

# ไมโคแบคทีเรียโอชีสในปลากัด

## Mycobacteriosis in Siamese Fighting Fish, *Betta splendens* Regan

องอาจ เลหาวิณี<sup>1</sup> สุปราณี ชินบุตร<sup>2</sup> เต็มดวง พึ่งขจรบุญ<sup>2</sup> พรเลิศ จันทรรักษ์กุล<sup>2</sup>

นงนุช เลหาวิสุทธิ<sup>3</sup>

Ong-ard Lawhavinit<sup>1</sup> Supranee Chinabut<sup>2</sup> Temdoung Pungkachonboon<sup>2</sup>

Pornlerd Chanratchakool<sup>2</sup> Nongnuch Laohavisuti<sup>3</sup>

1. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. งานพยาธิวิทยา กลุ่มวิจัยโรคสัตว์น้ำ สถาบันประมงน้ำจืด กรมประมง
3. งานสถานแสดงพันธุ์ปลาน้ำจืด สถาบันประมงน้ำจืด กรมประมง
1. Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University
2. Fish Pathology Section, Fish Health Unit, National Inland Fisheries Institute Department of Fisheries
3. Freshwater Aquarium Unit, National Inland Fisheries Institute, Department of Fisheries

### บทคัดย่อ

ปลากัดเป็นปลาสวยงามที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ปัจจุบันปลากัดเป็นปลาสวยงาม ที่มีราคาสูงทั้งตลาดภายในประเทศและการส่งออก อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลากัดจะพบว่าปลาป่วยและตายโดยไม่รู้สาเหตุอยู่เสมอ และปลาป่วยที่ถูกส่งมาตรวจที่สถาบันประมงน้ำจืดนั้น ผลการตรวจสอบพบว่า ปลาป่วยเป็นโรคไมโคแบคทีเรียโอชีส ยิ่งไปกว่านั้นปลากัดที่เลี้ยงในสถานแสดงพันธุ์ปลาน้ำจืดเองก็ยังคงตรวจพบปลากัดที่แสดงอาการคล้ายคลึงกัน ดังนั้นรายงานนี้จึงกล่าวถึงการสำรวจโรคไมโคแบคทีเรียโอชีสที่พบในปลากัดที่เลี้ยงในสถานแสดงพันธุ์ปลาน้ำจืด ระหว่างปี พ.ศ. 2531 ถึงปี พ.ศ. 2532

ผลการตรวจสอบพบว่าลักษณะภายนอกของปลาป่วยจะแสดงลักษณะท้องบวม ตกเลือดตามลำตัว และเกล็ดตั้ง จะพบตุ่มสีขาวเทาขนาดต่าง ๆ ตามอวัยวะภายใน โดยเฉพาะที่ม้ามและไต การตอบสนองทางเนื้อเยื่อวิทยาต่อเชื้อแบคทีเรียจะมีการสร้างแกรนูลอมาในจำนวนและขนาดต่าง ๆ กันตาม ม้าม ไต ตับ และลำไส้ แต่จะไม่พบที่สมองและหัวใจ ที่บริเวณกลางแกรนูลอมาจะมีเนื้อตายที่ติดสีชมพูของสียโอซิโนฟิลิกในลักษณะต่าง ๆ กัน ซึ่งจะถูกล้อมด้วยอีพิทีริออยด์ แต่ไม่พบไฟโบบลาสและไมโครแมโครฟาจ แบคทีเรียที่แยกได้ถูกจำแนกเป็นไมโคแบคทีเรีย พวกที่เจริญเติบโตเร็ว และสร้างเม็ดสีในสภาพที่มีแสงสว่างเท่านั้น

## Abstract

Siamese fighting fish, **Betta splendens** Regan is a very economically importance ornamental fish in Thailand. To day, it gives the highest income among the native market and exported ornamental fish. However, the morbidity and the mortality of it are usually found to be due to an unknown cause, The diseased fish were sent into the Diseased Laboratory at National Inland Fisheries Institute. The diagnostic result showed to be a mycobacteriosis. Furthermore, the fish which were cultured at NIFA, National Inland Fisheries Aquarium were also showed the similar clinical signs. This study, therefore, investigated an occurrence of mycobacteriosis in Siamese fighting fish which were cultured at NIFA during 1988 - 1989.

The clinical observation of the diseased fish revealed an abdominal swelling with body, hemorrhagic lesion on the body and raised scales. The gray-whitish nodules of various sizes involving and internal organs were found, especially in spleen and kidney. Histopathological responses to the bacterium were formation of granulomata of variable sizes and number in spleen, kidney, liver and intestine but it's not found in brain and heart. The granuloma were composed of a central area of pale eosinophilic amorphous caseous necrosis surrounded by epithelioid cells but fibroblast and giant cell were not observed. The isolated bacterium is identified as a rapidly growing photochromogenic mycobacterium.

## คำนำ

ไมโคแบคทีเรียโอซิส (mycobacteriosis) เป็นโรคที่พบเสมอในปลาน้ำจืดและปลาทะเล ซึ่งเลี้ยงอยู่ในประเทศแถบอบอุ่นและอากาศเย็น (Van Duijn, 1981) พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1897 ในปลาน้ำจืดที่เลี้ยงอยู่ในประเทศฝรั่งเศส บริเวณโรงพยาบาลโรคปอด ซึ่งเข้าใจว่าเชื้อแพร่ระบาดมาจากคนป่วย (Bataillon, et. al., 1897) ต่อมา Nigrelli และ Vogel (1963) ได้รายงานพบว่าโรคนี้ในปลา 151 ชนิด และ Ross (1970) พบว่าปลาแซลมอนจะเป็นโรคนี้มาก ปัจจุบันปัญหาของโรคนี้ก็พบบ่อยขึ้นในปลาที่นำมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม ทั้งจากน้ำจืดและน้ำเค็ม (Van Duijn, 1981) และในประเทศไทยเองก็ยังมีรายงานการพบโรคนี้ในปลาช่อนที่เลี้ยงไว้บริโภค (ชลอ และคณะ, 2526) แต่ไม่เคยมีรายงานพบโรคนี้ในปลาสวยงามที่เลี้ยงอยู่ในประเทศไทย จนกระทั่งในช่วงปี พ.ศ. 2530 ได้มีเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาสวยงามเพื่อการส่งออก ได้นำปลากัด (Siamese fighting fish, **Betta splendens**) ที่ป่วยและตายโดยไม่ทราบสาเหตุ ส่งให้ทางห้องปฏิบัติการทางโรคปลา สถาบันประมงน้ำจืดตรวจสอบอยู่เสมอ ผลการวิจัยพบว่าเป็นโรคไมโคแบคทีเรียโอซิส และในสถานแสดงพันธุ์ปลาน้ำจืดเองก็ยังพบปลาป่วยที่มีอาการคล้ายคลึงกับที่พบในปลาป่วยที่เกษตรกรนำมาส่งตรวจ และปลากัดเองเป็นปลาสวยงามที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เพราะมีราคาสูงและมีจำหน่ายในตลาดภายในประเทศ และเพื่อการส่งออก ดังนั้นรายงานนี้จะกล่าวถึงการสำรวจโรคไมโคแบคทีเรียโอซิสที่พบในสถานแสดงพันธุ์ปลาน้ำจืด สถาบันประมงน้ำจืดระหว่างปี พ.ศ. 2531 - 2532 เพื่อเป็นแนวทางแก้ไขปัญหที่เกิดขึ้นต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

ปลากัดที่ใช้จะซื้อมาจากพ่อเพาะพัก ซึ่งมีอายุประมาณ 1 เดือน และนำมาเลี้ยงในอ่างซิเมนต์ทรงสี่เหลี่ยมขนาด 80 × 80 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุน้ำบาดาลสูง 10 - 15 เซนติเมตร ให้อากาศตลอดเวลา

จำนวนปลากัดทั้งหมด 200 ตัว ซึ่งเลี้ยงด้วยลูกไร โดยให้วันละ 1 ครั้ง ดูตะกอนและถ่ายน้ำทุก ๆ 5 วัน เมื่อปลาอายุ 3 เดือน จะทำการกันอ่างโดยแบ่งเป็นช่องสี่เหลี่ยมขนาด  $7 \times 2$  เซนติเมตร ด้วยแผ่นพลาสติก ที่เจาะรูให้น้ำถ่ายเทถึงกันได้ แล้วแยกปลาลงเลี้ยงช่องละ 1 ตัว เพื่อป้องกันไม่ให้ปลากัดกัน

การเก็บตัวอย่างจะทำทุก ๆ เดือนจนครบ 1 ปี โดยสุ่มตรวจปลาจำนวน 16 ตัวต่อครั้ง นำปลาที่จะตรวจมาสลบด้วย quinaldine เข้มข้น 40 ส่วนในล้านส่วน และทำการเปิดช่องท้องโดยวิธีการปราศจากเชื้อ ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก ไต ตับ และม้าม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion agar และ Ogawa egg medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน และทำให้เชื้อบริสุทธิ์ก่อนนำไปจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธีของ Tsukamura (1984) หลังจากทำการเพาะเชื้อแล้ว ปลากัดจะถูกดองในน้ำยาบัพเฟอร์มาลีนเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยา และตัดด้วยไมโครโทมให้มีความหนา 5 - 6 ไมครอน แล้วทำการย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H & E) และสี (Ziehl Neelsen's method) ตามวิธีของ Humason (1979)

### ผลการทดลอง

ปลากัดตัวอย่างที่เก็บตรวจในเดือนที่ 1 ถึง 3 จะไม่พบการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ และผลทางเนื้อเยื่อวิทยาก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆ จนกระทั่งในเดือนที่ 4 เริ่มพบอาการผิดปกติของปลา บางตัว ซึ่งมีลักษณะท้องบวม เกล็ดตั้ง และตกเลือดตามลำตัว (ภาพที่ 1) และการตอบสนองทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่ามี การสร้างแกรนูโลมาที่บริเวณเยื่อยึดอวัยวะภายในลำไส้ (mesenteric tissue) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่ตายเนื่องจากการถูกทำลาย ดิสสิมพูของอีโอซิโนฟิลิกในลักษณะต่าง ๆ กัน อยู่บริเวณตรงกลางของแกรนูโลมา ซึ่งจะถูกล้อมรอบด้วยเซลล์อีพิทีลิออยด์ (epithelioid cells) แต่ไม่พบไฟโบบลาส (fibroblast) และ ไจแอนท์เซลล์ (giant cells) (ภาพที่ 2) ในปลาที่มีอาการรุนแรงจะพบแกรนูโลมาตามอวัยวะภายในอื่น ๆ เช่น ม้าม ไต (ภาพที่ 3) ตับ อวัยวะสืบพันธุ์ ช่องปาก และในชั้นเยื่อผิวหนัง (ภาพที่ 4) แต่ไม่พบในหัวใจและสมอง อัตราการเป็นโรคในปลาที่ทำการตรวจสอบพบว่ามีอัตราการเป็นโรคไมโคแบคทีเรียโอซิส เริ่มตั้งแต่ 25 เปอร์เซ็นต์ ในเดือนที่ 4 และเพิ่มสูงขึ้นจนอยู่ในช่วงระหว่าง 62.5 - 93.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีอัตราการเป็นโรคสูงสุดในเดือนที่ 11 คือสูงถึง 93.75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

อย่างไรก็ดีการแยกเชื้อในช่วงเดือนที่ 4 ถึง เดือนที่ 12 นั้นสามารถแยกเชื้อ *Mycobacterium* sp. ได้ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แสดงไว้ในตารางที่ 2 และจากคุณสมบัติเหล่านี้สามารถจะจำแนกเชื้อชนิดนี้ให้อยู่ใน Genus *Mycobacterium* ชนิดที่เจริญเติบโตได้เร็ว และสามารถสร้างเม็ดสีได้ในสภาพที่ต้องการแสงสว่าง

### วิจารณ์ผลการทดลอง

การวินิจฉัยโรคไมโคแบคทีเรียโอซิสในปลา โดยทั่วไปจะใช้การเปลี่ยนแปลงทางลักษณะภายนอกของปลาป่วย ซึ่งจะแสดงอาการว่ายน้ำเชื่องช้าลง ตาขุ่นมัว เกล็ดตั้ง ตกเลือดเป็นจุดเล็ก ๆ กระจายตามลำตัว การเปลี่ยนสีของผิวหนัง การสึกกร่อนของครีบ และการกินอาหารน้อยลงกว่าปกติ นอกจากนั้นการ

ตรวจพบแบคทีเรียพวกย้อมติดสีกรดได้อย่างเร็ว (acid fast bacteria) จากอวัยวะภายในของปลาป่วยก็จะช่วยให้ผลการวินิจฉัยถูกต้องมากขึ้น ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจะตรวจพบแกรนูลโอลมาตามอวัยวะภายใน โดยเฉพาะที่ม้าม และไต (Van Duijn, 1981) ซึ่งบางครั้งสามารถสังเกตเห็นด้วยตาเปล่าว่ามีตุ่มสีขาวเทากระจายอยู่ตามอวัยวะภายใน เช่น ม้าม และไต (Johnstone, 1927) ผลการศึกษาพบว่าปลากัดที่เลี้ยงในสถานแสดงพันธุ์ปลาน้ำจืดเป็นโรคเนื่องมาจากเชื้อ *Mycobacterium* sp. ซึ่งได้ทำการแยกเชื้อและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้ว พบว่าเป็นเชื้อ *Mycobacterium* sp. ชนิดที่เจริญเติบโตได้เร็ว และสร้างเม็ดสีในสภาพที่มีแสงสว่าง ซึ่งปัจจุบันมีจำแนกไว้เพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ *M. vaccae* ที่แยกเชื้อได้จากแผลของโค และดินตามแหล่งปศุสัตว์ทั่วไป และ *M. parafortuitum* ที่แยกได้จากฝุ่นละออง ดิน และน้ำในประเทศญี่ปุ่น (Wayne และ Kubica, 1986) และเชื้อ *Mycobacterium* ที่ก่อให้เกิดโรคในปลาที่มีรายงานอยู่หลายชนิด ปัจจุบันได้มีการศึกษาคุณสมบัติแล้วสรุปไว้เพียง 3 ชนิด เท่านั้น คือ *M. marinum* *M. fortuitum* และ *M. chelonae* subspecies *piscarium* (Austin และ Austin, 1987) แต่มีอีกชนิดหนึ่งที่เพิ่งจะรายงานว่าก่อให้เกิดโรคในปลา pejerrey, *Odonthestes bonariensis* ที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพวกที่เจริญเติบโตเร็วและสร้างเม็ดสีในสภาพที่มีแสงสว่างเช่นกัน (Hatai, et. al., 1989) อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากัดนี้กำลังดำเนินการศึกษาในรายละเอียดอยู่ ซึ่งผลการตรวจสอบมีแนวโน้มว่าจะเป็นเชื้อตัวใหม่ เพราะมีคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการที่ต่างไปจากเชื้อ *Mycobacterium* ที่เคยรายงานไว้ ส่วนการศึกษาเพื่อหาแนวทางการรักษาและป้องกันก็ยังคงกำลังศึกษาอยู่ เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลากัด ซึ่งเป็นปลาสวยงามที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยตัวหนึ่ง

## สรุป

ผลการตรวจสอบปลากัดป่วยที่เลี้ยงในสถานแสดงพันธุ์ปลาน้ำจืด พบว่าปลาป่วยเป็นโรคไมโคแบคทีริโอซิส และตลอดระยะเวลา 1 ปี พบว่ามีอัตราการเป็นโรคตั้งแต่ 25 เปอร์เซ็นต์ ในเดือนที่ 4 และมีอัตราการเป็นโรคสูงสุดถึง 93.75 เปอร์เซ็นต์ ในเดือนที่ 11 จากอาการของปลาป่วย และการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยาพบแกรนูลโอลมาในอวัยวะภายใน ซึ่งยืนยันว่าปลากัดนี้ป่วยเป็นโรคไมโคแบคทีริโอซิส และสามารถแยกเชื้อ *Mycobacterium* sp. ชนิดเจริญเติบโตเร็วและสร้างเม็ดสีได้ในสภาพที่มีแสงสว่างจากปลาป่วยได้ด้วย

## เอกสารอ้างอิง

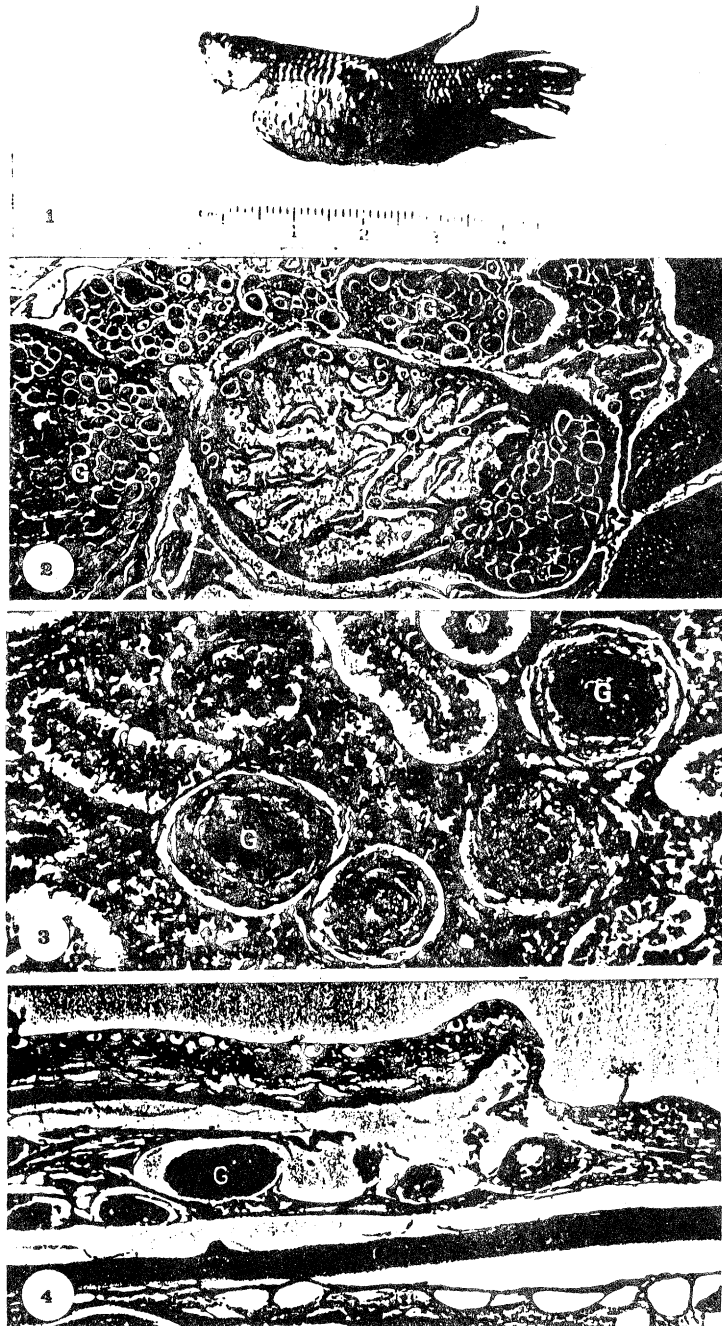
- ชลอ ลิมสุวรรณ สุปราณี ชินบุตร กมลพร ภวภูตานนท์ และองอาจ เลหาวิณีจ. 2526. วัณโรคในปลาช่อน. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 32 สถานบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรมประมง. 9 หน้า.
- Austin, B. and D.A. Austin. 1987. Bacterial Fish Pathogens. Ellis Horwood Limited, Chichester. pp. 61 - 67.
- Bataillon, E. and L. Terre. 1897. Un nouveau type de tuberculose C.R. Seanc. Soc. Biol. 49 : 446 - 449.
- Hetai, K., O. Lawhavinit, S.S. Kubota, K. Toda, and Y. Sugou. 1989. Mycobacterium infection in pejerrey, **Odonthestes bonariensis**. J. of Fish Diseases. (in press)
- Humason, G.L. 1979. Animal tissue technique. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 641 p.
- Johnstone, J. 1927. Diseased condition of fish. Rept. Lancs. Sea Fish Lab. 35 : 162 - 163.
- Nigrelli, R.F. and H. Vogel. 1963. Spontaneous tuberculosis in fishes and in other cold blooded vertebrates with special reference to **Mycobacterium fortuitum** CRaz. from fish and human lesions. Zoologica. 48 : 131 - 143.
- Ross, A.J. 1970. Mycobacteriosis among Pacific salmonid fishes In : A symposium on diseases of Fishes and Shellfishes (ed. by Sniezsko, S.F.) p. 279 - 283. Special Publication No. 5, American Fisheries Society, Washington, D.C.
- Tsukamura, M. 1984. Identification of mycobacteria. The Mycobacteriosis Research Laboratory of the National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan 88 p.
- Van Duijn, C. 1981. Tuberculosis in fishes. In : The diseases of ornamental fishes. (ed. by Ford, D.M.) J. small. Animal. Pract. 22 : 391 - 411.
- Wayne, C.G. and G.P. Kubica. 1986. Genus Mycobacterium, In : Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 2 (ed. by Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E Sharpe and J.G. Holt) pp. 1435 - 1457. Williams & Wilkins, London.

**ตารางที่ 1** แสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการตายของปลากัดที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Mycobacterium* sp. ที่เลี้ยง  
ในสถานแสดงพันธุ์ปลาน้ำจืด ระหว่างปี พ.ศ. 2531-2532

เดือน	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
อัตราการตาย	0	0	0	25	75	75	87.5	85	62.5	75	93.75	81.25

**ตารางที่ 2** แสดงคุณสมบัติของเชื้อ *Mycobacterium* sp. ที่แยกได้จากปลากัดจำนวน 10 สายพันธุ์

การทดสอบคุณสมบัติ	ผล
Growth at/on :	
25° c	10
28° c	10
37° c	10
42° c	0
5% (w/v) sodium chloride	1
0.2% (w/v) picric acid	0
0.2% (w/v) sodium nitrite	0
0.1% (w/v) sodium salicylate	0
Hydroxylamine (500ug/ml)	0
Production of :	
Arylsulphatase	10
Catalase	10
Niacin production	0
Nitrate reduction	0
Degradation of Tween 80	10
Production of acid from :	
Glucose	10
D-mannose	0
D-galactose	0
L-arabinose	10
D-xylose	0
L-rhamnose	10
Trehalose	10
Inositol	10
Manitol	0
Sorbitol	0



ภาพที่ 1 ปลาป๋วยที่แสดงลักษณะท้องบวม เกล็ดต้ง และลำตัวตกเลือด x 1.5

ภาพที่ 2 เยื่อหุ้มลำไส้ (mesenteric intestine) ที่มีแกรนูโลมา (G) ประกอบด้วยเยื่อตายที่ย้อมติดสีอีโอซินในฟักลิในขนาดต่างๆ ซึ่งถูกล้อมรอบด้วย epithelioid cells x 400 (H & E)

ภาพที่ 3 ไตของปลากัดป๋วยที่พบแกรนูโลมา (G) ในระยะต่างๆ x 400 (H & E)

ภาพที่ 4 แกรนูโลมา (G) ที่พบอยู่ตามเยื่อผิวหนังของปลากัดป๋วย x 200 (H & E)