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้การแลกเปลี่ยนออกซิเจนต่ำลง ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงลดลง ร่างกายจึงตอบสนองโดยการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นเพื่อให้เกิดความสมดุลของร่างกาย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้เพราะค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิมีความแตกต่างกันในแต่ละเดือน ซึ่งในเดือนที่อุณหภูมิสูงมีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นสูงกว่าเดือนที่อุณหภูมิต่ำกว่าเช่นกันรวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวก็มีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง และ Vectesi et al. (2012) ได้ทำการศึกษการตอบสนองทางโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว (*Dicentrarchus labrax*) ในระยะสั้นต่อการเพิ่มระดับไนเตรทในน้ำ พบว่า ในการเพาะเลี้ยงที่หนาแน่นส่งผลให้มีระดับแอมโมเนียในน้ำเพิ่มขึ้น การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนใหญ่มีระดับความเข้มข้นของไนเตรทต่ำกว่า 50 ppm แต่ในระบบเลี้ยงที่หนาแน่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบหมุนเวียนระดับความเข้มข้นไนเตรทมักเกิน 100 ppm ซึ่งจะส่งผลทำให้ปลากะพงขาวมีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง

การเข้าเกาะของปรสิต *Lernanthropus* sp. ที่บริเวณเหงือกปลากะพงขาว มีผลโดยตรงต่อการฉีกขาดของ primary และ secondary lamellae และการตกเลือด (haemorrhage) ที่บริเวณเหงือกปลา และนำไปสู่การอักเสบตรงบริเวณเหงือกปลาด้วยเช่นกัน (ปานระวี คชพันธุ์ และคณะ, 2562) ปลากะพงขาวจัดว่าเป็นปลาที่มีความจำเพาะกับปรสิตชนิดนี้ จากการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวยุโรป (European sea bass, *Dicentrarchus labrax*) ที่มีการเกาะติดของโคพีพอด *Lernanthropus kroyeri* ตามธรรมชาติ พบว่าปรสิตชนิดนี้สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาได้ ซึ่งกิจกรรมของไลโซไซม์ และ alternative complement pathway มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อปรสิตในระยะเริ่มแรก ในขณะที่ classical complement และ respiratory burst (RB) activity เพิ่มขึ้นในระยะหลังการติดเชื้อ จึงมีการนำพารามิเตอร์ดังกล่าวมาใช้เป็นตัวดัชนีต่อความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อปรสิตของปลา (Henry et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีการทดลองการติดตามการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาที่ติดเชื้อปรสิต มักตรวจการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มที่ตอบสนองต่อการอักเสบ เช่น ไซโตไคน์ (cytokine) โปรตีนในกลุ่มคอมพลีเมนต์ (complement protein) โปรตีนที่ตอบสนองต่อความเครียด เช่น heat shock protein และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเลือดปลา เช่น ferritin (Ning et al., 2013; Byadgi et al., 2019) ในการทดลองนี้เป็นการตรวจสอบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) คือ Transforming Growth Factor β (TGF- β) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) คือ Major histocompatibility complex class II (MHC II) ซึ่ง TGF- β มีฤทธิ์เป็น chemotactic factor ของ monocyte และกระตุ้น monocyte ให้หลั่ง IL-1, IL-6, TNF- α และ TNF- β รวมทั้งขัดขวางการสร้าง lymphocyte, monocyte และ Neutrophil ขัดขวางการเพิ่มจำนวนและการทำหน้าที่ของ NK cell และ ขัดขวางการหลั่ง Ig หลายชนิด แต่ส่งเสริมการสร้าง IgA นอกจากนี้ TGF- β ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ regulatory T cell (Treg) ทำให้มีการยับยั้งการตอบสนองต่อ apoptotic cell (Faliex et al., 2008) ในขณะที่ MHC II มีบทบาทในการ

กระตุ้นไซโตไคน์ โดยแอนติเจนที่จับกับ MHC class II จะถูกนำเสนอให้แก่ CD4+ cell เมื่อ CD4+ cell ถูกกระตุ้นจะหลั่งไซโตไคน์ (รับพร กิตติวัชร, 2556) จากผลการทดลอง พบว่า MHC class II มีการ down-regulated ในขณะที่ยีน TGF- β มีการ up-regulated ในไตส่วนหน้าและเหงือกของปลากะพงขาวที่มีการเกาะติดของปรสิตที่เหงือก แสดงให้เห็นว่าปรสิตชนิดนี้มีผลต่อภูมิคุ้มกันแบบ non-specific immunity ของปลากะพงขาว ซึ่งปลากะพงขาวที่ติดเชื้อจะมีการสร้างโปรตีน TGF- β เพิ่มขึ้นเพื่อไปกระตุ้นให้ monocyte (mononuclear phagocyte) ให้หลั่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ IL-1, IL-6, TNF- α และ TNF- β อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้ตรวจการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มไซโตไคน์ที่หลากหลาย จึงยังไม่สามารถอธิบาย กลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวที่มีการเกาะติดของปรสิตที่บริเวณเหงือกได้อย่างชัดเจน ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

จากการศึกษาในโครงการนี้ทำให้ทราบปัจจัยคุณภาพน้ำที่สามารถส่งเสริมให้ปริมาณของปรสิต *Lernanthropus* sp. เพิ่มมากขึ้น ช่วงเวลาการเข้าเกาะของพาราไซท์ และยืนยันผลกระทบของปรสิตชนิดนี้ต่อภูมิคุ้มกันของปลา ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปสู่การป้องกัน หรือการกำจัดพาราไซท์ เพื่อลดจำนวนพาราไซท์ในตัวปลา โดยเฉพาะในช่วงที่น้ำมีความเค็ม และอุณหภูมิสูง ควรมีการส่งเสริมการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ โดยการให้อาหารเสริมต่าง ๆ เพื่อให้ปลามีสุขภาพที่แข็งแรง และเป็นการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับปลา

5.2 สรุปผล

1. จากการสุ่มเก็บตัวอย่างปลากะพงขาว ที่เลี้ยงในกระชังบริเวณปากแม่น้ำบ้านท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี จำนวน 3 จุดเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 จำนวนปลา 481 ตัว ปลามีความยาวในช่วง 14.5-50.0 เซนติเมตร มีน้ำหนักในช่วง 33.0-1400.0 กรัม พบปรสิต *Lernanthropus* sp. ที่บริเวณเหงือกปลามากที่สุดในเดือนมีนาคม รองลงมาคือเดือนเมษายน มกราคม กุมภาพันธ์ พฤษภาคม ธันวาคม พฤศจิกายน ตุลาคม และมีอุยายน ตามลำดับ สำหรับเดือน กรกฎาคม สิงหาคม และกันยายน ไม่พบปรสิต

2. ความสัมพันธ์ของปรสิต *Lernanthropus* sp. ที่พบบริเวณเหงือกของปลากะพงขาวกับคุณภาพน้ำ พบว่าความหนาแน่นของปรสิตมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอุณหภูมิ น้ำ ความเค็ม และปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในน้ำ

3. ปริมาณปรสิต *Lernanthropus* sp. ที่พบบริเวณเหงือกของปลากะพงขาวส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบเลือดปลา คือ เมื่อปริมาณปรสิตเพิ่มมากขึ้น ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น เม็ดเลือดชนิด neutrophil และ monocyte จะเพิ่มขึ้น ในขณะที่ เม็ดเลือดชนิด lymphocyte จะลดลง รวมทั้งการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อปลามีการเกาะติดของปรสิตที่เหงือกในปริมาณสูง

4. คุณภาพน้ำที่เปลี่ยนแปลงในรอบเดือน ไม่ค่อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชังบริเวณปากแม่น้ำบ้านท่าแฉลบ

5.3 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการตรวจวัดพารามิเตอร์น้ำอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากจังหวัดจันทบุรีมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศค่อนข้างบ่อย จึงส่งผลกระทบต่อความชุกของพาราไซท์และควรทำการทดลองเลี้ยงปลาในคุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสมเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองเลี้ยงปลาในธรรมชาติ

6. ผลผลิต

6.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ

ปานระวี คชพันธุ์ , วิชญา วงษ์คำ, จันท์จรัส วัฒนะโชติ และ มลฤดี สนิธิ. (2562) การเปลี่ยนแปลงลักษณะพยาธิสภาพเหงือกของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เกิดจากโคพีพอด *Lernanthropus* sp. และกลุ่มโมโนจีเนีย *Diplectanum* sp. แก่นเกษตร 47 ฉบับพิเศษ 2 : 509-514.

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 256107A1080046 สัญญาเลขที่ 141/2561
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ “ความชุกชุมของปรสิต *Lernanthropus* sp. ในปลากะพงขาว
การเปลี่ยนแปลงลักษณะพยาธิสภาพของเหงือกและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาต่อเชื้อปรสิต”
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มลฤดี สนธิ
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2560 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2561
ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2560

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ		
งวดที่ 1 (50%)	101,750	เมื่อ ธันวาคม 2561
งวดที่ 2 (40%)	81,400	เมื่อ กันยายน 2562
งวดที่ 3 (10%)	20,350	เมื่อ กันยายน 2562
รวม	203,500 บาท	

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1. ค่าตอบแทน	20,000	20,000	0
2. ค่าจ้าง	108,000	108,000	0
3. ค่าวัสดุ	40,000	40,000	0
4. ค่าใช้สอย	15,150	15,150	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าสาธารณูปโภค	20,350	20,350	0
รวม	203,500	203,500	0

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

- กิจการ ศุภมาตย์ เยาวนิตย์ ดนยดล และสภาพร ดิเรกบุษราคม. (2530). ศึกษาองค์ประกอบเลือด บางประการของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*). *วารสารมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*, 9, 59-68.
- กรรณภรณ์ อินทชัย, ชัญญานุช ภู่มิ, วัชระ กสิณฤกษ์, ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา และ บดินทร์ บุตรอินทร์. (2556). การประยุกต์ใช้เทคนิค SDS-PAGE เพื่อตรวจหาปริมาณโปรตีน Extracellular Recombinant Single-chain Variable Fragment Anti-HIV-1 p17 จากโปรตีนรวม. *วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่*, 2, 107-121.
- กรรณิการ์ ขาวสะอาด. (2556). การศึกษา Immunoglobulin M (IgM) ในซีรัมปลาเศรษฐกิจโดย เทคนิค (SDS-PAGE). สาขาเทคโนโลยีทางทะเล, คณะเทคโนโลยีทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา ฉัตรสุดา คงเพ็ง. (2555). ผลกระทบของพาราคอวตคุณภาพต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ เหงือกใน ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*). ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี.
- มลฤดี สนธิ, สินีนาถ วรवास และศุภพงษ์ นพพันธ์. (2559). การปรากฏของปรสิตภายนอกใน ปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชัง บริเวณปากแม่น้ำท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, 34(2) 94-104.
- ไมตรี ดวงสวัสดิ์ และจารุวรรณ สมศิริ. (2528). คุณสมบัติของน้ำและการวิเคราะห์สำหรับการวิจัย ทางการประมง. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง, กรุงเทพฯ
- นิรัตติศัย เพชรสุภา และสุวิมล นิลรัตน์. (2551). พยาธิสภาพของปลากะพงขาวที่มีปรสิต. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง*, 2(1). 138-145.
- ปานระวี คชพันธุ์, วิชญา วงษ์คำ, จันทรจรัส วัฒนะโชติ และ มลฤดี สนธิ. 2562. การเปลี่ยนแปลง ลักษณะพยาธิสภาพเหงือกของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เกิดจากโคฟีพอด *Lernanthropus* sp. และกลุ่มโมโนจีเนีย *Diplectanum* sp. แก่นเกษตร 47 ฉบับพิเศษ 2: 509-514.
- वासना คงวัน. (2555). ค่าโลหิตวิทยาของปลานิลลูกผสมในระดับความเค็มที่ต่างกัน. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ วิทยาเขตชุมพร.
- วิจิตรา กลิ่นเจริญ. (2554). ศึกษาผลของ hypoxia ต่อค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีของโลหิตในปลา ฟลาว เวอร์ฮอร์น (*Cichlidae*) และการคืนสภาพหลังได้รับออกซิเจน. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญา มหาบัณฑิต คณะเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ศิริพร นามแดง. (2555). ความสามารถในการก่อโรคเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในปลากะพงขาว. ปัญหา พิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีทางทะเล, คณะเทคโนโลยีทางทะเล, , มหาวิทยาลัยบูรพา
- สุชาติดา ขำชะจิต. (2555). ลักษณะพยาธิสภาพเหงือกของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เกิด จากพาราไซท์กลุ่มโมโนจีเนีย (*Diplectanum* sp.) และกลุ่มโคฟีพอด (*Lernanthropus* sp.). ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, คณะเทคโนโลยีทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี.

- สมเจตน์ ปัญญาวิชย์. (2549). *ปลาเศรษฐกิจ*. กรุงเทพฯ : เกษตรสยามบุ๊คส์.
- แสงระวี แจ่มสว่าง. (2556). *การติดตามค่าองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มบางประการของปลากะพงขาว (Lates calcarifer) ที่เลี้ยงในกระชัง*. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี.
- สมใจ ศิริโชค. (2555). *จุลชีวอุตสาหกรรม Industrial microbiology*. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริม กรุงเทพฯ.
- สร้อย อักษรนำ. (2554). *ผลของอาหารเสริม เบต้า- กลูแคน ต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของปลากะพงขาว*. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, คณะเทคโนโลยีทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา
- สาวตรี ศรีทองสุข. (2559). *การศึกษารูปแบบของโปรตีนต้านจุลชีพจากน้ำเลือดหอย โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แบบเจลพอลิอะคริลลาไมด์*. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีทางทะเล, คณะเทคโนโลยีทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ศุภพงษ์ นพพันธ์. (2556). *พาราไซท์ภายนอกในปลากะพงขาว (Lates calcarifer) ที่เลี้ยงในกระชังบริเวณท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี*. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- อาชิตญา ติษฐกุลชัยมงคล. (2556). *ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมไลโวไซม์ในซีรัมและเมือกของปลากะพงขาว*. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีทางทะเล, คณะเทคโนโลยีทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา
- Ahmadivand, S., Farahmand, H., Mirvaghefi, A. R., Eagderi, S., Shokrpour, S. and Rahmati, H. H. (2014). Histopathological and haematological response of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) subjected to butachlor, *Veterinarni Medicina*, 59(9), 433–439.
- APHA. American Public Health Association. (1998). *Standard Methods for Examination of Water and Waste Water*, 20th ed. Maryland : Victor Graphics.
- Alvarez-Pelletero, (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126, 171-198.
- Byadgi, O., Beraldo P2, Volpatti D2, Massimo M2, Bulfon C2, Galeotti M2. (2019). Expression of infection-related immune response in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during a natural outbreak from a unique *dinoflagellate Amyloodinium ocellatum*. *Fish Shellfish Immunol*, 84, 62-72.
- Barassa, B., Nelson, S. C. and Arana S. (2003). A New Species of *Henneguya*, a Gill Parasite of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) from Brazil, with Comments on Histopathology and Seasonality, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 98(6), 761-765.
- Berillis, P., Mente, E., Nikouli, E., Makridis, P., Grundvig, H., Bergheim A. and Gausen, M. (2016). Improving aeration for efficient oxygenation in sea bass sea cages. blood, brain and gill histology. *Open Life Sci*, 11, 270–279.

- Bozorgnia, A., Alimohammadi, R. and Hosseini-fard, M. (2011). Acute effects of different temperature in the blood parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *International Conference on Environmental Science and Technology IPCBEE*, 6, 52-55.
- Bradford, M. M. (1976). A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brazenor, A.K. and Hutson, K.S. (2013). Effect of temperature and salinity on egg hatching and description of the life cycle of *Lernanthropus latis* (Copepoda: Lernanthropidae) infecting barramundi, *Lates calcarifer*. *Parasitology International*, 2013, 62, 437-447.
- Benmansour, A., Cazals, F., Six, A., Fillatreau, S., Sunyer, O., and Boudinot, P. (2013). Teleost fish mount complex clonal IgM and IgT responses in spleen upon systemic viral infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 34, 1643-1644.
- Caruana, S. (2014). *Studies on arteriosclerotic pathologies, haematology, immunology and lipids of captive Atlantic bluefin tuna*. Ph.D. Thesis, University of Stirling, United Kingdom.
- Cheng, A.C., Cheng, S.A., Chen, Y.Y. and Chen, J.C. (2009). Effects of temperature change on the innate cellular and humoral immune responses of orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immun*, 26(5), 768-772.
- Chu, K. B., Rashid, N. M. and Rani N. R. (2012). Infestation of gill copepod *Lernanthropus latis* (Copepoda:Lernanthropidae) and its effect on cage-cultured Asian sea bass *Lates calcarifer*. *Tropical Biomedicine*, 29(3), 443-450.
- Díaz-de-Alba, M., Raya, A. C., Castro, G., Ramírez, M. O., Mai, B. E., García, C. F., Montoro, M. T., Bellido, E. E., Santiago, R. T. and Riaño, G. (2017). Biomarker responses of Cu-induced toxicity in European seabass *Dicentrarchus labrax*: Assessing oxidative stress and histopathological alterations, *Marine Pollution Bulletin*, 124, 336-348.
- Diegane Ndong, Yu-Yuan Chen, Yu Hung Lin, Baskaraingan Vaseehatan and Jann-Chu Chen. (2007). The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish & Shellfish Immunology*, 22, 686-694.
- Dios, S., Romero, A., Chamorro, R., Figueras, A. and Novoa, B. (2010). Effect of the temperature during antiviral immune response ontogeny in teleosts. *Fish Shellfish Immun*, 29(6), 1019-1027.

- El -Deen, N., A. E. Mona, S. Zaki and I. S. Shalaby. (2013). Some investigations observed in culture Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) infested with *Lernanthropus kroyeri* and *Nerocila orbigny* and exposed to pollution during different seasons at Dammaitte province. *Life Sci J.* 10, 1877-1884.
- Ellis. E. A. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 25, 827-839. *Immunology*, 20, 137-151.
- Esteban A., Hernandez, V. and Michael, M-H. (2012). Innate Immune System Dynamics to Influenza Virus. *IFAC Proceedings Volumes*, 45, 260-265.
- Ezhilmathy, R., Rajalakshmi, K. and Chezhian, A. (2014). Histological alterations in sea bass, *Lates calcarifer* exposed to combined stressors of pesticide and metal (Profenofos and lead nitrate), *International Journal of Research in Marine Sciences*, 3(2), 44-47.
- Ferrantelli, F.V., Fortino, G., Arfuso, F., Giangrosso, G. and Faggio, C. (2015). *The Influence of Acute Handling Stress on Some Blood Parameters in Cultured Sea Bream (Sparus aurata Linnaeus, 1758)*. *eCollection*, 4(1), 4174 .
- Fillatreau, S., Six, A., Magadan, S., Castro, R., Sunyer, J.O. and Boudinot, P. (2013). The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Front. Immunol*, 4, 28.
- Fuda, H., Soyano, K., Yamazaki, F., and Hara, A. (1991). Serum immunoglobulin M (IgM) during early development of Masu Salmon (*Oncorhynchus mason*). *Comp Biochem Physiol*, 99, 637-643
- Henry MA1, Alexis MN, Fountoulaki E, Nengas I, Rigos G. (2009). Effects of a natural parasitological infection (*Lernanthropus kroyeri*) on the immune system of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Parasite Immunol*, 31(12), 729-740. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01150.x.
- Jamalzadeh, H.R., Keyvan, A., Ghomi, M.R. and Gherardi, F. (2009). *Comparison of blood indices in healthy and fungal infected Caspian salmon (Salmo trutta caspius)*, *Biotechnology*, 8(2), 319-322
- Jan H.W.M., Rombout, L. A., Simona, P., Giuseppe, S., and Viswanath, J., D., Hansen, Thomas, J., Farrugia, James Woodson and Kerry, J., Laing. (2011). Description of an elasmobranch TCR coreceptor: CD8 α from *Rhinobatos productus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 35, 452-460.
- Kiron (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish & Shellfish Immunology*, 31, 616-626.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lan, B. and Roy, A-D. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 457-472.

- Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immun*, 20(2), 137-151.
- Magnadottir, B., Jonsdottir, H., Helgason, S., Bjoornsson, B., Jorgensen T.O. and Pilstrom, L. (1999). Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). II: The effect of size and gender under different environmental conditions. *Comparative Biochemistry and physiology*, 122, 181-182.
- Manera M. and Dezfali BS. (2003). *Lernanthropus kroyeri* infections in farmed sea bass *Dicentrarchus labrax*: pathological features. *Dis Aquat Organ*, 2003, 57 (1), 80-177.
- Monteroa, F. E., Crespo, S., Padrós, F., Gándara, F. D., García, A. and Raga, J. A. (2004). Effects of the gill parasite *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) on the amberjack *Seriola dumerili* Risso (Teleostei: Carangidae). *Aquaculture*, 232, 153-163.
- Ndong, D., Chen, Y.Y., Lin, Y.H., Vaseeharan, B. and Chen, J. C. (2007). The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish Shellfish Immun*, 22(6), 686-694.
- Nikoskelainen, S., Bylund, G. and Lilius, E.M. (2004). Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Immunol*, 28(6), 581-592.
- Noga, E.J., Botts, S., Yang, M.S. and Avtalion, R. (1998). Acute stress causes skin ulceration in striped bass and hybrid bass (*Morone*). *Pathol*, 35(2), 102-107.
- Noga Y. and Rimona M. (1998). Hyaluronic Acid-Modified Bioadhesive Liposomes as Local Drug Depots: Effects of Cellular and Fluid Dynamics on Liposome Retention at Target Sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 349, 21-26.
- Nur Qamarina., Abdul Khalid and Faizah Shaharoum-Harrison. (2014). The Life Cycle of the Parasitic Crustacean, *Lernanthropus latis* Yamaguti, 1954 (Copepoda : Lernanthropidae), on Marine-Cultured Fish, *Lates calcarifer*, from Setiu Wetland, Terengganu. *Journal of Parasitology Research*; 1-6.
- Paruruckumani, P.S., Rajan, A. M., Ganapiriya, V. and Kumarasamy, P. (2015). Bioaccumulation and ultrastructural alterations of gill and liver in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) in sublethal copper exposure. *Aquat. Living Resour*, 28, 33-44.
- Priyadarsini, V., Binukumari, S. and Vasanthi, J. (2016). Acute and chronic toxicity of diclofenac drug and its effect on haematological parameters in the fresh water fish *Cirrhinus mrigala*. *Drug Chem Toxicol*, 4(6), 9-12.
- Randall, D.J. and Tsui, T.K. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Mar Pollut Bull.* 2002, 45 (12), 17-23.

- Rombout, J. H., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G. and Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immun*, 31(5), 616-626.
- Sami N., Goran B. and Esa-Matti L. (2004). Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 28, 581-592.
- Saurabh, S. and Sahoo, P. K. (2008). Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39, 223-239.
- Sho, S., Yoshiki, K., Ryuhei, K., Hiromitsu, K., Katsuya, I., Osamu, M., Naoki, I. and Kazuo, O. (2012). Morphology and distribution of blood fluke eggs and associated pathology in the gills of cultured Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, *Parasitology International*, 61, 242-249.
- Shugar, D. (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta*. 8, 302-309.
- Somamoto, T., Okamoto, N., Nakanishi, T., Ototake, M. and Nakao, M. (2009). In vitro generation of viral-antigen dependent cytotoxic T-cells from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Virology*, 389(1-2), 26-33.
- Strick, J. D.H. and Parson, T. R. (1972). *A Practical Handbook of Seawater Analysis, fisheries reseaech board of Canada*. Bulletin 167, Ottawa. 310 p.
- Teruyuki N., Hideaki T., Yasuhiro S. and Tomonori Somamoto. (2011). Cytotoxic T cells in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35, 1317-1323.
- Tirziu, E. (2009). Acute-phase Proteins in immune response. *Faculty of Veterinary Medicine Timisioara*, 329-399.
- Tomonon, S., Nobuaki, O., Teruyuki, N-M., and Miki, N. (2009). In vitro generation of viral-antigen dependent cytotoxic T-cells from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Virology*, 389, 26-33.
- Vectesi, D., Kotzamanis, I., Henry, M.A. and Vatsos I. N. (2012). Haematological and immunological responses of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to a short-term exposure to increased water levels of nitrate. *Fisheries Sciences*, 11(2), 430-439.
- Workenhe, S.T., Rise, M.L., Kibenge, M.J. and Kibenge, F.S. (2010). The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. *Immunol*, 47(16), 2525-2536.
- Yardimci, B. and Pekmezci, G. Z. (2012). Gill histopathology in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* (L.) coinfectd by *Diplectanum aequans* (Wagener, 1857) and *Lernanthropus kroyeri* (van Beneden, 1851), *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 59, 61-64.
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-de Frías, C., and Cortés, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 20, 126-136