บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเต่าน้ำจืดและเต่าบัว

เต่าเป็นสัตว์เลื้อยคลานอยู่ใน Class Reptilia, Order Chelonia หรือ Testudines จากการค้นพบหลักฐานทางวิวัฒนาการ มีการสันนิษฐานว่าสัตว์เลื้อยคลานใน Order Chelonia มีวิวัฒนาการมาจาก Eunotosaurus เมื่อกว่า 220 ปีมาแล้ว ซึ่งลักษณะทั่วไปของสัตว์ในกลุ่ม Chelonia คือ ร่างกายมีสิ่งห่อหุ้มเป็นแผ่นกระดูกจากชั้นผิวหนังแท้ (Dermis) ขากรรไกรไม่มีฟัน แต่เป็น horny sheath กระดูกสันหลังและซี่โครงเชื่อมกันเป็นกระดองภายในทวารหนักเป็นช่องตามยาว ซึ่ง Order Chelonia แบ่งได้เป็น 2 อันดับย่อย คือ Suborder Pleurodira และ Suborder Cryptodira

1. Suborder Pleurodira

ประกอบด้วยเต่าเพียงกลุ่มเดียว คือ กลุ่มที่มีคอยาวและเก็บหัวและคอโดยการพับเข้าด้านข้างของกระดอง (side-necked turtles)

2. Suborder Cryptodira

ประกอบด้วยเต่าที่สามารถหดหัวเข้าไปในกระดองได้ และพวกหัวใหญ่ที่ไม่สามารถหดหัวเข้าไปในกระดองได้ทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 10 ครอบครัว (family) ซึ่งรวมถึงเต่าบก (tortoise) และเต่าน้ำจืดที่มีกระดองแข็ง (terrapin) เต่าพวกที่อาศัยอยู่ใต้น้ำที่เป็นโคลน (mask and mud turtles) เต่าทะเล (sea turtles) และตะพาบ (soft shell turtle)

เต่าบัว *(Hieremys annandalii)* อยู่ในครอบครัว *Emydidae* ซึ่งเป็นเต่าน้ำจืด เต่าในครอบครัวนี้มีกระดองกลมรี อาศัยในน้ำจืด หรือครึ่งบกครึ่งน้ำ แต่มีบางชนิดที่อาศัยอยู่บนบกมากกว่าอยู่ในน้ำ โดยเฉพาะช่วงอากาศที่มีความชื้นสูงจะไม่ลงน้ำเลย อาศัยตามที่ลุ่ม หนอง บึง แม่น้ำต่างๆ ทะเลสาบ เต่าในครอบครัวนี้ เมื่อโตเต็มวัยจะกินทั้งพืชและสัตว์เป็นอาหาร ยกเว้นสกุล Emydoidea และ Deirochelys จะเป็นนักล่าที่กินสัตว์เป็นอาหาร ได้แก่พวกเต่านาที่กินหอยและปู ส่วนสกุล Pseudemys เมื่อโตขึ้นจะกินเฉพาะพืชเท่านั้น ในวงศ์นี้มีทั้งหมด 140 ชนิด (สำนักงานเสริมสร้างเอกลักษณ์ของชาติ, 2543) ตัวอย่างเต่าที่อยู่ในวงศ์นี้นอกเหนือจากเต่าบัว ได้แก่ เต่าจักร *(Heosemys spinosa)* เต่าหวาย *(Heosemys grandis)* เต่ากระอาน *(Batagur baska baska)* เต่าจัน *(Pyxidea mouhotii)* เต่าจาน *(Batagur baska ranongensis)* เต่าดำ *(Siebenrockiella crassicollis)* เต่าหับ *(Cuora amboinensis)* เต่านา *(Malayemys subtrijuga)* และเต่าญี่ปุ่น *(Trachemys scripta elegans)* (บพิธ และนันทพร, 2540) เป็นต้น

2.1.1 **ลักษณะทางอนุกรมวิธานของเต่าบัว** (Taxonomic Theory) (IUCN, 2006; สำนักงานเสริมสร้างเอกลักษณ์ของชาติ, 2543)

Kingdom Animalia
Phylum Chordata
Class Reptilia
Order Chelonia
Suborder Cryptodira
Family Emydidae
Genus *Hieremys*
Species *H. annandalii*

Scientific name: *Hieremys annandalii*

Synomyms: *Cyclemys annandalii* Boulenger (1903)

English common name: Yellow-headed temple turtle

ชื่อสามัญหรือชื่อท้องถิ่น: เต่าบัว เต่าหม้อ เต่าบึงหัวเหลือง เต่าวัด

2.1.2 **ลักษณะภายนอก** (Morphological character) **ของเต่าบัว**

กระดองของลูกเต่าบัวจะมีความกว้างใกล้เคียงกับความยาว แบนกลม และมีสันสีเหลืองที่แผ่นเกล็ดสันหลัง มีส่วนอ่อนอยู่ใจกลางกระดองส่วนล่างซึ่งมีสีเหลืองสม่ำเสมอ และมีเส้นสีเหลืองบนหัวสีดำ ส่วนเต่าบัวตัวเต็มวัยกระดองจะมีลักษณะยกสูงและยาว ไม่มีสันนูน หัวมีสีเทาและมีจุดประสีเหลืองและดำขนาดเล็ก มีกรามสีเหลือง มีจุดและแถบสีเหลืองที่หัว และการที่เต่าบัวไม่มีเส้นรัศมีบนกระดองส่วนล่างและไม่มีสันนูนกลางกระดองจะทำให้สามารถแยกเต่าบัวออกจากเต่าหวายที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันได้ง่ายยิ่งขึ้น กระดองส่วนล่างของเต่าบัวจะมีสีเหลือง และแต้มสีดำบนแผ่นเกล็ดและมีลักษณะเหมือนรอยเปื้อน แต่กระดองจะเป็นสีดำทั้งหมดเมื่ออายุเพิ่มขึ้น (Stuart et al., 2001)

เพ็ญศรี (2536) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และความแตกต่างทางเพศของเต่าบัวโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเต่าบัวมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างตั้งแต่แรกเกิดจนถึงตัวเต็มวัย (Ontogenic change) ซึ่งในวัยเจริญพันธุ์เพศเมียจะมีรูปร่างกลมกระดองล่างแบนราบเพื่อให้มีความเหมาะสมสำหรับการเพิ่มพื้นที่สำหรับการวางไข่ ส่วนเพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่ากระดองเว้าขึ้นและมีส่วนหน้าของกระดองล่าง (gular) ใหญ่กว่าของเพศเมีย เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการผสมพันธุ์ให้เกิดผลสำเร็จมากขึ้น และได้เปรียบคู่ต่อสู้ในการเข้าแย่งชิงเพศเมีย หรือ

การแย่ง territory ระหว่างเพศผู้ด้วยกัน ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะมีประโยชน์โดยตรงในการเพิ่มโอกาสในการอยู่รอด และให้ความสามารถในการสืบพันธุ์ที่ดี

2.1.3 แหล่งอาศัยและขอบเขตการกระจายในภาคพื้นที่ที่มีรายงาน

ตามธรรมชาติเต่าบัวอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ หนองน้ำ บ่อน้ำ และแหล่งน้ำอื่นๆ ที่มีน้ำไหลช้าหรือน้ำนิ่งในบริเวณที่ราบและสามารถอยู่รอดได้ในบริเวณน้ำกร่อย มีการกระจายตัวของประชากรบริเวณที่ราบต่ำในภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้บนแผ่นดินใหญ่ของประเทศไทย แต่เนื่องจากเต่าบัวเป็นเต่าที่มนุษย์นิยมนำไปปล่อยตามประเพณี ทำให้การกระจายตัวของประชากรเต่าบัวมีความเปลี่ยนแปลงไปจากธรรมชาติ นอกเหนือจากในประเทศไทยเต่าบัวยังพบได้ในบางบริเวณของประเทศลาว เวียดนาม กัมพูชา และคาดว่าอาจพบได้ในมาเลเซียและพม่า (Stuart et al., 2001)

2.1.4 กฎหมายคุ้มครองและสถานภาพเชิงอนุรักษ์

ปัจจุบันเต่าบัว และเต่าทุกชนิดที่เป็นพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทยจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 ของประเทศไทย เพื่อคุ้มครองเต่าเหล่านี้ให้พ้นจากการคุกคามและจากการค้า และเต่าบัวยังอยู่ในความคุ้มครองตามกฎหมายอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งชนิดพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: CITES) ในกลุ่ม Appendix II ซึ่งกำหนดว่าการค้าเต่าบัวสามารถทำได้ในระหว่างประเทศสมาชิกแต่ต้องอยู่ภายใต้การควบคุม และต้องมีการติดตามข้อมูลโดยผ่านกระบวนการออกใบอนุญาตเท่านั้น (UNEP-WCMC, 2006) นอกจากนี้เต่าบัวยังจัดเป็นสัตว์หายากและมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ตามประกาศของสมัชชาการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมโลก หรือ IUCN (International Union for The Conservation of Nature and Natural Resources) ในปี พ.ศ.2543 ซึ่งมีสถานภาพเชิงอนุรักษ์จัดอยู่ในบัญชีแดง (red list) รายชื่อสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ (Endangered) ของหลายประเทศ หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในหมวดนี้แม้ว่าจะไม่อยู่ในสถานะที่กำลังจะสูญพันธุ์ไปในทันทีทันใดแต่ก็มีความเสี่ยงสูงมากต่อการสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติในอนาคตอันใกล้ (IUCN, 2006) ในสถานะเชิงประชากรของเต่าบัวประเทศไทยยังไม่เป็นที่ทราบจำนวนที่แน่นอน แต่เป็นที่คาดการณ์ว่ามีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่องในพื้นที่ส่วนใหญ่ เนื่องจากการถูกจับเพื่อนำไปทำเป็นอาหาร การลดลงและถูกรุกรานถิ่นอาศัยและวางไข่ และผลจากมลพิษในสิ่งแวดล้อม (van Dijk et al., 2000)

2.2 หลักการโดยทั่วไปทางโลหิตวิทยาของสัตว์เลี้อยคลาน

ระบบหมุนเวียนโลหิตของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะสัตว์เลือดเย็น จะไวต่อการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอกมาก และผลตอบสนองต่อสิ่งเร้าจะปรากฏให้เห็นได้จากโลหิตวิทยา และเคมีโลหิต ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการใช้วินิจฉัยประกอบกับการประเมินสภาวะทางกายภาพในประชากรสัตว์เลื้อยคลาน (Thrall et al., 2004) การเปลี่ยนแปลงของโลหิตวิทยา และค่าเคมีโลหิตสามารถบ่งบอกความผิดปกติทางสรีรวิทยา และความผิดปกติทางพยาธิวิทยาได้เป็นอย่างดี เนื่องจากเมื่อเต่าได้รับความเครียด หรืออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จะทำให้เกิดการกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของคอร์ติซอล (cortisol) และแคททีโคลามีน (catecholamine) ในกระแสเลือด ซึ่งโน้มนำให้มีการเพิ่มขึ้นของอัตราเมแทบอลิสมของเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดในระบบหมุนเวียนโลหิตและค่าเคมีโลหิตในเลือดต่างๆ โดยปัจจัยอื่นที่มีผลทำให้ค่าโลหิตวิทยา และค่าเคมีโลหิตเปลี่ยนแปลง ได้แก่ ชนิด อายุ เพศ ภาวะทางโภชนาการ อุณหภูมิ ฤดูกาล การจับบังคับ การวางยา วิธีการตรวจ วิธีการเก็บรักษาตัวอย่าง การมีปรสิตภายนอก การได้รับสารพิษ และโรค (Wilkinson, 2003)

การตรวจลักษณะทางโลหิตวิทยาในสัตว์เลื้อยคลาน โดยการตรวจสอบจำนวน และลักษณะของเม็ดเลือดชนิดต่างๆ เป็นประโยชน์ในการประเมินภาวะโลหิตจาง (anemia) การอักเสบ (inflammation) ปรสิตในเลือด (parasitemias) ความผิดปกติในการสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic disorders) และความผิดปกติของการควบคุมสมดุลเลือด (hemeostatic alterations) (Thrall et al., 2004) เนื่องจากการติดเชื้อส่วนใหญ่ในสัตว์เลื้อยคลานทำให้เกิดผลตอบสนองโดยมีการอักเสบของเนื้อเยื่อที่ถูกกระทำ ซึ่งการอักเสบและภาวะติดเชื้อส่วนใหญ่ ล้วนมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่จำเพาะของเลือดในระบบไหลเวียนอย่างมีนัยสำคัญ การประเมินสถานะทางโลหิตวิทยา (hematology) โดยดูลักษณะเม็ดเลือดแต่ละชนิดจากการป้ายแผ่นเลือด (blood film) เป็นวิธีที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็วและให้ข้อมูลที่ดีต่อการประเมินภาวะสุขภาพของสัตว์เลื้อยคลาน อีกทั้งช่วยวินิจฉัยในกระบวนการเกิดโรคที่สำคัญได้ (Nicole et al., 2007)

2.2.1 การบังคับและเก็บเลือด (collection and handing of blood sample)

การเก็บตัวอย่างเลือดเป็นขั้นตอนที่ต้องให้ความระมัดระวัง เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดความเจ็บปวด และมีความเสี่ยงต่อการเป็นช่องทางทำให้สัตว์ติดเชื้อแบคทีเรียจากตำแหน่งที่เจาะเก็บเลือด และทำให้เกิดการติดเชื้อทางระบบตามมา การใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เป็นสิ่งที่สำคัญและจำเป็น ควรทำความสะอาดบริเวณที่ต้องการเจาะเลือดก่อนด้วย organic iodine soap หรือ chlorhexidine เข้มข้นร้อยละ 2 และเช็ดอีกครั้งด้วย isopropyl alcohol เข้มข้นร้อยละ 10 หรือ ethanol เข้มข้นร้อยละ 70 ส่วนความเจ็บปวดขึ้นกับตำแหน่งที่

ต้องการเจาะเก็บ และการพิจารณาของสัตวแพทย์ ซึ่งควรเลือกทำการเจาะเก็บในตำแหน่งที่ทำให้สัตว์เจ็บปวด หรือทำการจับบังคับให้น้อยที่สุดเป็นตำแหน่งแรก โดยเฉพาะในสัตว์ที่อ่อนแอ หรือทำการจับบังคับโดยไม่มีวางยาซึม หรือยาสลบก่อนการเจาะเก็บ (Nicole et al., 2007)

ปริมาณของเลือดที่ทำการเจาะเก็บควรคำนึงถึงความปลอดภัยต่อตัวสัตว์เป็นหลัก โดยพิจารณาจากขนาดและสภาวะสุขภาพของสัตว์ขณะนั้น โดยทั่วไปปริมาณของเลือดทั้งหมดในร่างกายของสัตว์เลื้อยคลาน มีความแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิด แต่ทั่วไปอยู่ที่ร้อยละ 5-8 ของน้ำหนักตัว (Smit and Kozubowski, 1985) สัตว์เลื้อยคลานที่มีสุขภาพดีสามารถทนต่อการสูญเสียเลือดเฉียบพลัน (acute lost) ได้ถึงร้อยละ 10 ของเลือดทั้งหมดในร่างกายโดยไม่เกิดผลข้างเคียง ดังนั้นการเจาะเลือดในปริมาณที่เหมาะสมจึงอยู่ที่ไม่เกินร้อยละ 0.7 ของน้ำหนักตัว เช่น เต่าหนัก 100 กรัม สามารถเก็บเลือดได้ 0.7 มิลลิลิตร และการเจาะเก็บเลือดซ้ำในสัตว์ตัวเดิมที่ได้ทำการเก็บเลือดในปริมาณมากไปแล้ว แม้ไม่เกินร้อยละที่แนะนำก็ควรทำการเว้นระยะเวลาในการเจาะเก็บเป็นระยะเวลานานพอก่อนการเจาะเลือดซ้ำ หากเป็นสัตว์ที่มีสุขภาพปกติสามารถเจาะได้ทุกวัน ในปริมาณไม่เกินที่กำหนด แต่หากเป็นสัตว์ป่วยควรพิจารณาจากสภาพสัตว์โดยทั่วไปการตรวจวัดเพื่อประเมินประสิทธิภาพในการรักษาแนะนำให้ทำทุก 2 วัน (Lillywhite et al., 1983)

การเจาะเลือดซ้ำ (serial blood sampling) เช่นการศึกษาเกี่ยวกับเภสัชศาสตร์ ซึ่งจำเป็นต้องเก็บเลือดในเต่าตัวเดิมหลายครั้ง โดยในบางกรณีอาจต้องทำการเก็บตัวอย่างเลือดทุกวันในช่วงหนึ่งอาทิตย์ ในเต่าที่มีขนาดเพียงพอหรือมากกว่า 100 กรัม อาจทำการสอดเข็ม vascular catheterization ไว้ที่หลอดเลือดเพื่อทำการเจาะเก็บเลือดหลายครั้ง (Prezant et al., 1994)

ในเต่าตำแหน่งที่ใช้ในการเจาะเลือดเต่ามีหลายตำแหน่ง การพิจารณาเลือกตำแหน่งที่เจาะขึ้นกับทักษะของผู้เจาะ และวัตถุประสงค์ในการตรวจเลือด ซึ่งตำแหน่งที่ทำการเจาะเก็บเลือดได้ ได้แก่ หัวใจ แอ่งเลือดที่ตา (orbital sinus) เส้นเลือดที่ขา (brachial vein) การตัดปลายนิ้ว (trimmed toe nails) เส้นเลือดใต้กระดอง (subcarapacial vein) เส้นเลือดที่ทางด้านล่างหรือด้านบนของหาง (ventral/dorsal coccygel vein) แอ่งเลือดที่คอ (cervical sinus) และเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) (Hernandez-Diver et al., 2002; Nicole et al., 2007) ซึ่งในแต่ละตำแหน่งนั้นมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไปดังนี้

- **การเจาะเก็บเลือดจากหัวใจ**

การเจาะเก็บเลือดจากหัวใจเป็นวิธีที่อันตรายกว่าวิธีอื่นๆ แต่เป็นตำแหน่งเดียวที่เก็บเลือดในปริมาณมากพอในกรณีการศึกษาในเต่าเล็กหรือแรกเกิดที่ไม่สามารถเจาะเก็บ

เลือดจากตำแหน่งอื่นได้ เนื่องจากลูกเต่ายังมีการสร้างแคลเซียมที่กระดองไม่สมบูรณ์ การสอดเข็มผ่านกระดองล่าง (plastron) ไปที่หัวใจจึงทำได้ง่าย โดยต้องทำความสะอาดกระดองด้วยเทคนิคปลอดเชื้อซ้ำหลายครั้งก่อน ส่วนในเต่าโตที่มีกระดองแข็งแล้ว หากต้องการเจาะหัวใจต้องใช้สว่านเจาะรูที่กระดองล่างก่อนโดยใช้ sterile drill bit หรือ spinal needle เจาะผ่านเนื้อเยื่ออ่อนภายใต้กระดองไปสู่หัวใจ กำหนดตำแหน่งที่เจาะจากขอบเขตของกระดองล่างอยู่บริเวณเส้นล่างของแผ่นเกล็ดกระดองของขาหน้า โดยควรทำการวางยาสลบก่อนทำการเจาะเก็บเลือดที่หัวใจ โดยทั่วไปวิธีนี้ใช้กับเต่าทดลองในห้องปฏิบัติการที่สามารถดูแลติดตามสุขภาพได้ทุกวัน หลังจากเจาะเก็บเลือดเสร็จแล้วต้องทำการปิดรูด้วยสารผนึกที่เหมาะสม เช่น bone wax (Johnson and Johnson, Co., Sommerville, NJ) และ Sterile methacrylate resin (Cyanoveneer, Ellman International Mfg., Inc., Hewlett, NY)

ข้อควรระวังที่สำคัญในการเจาะเก็บเลือดที่หัวใจคือ ความเคร่งครัดของเทคนิคปลอดเชื้อ เพราะหากมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียไปสู่ถุงหุ้มหัวใจ (pericardial sac) หรือ เชื้ออื่นที่ก่อโรค สามารถนำไปสู่ภาวะถุงหุ้มหัวใจอักเสบ (pericarditis) ซึ่งทำให้สัตว์เสียชีวิตตามมาได้ (Nicole et al., 2007)

- **การเจาะเก็บเลือดจากแอ่งเลือดที่ตา**

แอ่งเลือดที่ตาเป็นตำแหน่งที่เจาะเก็บเลือดในปริมาณน้อยได้ โดยใช้ capillary tubes ดูดเก็บเลือด แต่มีโอกาสที่จะทำให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อรอบลูกตา (periocular tissue) และกระจกตา (cornea) เนื่องจากเนื้อเยื่อรอบลูกตามีความไวมากต่อการสัมผัสและทำให้สัตว์เกิดความเจ็บปวด ดังนั้นสัตว์ควรได้รับการวางยาสลบก่อนการเก็บเลือด (Jacobson, 1993) การเก็บเลือดที่แอ่งเลือดที่ตาอาจทำให้เกิดการเจือจางของเลือดจากน้ำนอกเส้นเลือด (extravascular fluid) และสิ่งคัดหลั่งที่ตา ทำให้มีค่าเปลี่ยนแปลงไปของพลาสมา และมีผลต่อการนับจำนวนเม็ดเลือดได้ (Nicole et al., 2007)

- **การเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดที่ขา**

เส้นเลือดที่ขา อันได้แก่ scapular vein, brachial vein และ brachial artery เป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ในการเจาะเลือดในเต่าขนาดใหญ่ แต่เป็นวิธีที่ต้องอาศัยทักษะสูง เนื่องจากไม่สามารถเห็นเส้นเลือดผ่านจากผิวหนังเหมือนในสัตว์อื่น (blind technique) และเนื่องจากหลอดน้ำเหลืองที่ขาหน้าของเต่ามีการพัฒนามาก (Ottaviani and Tazzi,

1977) ทำให้การเก็บเลือดที่ตำแหน่งนี้เกิดการปนของน้ำเหลือง (lymph dilution หรือ hemodilution with lymph) ได้ง่าย ซึ่งอาจเห็นเป็นน้ำเหลืองบริสุทธิ์ลักษณะเป็นน้ำใสออกมาเพียงอย่างเดียว หรือปนกับเลือดออกมา โดยการปนน้ำเหลืองของตัวอย่างเลือดจะทำให้มีผลต่อการนับค่าเม็ดเลือด และการตรวจทางเคมีโลหิตที่คลาดเคลื่อนไปจากค่าจริงได้ (Gottdenker and Jacobson, 1995)

- **การเก็บเลือดจากการตัดปลายนิ้ว**

การเก็บเลือดจากการตัดปลายนิ้วควรใช้ในกรณีที่ไม่สามารถเก็บเลือดจากตำแหน่งอื่นได้ เนื่องจากเลือดที่ได้มีปริมาณน้อย และมีการปนของน้ำเหลือง และน้ำระหว่างเซลล์ (interstitial fluid) ทำให้ตัวอย่างที่ได้ไม่เหมาะสมต่อการตรวจเคมีโลหิตและค่าทางซีรั่มอื่นๆ (serologic values) อีกทั้งเป็นวิธีที่ทำให้สัตว์เจ็บปวดมากและมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อที่บาดแผลตามมา เนื่องจากเส้นเลือดในเนื้อเยื่อของนิ้วเท้าจะทอดยาวมากับเส้นประสาท (nerve ending) อยู่ร่วมด้วย ทำให้ไวต่อความเจ็บปวด และหากแผลตัดที่ปลายนิ้วไม่ปิดสนิท เนื่องจากไม่มีการปิดด้วยการจี้ด้วยความร้อนหรือปิดด้วยเรซิน หรือมีการหลุดออกของก้อนเลือดอุดทางเปิดแผล ย่อมเป็นโอกาสของการติดเชื้อแบคทีเรียสู่ระบบเลือดได้ ดังนั้นวิธีนี้ถึงไม่ควรใช้ในทางปฏิบัติหากไม่จำเป็น (Nicole et al., 2007)

- **การเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดใต้กระดอง**

การเจาะเลือดจากตำแหน่งเส้นเลือดใต้กระดอง เป็นวิธีเจาะเลือดที่ไม่สามารถมองเห็นแนวเส้นเลือดได้เช่นกัน (Hernandez-Diver et al., 2002) โดยเส้นเลือดนี้จะอยู่ในตำแหน่งมุมกระดูกคอชิ้นสุดท้ายที่ต่อกับกระดองหลัง เป็นเส้นเลือดที่มาจากการประสานรวมกันของ common intercostals และ caudal cervical branch ของเส้นเลือด external jugular veins เช่นเดียวกับเส้นเลือดที่อยู่ระหว่างกระดูกหาง (caudal vertebrae) ที่ต่อกับกระดอง (dorsal tail vein) เป็นตำแหน่งที่ใช้ในการเจาะเลือดจากเส้นเลือดหางด้านบน ความยาวของเข็มที่ใช้ในการเจาะเลือดจากรอยต่อเหล่านี้ขึ้นกับขนาดของเต่า ในเต่าขนาดใหญ่อาจจำเป็นต้องใช้เข็มที่มีความยาวมาก เช่น spinal needle โดยทั่วไปตำแหน่งนี้นิยมใช้ในการเจาะเต่าที่มีขนาดเล็กซึ่งทำการเจาะได้ง่าย (Nicole et al., 2007)

- **การเจาะเก็บเลือดจากแอ่งเลือดที่คอ**

ในเต่าบกและเต่าน้ำจืด สามารถเลือกเจาะเก็บเลือดได้จากเส้นเลือด postoccipital venous plexus ซึ่งอยู่ในบริเวณด้านบนของกระดูกคอ หลังตำแหน่ง occipital protuberance ของกะโหลก (Gottdenter and Jacobson, 1995) โดยทำการสอดเข็มผ่านมุมด้านขวาของกระดูกคอ ส่วนในเต่าทะเลจะใช้แอ่งเลือด dorsal cervical sinus ที่มีต้นกำเนิดมาจาก postoccipital venous plexus ซึ่งเป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ในการเจาะเลือดเต่าทะเลมากที่สุด (Owen and Ruiz, 1980) โดยการสอดเข็มในตำแหน่งซ้ายหรือขวาของแนวกลางคอด้านบนบริเวณต้นคอ (ด้านชิดกับกระดอง) ความลึกของแอ่งจะขึ้นกับขนาดของเต่า มีตั้งแต่ 0.5-3 ซม. และควรจับบังคับให้เต่าทะเลก้มหัวลงเพื่อให้สอดเข็มเข้าแอ่งเลือดได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตามการเจาะเลือดจากตำแหน่งนี้อาจเกิดการปนของน้ำเหลืองได้ และไม่สามารถมองเห็นเส้นเลือดได้จากภายนอกเช่นกัน (Campbell and Ellis, 2007)

- **การเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดที่คอ**

เส้นเลือดที่คอคือ jugular vein และ carotid artery เป็นตำแหน่งเดียวที่สามารถมองเห็นแนวเส้นเลือดจากภายนอกได้ แม้ในเต่าที่มีขนาดเล็กทั้งเต่าบก และเต่าน้ำจืด (Jacobson et al., 1991) เส้นเลือดที่คอเป็นตำแหน่งการเจาะเลือดที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจทางโลหิตวิทยา และเคมีโลหิต เนื่องจากจะได้เลือดที่บริสุทธิ์ ไม่มีการปนเปื้อนของน้ำเหลือง (Nicole et al., 2007) อย่างไรก็ตามการเจาะเลือดที่เส้นเลือดที่คอจำเป็นต้องทำการจับบังคับให้เต่ายืดคอออก ซึ่งทำได้อย่างยากลำบาก หรือเกือบทำไม่ได้เลยในเต่าบางชนิด เช่น เต่าหับ ที่ส่วนใหญ่ต้องวางยาสลบ หรือในเต่าที่มีขนาดไม่ใหญ่มาก สามารถทำการจับบังคับโดยไม่ต้องใช้ยาสลบโดยการกระตุ้นที่ขาหลัง เพื่อให้เต่ายืดคอออกมาจากกระดองแล้วจึงรีบทำการจับหัวไว้ หรือใช้ที่ยึดหรือเกี่ยวที่ปลายจะงอยปากบ้านบน เพื่อดึงให้เต่าออกมาด้วยมือข้างหนึ่งขณะที่หนีบตัวเต่าที่อยู่ที่เข่าหรือมีผู้ช่วยจับ เมื่อเต่ายืดคอออกมามากจะพบว่าเส้นเลือดดำที่คอ หรือ jugular vein จะโป่งขึ้นมาจนเห็นได้ชัดจากผิวหนัง ทั้งด้านซ้ายและขวา ส่วนเส้นเลือดแดง carotid artery จะอยู่ลึกกว่ามองเห็นได้ลำบาก แต่ประมาณได้จากตำแหน่งด้านล่างของ jugular vein ซึ่งจะวางตัวขนานไปด้วยกัน เมื่อรู้ตำแหน่งเส้นเลือดที่ต้องการเจาะแล้ว จึงทำความสะอาดก่อนด้วย ethanol เข้มข้นร้อยละ 70 และใช้เข็มหรือ butterfly เบอร์ 23G หรือ 25G ในการเก็บเลือด เมื่อเสร็จสิ้นควรทำการกดห้ามเลือดอย่างน้อย 5 นาที เพื่อป้องกันการเกิดถุงเลือด (hematona formation) ข้อควรระวังในการเจาะเลือดในตำแหน่งนี้ คือการเกิดโรคของ

กล้ามเนื้อ (myopathy) จากการจับบังคับดึงคอที่แรงเกินไป (Nicole et al., 2007) และตรวจพบการเพิ่มขึ้นของค่า creatinine kinase ในพลาสมา (Thrall et al., 2004)

2.2.2 กระบวนการทางโลหิตวิทยา (Hematology procedures)

การประเมินค่าเม็ดเลือดหรือ complete blood counts (CBCs) รวมถึงจำนวนเม็ดเลือดแดง (red blood cell count : RBC) ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (hemoglobin concentration: Hb) เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (packed cell volume: PCV) จำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cell count: WBC) การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (diffential leukocyte counts) และการประเมินจากลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือด (Campbell, 2006)

เม็ดเลือดในสัตว์เลื้อยคลานปกติ ประกอบด้วย เม็ดเลือดแดง (erythocytes) เม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูลโลไซต์ (คือ เฮเทอโรฟิล อีโอสิโนฟิล และเบโซฟิล) เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear (คือ ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และ อะซูโรฟิล) และทรอมโบไซต์ โดยในเต่าแต่ละชนิดจะมีค่าพิสัยอ้างอิง (reference intervals) ทางโลหิตวิทยาที่แตกต่างกันไป ดังตารางที่ 2.1

ตัวอย่างเลือดที่เก็บได้ควรบรรจุในหลอดเก็บเลือดที่บรรจุด้วยสารกันเลือดแข็งตัวชนิดลิเธียมเฮปาริน (lithium heparin) เท่านั้น เนื่องจากการใช้ EDTA (ethylenediaminetetraacetic) ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ที่สำคัญในเต่า (Jacobson, 1987 ; Muro et al., 1998) แม้ EDTA จะใช้ในสัตว์เลื้อยคลานอื่น เช่นงูได้ก็ตาม (Salakij et al., 2002a) แต่การใช้เฮปารินในการป้องกันการแข็งตัวของเลือด มักทำให้เม็ดเลือดเปลี่ยนสีเบี่ยงไปทางสีฟ้า (bluish tinge) ในพื้นหลังของแผ่นฟิล์มเลือด และย้อมติดสีเม็ดเลือดขาวได้ไม่ดีเท่าการใช้ EDTA อีกทั้งมักทำให้เกิดการเกาะตัวกันของเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดมากกว่า (Hawkey and Dennett, 1989) ซึ่งทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดได้ ดังนั้นควรทำการป้ายแผ่นฟิล์มเลือดทันทีหลังจากเจาะเลือดโดยไม่ต้องมีการใส่สารป้องกันการแข็งตัว การใช้สารป้องกันเลือดชนิดโซเดียมเฮปาริน (sodium heparin) หรือแอมโมเนียมเฮปาริน (ammonium heparin) สามารถใช้ในการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาได้เช่นกัน (Campbell, 2006) โดยไม่มีผลต่อการตรวจเคมีโลหิต แต่ควรทำการแยกพลาสมาออกจากเม็ดเลือดให้เร็วที่สุด เพื่อให้เกิดความถูกต้องในค่าเคมีโลหิตบางตัว โดยเฉพาะการลดลงของค่าโพแทสเซียม (potassium) ในเลือด (Abou-Madi and Jacobson, 2003)

การเตรียมแผ่นฟิล์มเลือด ด้วยวิธี coverslip method มีความเหมาะสมกับเม็ดเลือดของสัตว์เลื้อยคลานมากกว่า slide-to-slide method เนื่องจากทำให้เกิดความเสียหายกับเม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่และเปราะของสัตว์เลื้อยคลานได้น้อยกว่า อีกทั้งทำให้เกิดการกระจายของเม็ดเลือดที่ดี

เหมาะสำหรับการนับเม็ดเลือด และควรทำให้แผ่นฟิล์มแห้งอย่างรวดเร็ว (rapid drying) ด้วยการใช้อุปกรณ์ที่เป่าลมอุ่น ซึ่งจะไม่ทำให้เกิดภาพลวง (drying artifacts) ในเม็ดเลือดแดง

สีย้อมแผ่นฟิล์มเลือดในสัตว์เลี้อยคลานที่ดี คือสี Romanowsky-type stains เช่น Wright's-Giemsa, Wright's-Leishman's และ May-Grünwald การใช้สีย้อม Quick stain เช่น Diff-Quik® ใช้ได้เช่นเดียวกัน แต่ให้การติดสีจางมากกับแกรนูลของเม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิล (Muro et al., 1998) อีกทั้งแสดงสีแดง (eosinophilic) ของเฮเทอโรฟิลได้จาง และไม่ชัดเจน (LeBlanc, 2001) สีที่นิยมใช้ในสัตว์เลี้อยคลาน คือ Wright's-Giemsa เนื่องจากใช้แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ดี และใช้เวลาไม่มากนักในการย้อม (Nicole et al., 2007)

หลังจากทำการเจาะเก็บเลือดและป้ายแผ่นฟิล์มเลือดแล้ว เลือดที่เหลือทำการใส่หลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว ควรทำการพลิกหลอดไปมาเบาๆ เพื่อให้เลือดผสมดีกับสารกันแข็งตัว การใส่เลือดน้อยเกินไปหรือมีสารป้องกันการแข็งตัวมากเกินไปในหลอดเก็บเลือดอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของค่าฮีมาโตคริต และค่าโลหิตอื่นๆ โดยตัวอย่างเลือดที่แข็งตัวหรือมีไฟบริน (fibrin) ไม่ควรนำมาตรวจ และควรทำการตรวจเลือดให้เร็วที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ เนื่องจากการเก็บเลือดในสารป้องกันเลือดแข็งตัวเป็นเวลานานสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนและลักษณะรูปร่างของเซลล์ เช่น การแตกของแกรนูล (degranulation) ในเม็ดเลือดขาว การเกิดช่องว่างภายใน (vacuolation) ของเม็ดเลือดหรือการสลายของเซลล์เม็ดเลือด (cell lysis) ได้ (Nicole et al., 2007)

2.2.2.1 เม็ดเลือดแดง (Erythrocyte)

การประเมินเม็ดเลือดแดง นับรวมถึงค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (total red blood cell count; TRBC) ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hb) และลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดแดงในแผ่นฟิล์มเลือด การใช้วิธี microhematocrit เพื่อประเมินเม็ดเลือดแดงอัดแน่นนั้น ควรบรรจุเลือดลงใน microhematocrit tube ในปริมาณประมาณ 90% ของหลอดและอุดปลายด้านหนึ่ง ปั่นด้วย microhematocrit centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 *g* เป็นเวลา 5 นาที หลอดเลือดที่ปั่นแล้ว สามารถนำมาวัดค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในพลาสมา (total plasma protein) ดัชนีของการเกิดดีซ่าน (icterus index) และหลังจากตกตะกอนด้วยความร้อน (heat precipitation) สามารถนำมาประมาณค่าไฟบริโนเจน (fibrinogen) อย่างหยาบได้ด้วย

ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าแตกต่างกันไปในสัตว์เลี้อยคลานแต่ละชนิด โดยทั่วไปอยู่ที่ 20-45 % (Sypek and Borysenko, 1988)

พลาสมาในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่ใสไม่มีสี หรือเป็นสีเหลืองเล็กน้อย ขึ้นกับธรรมชาติของเม็ดสีในอาหารที่สัตว์กิน (dietary pigment) พลาสมาที่มีสีส้มถึงเหลืองสามารถพบในสัตว์เลื้อยคลานที่กินพืช (herbivore) เนื่องจากเม็ดสีแคโรทีนอยด์ (carotenoid pigment) พลาสมาสีเขียวบ่งบอกถึงความเข้มข้นของ biliverdin ที่สูงในเลือด ซึ่งพบได้เป็นปกติในสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มลิซาร์ด (lizard) (Campbell and Ellis, 2007) ความหนืดของพลาสมาในสัตว์เลื้อยคลาน รวมทั้งสัตว์ที่มีนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงเช่นนก พบว่ามีความเสถียรของกลไกและได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือสัตว์ที่ไม่มีนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงทำหน้าที่เป็นโครงร่างของเซลล์ (cytoskeletic structure) ทำให้เกิดความเสถียรที่ดีกว่า ทำให้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจึงไม่มีผลต่อการลดความหนืดของเลือด และด้วยเหตุที่สัตว์เลือดเย็นมีกลไกที่ควบคุมให้เลือดมีความหนืดให้เกิดการไหลผ่านของเม็ดเลือดแดงที่ capillary bed อย่างช้าๆ เพื่อให้เซลล์สามารถได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ทำให้สัตว์เหล่านี้มีความต้องการออกซิเจนในปริมาณต่ำกว่าในสัตว์เลือดอุ่น (Viscor et al., 2003)

ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดสามารถตรวจด้วยวิธีนับมือ (Hemocytometer) หรือใช้เครื่องตรวจนับเซลล์อัตโนมัติ (automated cell counter) โดยวิธีนับมือมีสองวิธี คือ erythrocyte Unopette system และ Natt-Herrick's solution ดังนี้

- **วิธีนับด้วยวิธี Erythrocyte Unopette system** (Becton-Dic Kinson Rutherford, NJ)

  วิธี Erythrocyte Unopette system เป็นการดูดเอาเลือดผสมใน Unopette vial ให้เป็นสารละลายเลือดที่ 1 : 200 ส่วนของสารละลาย แล้วจึงนับค่า Hemocytometer ทั้งสองฝั่ง โดยการวาง Hemocytometer ใน Petri dish ที่มีความชื้น หลังจากให้เซลล์หยุดเคลื่อนที่ก่อนประมาณ 5-10 นาที ทำการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ 4 มุม และตรงกลางของช่องใหญ่ด้วยกำลังขยายต่ำ เม็ดเลือดแดงจะมีขนาดใหญ่ ติดสีม่วงจาง และนิวเคลียสติดสีเข้ม ค่าเม็ดเลือดแดงทั้งหมด หรือ TRBC (cells/µl) คำนวณจากการนำจำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้คูณกับ 10,000 (Nicole et al., 2007)

- **วิธี Natt-Herrick's solution**

วิธี Natt-Herrick's solution เป็นการย้อมติดสีของ methyl-violet-based stain โดยเป็นวิธีที่ประกอบด้วยการเจือจางและย้อมสีไปด้วยกัน (Campbell, 1995 ; Natt and Herrick, 1952) โดยขั้นตอนแรกทำการเจือจางเลือดในอัตราส่วน 1 : 100 โดยใช้ 990 ไมโครลิตรของ Natt-Herrick's stain กับ 10 ไมโครลิตรของเลือด และนำ 100 ไมโครลิตรของสารละลายที่ได้ผสมกับ

900 ไมโครลิตรของสารละลาย isotonic sodium chloride เข้มข้นร้อยละ 0.85 ทำให้ได้เลือดที่อัตราส่วน 1 : 1,000 ของเลือดตัวอย่าง ทำการหยดนับด้วย Hemocytometer และนับเช่นเดียวกับวิธี Unopette system แต่การคำนวณ TRBC (cells/µl) คำนวณจากการนำจำนวนที่นับได้คูณกับ 1,000 (Nicole et al., 2007) หรือใช้ RBC pipette โดยดูดเลือดให้ถึงขีด 0.5 จากนั้นดูดน้ำยา Natt – Herrick's solution ให้จนถึงขีด 101 เขย่าเบาๆ นาน 1 นาที จะได้สารละลายเม็ดเลือด 1:200 จากนั้นนำไปหยดใน Hemocytometer หรือ Neubauer counting chamber โดยทิ้งไว้สักครู่ก่อน เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดอยู่นิ่ง การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง ให้นับที่หัวกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 40x โดยนับจากสี่เหลี่ยมจตุรัส 5 ช่อง (medium size square) ซึ่งเม็ดเลือดแดงจะไม่ติดสี นำจำนวนที่นับได้คูณด้วย 10,000 จะได้ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงต่อ 1 ไมโครลิตร (Thrall et al., 2004)

ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินทำการวัดได้เหมือนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ด้วยวิธี cyanmethemoglobin method หรือ hemoglobinometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL) ต่างที่การวัดด้วย spectrophotometer ที่ถูกต้องของฮีโมโกลบินด้วยวิธี Cyanmethemoglobin ในสัตว์เลื้อยคลานต้องมีการนำนิวเคลียสออกก่อน โดยการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก โดยการปั่นเหวี่ยง (5 นาที ที่ 500x*g*) ก่อนนำไปวัด optical density เพราะนิวเคลียสมีผลทำให้ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินสูงขึ้น (Campbell, 2006) ในสัตว์เลื้อยคลานปกติจะมีค่าฮีโมโกลบินที่แตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดสัตว์ ทั่วไปมีค่าตั้งแต่ 5.5-12 g/dL (Sypek and Borsenko, 1988)

ค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง (red cell indices) ได้แก่ ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (mean corpuscular volume; MCV) ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงหนึ่งเม็ด (mean corpuscular hemoglobin; MCH) และปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (mean corpuscular hemoglobin concentration; MCHC) ซึ่งใช้การคำนวณจากค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด และ ฮีโมโกลบิน ตามสูตร ดังนี้

$$\text{MCV (fl)} = (\text{PCV} \times 10) / \text{RBC}$$

$$\text{MCHC (mg/dl)} = (\text{Hb} \times 100) / \text{PCV}$$

$$\text{MCH (pg)} = (\text{Hb} \times 10) / \text{RBC}$$

ขนาดของเม็ดเลือดแดงในเต่าบกจะมีขนาดใหญ่กว่าเต่าน้ำ และเม็ดเลือดแดงในเต่าบกจัดว่ามีขนาดใหญ่ที่สุดในบรรดาสัตว์เลื้อยคลาน โดยลิซาร์ดมีขนาดเม็ดเลือดแดงที่เล็กที่สุด และ งูเต่าน้ำ อะลิเกเตอร์ (จระเข้น้ำเค็ม) และเต่าบก มีขนาดเม็ดเลือดแดงที่ใหญ่มากขึ้นตามลำดับ (Sypek and Borsenko, 1988, Campbell, 2006, Gottdenker and Jacobson, 1995) ขนาดของเม็ดเลือดจะมีค่าผกผันกับค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด คือ สัตว์เลื้อยคลานที่มีเม็ดเลือด

แดงขนาดเล็กกว่าจะมีค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดสูงกว่าด้วยเช่นกัน (Sypek and Borsenko, 1988; Campbell, 2006)

2.2.2.2 เม็ดเลือดขาว (Leukocyte)

การประเมินเม็ดเลือดขาว กล่าวรวมถึงจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (total white blood cell count; TWBC) การนับแยกเม็ดเลือดขาว (differential leukocyte count) และประเมินลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดขาวในแผ่นฟิล์มเลือด โดยการนับเม็ดเลือดขาวของสัตว์เลี้ยงคลานด้วยเครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ มักมีผลคลาดเคลื่อนจากเม็ดเลือดแดงและทรอมโบไซต์ (Nicole et al., 2007) จึงนิยมใช้วิธีนับมือมากกว่า

การนับเม็ดเลือดขาวด้วยวิธีการนับมือของในสัตว์เลี้อยคลานมี 2 วิธี คือวิธีนับโดยตรงด้วย Natt-Herrick's solution และวิธีนับกึ่งโดยตรง (Semidirect count) ด้วย phloxine B solution ซึ่งทั้งสองวิธีจะนำมานับด้วย Hemocytometer เหมือนกัน (Campbell, 2006; Schermer, 1967)

- **วิธี** Natt-Hemick's solution

เตรียมด้วยวิธีเหมือนการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ในหัวข้อ 2.2.2.1 โดยเม็ดเลือดขาวจะมีลักษณะกลมและติดสีม่วงเข้มที่แกรนูล หรือม่วงอ่อนที่ไซโตพลาสซึม ทำการนับใน 9 ช่องใหญ่ จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Cell/μL) คำนวณได้จากจำนวนที่นับ บวกร้อยละ 10 ของค่าที่ได้ คูณ 100

ข้อดีของวิธี Natt-Herrick's solution คือ สามารถนับได้ในคราวเดียวกับการนับเม็ดเลือดแดง และทรอมโบไซต์ เนื่องจากมีขั้นตอนเหมือนกัน ส่วนข้อเสียคือ วิธีนี้ทำให้แยกเซลล์ลิมโฟไซต์ขนาดเล็กกับทรอมโบไซต์ได้ยาก ทำให้อาจเกิดความคลาดเคลื่อนของจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ แก้ไขโดยตรวจด้วยกำลังขยายที่มากขึ้นจะเห็นว่าลิมโฟไซต์จะมีลักษณะกลมเล็กกว่าและติดสีม่วงจาง ส่วนทรอมโบไซต์จะมีรูปร่างขรุขระและติดสีของไซโตพลาซึมที่อ่อนใสและโปร่งแสงกว่า อีกทั้งวิธีนี้สามารถทำให้ความผิดพลาดเนื่องจากขั้นตอนการเจือจางกับสารละลายได้ง่าย ทำให้จำนวนเม็ดเลือดที่นับได้มีความคลาดเคลื่อน (Nicole et al., 2007)

การแก้ไขปัญหาการแยกเม็ดเลือดขาวกับรอมโบไซต์สามารถใช้วิธีของ McCracken (2005) โดยการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (TWBC count) และจำนวนทรอมโบไซต์ โดยใช้ RBC pipette และสาร Natt and Herrick's solution โดยทำการนับเม็ดเลือดขาว และทรอมโบไซต์ที่แยกกันได้ยากรวมกันใน

Hemocytometer ทำการนับใน counting chamber ในสี่เหลี่ยมจตุรัสทั้ง 9 ช่อง แล้วคำนวณจำนวนรวมของเม็ดเลือดขาวและทรอมโบไซต์จากสูตร

(TWBC + Thrombocyte count/ µL) =

(จำนวนทั้งหมดที่นับได้ของเม็ดเลือดขาวและทรอมโบไซต์ทั้งหมด 9 ช่อง + 10%) x 200

เมื่อทำการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว ทำการนับจำนวนทรอมโบไซต์ที่พบต่อการพบเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์ ซึ่งนำมาใช้คำนวณได้ทั้งค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด และจำนวนทรอมโบไซต์ดังนี้

Thrombocyte count (cells/ µL)

$$= \frac{\text{(TWBC+ Thrombocyte count) x จำนวนทรอมโบไซต์ต่อเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์}}{\text{จำนวนทรอมโบไซต์ที่พบ + 100}}$$

TWBC count (cells/ µL)

= (TWBC+ Thrombocyte count) - จำนวนทรอมโบไซต์ต่อเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์

- **วิธี Phloxine B method**

ในสัตว์เลื้อยคลานปกติจะมีเม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิลสูงที่สุด โดยเฉพาะในเต่าบกบางชนิด วิธีการนับกึ่งโดยตรงด้วย phloxine B method จึงสามารถนำมาใช้ในการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดได้ โดยวิธีนี้ให้เกิดการติดสีแดงชัดเจนของเฮเทอโรฟิล และอีโอสิโนฟิล ใน Hemocytometer ซึ่งในปัจจุบันทำได้ง่าย โดยใช้ Eosinophil Unopette 5877® system (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ) ซึ่งพัฒนาการใช้มาจากการใช้นับจำนวนอีโอสิโนฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Costello, 1970) วิธีการคือ ทำการเจือจางเลือดในอัตราส่วน 1 : 32 ลงใน Eosinophil Unopette ซึ่งบรรจุด้วยสารละลาย phloxine dye แล้วจึงทำการหยดใน Hemocytometer ที่วางใน Petri dish ที่มีความชื้น และวางให้เซลล์หยุดเคลื่อนที่ก่อน 5-10 นาทีแล้วจึงทำการนับเซลล์ที่ติดสีแดงใน 9 ช่องใหญ่ทั้ง 2 ฝั่ง ผลที่ได้นำมาคำนวณจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด เฮเทอโรฟิล และอีโอสิโนฟิลต่อตารางลูกบาศก์มิลลิเมตรของเลือด ดังนี้

Heterophil + Eosinphil/µl = (cells counted x 10 x 32)/ 18

หลังจากนั้นนำผลการนับแยกเม็ดเลือดจากแผ่นฟิล์มเลือดมาคำนวณหา TWBC/µl โดยสูตร ดังนี้

$$\text{TWBC/µl} = \frac{\text{[(Heterophil + Eosinphil /µl) x 100]}}{\text{\% Heterophil และ Eosinphil}}$$ (Campbell, 2006)

แต่หากเลือดที่ได้น้อยสามารถทำได้เพียงการป้ายแผ่นฟิล์มเลือด การประมาณจำนวนเม็ดเลือดขาวสามารถใช้วิธีเดียวกับที่ใช้ในนก โดยการนับเซลล์เม็ดเลือดจากแผ่นฟิล์มเลือด โดยมีสูตร ดังนี้

เซลล์/ไมโครลิตร = (ค่าเฉลี่ย # ของเซลล์ต่อ field) x (กำลังขยายเลนส์วัตถุ)^2

ตัวอย่าง เช่น ค่า TWBC ที่นับภายใต้กำลังขยาย 50 x ใน 10 field พบเม็ดเลือดขาวทั้งหมด 50 เซลล์ คือ เฉลี่ยได้ 5 เซลล์ต่อ field เมื่อ คูณด้วย 50^2 (2,500) ผลของ TWBC ที่ได้ คือ 12,500 Cell/µl (Campbell and Cole, 1986)

วิธีการนับเม็ดเลือดด้วยวิธีนับด้วยมือจากแผ่นฟิล์มเลือดดังวิธีการข้างต้น นิยมใช้เพื่อเป็นควบคุมคุณภาพ (quality control) ควบคู่กับการนับเม็ดเลือดขาวด้วย Hemocytometer เนื่องจากมีความคลาดเคลื่อนจากขั้นตอนได้มาก (Nicole et al., 2007)

2.2.2.3 ทรอมโบไซต์ หรือเกล็ดเลือด (Thrombocytes)

ในสัตว์เลื้อยคลานทรอมโบไซต์เกาะตัวกันได้รวดเร็วภายนอกตัวสัตว์ (*in vitro*) เช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การเกาะตัวกันของทรอมโบไซต์ทำให้จำนวนนับของเซลล์คลาดเคลื่อนได้มาก โดยอาจเพิ่มขึ้น หรือลดลงได้ ในกรณีที่แผ่นฟิล์มเลือดมีการกระจายตัวของเซลล์ที่ดี สามารถทำการนับจำนวนเกล็ดเลือดได้จากแผ่นฟิล์มเลือด โดยทำการนับจำนวนทรอมโบไซต์ที่มีต่อเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์ โดยทั่วไปจำนวนทรอมโบไซต์ในสัตว์เลื้อยคลานอยู่ที่ 25-350 เซลล์/เม็ดเลือดขาว 100 เซลล์ (Sypek and Borsenko, 1988) แต่วิธีนี้มีความคลาดเคลื่อนไปในทางมากขึ้น หรือน้อยลงได้ เนื่องจากการนับขึ้นกับจำนวนเม็ดเลือดขาว ดังนั้นอาจทำการนับจำนวนทรอมโบไซต์ด้วยวิธี Natt-Herrick's solution ในคราวเดียวกันกับการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด หรือจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด โดยนับทรอมโบไซต์ในช่องใหญ่กลาง Hemocytometer ของทั้ง 2 ฝั่ง และนำจำนวนที่นับได้มาคูณด้วย 500 จะได้ค่าจำนวนทรอมโบไซต์/µl แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนับด้วย Hemocytometer มีข้อเสียเช่นกัน เนื่องจากทรอมโบไซต์มักเกาะตัวกัน ค่าที่ได้จึงไม่แน่นอนหรือคลาดเคลื่อนได้ (Campbell, 2006)

2.2.2.4 ค่าโปรตีนในพลาสมา (total Protein) และไฟบริโนเจน (fibrinogen)

ในการตรวจโปรตีนพลาสมาของสัตว์เลื้อยคลาน นิยมทำการวัดด้วย refractometer ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย แต่มีความแม่นยำต่ำ (Nicole et al., 2007) ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจโปรตีนในพลาสมา ควรใช้วิธี Biuret method ด้วย spectophotometry (Kingsley, 1972) ปกติค่าโปรตีนในพลาสมาของสัตว์เลื้อยคลานอยู่ในระดับ 3-8 g/dl (Campbell, 2006)

องค์ประกอบของไฟบริโนเจนในเลือดตัวอย่างสามารถประเมินอย่างหยาบจากวิธีตกตะกอนด้วยความร้อน (heat precipitation test) โดยทำการวัดความแตกต่างของ total plasma solids ก่อนและหลังการให้เกิดการตกตะกอนด้วยความร้อนของไฟบริโนเจน มีขั้นตอนคือ นำ microhematocrit tube ที่ใช้วัด hematocrit หลอดหนึ่งปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 *g* แล้ว หักเอาส่วนพลาสมามาวัดด้วย refractometer และหลอดที่สองเอาไปให้ความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส ใน water bath นาน 3 นาที ตามด้วยนำไปปั่นเหวี่ยง แล้วนำมาวัดเหมือนหลอดแรก ค่า Total solids แตกต่างกันของทั้ง 2 หลอด คือค่าของ fibrinogen (mg/dl) โดยทั่วไปมีค่าอยู่ที่ 100-200 mg/dl อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีความไวต่ำ หรือใช้ไม่ได้ในสัตว์ที่มีค่าไฟบริโนเจนปกติต่ำ เนื่องจากมีค่าแตกต่างกันน้อยมากจนตรวจวัดไม่ได้ ดังนั้นการใช้ ocular micrometry และ coagulation-based assay จึงมีความถูกต้องมากกว่าในการประเมินค่าไฟบริโนเจน (Meyer and Harvey, 2004) ในเต่าพบว่าค่าไฟบริโนเจนมีความสัมพันธ์กับค่าโปรตีนทั้งหมดในพลาสมามากกว่าในนก และในหนูอย่างมีนัยสำคัญ (Viscor et al., 2003) โดยค่าไฟบริโนเจนที่สูงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม บ่งบอกถึงการเกิดขบวนการอักเสบ (active inflammation) และความเปลี่ยนทางสรีรวิทยา แต่ในสัตว์เลื้อยคลานยังไม่มีรายงานการศึกษาของค่าที่เปลี่ยนแปลงต่อตัวสัตว์ที่ชัดเจน

2.2.3 การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา

ค่าโลหิตวิทยาในสัตว์เลื้อยคลานมีผลจากหลายปัจจัย ที่นอกเหนือจากความเจ็บป่วยของสัตว์ ได้แก่ ปัจจัยภายนอก เช่น ฤดูกาล สภาวะแวดล้อม ตำแหน่งการเจาะเลือด วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ปัจจัยภายใน เช่น อายุ และเพศ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ล้วนมีผลต่อเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด โดยข้อมูลทางโลหิตวิทยาทั้งหมดที่ได้จะสามารถนำมาใช้ในการช่วยประมวล วินิจฉัยโรค พยากรณ์ และติดตามผลการรักษาในสัตว์เลื้อยคลานได้ (Campbell and Ellis, 2007)

2.2.3.1 เม็ดเลือดแดงและการตอบสนองต่อการเกิดโรค

- **ลักษณะรูปร่างและหน้าที่ของเม็ดแดงปกติ**

เม็ดเลือดแดงในสัตว์เลื้อยคลานเป็นเม็ดเลือดที่มีนิวเคลียส มีรูปร่างรี และใหญ่กว่าเม็ดเลือดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ที่มีเม็ดเลือดแดงมีนิวเคลียสด้วยกัน คือสัตว์ปีก สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และปลา พบว่าเม็ดเลือดของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำเป็นเม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด โดยทั่วไปเม็ดเลือดแดงโตเต็มวัยในสัตว์เลื้อยคลานจะมีนิวเคลียสที่ขอบไม่เรียบ รูปร่างกลมกึ่งรี มีโครมาตินหยาบ (coarse chromatin) ติดสีเข้ม และไซโตพลาสซึมสีออกแดง (eosinophilic) เนียน เม็ดเลือดแดงอ่อน เรียกว่า polychromatophilic erythocytes เนื่องจากมีการติดสีไม่สม่ำเสมอ รูปร่างคล้ายคลึงกับเม็ดแดงที่โตเต็มวัย แต่ค่อนข้างกลม และไซโตพลาสซึมออกสีฟ้า

มากกว่าเมื่อย้อมด้วยสี Romanowsky stain นิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงอ่อนจะมีการเกาะเป็นกลุ่มของโครมาตินชัดเจน มี euchromatin ที่บ่งบอกถึงการสร้าง active hemoglobin ในเซลล์เม็ดเลือด ระยะของเม็ดเลือดแดงอ่อนที่พบมากคือ ระยะรูบริไซต์ (rubricyte) ซึ่งมีนิวเคลียสรูปร่างกลมขอบไม่เรียบ และมีการเกาะกลุ่มของโครมาตินภายใน ไซโตพลาสซึมกลมติดสีน้ำเงิน เม็ดเลือดแดงอ่อนระยะรูบริไซต์มีลักษณะคล้ายกับลิมโฟไซต์และพบได้มากในสัตว์ที่อยู่ในภาวะ regenerative response เม็ดเลือดที่ยังมีขบวนการแบ่งตัว (replication) จะสามารถพบ mitotic figure ได้ในแผ่นฟิล์มเลือด โดยเฉพาะในสัตว์ป่วยที่ยังสร้างเม็ดเลือดใหม่ได้ (active regeneration) เมื่อเม็ดเลือดอ่อนมีอายุมากขึ้น นิวเคลียสที่กลมจะเปลี่ยนเป็นรี และมีลักษณะของ pyknotic ที่เป็นสารติดสีเข้มแน่นของโครมาตินในนิวเคลียส ในสัตว์เลี้อยคลานปกติสามารถพบเม็ดเลือดแดงอ่อนได้เป็นปกติ แต่ในปริมาณไม่มากนักในกระแสเลือด รวมถึงการพบเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีนิวเคลียส (erythroplastid) ที่อาจพบได้เป็นปกติในสัตว์ที่ไม่มีอาการเจ็บป่วย (Campbell, 1995, Hawkey and Dennett, 1989)

ขนาด จำนวน และปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง เมื่อเปรียบเทียบกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก และสัตว์เลื้อยคลาน พบว่าสัตว์เลื้อยคลานมีจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน และเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ต่ำกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและนก (Hawkey et al., 1991)

หน้าที่ของเม็ดเลือดแดงในสัตว์เลื้อยคลานคล้ายกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยในนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงประกอบด้วย hemoglobin tetramers ที่ทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนเข้าและนำคาร์บอนไดออกไซด์ออกแลกเปลี่ยนระหว่างเลือดและเนื้อเยื่อ โครงสร้างของฮีโมโกลบินในสัตว์เลื้อยคลานแต่ละชนิดมีลักษณะที่ค่อนข้างคล้ายคลึงกัน (Coates, 1975) อย่างไรก็ตามความเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยของโครงสร้างโมเลกุลมีผลต่อความสามารถในการขนส่งออกซิเจน (oxygen affinity) ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Rücknagel and Braunitzer, 1988) โดยในเต่าจะมีความสามารถในการขนส่งออกซิเจนน้อยกว่าในลิซาร์ด (Johansen et al., 1980 ; Torsoni and Ogo, 1995) มีการศึกษาในเต่าแก้มแดง (red eared sliders ; *Trachemys scripta elegans*) ว่า hemoglobin tetramer ในเลือดมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งออกซิเจน และความเข้มข้นของ ATP (adenosine triphosphate) (Frische et al., 2001)

เม็ดเลือดแดงสร้างและปลดปล่อยมาจากไขกระดูก และกำจัดออกด้วยขบวนการกลืนทำลาย (phagocyte) ในม้าม การสร้างเม็ดเลือดแดงเกิดเป็นหลักในบริเวณนอกเส้นเลือด (extravascular space) ของไขกระดูก และเกิดได้เช่นกันจาก erythroid precursors ที่แบ่งตัวในกระแสเลือด ในระยะแรกเกิดของสัตว์เลื้อยคลานถุงไข่แดงเป็นตำแหน่งปฐมภูมิในการสร้างเม็ดเลือด และอาจทำหน้าที่ไปจนถึงช่วงอายุหนึ่งปีแรกของสัตว์ (Vasse and Beaupain, 1981) อายุ

ของเม็ดเลือดแดงในสัตว์เลื้อยคลานมีระยะเวลายาวนานกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เม็ดเลือดแดงมีอายุประมาณ 2-5 เดือน (60-150 วัน) แต่ในสัตว์เลื้อยคลานจะมีอายุถึง 600-800 วัน ซึ่งอาจเกิดจากขบวนการเมแทบอลิสมที่ต่ำกว่า (Frye, 1991) โดยเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุขัยจะเข้าสู่ programmed cell death ทำให้เกิดการ apoptosis ตามมา (Miyamoto et al., 2005)

ความแตกต่างของเม็ดเลือดแดงระหว่างเพศ มีการรายงานในสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิด ใน New Guinea snapping turtle (*Elseya novaeguinae*) และ grass snake (*Natrix natrix*) เพศผู้พบค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และบิลิรูบิน (bilirubin) ที่สูงกว่าเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ (Anderson et al., 1997; Wojtaszek, 1991) และในกิ้งก่าอีกัวน่าเขียว เพศเมียจะมีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCHC) สูงกว่าเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Harr et al., 2001)

การศึกษาวิจัยในปีก่อน ค.ศ.1979 มีรายงานว่าการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของ methemoglobin ในสัตว์เลื้อยคลานเกิดขึ้นได้ในสัตว์ที่สุขภาพปกติ ตรงกันข้ามกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ความเข้มข้นของ methemoglobin ที่เพิ่มขึ้นจะเป็นการบ่งบอกถึงพยาธิสภาพ โดยในเต่าปกติ methemoglobin ที่วัดได้มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 5-60 (Sullivan and Riggs, 1964) ซึ่งมากกว่าที่ตรวจพบได้ในลิซาร์ด ซึ่งมีค่าร้อยละ 2-5 (Pough, 1969) และในงูที่มีร้อยละ 6-28 (Prado, 1946) อย่างไรก็ตามปัจจุบันได้มีรายงานที่กล่าวถึงการเปรียบเทียบค่า methemoglobin ในสัตว์แต่ละชนิด พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าความเข้มข้น methemoglobin ที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์เลื้อยคลาน และนก (Rodkey et al., 1979) โดยในเต่า yellow-footed tortoise (*Geochelone denticulata*) และเต่า red-footed tortoise (*Geochelone carbonaria*) พบว่า methemoglobin มีน้อยกว่า 1% (Gruga and Grigg, 1980; Torsoni et al., 2002) คล้ายคลึงกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

- **ความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง**

การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะรูปร่างเม็ดเลือดแดงที่เปลี่ยนแปลงกับลักษณะกระบวนการเกิดโรคในสัตว์เลื้อยคลานยังมีอยู่จำกัด การติดสีของของสีเม็ดเลือดแดงไม่สม่ำเสมอ (Polychromasia) แสดงถึงการมีเม็ดเลือดแดงอ่อนในแผ่นฟิล์มเลือดเรียกเม็ดเลือดแดงเหล่านี้ว่า Polychromatophils ซึ่งในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่ที่มีสุขภาพปกติจะมีน้อยกว่าร้อยละ 1 ของจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด หากพบจำนวนมากขึ้นเป็นการบ่งบอกถึงภาวะโลหิตจางของสัตว์เลื้อยคลาน เนื่องจากการเกิดการตอบสนองเร่งให้มีการสร้างเม็ดเลือดแดงใหม่ทดแทน (regenerative response) ในสัตว์ที่ร่างกายยังคงสามารถสร้างเม็ดเลือดใหม่ขึ้นได้

ขบวนการสร้างเม็ดเลือดแดงทดแทน (erythroid regenerative response) ในสัตว์เลื้อยคลานมีการตอบสนองที่ช้ากว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การศึกษาในเต่าแก้มแดงและกระต่ายที่มีการโน้มนำเต่าเกิดภาวะโลหิตจาง โดยใช้ Phenylhydrazine hydrochloride พบว่าเต่าตอบสนองให้เกิดการสร้างเม็ดเลือดใหม่หลังจากนั้น 1 เดือน และอาจมีการสร้างในอัตราที่สูงที่สุดหลังจากนั้นได้ถึง 2 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับกระต่ายที่พบว่าการตอบสนองต่อการสร้างเม็ดเลือดแดงจะเกิดภายใน 5 วัน การลดลงของปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (MCV) และปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินเม็ดในเม็ดเลือดแดง (MCHC) เป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะ polychromasia ที่มากขึ้นสัตว์เลื้อยคลาน (Sheeler and Barber, 1965) เนื่องจากภาวะ polychromasia แสดงถึงการเร่งการสร้างเม็ดเลือดแดงอ่อนทำให้มีการลดลงของความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง เนื่องจากเม็ดเลือดแดงอ่อนมีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ ค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ยจึงมีค่าลดลง แตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เม็ดเลือดแดงอ่อนที่เร่งสร้างออกมาจะมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดแดงปกติ ทำให้ค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ยที่สูงขึ้น (Nicole et al., 2007)

ในสัตว์เลื้อยคลานปกติสามารถพบเม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ หรือ Poikilocytosis ได้เล็กน้อย ซึ่งอาจจากการเตรียมแผ่นฟิล์มเลือดที่ไม่ดี ทำให้เม็ดเลือดเลือดแดงเสียสภาพ และมีรูปร่างที่แตกต่างไปจากลักษณะปกติ อย่างไรก็ตามภาวะ polychromasia ที่เพิ่มขึ้นบ่งบอกถึงภาวะการติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) หรือ การติดเชื้อเรื้อรังอย่างรุนแรงอื่นๆ (Frye, 1991)

อินคลูชันในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง (erythrocytic inclusion) ในเต่าตนุ (Work et al., 1998) เต่าบกทะเลทราย (Alleman et al., 1992) และสามารถพบได้ในสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิด โดยมีลักษณะเป็นหลุม หรือจุดเดี่ยวๆ สีฟ้า (basophilic) หรืออาจเห็นเป็นลักษณะวงแหวนใสในเม็ดเลือดแดง โดยสัตว์เหล่านี้ไม่มีอาการผิดปกติ (Nicole et al., 2007) การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าจุดเหล่านี้ คือลักษณะของออแกนแนลที่เสื่อมสภาพ (degenerated organelles) ภายในเม็ดเลือดแดง (Alleman et al., 1992) โดยการเกิดจุด หรือขนาดที่ใหญ่ขึ้นของจุดอินคูซันชนิดนี้อาจมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของอายุเม็ดเลือดแดง (Davis and Holcomb, 2008) อย่างไรก็ตามใน Metin et al. (2006) และ Matson et al. (2005) กล่าวว่าจุดสีฟ้านี้คือ micronucleus (MN) ซึ่งเป็นสิ่งบ่งชี้ทางชีววิทยา (biomarker) ถึงความเสียหายของโครโมโซม (chromosomal damage) ในเม็ดเลือดแดง จากการสัมผัสและปนเปื้อนของสารที่ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม (clastogen) หรือสารที่เป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxic) เช่น polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) เรดิโอนิวไซด์ (radionuclides) และสารฆ่าแมลงบางชนิด โดยที่สัตว์อาจไม่แสดงอาการ มีรายงานในเต่าบึงยุโรป (*Emys orbicularis*) ที่สุ่มตัวอย่างมา

จากบ่อที่ตรวจพบ PAHs และปรอทปนเปื้อนในน้ำ ตรวจพบ MN อยู่ในเม็ดเลือด 6.0-9.7 เซลล์ต่อเม็ดเลือดแดงที่นับหนึ่งพันเซลล์ (Matson et al., 2005) แต่ขณะที่ในเต่าน้ำจืดชนิดเดียวกันที่เลี้ยงภายในฟาร์มภายในประเทศ มี MN อยู่เพียง 0.3-1.6 เซลล์ต่อเม็ดเลือดแดงที่นับหนึ่งพันเซลล์ แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของ MN ในเต่ามีนัยสำคัญต่อการบ่งบอกถึงความเสียหายของสารพันธุกรรมจากสารพิษของสิ่งแวดล้อม (Metin et al., 2006)

การพบก้อนสี่เหลี่ยม สามเหลี่ยมมุมฉาก หรือหกเหลี่ยมคล้ายผลึกสีจางในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง ในไซโนโซรัสกิ้งก่าอีกัวน่า (*Cyclura cornuta* และ *C. figgensi*) พบว่าเป็นผลึกของฮีโมโกลบินโปรตีน (Simpson et al., 1980; Simpson et al., 1982) ซึ่งอาจพบได้เช่นกันในลิซาร์ด งู และเต่าบก (Nicole et al., 2007) และอาจสามารถพบผลึกได้ในนิวเคลียสของกิ้งก่าอีกัวน่าเขียว (Harr et al., 2001) ซึ่งยังไม่ทราบถึงสาเหตุและนัยสำคัญของการเกิดผลึกเหล่านี้ต่อตัวสัตว์เลื้อยคลาน โดยในสัตว์ปกติจะมีผลึกโปรตีนนี้ไม่เกินร้อยละ 1 และในไซโนโซรัสกิ้งก่าอีกัวน่าที่ป่วยสามารถพบได้มากขึ้นถึงร้อยละ 5-10 การพบผลึกคล้ายกันนี้ในกวางและคน พบได้ในกรณีที่เป็นโรคโลหิตจางแบบ sickle cell โดยโครงสร้างทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของผลึกเป็นลักษณะของการ polymerization ของไมโครทูบูลในฮีโมโกลบินโปรตีน ซึ่งการพบผลึกนั้นจำนวนเล็กน้อยในเม็ดเลือดแดงของสัตว์ ไม่มีนัยสำคัญต่อการขนส่งออกซิเจนของเลือด และสามารถพบได้จำนวนเล็กน้อยในสัตว์ปกติ สัตว์ที่อยู่ในภาวะเจริญพันธุ์ อาการที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดผลึกนี้มากขึ้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่ามีอิทธิพลจากพันธุ์กรรม โดยเฉพาะในสัตว์ที่ผสมพันธุ์เองในที่เพาะเลี้ยง (Simpon et al., 1982)

การพบอินคลูชันของไวรัส (viral inclusion) ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง มีรายงานใน Brazilian lancehead viper (*Bothrops moojeni*) ที่ตรวจพบมะเร็งที่ไต (renal carcinoma) ในงูนี้พบ อินคลูชันสองชนิดในเม็ดเลือดแดงเดียวกัน คืออินคลูชันลักษณะเป็นผลึกโปร่งแสงรูปร่างหกเหลี่ยม และโปรตีนที่ไม่ทราบที่มา งูดังกล่าวมีอาการโลหิตจางรุนแรง และมีการตอบสนองของการเร่งการสร้างเม็ดเลือดแดงอ่อนอย่างมาก จากการศึกษาโครงสร้างระดับอิเล็กตรอนพบว่าอินคลูชันของฮีโมโกลบินโปรตีนทั่วไป (Johnsrude et al., 1997) คล้ายกับรายงานใน East African Chameleons (*Chamaeleo dilepis*) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัสในครอบครัวเดียวกับ Iridoviridae เช่นกันในเม็ดเลือดแดง (Telford and Jacobson, 1993)

การติดเชื้อปรสิตในเม็ดเลือดแดง (Erythoparasites) พบได้ในเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลื้อยคลานบางชนิด อาจสับสนกับอินคลูชันทั่วไปที่พบได้เป็นปกติ ซึ่งปรสิตในเลือดบางชนิดอาจก่อให้เกิดภาวะโลหิตจางและพยาธิสภาพอื่นๆ ได้

- **ภาวะโลหิตจาง** (anemia) **และเม็ดเลือดมากเกิน** (polycythemia)

ในสัตวเลี้ยงคลานการเกิดเม็ดเลือดมากเกิน หรือเม็ดเลือดน้อยกว่าปกติ อาจเกิดจากปัจจัยในการเก็บเลือด และการเตรียมเลือดได้ เนื่องจากหลอดเลือดที่ตำแหน่งที่เจาะเก็บเลือดทั้งที่หาง ขา คอ แอ่งเลือดต่างๆ ล้วนแต่มีหลอดน้ำเหลืองขนานติดกันมาก เจาะเก็บเลือดที่ตำแหน่งเหล่านี้ จึงปนด้วยน้ำเหลืองทำให้ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินและค่าเม็ดเลือดต่างๆ ลดลง ซึ่งในกรณีที่ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำ โดยที่ไม่พบเม็ดเลือดแดงอ่อนมากขึ้น หรือมีลิมโฟไซต์ขนาดเล็กจำนวนมากขึ้น ควรสงสัยการปนเปื้อนน้ำเหลือง ซึ่งตัวอย่างนี้ไม่เหมาะสมในการตรวจค่าทางโลหิตวิทยา (Heard et al., 2004)

การเกิดภาวะโลหิตจางในสัตวเลี้ยงคลานอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของการทำลายเม็ดเลือดแดง การลดลงของการสร้างเม็ดเลือดแดงหรือการเสียเลือด ทั้งภาวะโลหิตจางแบบ regenerative และ non-regenerative ทำให้พบเม็ดเลือดติดสีไม่เท่ากัน หรือ polychromasia ได้ทั้งสองแบบ สัตวเลี้ยงคลานที่มีการตอบสนองโดยการเร่งการสร้างเม็ดเลือดแดงอ่อนเป็นเวลานานจะเป็นลักษณะของภาวะโลหิตจางเรื้อรัง ซึ่งสามารถจำแนกชนิดของ regenerative และ non-regenerative ได้จากการพิจารณาว่าหากการเกิดภาวะโลหิตจางต่อเนื่องนานมากกว่า 1 เดือน แต่การแสดงออกของจำนวนเม็ดเลือดแดงอ่อนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อาจพิจารณาได้ว่าสัตว์อยู่ในภาวะโลหิตจางแบบ non-regenerative หรือการเกิดโรคติดเชื้อหรือพยาธิสภาพทางระบบ ซึ่งโรคหลายชนิด เช่น ภาวะตับหรือไตวาย มักทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง แบบ non-regenerative เช่นกัน (Nicole et al., 2007)

เต่าตนุที่เกิด fibropapilloma อย่างรุนแรงอันมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ Herpesvirus พบว่ามีผลทำให้ภาวะโลหิตจางระดับปานกลางถึงรุนแรงได้ ในเต่าตนุที่ติดเชื้อไวรัสจะพบการลดลงของค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดลงประมาณร้อยละ 35 จากปกติ (Herbst et al., 2004) และในเต่าทะเลโรคติดเชื้อนี้ยังมีความสัมพันธ์กับการลดลงของค่าโปรตีนพลาสมา และเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ เบโซฟิล และอิโอสิโนฟิล ซึ่งมีสมมติฐานว่าการติดเชื้อไวรัสกลุ่ม Herpes อาจมีผลต่อสายวิวัฒนาการของต้นกำเนิดเซลล์เม็ดเลือด เนื่องจากการติดเชื้อทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ microenvironment ของไขกระดูก ทำให้เกิดการสร้างเม็ดเลือดต่างๆ จากไขกระดูกลดน้อยลง (Work and Balazs, 1999)

ผลของสารพิษอาจมีผลต่อการเกิดภาวะโลหิตจาง โดยมีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารพิษ Sigma chlordanes ที่ในตัวอย่างชิ้นเนื้อไขมันของเต่าหัวค้อนในธรรมชาติพบว่ามีความสัมพันธ์ผกผันกับ จำนวนเม็ดเลือดแดง ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน และเม็ดเลือดแดงอัดแน่นอย่างมีนัยสำคัญ (Keller et al., 2004)

ในสัตว์เลื้อยคลาน การอดอาหารเป็นผลต่อการลดลงของจำนวนเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดแดงอัดแน่น และความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Pati and Thapliyal, 1984) อย่างไรก็ตาม สัตว์ที่อยู่ระหว่างการจำศีล (hibernation) และช่วงเวลาที่แห้งแล้ง สัตว์ที่ไม่มีการดื่มน้ำเป็นสัปดาห์ถึงเป็นเดือน เป็นผลทำให้สัตว์เหล่านี้เกิดภาวะขาดน้ำ (dehydrate) ซึ่งจะตรวจพบการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนของค่าเลือด โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่เพิ่มสูงขึ้น (Dickinson et al., 2002) อุณหภูมิมีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา เช่นกันในสัตว์เลื้อยคลาน เนื่องจากสัตว์เลื้อยคลานเป็นสัตว์เลือดเย็น ในการศึกษาทางห้องปฏิบัติการใน Cunningham skink (*Egernia cunninghami*) เปรียบเทียบระหว่างการอาศัยในคอกที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียล และคอกที่ควบคุมอุณหภูมิปกติ พบว่าในสัตว์ที่อาศัยในอุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 48 ชม. มีการลดลงของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมากกว่าร้อยละ 20 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่ลดลงมีผลต่อการลดลงของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และความเข้มข้นของฮีโมโกลบินอย่างมีนัยสำคัญ (Maclean et al., 1975) แต่ในการศึกษาในเต่า painted turtle (*Chrysemys picta*) ที่อยู่ในระหว่างการจำศีลในที่เย็น แสดงค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินที่สูงขึ้น และการเพิ่มขึ้นของความสามารถในการขนส่งออกซิเจนในเลือดเพิ่มขึ้น แม้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างในเลือดที่ลดต่ำลง (Rücknagel et al., 1988) แสดงให้เห็นว่าการประเมินภาวะโลหิตจางและการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยานั้น ต้องอาศัยการวิเคราะห์ปัจจัยเฉพาะของสัตว์แต่ละชนิด และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นผลกระทบที่สำคัญต่อค่าโลหิตวิทยาของสัตว์ร่วมด้วย

2.2.3.2 เม็ดเลือดขาวและการตอบสนองต่อโรค

เม็ดเลือดขาวในสัตว์เลื้อยคลาน แยกได้เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล ได้แก่ เฮเทอโรฟิล อีโอสิโนฟิล และเบโซฟิล และเม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells ได้แก่ ลิมโฟไซต์ และ โมโนไซต์ ซึ่งเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูลจะมีมีความแตกต่างกันไปอย่างมาก ในแต่ละชนิดสัตว์ ทั้งขนาดของเซลล์ และลักษณะของแกรนูลในไซโตพลาสซึม รวมทั้งลักษณะของนิวคลีไอด์ โดยเม็ดเลือดขาวชนิด ลิมโฟไซต์ และ โมโนไซต์ ที่พบในระบบไหลเวียนของสัตว์เลื้อยคลาน จะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งในสัตว์เลื้อยคลานแต่ละชนิดจะมีจำนวนของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด และจำนวนเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดแตกต่างหลากหลายไปตามชนิดของสัตว์ (Alleman et al., 1999) ซึ่งการแยกเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดควรอ้างอิงจากการใช้สีย้อมที่เป็นสากล คือสีกลุ่ม Romanowsky-type stain (Campbell and Ellis, 2007)

ก. เฮเทอโรฟิล (Heterophil)

ส่วนใหญ่เม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิลจะมีขนาดใหญ่ กลม และมีไซโตพลาสซึมค่อนข้างใส บรรจุด้วยแกรนูลสีชมพูส้ม รูปร่างกระสวย มีนิวเคลียสที่ค่อนข้างเอียงไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ รูปร่างของนิวเคลียสจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์เลื้อยคลาน โดยส่วนใหญ่ในงู เต่า และจระเข้ จะมีนิวเคลียส รี กลม อันเดียว เอียงไปด้านด้านหนึ่งของเซลล์ ส่วนในลิซาร์ดจะมีนิวเคลียสตั้งแต่ 2 พู (lobe) ขึ้นไป ค่าเฉลี่ยขนาดของเม็ดเลือดขาวชนิด เฮเทอโรฟิล ในสัตว์เลื้อยคลานอยู่ที่ 10-26 ไมครอน ขนาดจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ และแม้แต่ในสัตว์ตัวเดียวกันอาจมีขนาดเม็ดเลือดที่แตกต่างกัน (Saint Girons, 1970) จำนวนของแกรนูลในไซโตพลาสซึมจะแตกต่างกันไปตามชนิดสัตว์เช่นกัน โดยแกรนูลในเต่าและจระเข้จะออกสีแดงส้มและเป็นรูปกระสวย ส่วนในตัวสแควมาต้า แกรนูลจะสีส้ม ลักษณะมุมหัก มีรูปร่างหลายแบบ นิวเคลียสกลมมีหลายพู (Montali, 1988) ส่วนเฮเทอโรฟิล ในงูจะมีแกรนูลแน่น แกรนูลยาวสีเข้มแดง มักเห็นเป็นแกรนูลรวมตัวกัน นิวเคลียสกลมขนาดต่างๆ กัน เอียงไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ โดยในงูจะมี เฮเทอโรฟิล สองชนิด แบ่งได้จากแกรนูลที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน คือแบบขรุขระ และแบบรีหรือยาว โดยจะมีสีส้มแดงหมือนกัน ซึ่งคาดว่าเป็นเซลล์เฮเทอโรฟิลที่อยู่ในระยะพัฒนาหรืออายุที่แตกต่างกัน (Alleman et al., 1999; Bounous et al., 1996; Salakij et al., 2002a) ความเข้มในการติดสีมักขึ้นกับระยะพัฒนาแต่ละอายุของเซลล์ (Egami and Sasso, 1988) ในกิ้งก่าอีกัวน่าเขียว เฮเทอโรฟิล มีแกรนูลหลายรูปร่าง หรืออาจเป็นแท่งกระสวย นิวเคลียสแบ่งเป็นพู (Montali, 1988) ในจระเข้ เฮเทอโรฟิลจะมีขนาดแกรนูลขนาดใหญ่ แต่มีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในลิซาร์ดที่มีแกรนูลเล็กกว่า (Frye, 1991) เม็ดเลือดชนิดนี้ในอเมริกันอะลิเกเตอร์จะมีนิวเคลียสกลม รี หรือเป็นรูปเลนส์ (lenticular) บางเซลล์อาจมีสองนิวเคลียส (Mateo et al., 1984)

ความผิดปกติของรูปร่างลักษณะเฮเทอโรฟิลพบได้มากในกรณีที่ร่างกายตอบสนองต่อการอักเสบและติดเชื้อ การเกิด Toxic change คือลักษณะที่เปลี่ยนไปของ เฮเทอโรฟิล ที่เกิดมากในรายที่มีการติดเชื้อหรือเกิดการอักเสบอย่างรุนแรง โดยความเปลี่ยนแปลงนี้เกิดตั้งแต่ในไขกระดูกก่อนที่จะปลดปล่อยเม็ดเลือดขาวออกมาในกระแสเลือด การพิจารณาการเกิด Toxic change ดูจากทั้งจำนวนของเฮเทอโรฟิล ที่ผิดปกติและความรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงที่รุนแรงส่วนมากเกิดจากพิษของแบคทีเรีย และมักมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคของทางเดินอาหาร หรือการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ (Gram-negative baeteria) เฮเทอโรฟิลที่เกิดพิษจะมีลักษณะของการเปลี่ยนสีของไซโตพลาสซึมไปในทางติดสีน้ำเงินมากขึ้น มีการแตกของแกรนูล (degranulation) การเกิดช่องว่าง (vacuolation) มีแกรนูลที่ผิดปกติไป และมีจำนวนพูของนิวเคลียสมากขึ้น ซึ่งระดับของการเกิด Toxic change ขึ้นกับความรุนแรงของโรค

ภาวะ Toxic change ปานกลางจะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงสีของไซโตพลาสซึมเป็นสีน้ำเงิน โดยที่แกรนูลยังคงปกติทั้งจำนวนและรูปร่าง ส่วนการแตกของแกรนูลอาจเกิดจากผลพวงที่เกิดจากขั้นตอนการเตรียมแผ่นฟิล์มเลือด หรือการเก็บเลือดในสารกันแข็งตัวนานเกินไป โดยการเปลี่ยนแปลงในรูปร่างและสีของแกรนูลจะบ่งบอกถึงการเกิดพิษที่รุนแรง แกรนูลที่มีลักษณะรูปร่างหลากหลายสีน้ำเงินเข้มถึงสีม่วง และบางครั้งอาจมีขนาดใหญ่กว่าปกติ นิวเคลียสสีชมพู ในกรณีที่ปกติสัตว์ชนิดนั้น นิวเคลียสรูปร่างกลม หรือมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจัดได้ว่าเกิด Toxic change ขึ้น (Campbell, 2006) ลักษณะ left shifting คือการบ่งบอกว่ามีการสร้างของเม็ดเลือดขาวอ่อนชนิด myelocytes และ metamyelocytes ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของเฮเทอโรฟิลที่โตเต็มที่เซลล์อ่อนเหล่านี้จะมีขนาดนิวเคลียสใหญ่กว่าแกรนูลรูปร่างไม่แน่นอนและไซโตพลาสซึมสีฟ้า ซึ่งบรรจุด้วยแกรนูลปฐมภูมิ (primary granule) การเกิดสภาวะเช่นนี้พบมากในกรณีการติดเชื้อรุนแรงของเนื้อเยื่อที่มีการสะสมมากของเฮเทอโรฟิล อย่างไรก็ตามการเกิด left shifting และ Toxic change มักมีการเกิดทั้งคู่พร้อมกัน มีผลต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด และอาการทางคลินิกที่แสดงออกของสัตว์ป่วย การพบแบคทีเรียในเม็ดเลือดจากการกลืนทำลาย พบได้ในรายที่เกิดภาวะโลหิตจางรุนแรง (Nicole et al., 2007)

การแตกของแกรนูลของเฮเทอโรฟิลนอกจากการเกิด Toxic change แล้ว อาจเกิดได้มากจากผลพวงของการเก็บตัวอย่าง ผลของการเก็บเลือดในสารกันแข็งตัวของเลือด และการตรึงเซลล์ก่อนการย้อมที่เร็วเกินไป หรือในสัตว์บางชนิดเกิดได้เป็นปกติ เช่นในสแควมาต้า และจระเข้ โดยการแยกว่าการแตกของแกรนูลเกิดจากการเสื่อมของอายุเม็ดเลือดขาวเองหรือไม่ อาจพิจารณาร่วมกับการเกิด Pyknosis ในนิวเคลียสของเซลล์ร่วมด้วย (Alleman et al., 1999)

จากการศึกษาทางไซโตเคมี และโครงการสร้างทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พิสูจน์ได้ว่าเม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลในสัตว์เลื้อยคลานมีหน้าที่เทียบเท่ากับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยทำหน้าที่หลักในการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม (phogocytosis) ฆ่าเชื้อจุลชีพ (anti-microbiocidal activity) และเป็นตัวหลักในการตอบสนองต่อการอักเสบในร่างกาย (Azevedo and Lunardi, 2003; Montali, 1988; Sypek and Borysenko, 1988)

เฮเทอโรฟิลในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่ ไม่ติดสีการย้อมไซโตเคมีของ peroxidase แสดงให้เห็นว่าเม็ดเลือดขาวชนิดนี้มีไม่มีเอนไซม์ peroxidase เหมือนในนิวโทรฟิลของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Nicole et al., 2007) อย่างไรก็ตามในกิ้งก่าอีกัวน่าเขียว เฮเทอโรฟิลแสดงการติดสีต่อ benzidine peroxidase (PO) และ Sudan black B (SBB) บ่งบอกถึงว่าในกิ้งก่าอีกัวน่าและสัตว์ตระกูลลิซาร์ดเฮเทอโรฟิลมีความสามารถในการฆ่าจุลชีพและทำหน้าที่ในกระบวนการ oxidative burst (Harr et al., 2001) ใน inland bearded dragon (*Pogona vitticeps*) ทั้งเฮเทอโรฟิลและอีโอสิโนฟิลติดสีชัดเจนต่อ SBB บ่งบอกความเป็นไปได้ว่าในสัตว์กลุ่มสแควมาต้านี้ เฮเทอโรฟิล และ

อีโอสิโนฟิลอาจเป็นเซลล์ชนิดเดียวกัน ซึ่งทำหน้าที่เหมือนกัน (Eliman, 1997) ในสัตว์เลื้อยคลานปกติส่วนใหญ่จะมีเม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิล ประมาณร้อยละ 30-45 ของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด และเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีจำนวนมากที่สุดในเต่า และจระเข้ (Alleman et al., 1992; Christopher et al., 1999; Frye, 1991) ในจระเข้ค่าเฉลี่ย (mean) ของจำนวนเฮเทอโรฟิลและจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดของเพศผู้มีค่าสูงกว่าในเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ (Stacy and Whitaker, 2000) และในสัตว์เลื้อยคลานทั่วไปจำนวนเฮเทอโรฟิลมีค่าสูงที่สุดในฤดูร้อนและต่ำสุดในระหว่างการจำศีล (Duguy, 1970)

ปัจจัยที่ทำให้จำนวนเฮเทอโรฟิลสูงขึ้น (heterophilia) ได้แก่ การอักเสบจากการติดเชื้อ เช่น จุลชีพ หรือปรสิต จากการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ หรือการเกิดเนื้อตาย สัตว์เลื้อยคลานตัวเมียที่มีไข่แก่ (gravidity) สัตว์ที่ได้รับ glucocorticoid ความเครียด เนื้องอก และการเกิด granulocytic leukemia (Campbell, 2006; Campbell and Ellis, 2007; Cuadrado et al., 2002)

ในกรณีที่จำนวนเฮเทอโรฟิลลดลงกว่าปกติ (Heteropenia) พบได้ในการติดเชื้อจำนวนมากอย่างเฉียบพลันเป็นผลให้มีการรวมตัวใน เฮเทอโรฟิล ไปที่เนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบ (Nicole et al., 2007)

ข. อีโอสิโนฟิล (Eosinophil)

เม็ดเลือดขาวชนิดนี้มีขนาดใหญ่ (9-20 ไมครอน) รูปร่างกลม ขนาดใกล้เคียงกับเฮเทอโรฟิล ไซโตพลาสซึมบรรจุด้วยแกรนูลส้มแดง กลม และมีนิวเคลียสกลมรี หรือเป็นรูปเลนส์ หรือมี 2 ขา ซึ่งอยู่กลางเซลล์หรือเอียงไปด้านใดด้านหนึ่ง (Campbell, 2006; Montali, 1998) ลักษณะของเม็ดเลือดแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิด เช่น ในเต่าตนุฮาวาย (Hawaiian green turtle) พบอีโอสิโนฟิล 2 ชนิด คือ อีโอสิโนฟิลขนาดเล็ก (small eosinophil) และอีโอสิโนฟิลขนาดใหญ่ (large eosinophil) (Work et al., 1998)

ในกิ้งก่าอีกัวน่าแกรนูลของอีโอสิโนฟิล อาจเป็นสีฟ้าหรือ ฟ้าเขียว เมื่อย้อมด้วยสี Romanowsky-type stain ซึ่งเรียกว่าอีโอสิโนฟิลสีเขียว (green eosinophil) (Heard et al., 2004)

ปฏิกิริยาทางไซโตเคมีของอีโอสิโนฟิลในสัตว์เลื้อยคลานจะให้ผลบวกต่อ peroxidase ชัดเจน ซึ่งจะต่างจากเฮเทอโรฟิล (Allerman et al., 1992; Sypek and Borysenko, 1988) ยกเว้นในสัตว์เลื้อยคลานบางชนิด เช่นในกิ้งก่าอีกัวน่าเขียวที่ย้อมติดสีทั้ง อีโอสิโนฟิล และ เฮเทอโรฟิล (Harr et al., 2001) แกรนูลของอีโอสิโนฟิลในงูจงอางมีขนาดหลากหลาย มีแกรนูลสีฟ้าจาง อาจเบียดบังนิวเคลียส (Salakij et al., 2002a) คล้ายในกิ้งก่าอีกัวน่าที่แกรนูลใหญ่กลม สีฟ้าถึงม่วง (Harr et al., 2001) ส่วนการพบอีโอสิโนฟิลในงูยังมีรายงานที่แตกต่างกันไป ในบางรายงานมีการกล่าวแยกออกมาเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอสิโนฟิลได้เลย เช่นใน South American rattlesnake

(*Crotalusdurissus terrificus*) (Troiano et al., 1997) งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) (Salakij et al., 2002a) และ boid snake (*Corallus caninus*) (Campbell and Ellis, 2007) แต่ในอีกหลายรายงานที่ไม่จำแนกการมีอีโอสิโนฟิลในงู แต่จัดอยู่ในประเภทของเฮเทอโรฟิล Type II แทน เช่นใน eastern diamondback rattles snake (*Crotalus adamanteus*) (Alleman et al., 1999) yellow rat snake (Dotson et al., 1995) และสแควมาต้า (Squamata; *Bothrops jararaca*) (Egami and Sasso, 1988)

ความผิดปกติของรูปร่างอีโอสิโนฟิล พบได้น้อย การเกิดภาวะ left-shift อย่างรุนแรง จะพบ ลักษณะของแกรนูลอีโอสิโนฟิล มีสีฟ้าจางถึงเข้มปานกลาง มีการปรากฏขึ้นของแกรนูลปฐมภูมิปนอยู่กับแกรนูลสีส้มแดงกลม อาจพบการแตกของแกรนูล ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค และส่วนใหญ่มักเกิดจากขบวนการเตรียมแผ่นฟิล์มเลือดที่ไม่เหมาะสม (Nicole et al., 2007)

ในสัตว์เลื้อยคลานที่มีสุขภาพปกติ จะมีจำนวนอีโอสิโนฟิล เฉลี่ยอยู่ที่ประมาณร้อยละ 7-20 (Frye, 1991) ยกเว้นในเต่าซึ่งมีจำนวนของเม็ดเลือดชนิดนี้มากกว่าค่าเฉลี่ย และในลิซาร์ดจะมีค่าจำนวนอีโอสิโนฟิลเฉลี่ยน้อยที่สุด (Sypek and Borysenko, 1988) จำนวนของอีโอสิโนฟิลมีอิทธิพลจากปัจจัยของฤดูกาล โดยมีจำนวนมากที่สุดในระหว่างการจำศีลและมีน้อยที่สุดในฤดูร้อน ตรงข้ามกับเฮเทอโรฟิล (Duguy, 1970)

การเพิ่มของอีโอสิโนฟิลอาจเป็นผลจากการติดเชื้อปรสิต และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (nonspecific immune stimulation) ใน snapping turtle พบว่าอีโอสิโนฟิลมีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในการเกิด phagocytize immune complexs (Mead and Borysenko, 1984) ส่วนนัยสำคัญของการลดลงของอีโอสิโนฟิล (eosinopenia) ในสัตว์เลื้อยคลานยังไม่มีการรายงาน

ค. เบโซฟิล (Basophil)

เบโซฟิลในสัตว์เลื้อยคลานทั่วไปมีขนาดเซลล์เล็ก แกรนูลกลมสีเข้ม ติดสี metachromatic staining นิวเคลียสไม่ชัดเจน เป็นสีม่วงเข้มอยู่ค่อนข้างกลางเซลล์ (Montali, 1988) ขนาดอยู่ที่ประมาณ 7-20 ไมครอน โดยในบรรดาสัตว์เลื้อยคลานเบโซฟิลในลิซาร์ดจะมีขนาดเล็กที่สุด (Frye, 1991) นิวเคลียสกลมและไม่มีพู อาจเกิดการแตกของแกรนูลทำให้เห็นแต่เซลล์กลมเล็ก ไซโตพลาสซึมสีม่วง ซึ่งอาจทำเห็นช่องว่างภายในใสชัดเจน การแตกของแกรนูลนี้เกิดขึ้นได้ง่ายจากการใช้สีย้อมที่ละลายในน้ำ (water-based stain) (Campbell, 2006) และพบได้ในการย้อมด้วยสี Rowanowsky-type stains ซึ่งตรึงเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์ (Nicole et al., 2007)

เบโซฟิล ในสัตว์เลื้อยคลานมีหน้าที่คล้ายกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ surface immunoglobulins และการปลดปล่อยฮีสตามีน (histamine) (Mead et al., 1983 ; Sypek et al., 1984 ; Sypek and Borysenko, 1988) จำนวนของ เบโซฟิล มีความหลากหลายกันไปขึ้นกับชนิดของสัตว์ และอิทธิพลของฤดูกาล ตำแหน่งที่อยู่อาศัยของสัตว์และอายุของสัตว์ (Work et al., 1998) ในเต่าบกและเต่าน้ำที่มีสุขภาพปกติอาจพบจำนวนเบโซฟิล ได้ถึงร้อยละ 40 ของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Alleman et al., 1992; Duguy, 1970; Sypek and Borysenko, 1988)

Saint Girons (1970) กล่าวว่าจำนวน เบโซฟิล มีผลจากฤดูกาลน้อยมาก อาจพบมากขึ้นหากสัตว์อยู่ในช่วงที่มีการทำงานของร่างกายมาก (activity) ส่วนในเต่าบกทะเลทรายจะพบจำนวน เบโซฟิล ลดต่ำในระหว่างจำศีล (Christopher et al., 1999)

ง. ลิมโฟไซต์ (Lymphocytes)

ในสัตว์เลื้อยคลานลิมโฟไซต์เหมือนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีหลายขนาดตั้งแต่เล็กไปถึงใหญ่ ในลิมโฟไซต์ขนาดเล็ก (small lymphocyte) มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 5-9 ไมครอน ส่วนลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ (large lymphocyte) มีขนาดใหญ่ได้ถึง 15 ไมครอน (Saint Giron, 1970) โดยลิมโฟไซต์ในสัตว์เลื้อยคลานจะแยกได้ยากกับทรอมโบไซต์ที่มีลักษณะคล้ายกัน โดยที่ลิมโฟไซต์มีขนาดใหญ่กว่าและมีขอบเซลล์ชัดเจน ไซโตพลาสซึมน้อยมีสีฟ้ากึ่งฟ้าเข้ม ทรงกลมหรือรีเล็กน้อย นิวเคลียสของลิมโฟไซต์ใหญ่กว่า รูปร่างกลมถึงรี วางอยู่ตรงกลางหรือเอียงไปด้านในด้านหนึ่งของเซลล์ ในนิวเคลียสของลิมโฟไซต์มีโครมาตินเกาะกลุ่มกัน (chromatin clumped) มีอัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึม (N : C ratio) สูง เซลล์อ่อนของลิมโฟไซต์มีขนาดใหญ่ ไซโตพลาสซึมน้อย มีสีเข้มฟ้ากว่า นิวเคลียสกลมถึงรี มีโครมาตินสีอ่อนเรียบสีม่วงอ่อนกว่า หรือประกอบด้วยนิวคลีโอลัส โดยปกติจะพบเซลล์อ่อนนี้ได้น้อย (Nicole et al., 2007)

ปฏิกิริยาไซโตเคมีของลิมโฟไซต์ ในสัตว์เลื้อยคลานทั่วไปมีคุณสมบัติการติดสีที่ใช้แยกกับทรอมโบไซต์ได้ โดยลิมโฟไซต์จะให้ผลลบต่อ periodic acid-Schiff (PAS) ส่วน ทรอมโบไซต์ จะให้ผลบวก เช่นใน eastern diamondback rattlesnake (Alleman et al., 1999) เต่าทะเลทราย (Alleman et al., 1999) งูจงอาง (Salakij et al., 2002a) อย่างไรก็ตามใน American alligator ผลจะตรงกันข้ามกับสัตว์อื่น คือ ลิมโฟไซต์ให้ผลบวกต่อ PAS ส่วนทรอมโบไซต์ให้ผลลบต่อ PAS (Mateo et al., 1984)

การพบ reactive ลิมโฟไซต์ บ่งบอกถึงการเกิดการกระตุ้นจากแอนติเจน (Antigenic stimulation) ซึ่งมีลักษณะใหญ่กว่าเม็ดเลือดปกติเป็นส่วนใหญ่ แยกได้ง่ายจากการพบแวลคูโอลเล็กๆ จำนวนมากชัดเจนในไซโตพลาสซึม บางครั้งจะพบลักษณะคล้าย plasma cell

(plasmacytoid) ใน African spur-thighed tortoise (*Geochelone sulcata*) พบ reactive ลิมโฟไซต์ ที่มีลักษณะของอะซูโรฟิลลิกแกรนูลเป็นจุดเล็ก (needle-like) การพบลิมโฟไซต์อ่อน หรือ lymphoblasts ซึ่งมีโครมาตินเรียบ และมีนิวคลีโอไลด์เด่นขึ้น 1-2 นิวคลีโอไลด์ อาจบ่งบอกถึงสัตว์มีภาวะการเกิดโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน (Nicole et al., 2007)

ลิมโฟไซต์ในสัตว์เลื้อยคลานแบ่งออกเป็น ที-ลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) และ บี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) เช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดย ที-ลิมโฟไซต์ จะตอบสนองด้วยการเป็น cellular immune respone และ บี-ลิมโฟไซต์จะตอบสนองด้วยการสร้าง immunoglobulin (Sypek and Borsenko, 1988) ลิมโฟไซต์ เป็นเม็ดเลือดที่มีจำนวนมากที่สุดในกระแสเลือดและเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือดของสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่ อาจมีเปอร์เซ็นต์มากถึงร้อยละ 80 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Alleman et al., 1999 ; Lamirande et al., 1999; Salakij et al., 2002a; Sypek and Borsenko, 1988; Troiano et al., 1997; Work et al., 1998) ยกเว้นในเต่าและจระเข้ที่มีเฮเทอโรฟิลมากที่สุด (Alleman et al., 1999 ; Christopher et al., 1999 ; Mateo et al., 1984)

จำนวนของลิมโฟไซต์มีอิทธิพลจากฤดูกาลและปัจจัยเฉพาะตัวของสัตว์ ในเต่าทะเลทรายพบว่าลิมโฟไซต์มีจำนวนต่ำที่สุดในช่วงฤดูหนาว หรือระหว่างการจำศีล และสูงสุดในระหว่างฤดูร้อน (Christopher et al., 1999) จำนวนที่ลดลงของลิมโฟไซต์ในช่วงเวลาดังกล่าวอาจเกิดเนื่องจากความสัมพันธ์ของความสามารถในการสร้าง primary immune response ที่ลดลงในอุณหภูมิที่ต่ำลงหรือในระหว่างการจำศีล (Wright's and Cooper, 1981) และส่วนใหญ่สัตว์เพศเมียจะมีจำนวนลิมโฟไซต์ที่มากกว่าสัตว์ตัวผู้ที่เป็นชนิดสัตว์ และอายุเดียวกัน (Sypek and Borsenko, 1988) อีกทั้งในจระเข้ที่โตเต็มวัยจะมีจำนวน ลิมโฟไซต์น้อยกว่าลูกจระเข้ และจระเข้ที่ยังไม่เจริญวัยเต็มที่ (subadults) (Stacy and Whitaker, 2000)

การเพิ่มจำนวนมากขึ้นของลิมโฟไซต์ (lymphocytosis) เกิดขึ้นได้ในกรณีที่มีการหายของบาดแผล หรือมีการติดเชื้อ หรือการอักเสบที่เรื้อรัง การติดเชื้อไวรัสและปรสิตต่อโรค เช่น Anasakiasis, spirochidiasis และปรสิตในเลือด อาจทำให้พบการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวชนิดนี้เช่นกัน (Campbell, 2006) รวมทั้งการเกิด lymphoid leukemias และ inclusion body disease (IBD) (Jacobson, 1999)

การลดลงของจำนวน ลิมโฟไซต์ (lymphopenia) พบได้ในกรณีการขาดอาหาร และการได้รับ corticosteroid รวมทั้งความเครียด (Nicole et al., 2007)

จ. พลาสมาเซลล์ (Plasma cell)

พลาสมาเซลล์มีลักษณะกลมถึงรี มีขอบเขตของเซลล์ที่ชัดเจนมีไซโตพลาสซึมมากติดสีฟ้าเข้มชัดเจน มีส่วนสีจางรอบนิวเคลียสที่เรียกว่า Golgi zone (Sypek and Borsenko, 1988) นิวเคลียสเอียงไปด้านใดด้านหนึ่ง โครมาตินหยาบ มีอัตราส่วนของนิวเคลียส ต่อไซโตพลาสซึมต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับลิมโฟไซต์ ปกติ เมื่อมีการกระตุ้นทางภูมิคุ้มกัน พลาสมาเซลล์อาจมีลักษณะของช่องว่างภายในสีใส หรือสีฟ้าจางจำนวนหลากหลาย (Russell-bodies) เมื่อย้อมด้วยสี Romanowsky-type stain ซึ่งอาจเรียกว่า Mott cells โดยในเต่าบก Gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*) สามารถแยกพลาสมาเซลล์ได้ยากจากลิมโฟไซต์ที่มีลักษณะแบบพลาสมาเซลล์ (plasmacytoid lymphocyte) (Nicole et al., 2007)

พลาสมาเซลล์จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นในกรณีที่สัตว์เลื้อยคลานนั้นมีการติดเชื้อหรือการอักเสบอย่างรุนแรง ซึ่งทั่วไปจะพบพลาสมาเซลล์ได้ในสัตว์ปกติเพียงร้อยละ 0.2-0.5 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Frye, 1991)

ฉ. โมโนไซต์ (Monocyte)

โมโนไซต์เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในระบบไหลเวียนเลือดของสัตว์เลื้อยคลาน มีขนาดอยู่ที่ 8-25 ไมครอน ซึ่งมีบางส่วนของหน้าที่ และรูปร่างลักษณะที่คล้ายคลึงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Sypek and Borsenko, 1988) ไซโตพลาสซึมมีขอบเขตชัดเจนเป็นสีออกเทาจางถึงออกสีฟ้า ขนาดรูปร่างและช่องว่างภายในไซโตพลาสซึมจะขึ้นกับความตื่นตัวของเซลล์ (reactive stage) นิวเคลียสของโมโนไซต์ จะมีรูปร่างหลากหลายอาจกลม รี ทรงตัวยู หรือเป็นพู ที่บรรจุด้วยโครมาตินที่เกาะกลุ่มเล็กน้อย ติดสีม่วงจางกว่านิวเคลียสของลิมโฟไซต์ (Nicole et al., 2007) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสี alpha-napthyl butyrate esterase เป็นสีที่มีความจำเพาะต่อโมโนไซต์ (Raskin and Valenciano, 2000) และสามารถติดสี ANAE ซึ่งปกติในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะติดสีเฉพาะกับโมโนไซต์ และลิมโฟไซต์ (Ranki et al., 1980)

โมโนไซต์ทั่วไปในสัตว์เลื้อยคลานมีได้มากถึงร้อยละ 10-20 ของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Sypek and Borsenko, 1988 ; Pienaar, 1962) แต่ไม่พบเม็ดเลือดชนิดนี้เลยในลูกเต่าตนุ (Aguirre et al., 1995; Wood and Ebank; 1984) ฤดูกาลไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวน โมโนไซต์มากนัก (Duguy, 1970 ; Sypek and Borsenko, 1988) แต่ในเต่าทะเลทรายมีรายงานว่าฤดูกาลมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดชนิดนี้ โดยในระหว่างการจำศีลจะมีจำนวนโมโนไซต์เพิ่มขึ้น (Christopher et al., 1999) การเพิ่มขึ้นของ โมโนไซต์เกิดขึ้นเมื่อมีการกระตุ้นจากการติดเชื้อที่เรื้อรัง ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเกิด granuloma และ giant cell formation รวมทั้งมีความจำเพาะต่อการเกิด granuloma จากการติดเชื้อแบคทีเรียและมีไข่ปรสิตของ

spirochid trematode (Campbell, 2006) ในคาเมเลี่ยน (chameleons) ที่เกิดภาวะไข่ค้างจะพบการสูงขึ้นของ โมโนไซต์ เปรียบเทียบกับในคาเมเลี่ยนที่ผ่านการวางไข่แล้ว (Cuadrado et al., 2002) อีกทั้งยังสามารถพบปรสิต Chlamydia-like orgamism และ pox-like virus ภายในไซโตพลาสซึมของโมโนไซต์ ในกระแสเลือดของคาเมเลี่ยนคอพับ (flap-necked chameleons; *chamaeleo dilepis*) (Jacobson and Telford, 1990)

ช. อะซูโรฟิล (Azurophil)

เม็ดเลือดขาวชนิดนี้พบได้บ้างในเต่าบางชนิด และพบได้เป็นปกติในสแควมาต้าและจระเข้ (Alleman et al., 1999 ; Dotson et al., 1995 ; Hawkey and Dennett, 1989) โดยในเต่าหัวค้อนและลูกเต่าหัวค้อน (*Caretta caretta*) ที่มีสุขภาพปกติสามารถพบอะซูโรฟิลประมาณร้อยละ 5 ของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Smith et al., 2000; Keller et al., 2004) เม็ดเลือดนี้จะมีลักษณะของ โมโนไซต์ กับ แกรนูลโลไซต์อยู่ด้วยกัน อะซูโรฟิลเป็นเซลล์ขนาดใหญ่กลม แกรนูลในไซโตพลาสซึมเล็กคล้ายฝุ่นสีม่วง และอาจประกอบกับแวลคูโอลใสจำนวนเล็กน้อยภายในนิวเคลียสกลมรีเอียงไปด้านใดด้านหนึ่งเล็กน้อย และมีการเกาะกลุ่มของโครมาตินภายใน โดยอะซูโรฟิลอ่อนจะมีขนาดนิวเคลียสใหญ่กว่า โดยมีรูปร่างรีหรือรูปร่างนิวเคลียสไม่แน่นอน มีอัตราส่วนนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมต่ำ (Nicole et al., 2007)

ปฏิกิริยาไซโตเคมีของเซลล์อะซูโรฟิลสามารถบ่งบอกถึงหน้าที่ของเซลล์ได้ในงู eastern diamondback rattlesnakes พบว่าอะซูโรฟิลให้ผลบวกต่อสี benzidine peroxidase, sudan black B และ PAS คล้ายกับนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Alleman et al., 1999) ซึ่งการเกิดผลบวกต่อสีดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอะซูโรฟิลในงูมีหน้าที่เป็นเซลล์กลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม (phagocyte cell) โดยขบวนการ oxidative burst คล้ายกับในนิวโทรฟิลของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Head et al., 2004) ส่วนอะซูโรฟิลในกิ้งก่าอีกัวน่า หรือในกลุ่มลิซาร์ดกลับให้ผลลบต่อ benzidine peroxidase และ sudan black B แสดงถึงว่ามีเซลล์ต้นกำเนิดในกลุ่ม monocytoid cell (Harr et al., 2001) ซึ่งอาจจัดเป็นกลุ่มของ โมโนไซต์ หรือเป็นโมโนไซต์ที่มีลักษณะแบบอะซูโรฟิล (azurophilic monocyte) (Heard et al., 2004)

ในงูอะซูโรฟิลเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีจำนวนมากเป็นที่สองในกระแสเลือด (Alleman et al., 1999; Salakij et al., 2002a) อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของจำนวนอะซูโรฟิลปกติและเซลล์อ่อน มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อและการอักเสบ เช่นการติดเชื้อแบคทีเรีย หรือการเกิดโรคระบบเฉียบพลันในงู (Jacobson et al., 1997) ส่วนในกิ้งก่าอีกัวน่า หรือกลุ่มลิซาร์ดพบว่าอะซูโรฟิล มีจำนวนน้อย และอิทธิพลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนเหมือนกับอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ต่อ โมโนไซต์ (Nicole et al., 2007)

2.2.3.3 ทรอมโบไซต์และการตอบสนองต่อการเกิดโรค

เกล็ดเลือดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (platelets) ไม่มีนิวเคลียส และเป็นเพียงชิ้นส่วนที่แยกออกมาจากไซโตพลาสซึมของ megakaryocyte แต่สัตว์อื่นๆ รวมทั้งสัตว์เลื้อยคลาน จะเรียกเซลล์ที่ทำหน้าที่คล้ายเกล็ดเลือดว่าทรอมโบไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียส มีต้นกำเนิดมาจากไขกระดูกโดยตรง และมีทรอมโบบลาสต์ (thromboblast) เป็นเซลล์อ่อนที่เป็น precursor

ทรอมโบไซต์ มีรูปร่างเป็นกระสวยถึงกลม ไซโตพลาสซึมเห็นได้ชัดเจน มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง กรมหรือรี ติดสีม่วงเข้มและมีโครมาตินสีเข้ม เซลล์ทรอมโบไซต์ที่ Inactivated จะมีลักษณะไซโตพลาสซึมใส อาจพบอะซูโรฟิลริกแกรนูลเล็กๆ ภายใน (Nicole et al., 2007) ทั่วไปทรอมโบไซต์มีความยาว 8-16 ไมครอน ความกว้าง 5-9 ไมครอน (Sypek and Borsenko, 1988) โดยกระบวนการเตรียมแผ่นฟิล์มเลือด สามารถทำให้ทรอมโบไซต์แตกหรือ activated ได้ง่าย (Campbell, 1995) เมื่อเซลล์แตกจะเห็นแต่นิวเคลียสมีขอบเรียบลอยอิสระ การเกิด activated ของทรอมโบไซต์เหมือนกับเกิดในเกล็ดเลือด คือ มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เกิดการเกาะกลุ่มกัน และอาจพบการเกิด pseudopods หรือมีไซโตพลาสซึมที่ขอบเขตไม่แน่นอน และมีแวลคูโอลภายใน การเกิดการเกาะกลุ่มของทรอมโบไซต์ ทำให้การนับจำนวนของทรอมโบไซต์ เกิดความคลาดเคลื่อน แต่เป็นผลดีในการช่วยแยกชนิดของลิมโฟไซต์ออกจากทรอมโบไซต์ได้ (Nicole et al., 2007)

ปฏิกิริยาไซโตเคมีของทรอมโบไซต์ให้ผลบวกต่อสี PAS ในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่ (Alleman et al., 1992; Alleman et al., 1999; Salakij et al., 2002a) ยกเว้นใน American alligator ที่ให้ผลลบต่อ PAS (Mateo et al., 1984)

ทรอมโบไซต์มีหน้าที่หลักในการสร้างทรอมบัส (thrombus formation) และมีส่วนเกี่ยวข้องในการหายของบาดแผล (Sypek and Borsenko, 1988) การศึกษาจำนวนทรอมโบไซต์ในสัตว์เลื้อยคลานยังมีการศึกษาอยู่จำกัด โดยมีรายงานในสัตว์เลื้อยคลานอเมริกาใต้ว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 25-350 เซลล์ ต่อจำนวนเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์ (Pienaar, 1962)

เซลล์อ่อนของทรอมโบไซต์ จะมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ที่โตแล้ว ไซโตพลาสซึมออกสีน้ำเงิน การเพิ่มขึ้นของเซลล์อ่อนนี้เกิดขึ้นได้ ในกรณีเกิดการเร่งการสร้างของเม็ดเลือดในสัตว์ที่มีภาวะโลหิตจางเนื่องจากไขกระดูกมีการเร่งการปล่อยออกมาของเซลล์ทำให้ เซลล์อ่อนของทรอมโบไซต์ออกมาในกระแสเลือดมาก สามารถพบทรอมโบไซต์ที่มี 2 นิวเคลียสได้ (binucleated) ในสัตว์ที่มีภาวะโลหิตจาง (Frye, 1991) ในการอักเสบรุนแรง นิวคลีไอด์ของทรอมโบไซต์ อาจมีรูปร่างหลากหลายและอาจพบได้ในกรณีที่สัตว์เลื้อยคลานนั้นมีภาวะโลหิตจางเรื้อรัง (Hawkey and Dennett, 1989)

จำนวนทรอมโบไซต์ที่ลดลง (thrombocytopenia) อาจเกิดจากกระบวนการเก็บเลือดนานเกินไป หรือความคลาดเคลื่อนของผลทางห้องปฏิบัติการ เช่นการเกิดการเกาะกลุ่มของ ทรอมโบไซต์ ซึ่งพบได้เป็นปกติ เมื่อใช้เฮปารินเป็นสารกันการแข็งตัวของเลือด ทำให้จำนวนทรอมโบไซต์ที่นับได้ลดลง (pesudothrombocytopenia) หรือเกิดขึ้นจริงจากการสร้างเม็ดเลือดลดลง เนื่องจากการติดเชื้อ สารพิษหรือเนื้องอกที่ไขกระดูก ส่วนการเพิ่มขึ้นของเกล็ดเลือดเกิดได้จากการติดเชื้อ การอักเสบ หรือโรคทางภูมิคุ้มกัน (immune-mediated disease) (Nicole et al., 2007)

2.2.3.4 การติดเชื้อที่พบเห็นได้จากการตรวจเลือด

สัตว์เลี้อยคลานส่วนใหญ่ในธรรมชาติมักพบปรสิตในเลือดโดยไม่ก่อให้เกิดโรค อย่างไรก็ตามปรสิตบางชนิดก็สามารถก่อให้เกิดอาการทางคลินิก ที่สำคัญ เช่น ภาวะโลหิตจาง หรือทำให้เกิดอาการขึ้นเมื่อมีปัจจัยโน้มนำ เช่น ความเครียด การติดเชื้อ ต่อโรคอื่นๆ ร่วม หรือการจัดการเลี้ยงดูที่ไม่ดี ซึ่งเป็นผลทำให้มีการเพิ่มจำนวนของปรสิตในร่างกายจนเกิดอาการป่วย (Nicole et al., 2007) ปรสิตในเลือดสามารถพบได้ในเซลล์เม็ดเลือด หรือล่องลอยอยู่ในพลาสมา ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มของ hemaprotozoa, piroplasmid และ filarial worm หรือการติดเชื้ออื่นๆ ที่อาจตรวจพบได้ เช่นการพบอินคลูชันของไวรัส และแบคทีเรีย

ก. Hemoparasite

Hemogragarines, plasmoiids และ trypanosome จัดอยู่ในกลุ่มของปรสิตในเลือดที่พบได้บ่อยในสัตว์เลี้อยคลาน โดยทั่วไปปรสิตในเลือดจะมีตัวพาหะนำ (vector) จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แมลง หรือ สัตว์ในกลุ่ม annelid โดย hemoparasite ที่มีรายงานการพบในเต่าได้แก่

- **Hemoragarine**

ปรสิตในเม็ดเลือดกลุ่ม Hemogregarine มีอยู่ 4 สกุล (genera) คือ *Hemogregarina, Hepatozoon, Karyolysus* และ *Hemolivia* spp. การจำแนกปรสิตในสกุลนี้ไม่สามารถทำได้โดยการดูจากเม็ดเลือดเพียงอย่างเดียว (Telford, 1984) ในการย้อมสี สเมียร์เลือดด้วย Romanowsky stained จะเห็นลักษณะของแกมอนต์ (gamont) มีรูปร่างคล้ายไส้กรอก ไซโตพลาสซึมของปรสิตติดสีม่วงจาง มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง หรือเอียงเล็กน้อย โดยติดสีม่วงเข้ม ยกเว้นใน *Hemogregarina* spp. ที่จะเป็นลักษณะของ meront ที่ไม่มีเม็ดสี และสามารถพบได้ทั้งในเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาว (Jacobson, 1983) โดยทั่วไปแกมอนต์ของปรสิตที่อยู่ในเม็ดเลือดและผลักให้นิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไปอยู่ทางด้านข้าง ทำ

ให้เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างและขนาดที่ผิดปกติไป (Lane and Mader, 2006) ในบางกรณีอาจพบว่ามีแกมอนต์จำนวนสอง หรือมากกว่าในเม็ดเลือด หรืออาจพบแกมอนต์หลุดออกมาอยู่นอกเซลล์ โดย Hemogregarine ในเต่าน้ำ และอะลิเกเตอร์มักพบเป็นการติดเชื้อในสกุล *Hemogregarina* spp. ส่วนในสกุล *Hepatozoon* spp. พบได้บ่อยในงูบกและงูน้ำ การติดต่อของปรสิตผ่านมาโดยการติด sporozoites ที่นำมาโดยแมลง หรือปลิง (Frye, 1991; Salakij et al., 2002a)

โดยทั่วไปปรสิตในเลือดกลุ่ม Hemogregarines ไม่ทำให้เกิดความเจ็บป่วยหรือพยาธิสภาพ แต่มีรายงานการพบงูที่มีการเกิดฝีในตับที่บรรจุด้วย hepatozoon meront ร่วมกับการพบปรสิตนี้ในเลือด (Wozniak et al., 1998) โดย Wozniak and Telford (1991) กล่าวว่าปรสิตในกลุ่ม Hemogregarines นั้นจะไม่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ที่เป็นโฮสต์ตามธรรมชาติ แต่จะทำให้โรค อาการอักเสบ อย่างมีนัยสำคัญได้ เมื่อมีการติดเชื้อในสัตว์ที่ไม่ได้เป็นโฮสต์ตามธรรมชาติ ซึ่งในงู และลิซาร์ด การติดต่อของเชื้อ *Hepatozoon* spp. สามารถติดต่อได้ตั้งแต่แรกเกิด หรือโดยการกิน (oral transmission) (Telford, 1984)

- **Plasmodium**

ปรสิตในครอบครัว Plasmodiiae มีสมาชิกอยู่ 5 สกุล ที่พบการรายงานในเต่าและสัตว์เลื้อยคลาน คือ *Plasmodium*, *Fallisia*, *Saurocytozoon*, *Haemocystidium* และ *Haemoproteus* spp. โดยในงูและเต่าน้ำสามารถพบการติดเชื้อ *Haemoproteus* ได้ ส่วนการติดเชื้อ *Plasmodium*, *Fallisia*, *Saurocytozoon* และ *Haemocystidium* spp. พบได้ในสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มลิซาร์ด (Lane and Mader, 2006) โดยเชื้อ *Plasmodium* spp. ในสัตว์เลื้อยคลานมีมากกว่า 90 ชนิด (species และ subspecies) ปรสิตในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อมาเลเรีย (malaria) พบได้มากที่สุดในในเต่าน้ำ และเต่าบก พบได้ในลิซาร์ด และพบได้บ้างในงู sporogony ของปรสิตอาศัยอยู่ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งการติดต่อของ sporozoite ติดต่อโดยการดูดกินเลือดของตัวที่มีเชื้อไปสู่ตัวต่อไป และมีการพัฒนาเป็นระยะ merogony และ gametocyte ในสัตว์เลื้อยคลานที่เป็นโฮสต์ (Telford, 1984) ปรสิตในระยะ gametocyte, meront และ trophozoite สามารถพบได้ทั้งในเม็ดเลือดและนอกเม็ดเลือด

Plasmodium มี gametocyte เป็นลักษณะกลม รี หรือทรงยาว โครงสร้างติดสีส้มจาง หรือชมพูเข้ม บรรจุด้วยแกรนูลเม็ดสี (refractile pigment granule) วาว สี

ทองน้ำตาลถึงดำ ซึ่งแกรนูลนี้เกิดจากการเสียสภาพของฮีโมโกลบิน ซึ่งลักษณะนี้สามารถพบได้เช่นกันในการติดเชื้อ *Haemocystidium* และ *Haemoproteus* spp. ซึ่งลักษณะของแกรนูลเม็ดสีนี้ทำให้สามารถใช้แยก *Plasmodium* และ *Haemoproteus* spp. ออกจากปรสิตในกลุ่ม hemogragarine ที่พบเม็ดสีน้อยได้ (Campbell, 2006)

trophozoite ของ *Plasmodium* spp. ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงจะมีลักษณะโครงสร้างเป็น focal packets หรือ signet-ring (Keymer, 1981)

Saurocytozoon spp. จะมี gametocyte ขนาดกลมใหญ่ อยู่ในเม็ดเลือดขาว พบแกรนูลเม็ดสีได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ *Plasmodium* และ *Haemoproteus* spp. (Keymer, 1981)

การติดเชื้อในครอบครัว Plasmodiidae ในธรรมชาติส่วนมากไม่ทำให้เกิดโรค แต่ในบางครั้งอาจพบภาวะโลหิตจางในระดับปานกลางได้ (Lane and Mader, 2006) การติดเชื้อรังเรื้อจะมีการคงอยู่ของเชื้อได้จนตลอดชีวิตของสัตว์ การเกิดภาวะโลหิตจางรุนแรง พบได้ในกรณีการติดเชื้อ *Plasmodium* spp. มากจนเกิดการอุดตันของรอยต่อของหลอดเลือดฝอย (thrombosis in capillary beds) (Frye, 1991)

- Trypanosomes

ปรสิตชนิดนี้เป็นโปรโตซัวขนาดใหญ่ที่มีแฟลกแจลล่าในการเคลื่อนที่ (flagellate protozoa) ประกอบด้วย kinetoplast และ undulating membrance (trypamastigote) สามารถพบ Trypanosomes ลอยอยู่ในน้ำเลือดของสัตว์เลี้ยงคลานได้หลายชนิด (Nicole et al., 2007) ในสัตว์เลี้ยงคลานที่อยู่บนบกการติดต่อเกิดผ่านทางแมลงดูดเลือด เช่น phletomite sand flies, biting dipteran flies ส่วนในสัตว์เลี้ยงคลานที่อยู่ในน้ำการติดต่อผ่านทางปลิง (Frye, 1991; Keymer, 1981) การติดภาวะ trypanosomiasis เกิดขึ้นในกรณีที่มีการติดเชื้อปรสิตในกระแสเลือดจำนวนมาก ซึ่งมักมีผลต่อการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ (subclinical infection) อย่างยาวนาน (Lane and Mader, 2006)

- Piroplasmida

ปรสิตในกลุ่มนี้รวมถึง Aegyptianella (Tunetella) และ Sauroplasma (Serpentoplasma, Chelonoplasma) ซึ่งพบได้บ้างในเต่า ลิซาร์ด และงู (Keymer, 1981) ปรสิตในกลุ่มนี้มีขนาดเล็กมาก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 ไมครอน) เห็นเป็นอิน

คูลชันสีน้ำเงินแบบจุดกลม (punctuate basophilic inclusion) ในเม็ดเลือดแดง โดยมักเกาะกลุ่มอยู่รวมกัน หรือมีแวคูลโอลล้อมรอบ (Frye, 1991)

- Sauroleishmania

โปรโตซัวชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับการพบเชื้อ trypanosomes ในกระแสเลือดในสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิด โดยเฉพาะในลิซาร์ด (Keymer, 1981) โดย amastigote ของเชื้อสามารถพบในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง เป็นอินคลูชันสีน้ำเงินเข้ม รูปร่างกลม มีรูตรงกลาง โดยอาจอยู่เดี่ยวๆ หรืออยู่รวมกันหลายอัน (Paperna et al., 2001) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ปรสิตนี้พบได้ในแมคโครฟาจ (macrophage) โดยมีลักษณะของ bar-shaped extrachromasomal DNA fragment เรียกว่า kinetoplast ปรสิตในรูปแบบที่เคลื่อนที่ได้ หรือ motile promastigote form ที่มีแฟลกเจลล่าในการเคลื่อนที่ พบล่องลอยอิสระอยู่ในกระแสเลือดได้ การติดเชื้อของ Sauroleiphmaria ติดต่อมาสู่สัตว์เลื้อยคลานโดย phletomine sandflies (Frye, 1991) การวินิจฉัยการติดเชื้อนี้โดยการตรวจจากแผ่นฟิลม์เลือดทำได้ยาก การใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นตัวเลือกในการวินิจฉัยที่ดีกว่า (Campbell, 2006)

- Microfilaria

เชื้อปรสิต filarial worm ในสัตว์เลื้อยคลานสามารถพบได้หลายชนิด ขึ้นกับชนิดสัตว์ เช่น เชื้อ Cardianema พบได้ในเต่า และ lacertid lizard เชื้อ Macdonaldius สามารถพบในงูและลิซาร์ด เชื้อ Foleyella พบได้ในคาเมเลี่ยน และ lacertid lizard เชื้อ Saurositus พบได้ใน lacertid lizard เชื้อ Oswaldofilaria พบได้ใน จระเข้ และ lacertid lizard เป็นต้น (Lane and Mader, 2006) การตรวจเชื้อ filarial สามารถพบได้ง่ายด้วยการย้อมสีแผ่นฟิลม์เลือดด้วย Romanowsky stained การติดเชื้อนี้ส่วนใหญ่ไม่มีการแสดงออกของอาการป่วย แต่หากมีการติดเชื้อในจำนวนมาก สามารถทำให้เกิด thrombosis และเกิดการอุดตันของหลอดเลือดซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการบวมน้ำ (edama) การเกิดพังพืด (fibrosis) และการเกิดเนื้อตายในบริเวณที่เกิดพยาธิสภาพได้ การติดต่อของ microfilaria ผ่านทางยุงดูดเลือด หรือเห็บดูดเลือด (Nicole et al., 2007)

- Spirochiidae

ปรสิตนี้จัดอยู่ในพวกเดียวกับหนอนพยาธิใบไม้ (digenetic fluke) ซึ่งมีการพัฒนามาอาศัยอยู่ในกระแสเลือดในสัตว์เลื้อยคลาน รวมทั้งในเต่า โดยปรสิตระยะ cercariae จะมีการแทรกผ่านผิวหนัง หรือชั้นเยื่อเมือกในโฮสต์ เข้าไปพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยในหัวใจ และหลอดเลือด พยาธิที่โตเต็มวัยแล้วสามารถปลดปล่อยไข่ ซึ่งจะแทรกผ่านหลอดเลือดฝอย หรือเกาะตัวกันอยู่ที่ปลายหลอดเลือดฝอย การพบไข่ในเลือดบ่งบอกถึงการติดเชื้ออย่างรุนแรง (Lane and Mader, 2006)

ข. อินคลูชันไวรัสในเม็ดเลือด (Viral inclusion)

ไวรัสที่สามารถพบได้ในเม็ดเลือดในสัตว์เลื้อยคลาน มี 3 เชื้อไวรัสหลัก คือ เชื้อ Inclusion Body Disease (IBD) ซึ่งพบได้ในงู boid snake (Garner and Raymond, 2004) เชื้อ poxvirus ซึ่งพบได้ใน flap-neck cameleon (Jacobson and Telford, 1990) และ Iridovirus ซึ่งสามารถพบได้ในเต่า และสัตว์เลื้อยคลานอื่นๆ (Campbell, 2006)

การพบ Iridovirus inclusion ในเม็ดเลือดสัตว์เลื้อยคลานมีรายงานใน เต่า ลิซาร์ด และงู (Allender et al., 2006; Marquardt and Yeager, 1967) ซึ่งลักษณะของอินคลูชันในสัตว์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไป ในลิซาร์ด พบอินคลูชันในเม็ดเลือดแดง เป็นลักษณะจุดเล็กสีแดงส้มกลมถึงรี อาจพบร่วมกับ rectangular albuminoid vacuoles ซึ่งมีลักษณะคล้าย Pirhemocytonosis แต่สามารถวินิจฉัยแยกได้ภาใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบเป็นลักษณะของอนุภาคไวรัส ที่อยู่ในกลุ่มของครอบครัว Iridoviridae ในตัวคาเมเลี่ยนไวรัสที่มีลักษณะเดียวกัน ใช้ชื่อเรียกว่า lizard erythrocytic virus (LEV) (Telford and Jacobson, 1993)

อินคลูชันของการติดเชื้อ Iridovirus ในเม็ดเลือดแดงงูมีสองแบบ คือ มีหนึ่งอินคลูชันไวรัสและหนึ่งผลึก โดยตัวไวรัส มีลักษณะของแกรนูลขนาดเล็ก ติดสีส้มแดงที่มีการเกาะกลุ่มกันเล็กๆ และผลึก จะมีลักษณะโปร่งแสง รูปร่างหกเหลี่ยมและแบน การติดเชื้อที่รุนแรงขึ้น สัมพันธ์กับผลึกที่ใหญ่ขึ้น โดยส่วนใหญ่มีเพียงหนึ่งอินคลูชันต่อหนึ่งเซลล์เม็ดเลือดแดง การพบสองอินคูชันพบได้บ้าง (Johnsrude et al., 1997) โดยก่อนหน้านี้มีการวิเคราะห์ว่าเป็นการติดเชื้อโปรโตซัว Toddia แต่เมื่อทำการพิสูจน์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเป็นอนุภาคของไวรัส โดยให้ชื่อว่า snake erythrocyte virus (SEV) (Johnsrude et al., 1997; Smith et al., 1994) ซึ่งผลึกที่พบเป็นผลพลอยได้ส่วนเกิน (by product) ที่เกิดขึ้นจากเซลล์และไวรัสมีการใช้ไขมัน และโปรตีน ผลของการติดเชื้อไวรัส มีรายงานในตัวสแควมาต้าที่พบอินคลูชันของไวรัส มีการเกิดภาวะโลหิตจางอย่างรุนแรง (Johnsrude et al., 1997; Telford,1984)

ในเต่า eastern box turtle (Terrapene caralina) สามารถพบอินคลูซันของ iridovirus ในเม็ดเลือดขาวชนิด โมโนไซต์ อะซูโรฟิล และเฮเทอโรฟิล โดยมีลักษณะเป็นอินคลูซันเดี่ยว กลม ถึงรี เหมือนแกรนูล ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-7 ไมครอน ในบางอินคลูซันพบการเกิด multiple fragment (Allender et al., 2006)

การแยกการเกิดอินคลูซันที่ไม่เกิดจากไวรัส (Nonviral inclusion) จากอินคลูซันที่เกิดจากไวรัส สามารถแยกได้จากลักษณะของผลึกของฮีโมโกลบิน ออแกลแนลที่เสื่อมสลาย (degenerative organelles) เศษเซลล์ (cell debris) สิ่งที่เกิดจากขบวนการกลืนทำลาย (phagocytized material) และปรสิตในเลือด

ในเต่าบกทะเลทราย (Gopherus agassizii) ในเม็ดเลือดแดงที่มีอินคลูซันที่เป็นจุดสีน้ำเงิน ขนาดเล็ก หรืออินคลูซันที่มีลักษณะเป็นวงใส มีการศึกษาพบว่าเกิดจากออแกลแนลที่เสื่อมสลายในเม็ดเลือดแดง (Alleman et al., 1992) ในกิ้งก่าอีกัวน่าสามารถพบอินคลูซันหกเลี่ยมสมมาตรใส (clear symmetrical hexagonal inclusion) คล้ายผลึกของฮีโมโกลบินในเซลล์ ได้เป็นปกติ (Harr et al., 2001; Simpson et al., 1980) โดยอินคลูซันเหล่านี้พบได้ในเม็ดเลือดแดงจำนวนมากในกระแสเลือดโดยที่สัตว์ไม่มีความผิดปกติของสุขภาพ รวมทั้งการเกิดแวคูโอลใสขนาดหลากหลายในเม็ดเลือดขาวชนิด อะซูโรฟิล และ โมโนไซต์ เกิดขึ้นได้จากไขมัน ซึ่งอาจมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับอินคลูซันของไวรัส (Garner and Raymont, 2004) หรือ การบรรจุด้วยเม็ดสีเมลานินในเซลล์แมคโครฟาจ (Melanin-containing magcrophage) หรือเซลล์โมโนไซต์ที่มีขบวนการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม ซึ่งพบได้เป็นปกติในสัตว์เลื้อยคลานทั่วไป (Nicole et al., 2007)

ค. แบคทีเรียในเลือด (Bacterimia)

ในสัตว์เลื้อยคลานสามารถพบแบคทีเรียในกระแสโลหิตได้หลายชนิด ซึ่งควรระมัดระวังผลลวงที่เกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่มาจากผิวหนัง หรือมาจากแบคทีเรียที่ติดอยู่แล้วบนสไลด์ หรือในสีย้อม ในกรณีที่เกิดจากภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) จะสามารถพบแบคทีเรียชนิดเดียวกัน (monomorphic bacteria) ได้ทั้งภายในและนอกเม็ดเลือด โดยเฉพาะในเม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิล และโมโนไซต์ที่มักพบการกลืนทำลายของแบคทีเรียเข้าภายในเซลล์ ซึ่งสัมพันธ์กับความรุนแรงของการติดเชื้อที่เกิดขึ้น ใน emerald tree boas (*Corallus caninus*) มีรายงานการพบอินคลูซันของ *Chlamydophila pneumoniae* ในโมโนไซต์ประมาณร้อยละ 20 ของเม็ดเลือดชนิดนี้ทั้งหมด ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดอาการ repetitive regurgitation (Nicole et al., 2007)

ในไรโนโซรัส กิ้งก่าอีกัวน่า (*Cyclura cornuta*) พบรายงานการพบเชื้อแบคทีเรียที่มีรูปร่างเกลียว (spiral–shaped bacterium) ในกระแสเลือดและไขกระดูก ซึ่งอยู่ในครอบครัว Spirillaceae (Simpson et al., 1981) และการพบเชื้อ Chlamydia ในเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ใน flap-neck chameleon (Jacobson and Telford, 1990)

2.2.4 การใช้เทคนิคพิเศษในการศึกษาทางโลหิตวิทยา

การใช้เทคนิคการย้อมสีพิเศษ หรือสีไซโตเคมี (cytochemical stain) ซึ่งเป็นสีที่ใช้ในการศึกษาเพื่อตรวจเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดขาวเพื่อการวินิจฉัยโรคที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับเม็ดเลือด หรือแยกแยะชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ (Raskin and Valenciano, 2000) ซึ่งในปัจจุบันนำมาใช้ช่วยในการจำแนกลักษณะเม็ดเลือดในสัตว์ป่า โดยเฉพาะในสัตว์เลื้อยคลานที่มีลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดที่ค่อนข้างแตกต่างกัน แม้อยู่ใน order เดียวกัน (Alleman et al., 1999) โดยปฏิกิริยาเคมีของสีกับเซลล์มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยลักษณะเซลล์ที่แยกออกได้ไม่ชัดเจน (undifferentiated) ดูจากคุณสมบัติการติดสีของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเม็ดเลือดแต่ละชนิด ซึ่งจะมีลักษณะการติดสีที่แตกต่างกันไปตามชนิดเม็ดเลือด และชนิดของสัตว์ชนิดนั้นๆ โดยเซลล์เม็ดเลือด อาจติดจำเพาะกับสีชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือติดกับสีหลายชนิด ซึ่งการแปลผลการย้อมไซโตเคมีควรคำนึงถึงการย้อมติดสี ความเข้ม และรูปแบบ (pattern) ในการติดสี มากกว่าดูเพียงย้อมติดสีหรือไม่ (Raskin and Valenciano, 2000) มาใช้ประกอบกับการย้อมสีเซลล์แบบปกติในกลุ่ม Romanowsky-type stain การจำแนกชนิดและจำนวนเม็ดเลือด และการย้อมสีไซโตเคมียังใช้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบดูลักษณะการติดสีของเซลล์เม็ดเลือดขาวของสัตว์แต่ละชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของสัตว์ชนิดนั้นๆ เช่น สัตว์ในกลุ่มปลา ได้แก่ ปลาดุกออร์มอส (*Hoplosternum littorale*) (Tavares-Dias and Barcellos, 2005) ปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio*) (Tripathi et al., 2004) ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (UEDA et al., 2001) ปลาเทอร์บอต (*Psetta maxima L.*) (Burrows et al., 2001) ในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน ได้แก่ ตัวสแควมาต้า (squamata) (*Tupinambis merianae*) (Carvalho et al., 2006) ตะกวด (*Gallotia simonyi*) (Martinez-Silvestre et al., 2005) งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) (Salakij et al., 2002a) กิ้งก่าอีกัวน่าเขียว (*Iguana iguana*) (Harr et al., 2001) ซึ่งรวมไปถึงการศึกษาในเต่าชนิดต่างๆ ได้แก่ เต่าดาวอินเดีย (*Geochelone elegans*) (Sailasuta et al., 2006a) เต่าหัวค้อน (*Caretta caretta*) (Casal and Orós, 2006) เต่าบกทะเลทราย (*Gopherus agassizii*) (Alleman et al., 1992; Garner et al.,1996) เต่าหญ้า (*Lepidochelys kempi*) (Cannon, 1992) เต่าตนุ (*Chelonia mydas*) (Work et al., 1998)

สีย้อมไซโตเคมีที่ใช้ได้แก่ สี peroxidase, non-specific esterase, acid phosphatase, sudan black B, periodic acid-schiff, bata-glucuronidase, alkaline phosphatase และ toluidine blue ซึ่งจำแนกคุณสมบัติในการย้อมติดสี สีย้อม peroxidase เช่น benzidine peroxidase และ myeloperoxidase จะติดสีเซลล์เม็ดเลือดที่มีเอนไซม์ peroxidase โดยให้สีน้ำเงินอมม่วง ซึ่งโดยส่วนใหญ่เอนไซม์นี้จะอยู่ในเซลล์แกรนูโลไซต์ (granulocyte) สีย้อม alpha-naphthyl butyrate esterase เป็นสีจำเพาะกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด โมโนไซต์ ในมนุษย์ สีย้อม Sudan black B ย้อมติดไขมัน เช่น ฟอสโฟไลปิด (phospholipids) ไขมันธรรมชาติ (natural fat) และสเตอรอล (sterol) หรือสีย้อม toluidine blue ซึ่งย้อมติดสีสารฮีตตามีน ซึ่งใช้จำแนก mast cell ในมนุษย์ สี periodic acid-Schiff ใช้ย้อมสารไกลโคเจน (Raskin and Valenciano, 2000) เป็นต้น

ตัวอย่างของการใช้สีไซโตเคมีในเต่าได้แก่ รายงานการศึกษาลักษณะและการย้อมติดสีทางไซเคมีของเม็ดเลือดในลูกเต่าหัวค้อน (*Caretta caretta*) เพื่อใช้ช่วยในการจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาว โดยใช้ benzidine peroxidase, chloroacetate esterase, alpha-naphthyl butyrate esterase (ชนิดมีและไม่มี sodium fluoride), acid phosphatase (ชนิดมีและไม่มี tartaric acid), sudan black B, periodic Acid-Schiff และ toluidine blue ซึ่งทำให้สามารถจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวในเต่าหัวค้อนได้เป็น 5 ชนิด คือ เฮเทอโรฟิล อีโอสิโนฟิล เบโซฟิล ลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ จากที่มีคุณสมบัติในการย้อมติดสีที่แตกต่างกัน โดยไม่พบอะซูโรฟิล (Casal and Orós, 2006)

หรือในการศึกษาของ Work et al. (1998) ได้ทำการศึกษาลักษณะและการย้อมติดสีทางเคมีของเม็ดเลือดในเต่าตนุ (*Chelonia mydas*) โดยใช้สีพิเศษในการจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวในเต่าตนุได้เป็น 5 ชนิดเช่นเดียวกัน คือ เฮเทอโรฟิล อีโอสิโนฟิล เบโซฟิล ลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscopy) เป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษาตัวอย่างได้หลายชนิด เป็นกล้องที่ใช้ลำแสงของอิเล็กตรอน วิ่งผ่านวัตถุที่ต้องการจะดู ทำให้เกิดการหักเหของลำแสงที่จะตกลงบนจอรับภาพเรืองแสง ทำให้เกิดภาพขึ้น มีกำลังขยายสูงมาก ถึง 500,000 เท่า หรือมากกว่า แต่ตัวอย่างต้องสามารถทนอยู่ได้ในสภาวะสุญญากาศและทนต่อลำแสงอิเล็กตรอนที่มากระทบโดยตรง เนื่องจากแหล่งกำเนิดแสงอิเล็กตรอน คือ ปืนยิงอิเล็กตรอน (Electron gun) ซึ่งเป็นขดลวดทังสเตน ดังนั้นการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจึงต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดภาพที่ดีและถูกต้อง การเตรียมตัวอย่างมีหลายวิธีขึ้นกับชนิดของตัวอย่างและวัตถุประสงค์ของการศึกษา (รุจิพร, 2541)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ *กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM)* ใช้ในการศึกษาโครงสร้างภายในของเซลล์ โดยลำแสงอิเล็กตรอนจะส่องผ่านเซลล์ หรือตัวอย่างที่ศึกษา ภาพเป็น 2 มิติ ตัวอย่างต้องผ่านกระบวนการตัดเนื้อเยื่อในพาราฟินก่อน มองผ่าน fluorescence screen และ*กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)* ใช้ศึกษาผิวของเซลล์หรือผิวของตัวอย่างวัตถุที่นำมาศึกษา โดยลำแสงอิเล็กตรอนจะส่องกราดไปบนผิวของวัตถุ ทำให้ได้ภาพซึ่งมีลักษณะเป็นภาพ 3 มิติ ตัวอย่างไม่ต้องผ่านกระบวนการตัดเนื้อเยื่อในพาราฟิน แต่กำลังขยายต่ำกว่า TEM ภาพผ่าน Detector มามองเห็นที่จอภาพ

การศึกษาทางโลหิตวิทยา โดยการแยกชนิดเม็ดเลือดผ่านทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนนั้น พิจารณาประกอบจากจำนวนเซลล์ ขนาด รูปร่าง การกระจายของแกรนูล และรูปร่างของนิวเคลียส โดยลักษณะโครงสร้าง และองค์ประกอบในเซลล์จะมีความสัมพันธ์กับหน้าที่ของเม็ดเลือดแต่ละชนิด และสามารถนำมาอธิบายการทำงาน และลักษณะการย้อมติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงได้ค่อนข้างชัดเจน (Tripathi et al., 2004) ซึ่งใช้ในการศึกษาเม็ดเลือดของสัตว์หลายชนิดร่วมกับการศึกษาทางโลหิตวิทยาเบื้องต้นอื่นๆ เช่น การย้อมสีธรรมดา และการย้อมสีทางไซโตเคมี โดยเฉพาะการศึกษาเพื่อจำแนกลักษณะโดยละเอียดทางโครงสร้างของเม็ดเลือดขาว เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของสัตว์ชนิดนั้นๆ และทำเพื่อเปรียบเทียบกับในสัตว์อื่น เช่น ปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio*) (Tripathi et al., 2004) ตัวสแควมาต้า (squamata) (*Tupinambis merianae*) (Carvalho et al., 2006) ตะกวด (*Gallotia simonyi*) (Martinez-Silvestre et al., 2005) งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) (Salakij et al., 2002a) เต่าหัวค้อน (*Caretta caretta*) (Casal and Orós, 2006) เต่าดาวอินเดีย (*Geochelone elegans*) (Sailasuta et al., 2006 a) กวางเรนเดียร์ (*Rangifer tarandus*) (Henkel et al., 1999) โลมาอิระวดี (*Orcaella brevirosris*) (Sailasuta et al., 2006b) เป็นต้น

2.3 หลักการโดยทั่วไปของเคมีโลหิตของสัตว์เลื้อยคลาน

ข้อมูลของค่าเคมีโลหิต มักนำมาใช้เพื่อประเมินภาวะสุขภาพในสัตว์เลื้อยคลานที่มีปัญหาสุขภาพ อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับข้อมูลทางเคมีโลหิตที่ได้ยังคงมีความแตกต่างอยู่มาก เนื่องจากค่าทางเคมีโลหิตในเต่าและสัตว์เลื้อยคลานทั่วไปมักมีค่าในช่วงปกติที่ค่อนข้างกว้าง เนื่องจากกลไกเมแทบอลิสมในเลือดขึ้นกับอุณหภูมิ ฤดูกาลเป็นสำคัญ อีกทั้งยังมีความแตกต่างในเต่าแต่ละชนิด อายุ เพศ ภาวะทางโภชนาการ สภาวะทางกายภาพ และการจัดการ โดย Wilkinson (2003) กล่าวว่าในเต่าตัวเมียจะมีการเปลี่ยนแปลงของค่าเคมีโลหิตเลือดตามวงรอบชีวิตของแต่ละฤดูกาลที่มากกว่าเต่าตัวผู้ เป็นต้น การใช้ค่ามาตรฐานอ้างอิงจึงมีข้อจำกัดในการใช้

อยู่มากกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ถึงแม้ว่าจะมีปัจจัยภายนอกดังกล่าว สามารถทำให้ค่าเคมีโลหิตผันแปรได้เช่นเดียวกันในสัตว์อื่นๆ แต่ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำที่เป็นสัตว์เลือดเย็น (ectotherm) ปัจจัยภายนอกจะมีอิทธิพลเป็นอย่างมากกับความปกติทางกายภาพและสุขภาพเมื่อเปรียบเทียบกันกับในสัตว์เลือดอุ่น (endotherm) (Thrall et al., 2004) นอกจากนั้นความแตกต่างทางเทคนิคของผู้ตรวจก็เป็นปัจจัยที่สำคัญ โดยเฉพาะค่าเอนไซม์ในเลือด เช่น alkaline phosphatase (AP) aspartate aminotransferase (AST) และ lactate dehydrogenase (LDH) ซึ่งเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ขึ้นกับ วิธีการเก็บ เวลา สารที่ใช้ในการกันเลือดแข็งตัว (Wilkinson, 2003) และตำแหน่งที่ใช้เจาะเก็บเลือด (López-Olvera et al., 2003) เป็นต้น

การศึกษาค่าทางเคมีโลหิตในเต่าที่มีการรายงาน เช่น การตรวจค่าพิสัยอ้างอิงปกติ (normal reference values) ทางเคมีโลหิตในพลาสมาของเต่าบึงยุโรป (*Emys orbicularis*) โดยแบ่งกลุ่มตามเพศ (Metin et al., 2006) เต่าบกรัสเซีย (*Agrionemys horsfieldi*) (Knotkovà et al., 2002) เต่าบกทะเลทราย (Dickinson et al., 2002) เต่าตนุ (*Chelonia mydas*) โดยแบ่งกลุ่มตามเพศ และความแตกต่างของความยาวกระดอง (Bolten and Bjorndal, 1992) และเต่าบกรัศมี (*Geochelone radiate*) โดยแบ่งกลุ่มตามเพศ และฤดูกาล (Zaias et al., 2006) อีกทั้งการศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวกับค่าทางเคมีโลหิต อีกหลายรายงาน เช่น การศึกษาค่าทางเคมีโลหิตปกติเปรียบเทียบกับเมื่อเต่าได้รับยาถ่ายพยาธิชนิด Fenbendazole ในเต่าบกเมดิเตอร์เรเนียน (*Testudo Hermanni*) (Neiffer et al., 2005) หรือ การศึกษาผลของการฉีดยาเจนตาไมซินเข้ากล้ามเนื้อในเต่าหับตะวันออก (*Terrapene caralina carolina*) (Beck et al.,1995) เป็นต้น ซึ่งรายงานข้างต้นที่กล่าวมาค่าทางเคมีโลหิตต่างๆ ที่ได้ส่วนใหญ่มีค่าที่แตกต่างกันไป หรือมีค่าที่ผันแปรในค่าเคมีโลหิตแต่ละตัวเป็นอย่างมาก (ตารางที่ 2.1) การใช้ในทางคลินิกจึงมีการแนะนำให้ใช้ค่าเคมีโลหิตในเต่าชนิดเดียวกัน หรือทำการเปรียบเทียบตามลำดับช่วงเวลาในเต่าตัวเดียวกัน โดยใช้ค่ามาตรฐานอ้างอิงในเต่าที่ใกล้เคียงกันที่สุดเป็นตัวช่วยในการประกอบการวิเคราะห์ (Wilkinson, 2003)

2.3.1 การใช้ตัวอย่างเลือด และเลือกทดสอบค่าเคมีโลหิต

การจับบังคับและเก็บตัวอย่างเลือดที่ใช้ในทางเคมีโลหิต เช่นเดียวกับที่อธิบายในหัวข้อ 2.2.1 ซึ่งการเก็บตัวอย่างในการตรวจค่าเคมีโลหิตบางค่าสามารถใช้ตัวอย่างที่ปนเปื้อนน้ำเหลืองได้ เช่นค่ากลูโคส แคลเซียม ฟอสฟอรัส โซเดียม ยูเรีย และเอนไซม์ต่างๆ ในพลาสมา หรือซีรั่ม แต่ในบางปัจจัยเลือดการปนเปื้อนของน้ำเหลือง มีผลต่อความคลาดเคลื่อนของค่าที่ได้ เช่น ทำให้เกิดการลดลงของค่าโปรตีนในพลาสมา และโพแทสเซียมจากความเป็นจริงอย่างมีนัยสำคัญ (Gottdenker and Jacobson, 1995; Crawshaw and Holz, 1996) โดยทั่วไปแล้วการตรวจทาง

โลหิตวิทยาการใช้พลาสมาเป็นตัวเลือกที่ดีกว่าการใช้ซีรั่ม เนื่องจากการแข็งตัวของเลือดในสัตว์เลี้ยงคลานมีเวลาที่ไม่แน่นอน หรือมีเวลานาน ซึ่งทำมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อค่าอิเล็กโตรไลต์ในซีรั่ม ดังนั้นจึงควรเลือกใช้สารกันแข็งตัวของเลือด (ลิเธียมเฮปาริน) การที่การแข็งตัวของเลือดใน antithrombin factor ในกระแสเลือดมากตามธรรมชาติ เพื่อป้องกันการเกิดการอุดตันของเลือดเนื่องจากการไหลเวียนของเลือดในสัตว์เลี้ยงคลานที่ช้ามาก (Campbell, 2006)

ส่วนใหญ่เลือดที่ทำการเจาะได้ในสัตว์เลี้ยงคลานมักมีปริมาณจำกัด จึงเป็นการยากที่จะทำการตรวจค่าทางเคมีโลหิตให้ครบทุกปัจจัยได้ โดยทั่วไปให้ทางปฏิบัติค่าที่เป็นตัวเลือกอันดับต้นๆ ที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์สภาวะร่างกายในเต่า ได้แก่ โปรตีนทั้งหมด (total protein: TP) โปรตีนอัลบูมิน (albumin) กลูโคส (glucose) กรดยูริค (uric acid) เอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) เอนไซม์ creatinine kinase (CK) แคลเซียม (calcium) และฟอสฟอรัส (phosphorus) ในเลือด ส่วนการตรวจค่าอื่นๆ ที่ใช้ในการตรวจวัดได้เช่นกัน คือ creatinine เอนไซม์ lactase dehydrogenase (LD) โซเดียม (sodium) โพแทสเซียม (potassium) คลอไรด์ (chloride) ก๊าซคาร์บอนไดต์ออกไซด์ในเลือด (total CO_2) และโปรตีนแยกละเอียดด้วย protein electrophoresis ซึ่งในปัจจุบันเครื่องตรวจค่าเคมีโลหิตแบบ dry reagent และ reflectance photometry สามารถใช้เลือดจำนวนน้อยในการตรวจแต่ละค่าได้ (10-30 µL) ทำให้สามารถตรวจค่าเคมีโลหิตเหล่านี้ที่สำคัญได้อย่างครบถ้วนในเลือดเพียง 0.5 มล.(Thrall et al., 2004)

2.3.2 การประเมินสภาพการทำงานของไตในสัตว์เลี้ยงคลาน

ไตส่วนนอก (renal cortex) ในสัตว์เลี้ยงคลานมีหน่วยไตแบบพื้นฐานหรือ cortical nephron ท่อไตไม่มีส่วนของ loop of Henle ทำให้สัตว์เลี้ยงคลานไม่สามารถทำให้ปัสสาวะมีความเข้มข้นได้ โดยเฉพาะไตของเต่ามีหน่วยไตจำนวนน้อยกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบด้วย glomerulus ที่สั้นมี proximal tubule ที่หนาและยาว และส่วน distal tubule ที่สั้นและบาง และไม่มี loop of Henle ซึ่งส่งผลให้ไม่สามารถทำให้ปัสสาวะมีความเข้มข้นได้ และไม่มีกรวยไต (renal pelvis) (Wilkinson, 2003)

ในสัตว์เลี้ยงคลานของเสียไนโตรเจน (nitrogenous wastes) ที่ขับจากไตของมีหลากหลายตั้งแต่กรดยูริค (uric acid) ยูเรีย (urea) และแอมโนเนีย (ammonia) ขึ้นกับสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติของสัตว์ โดยยูเรียและแอมโนเนียจะเป็นของเสียที่ละลายในน้ำ ขับไปพร้อมกับน้ำปัสสาวะทำให้สัตว์ต้องเสียน้ำมากกว่าการขับเป็นของเสียที่ไม่ละลายน้ำ เช่น กรดยูริค (Campbell, 2006)

ในเต่าน้ำจืดที่ใช้ชีวิตอยู่กับน้ำเป็นส่วนใหญ่ การขับของเสียจะมีปริมาณมากในรูปของยูเรียและแอมโนเนีย ในเต่าทะเลจะขับในรูปของกรดยูริค ยูเรีย และแอมโนเนีย ส่วนในอะลิเกเตอร์

จะขับในรูปของกรดยูริค และแอมโมเนีย ในสัตว์เลื้อยคลานที่อยู่บนบก เช่นเต่าบก ซึ่งมีความจำเป็นในการเก็บรักษาน้ำในร่างกาย การขับของเสียจึงอยู่ในรูปของกรดยูริค และเกลือยูเรต (urate salt) ที่เป็นลักษณะกึ่งของแข็ง (semisolid state) (Thrall et al., 2004)

การประเมินพยาธิสภาพของไตจากค่าเคมีโลหิตในสัตว์เลื้อยคลานทำได้ยากกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องด้วยความแตกต่างของสรีรวิทยา ตัวอย่างเช่นค่า blood urea nitrogen (BUN) และ creatinine ในพลาสมาของสัตว์เลื้อยคลาน ไม่นิยมใช้เนื่องจากไม่สามารถบอกการทำงานของไตได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยทั่วไปค่า BUN ในสัตว์เลื้อยคลานจะมีค่าต่ำ (น้อยกว่า 10 mg/dL) (Marks and Citino, 1990; Wright's and Skeba, 1992; Rosskopf, 1982; Taylor and Jacobson, 1982, Lawrence, 1987; Samour et al., 1986) อย่างไรก็ตามในสัตว์เลื้อยคลานที่อยู่ในน้ำ โดยเฉพาะเต่าน้ำจืดค่า BUN สามารถใช้ประเมินภาวะโรคไตได้ เนื่องจากสัตว์ขับของเสียในรูปยูเรียเป็นหลัก ส่วนสัตว์เลื้อยคลานที่อยู่บนบก จะมีการขับของเสียในรูป uricotelic เป็นหลัก ค่า BUN ของสัตว์เลื้อยคลานที่อยู่บนบกจึงมีค่าต่ำกว่า 15 mg/dL ยกเว้นในเต่าบก โดยเฉพาะเต่าบกทะเลทราย ที่มีค่า BUN ปกติสูง 30-100 mg/dL (Rosskopf, 1982; Taylor and Jacobson, 1982, Lawrence, 1987; Samour et al., 1986) ซึ่งเป็นการไกในการควบคุมออสโมลาลิตี้ในพลาสมา (plasma osmolarity) ป้องกันการสูญเสียน้ำของร่างกายในเต่าบก โดยในเต่าน้ำจืด และจระเข้จะมีค่าออสโมลาลิตี้ในพลาสมาใกล้เคียงกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีค่าสูงกว่าในสัตว์เลื้อยคลานที่อยู่บนบก ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่า BUN ในเต่าน้ำจืดจึงสามารถบ่งบอกการเกิดภาวะไตวายรุนแรง prerenal azotemia หรือ การกินอาหารที่มีโปรตีนสูงได้ แต่อย่างไรก็ตามค่า BUN เป็นค่าที่ตอบสนองต่อภาวะไตวายที่เกิดขึ้นช้า หรืออาจไม่เพิ่มขึ้นเมื่อสัตว์เกิดโรค (Campbell, 2006)

ค่า creatinine เป็นส่วนประกอบปกติที่ขับมาพร้อมกับปัสสาวะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ในสัตว์เลื้อยคลาน creatinine มีค่าที่ต่ำมากกว่าที่ตรวจวัดได้ (น้อยกว่า 0.1 mg/dL) (Jacobson et al., 1990; Taylor and Jacobson, 1982; Holz and Holz, 1994) ค่า creatinine จึงเป็นค่าที่ไม่สามารถใช้ในการตรวจประเมินโรคไตในสัตว์เลื้อยคลานได้ ยกเว้นในกรณีที่เครื่องตรวจวัดมีความละเอียดสูงสามารถวัดค่าที่ต่ำได้ ซึ่งโดยส่วนใหญ่ไม่มีการใช้ในทางสัตวแพทย์ (Campbell, 2006)

กรดยูริคเป็นผลผลิตหลักจากการแคตาบอไลต์ของโปรตีน ไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (nonprotein nitrogen) และพิวรีน (purine) โดยมีสัดส่วนร้อยละ 80-90 ของของเสียไนโตรเจนทั้งหมด ในสัตว์เลื้อยคลานที่อยู่บนบก ทั่วไปค่ากรดยูริคในเลือดปกติมีค่าน้อยกว่า 10 mg/dL (Frye, 1991) กรดยูริคที่เพิ่มขึ้นในเลือด (hyperuricemia) จะเป็นค่าที่น่าเชื่อถือมากกว่าในการบ่งบอกถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นของไตในสัตว์เลื้อยคลาน (Divers et al., 1996; Kölle and

Hoffman, 2001) ทั่วไปค่าที่มากกว่า 15 mg/dL มักมีความสัมพันธ์กับภาวะโรคไตที่เกิดขึ้น เช่นในกรณีการเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดอย่างรุนแรง การสะสมของแคลเซียมที่ไต (nephrocalcinosis) และพิษที่ไต (nephrotoxicity) อย่างไรก็ตามกรดยูริคในพลาสมาเป็นค่าที่ไม่มีความไว และความจำเพาะต่อการเกิดโรคที่ไต ภาวะกรดยูริคในกระแสเลือดที่สูงขึ้น จะเกิดขึ้นเมื่อมีการสูญเสียหน้าที่ของไตแล้ว 2-3 ส่วน หรือมากกว่าในไต และสามารถบ่งบอกการเกิดเกาต์ (gout) หรือแสดงถึงว่าสัตว์มีการกินอาหารที่มีโปรตีนสูงมาก่อนเท่านั้น (Campbell, 2006) เนื่องจากค่ากรดยูริคจะไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหากไม่มีความเสียหายที่รุนแรงต่อไต การตรวจค่าอื่นเพิ่มเติมเพื่อประเมินภาวะไตวายก่อนถึงระยะที่รุนแรงจึงควรทำร่วมด้วย โดยค่าที่สามารถบ่งบอกถึงความผิดปกติของไต ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของค่าฟอสฟอรัสในกระแสเลือด (hyperphosphataemia) (Miller, 1998) หรือค่าอัตราส่วนของฟอสฟอรัสต่อแคลเซียม (P:C ratio) ซึ่งจัดเป็นค่าที่มีความไว (sensitive parameter) ต่อการวินิจฉัยพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นที่ไตได้ตั้งแต่ระยะแรกๆ (early detection) ของการเกิดโรค (Kölle and Hoffman, 2001)

สัตว์เลี้อยคลานที่กินสัตว์เป็นอาหาร (carnivore) มีค่ากรดยูริคในเลือดที่มากกว่าในสัตว์เลี้อยคลานที่กินพืช (herbivore) และมีค่าขึ้นสูงในช่วงเวลาหลังจากการกินอาหาร (postprandial hyperuricemia) สามารถเพิ่มได้ถึง 1.5-2 เท่าของค่าปกติของสัตว์นั้น (Frye, 1991)

การเกิดเกาต์ มี 2 แบบ คือ แบบปฐมภูมิ (primary gout) ที่เกิดมาจากการสร้างกรดยูริคที่มากเกิน หรือ แบบทุติยภูมิ (secondary gout) ที่เกิดจากโรคที่มีผลต่อการสร้าง และหลั่งกรดยูริคอีกที ซึ่งสามารถเกิดได้จาก การขาดอาหาร โรคไต (โดยเฉพาะที่เกิดจากความเสียหายของท่อไต) ภาวะขาดน้ำอย่างยาวนาน และการกินอาหารที่มีพิวรีนมากเกิน (เช่นสัตว์เลี้อยคลานที่กินพืชที่ได้รับอาหารที่เป็นเนื้อสัตว์ในปริมาณที่สูง) ซึ่งการเกิดโรคเกาต์สามารถบ่งบอกได้จากค่ากรดยูริคที่เพิ่มสูงมากกว่า 2 เท่าของค่าปกติ (Campbell, 2006)

ในไตของสัตว์เลี้อยคลานมีการทำงานของเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) และ alkaline phosphatase (AP) ที่สูง (Ramsay and Dotson, 1995) แต่การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์นี้ในเลือดอย่างมีนัยสำคัญกลับไม่มีความสัมพันธ์กับภาวะโรคไต เพราะเมื่อเอนไซม์นี้ถูกขับออกมาจากเซลล์ไตที่เสียหายจะขับออกไปทางปัสสาวะ โดยไม่ออกมาทางกระแสเลือด (Boyd, 1988)

2.3.3 การประเมินค่าแคลเซียม และฟอสฟอรัสในสัตว์เลี้อยคลาน

เมแทบอลิสมของแคลเซียมในเลือด และแคลเซียมอิสระ (ionized calcium) ในพลาสมาของสัตว์เลี้อยคลาน ควบคุมโดย parathyroid hormone (PTH), calcitonin (CT) และ activated

vitamin D_3 (1,25 dihydrocholecalciferol) เป็นหลัก และมีผลจากฮอร์โมนอื่นๆ เช่น estrogen, thyroxin และ glucagon (Dubewar et al., 1979)

หน้าที่โดยหลักของ PTH คือควบคุมระดับแคลเซียมในเลือด โดยมีผลกระทำต่อกระดูก ไต และชั้นเยื่อเมือกของลำไส้ เมื่อระดับแคลเซียมในเลือดต่ำจะมีการกระตุ้นการหลั่งของ PTH เป็นผลทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายแคลเซียมจากกระดูก เพิ่มการดูดซึมของแคลเซียมจากลำไส้ และการดูดกลับของแคลเซียมในไต (Campbell, 2006)

หน้าที่ของ Calcitonin ในสัตว์เลื้อยคลานยังไม่มีการพิสูจน์แน่ชัด แต่ทำหน้าที่สำคัญในทางตรงกันข้ามกับ PTH โดยเมื่อมีการเพิ่มแคลเซียมในเลือด จะกระตุ้นการหลั่ง Calcitonin จาก ultimobrachial gland ซึ่งจะยับยั้งการสลายแคลเซียมจากกระดูก (Thrall et al., 2004)

หน้าที่ของ activated vitamin D_3 คือกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียม และฟอสฟอรัสที่เยื่อเมือกของลำไส้ การเกิด activated vitamin D_3 เกิดได้โดยแสง (photochemical product) ที่มีรังสีอุลตร้าไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 290-320 nm ซึ่งจำเป็นต่อเมแทบอลิสมของแคลเซียมในสัตว์เลื้อยคลานมาก (Thrall et al., 2004)

ในสัตว์เลื้อยคลานเพศเมียจะมีเมแทบอลิสมของแคลเซียมในระหว่างการสร้างไข่เหมือนในนก คือมีค่าสูงขึ้น (hypercalcemia) จากการตอบสนองต่อฮอร์โมน estrogen และการทำงานของระบบสืบพันธุ์ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมในเลือดทั้งหมด (total plasma calcium) มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ protein bound calcium ระหว่างการพัฒนาของฟอลลิเคิล (follicular development) ก่อนการตกไข่ (ovulation) และอาจมีค่าเพิ่มขึ้น 2-4 เท่า (Dessauer, 1970)

ค่าปกติของแคลเซียมในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่อยู่ที่ประมาณ 8-11 mg/dL ค่ามีความหลากหลายไปตามแต่ละชนิดสัตว์และสรีรวิทยาในขณะนั้นของสัตว์เลื้อยคลาน เช่นในเต่าบกบางชนิดจะมีค่าแคลเซียมในเลือดที่ต่ำกว่าสัตว์อื่นๆ คือน้อยกว่า 8 mg/dL (Samour et al., 1986; Thrall et al., 2004; Campbell, 2006)

การตรวจค่าแคลเซียมอิสระเป็นค่าที่ดี เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมในเลือดเกิดได้จากหลายปัจจัย (Campbell, 2006) ในกิ้งก่าอีกัวน่าเขียว ค่าเฉลี่ยของแคลเซียมอิสระในเลือดเท่ากับ 1.47 ± 0.105 mmol/L ซึ่งค่าที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเกิดในสัตว์ที่มีไข่แก่ ทำให้สามารถใช้ในการประเมินสภาวะสุขภาพในกิ้งก่าอีกัวน่าที่ไข่แก่ อีกทั้งสามารถใช้ช่วยประเมินภาวะโรคไต และการชัก (seizure) (Dennis et al., 2001)

การลดลงของค่าแคลเซียมในเลือด (hypocalcemia) ในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่เกิดเมื่อมีค่าแคลเซียมในเลือดต่ำกว่า 8 mg/dL ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุของการกินอาหารที่ขาดแคลเซียม การขาดวิตามิน D_3 การกินอาหารที่มีฟอสฟอรัสสูง ภาวะเลือดเป็นด่าง (alkalosis) อัลบูมินใน

เลือดต่ำ (hypoalbuminemia) หรือ ภาวะ hypoparathyroidism การเกิดภาวะ secondary nutritional hyperparathyroidism เป็นความผิดปกติที่สามารถพบได้บ่อยในสัตว์เลื้อยคลานที่กินพืช เนื่องจากอาหารที่เป็นพืชมักมีแคลเซียมต่ำ แต่ฟอสฟอรัสสูง อีกทั้งการกินอาหารที่ขาดวิตามิน D_3 และไม่ได้รับรังสี UV เป็นปัจจัยโน้มนำที่สำคัญในภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำ ในลูกสัตว์เลื้อยคลาน ที่เกิดภาวะ secondary nutritional hyperparathyroidism ส่วนมากจะมีปัญหากระดูกที่เกิดจากอาหารเป็นสาเหตุ (nutritional origin metabolic bone disease : NMBD) ทำให้เกิดกระดูกบาง (fibrous osteodystrophy) และกระดูกหักจากพยาธิสภาพที่กระดูกโน้มนำ (pathogenic bone fracture) (Boyer, 2006; Donoghue and Langenberg, 2006)

สัตว์เลื้อยคลานโตเต็มวัยที่มีอาการกล้ามเนื้อสั่น (muscle tremors) อัมพฤกษ์ (paresis) และชัก จะตรวจพบค่าแคลเซียมในเลือดที่ต่ำ ในสัตว์เลื้อยคลานที่กินเนื้อสัตว์ การได้รับอาหารที่มีแคลเซียมต่ำ ที่ทำให้เกิดภาวะค่าแคลเซียมในเลือดที่ต่ำ จะทำให้เกิดความไม่สมดุลของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในเลือด และอาจทำให้เกิดภาวะ secondary renal hyperparathyroidism ตามมาได้ (Campbell, 2006)

การเกิดภาวะแคลเซียมในเลือดสูง (hypercalcemia) ในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่เกิดเมื่อมีค่าแคลเซียมในเลือดสูงกว่า 20 mg/dL เกิดได้จากการได้รับแคลเซียม หรือ วิตามิน D_3 ทางการกินที่มากเกิน (Frye et al., 1991) ผลของการเกิดภาวะแคลเซียมในเลือดสูง จะทำให้เกิดภาวะ primary hyperparathyroidism, pseudohyperparathyroidism และการสลายของกระดูก (osteolytic bone disease) ซึ่งพบรายงานการเกิดน้อยในสัตว์เลื้อยคลาน (Campbell, 2006)

อย่างไรก็ตามค่าเหล่านี้ขึ้นกับชนิดสัตว์ เช่นในงูอินดิโก (indigo snake: Drymarchon spp.) พบค่าแคลเซียมในเลือดสูงได้เป็นปกติ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 159,000 mg/dL (30,000-337,000 mg/dL) เช่นเดียวกับค่าฟอสฟอรัสที่สูง คือ 35 mg/dL (8-69 mg/dL) (Drew, 1994)

ค่าปกติของฟอสฟอรัสในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่อยู่ที่ประมาณ 1-5 mg/dL (Stein, 2006) การเกิดภาวะฟอสฟอรัสในเลือดต่ำเกิน (hypophosphatemia) อาจเกิดจากสาเหตุของการขาดอาหาร หรือกินอาหารที่ขาดฟอสฟอรัส ส่วนภาวะฟอสฟอรัสในเลือดสูงเกิน (hyperphosphatemia) โดยมีค่าที่สูงกว่า 5 mg/dL อาจเกิดจากสาเหตุของการกินอาหารที่มีฟอสฟอรัสมากเกิน มีภาวะวิตามิน D_3 เกิน (hypervitaminosis D_3) และโรคไต ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงต่อเนื้อเยื่อ และการสลายของกระดูกได้ แต่พบน้อยมาก การตรวจพบค่าฟอสฟอรัสในเลือดสูงอาจเกิดจากการไม่ได้แยกพลาสมาออกจากเลือดโดยเร็ว เนื่องจากเม็ดเลือดแดงสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาจากเซลล์ทำให้เกิดผลลวงได้ (Campbell, 2006)

2.3.4 การประเมินสภาพการทำงานของตับในสัตว์เลี้ยงคลาน

การประเมินค่าเอนไซม์ตับในสัตว์เลี้ยงคลานมีความคล้ายคลึงกับในนก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจากมีการทำงานของเอนไซม์ LD และ AST สูงในเนื้อเยื่อตับ โดยการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์นี้สามารถบ่งบอกการเกิดโรคที่เกิดกับเซลล์ตับ (hepatocellular disease) (Boyd, 1988)

ค่า AST ในพลาสมาของสัตว์เลี้อยคลานไม่มีความจำเพาะเนื่องจากพบได้ในเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น ตับ กล้ามเนื้อ และไต การเพิ่มขึ้นบ่งบอกถึงความเสียหายที่ตับ กล้ามเนื้อ หรือไตได้ (Diver, 2000) ค่าเอนไซม์ AST ปกติที่พบในสัตว์เลี้อยคลานไม่ควรเกิน 250 IU/L การเพิ่มขึ้นบ่งบอกถึงความเสียหายที่ตับ หรือกล้ามเนื้อได้ อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ AST เกิดได้เช่นกันในกรณีการเกิดโรคทั่วไป เช่น การติดเชื้อในกระแสโลหิต ภาวะโลหิตเป็นพิษ และการเสียหายของเนื้อเยื่ออื่นๆ (Thrall et al., 2004)

ค่า LD ในพลาสมามีความสัมพันธ์กับเนื้อเยื่อหลากหลายในสัตว์เลี้อยคลาน อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของค่า LD ในพลาสมาที่มากกว่า 1,000 IU/L อาจบ่งบอกถึงความเสียหายที่ตับ กล้ามเนื้อลาย หรือกล้ามเนื้อหัวใจ แต่ควรระวังผลลวงจากการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ทำให้ค่าสูงขึ้นได้ (Thrall et al., 2004)

ค่า ALT ในพลาสมาของสัตว์เลี้อยคลานไม่มีความจำเพาะ เช่นเดียวกับค่าเอนไซม์ AST ค่าเฉลี่ยเอนไซม์ ALT ปกติที่พบในสัตว์เลี้อยคลานมักต่ำกว่า 20 IU/L และแม้ค่าเอนไซม์ ALT จะพบได้ในตับก็ตาม แต่ค่าเอนไซม์ ALT ที่เพิ่มขึ้นกลับไม่มีความสัมพันธ์กับความเสียหายของตับเหมือนค่าเอนไซม์ AST และ LD (Thrall et al., 2004) อย่างไรก็ตามการขึ้นสูงของเอนไซม์ ALT อาจบ่งบอกของการอักเสบที่ไต (glomerulonephritis) ในลูกเต่าอาจจะมีค่าของเอนไซม์ ALT สูงกว่า (9-15 U/l) ในเต่าตัวเต็มวัย (1-6 U/l) และการเจาะเลือดจากบริเวณหางมักจะพบว่ามีค่าของเอนไซม์ ALT ต่ำกว่าปกติ (Wilkinson, 2003)

AP ของสัตว์เลี้อยคลานพบได้ในเนื้อเยื่อหลายชนิด ค่า AP จึงไม่มีความจำเพาะต่ออวัยวะใด อีกทั้งมียังมีการศึกษาน้อยเกี่ยวกับค่านี้ในสัตว์เลี้อยคลาน อย่างไรก็ตามค่า AP ที่เพิ่มขึ้นอาจสามารถบ่งบอกถึงความผิดปกติของ osteoblastic activity (Thrall et al., 2004) หรือสภาวะ Metabolic bone disease หรืออาจเกิดจะภาวะที่มีวิตามินดีในกระแสเลือดต่ำ และสามารถพบได้ในลูกเต่าหรือเต่าที่ยังโตไม่เต็มที่ (765-1157 U/l) และในเต่าเพศเมียที่มีภาวะ pre-ovalatory follicular stasis (666-1272 U/l) (Wilkinson, 2003)

Biliverdin เป็นน้ำดีสีเขียวที่เป็นผลผลิตหลักจากการแคตาบอไลต์ของฮีโมโกลบินในสัตว์เลี้อยคลาน การพบสีพลาสมาเป็นสีเขียว ซึ่งเกิดจากการสะสมของ biliverdin ในเลือดสามารถเป็นตัวบ่งบอกการเกิดโรคที่เกี่ยวกับตับและท่อน้ำดี (hepatobiliary disease) อย่างไรก็

ตามในสัตว์บางชนิดพลาสมามีสีเขียวเป็นปกติ โดยเฉพาะในลิชาร์ดซึ่งสามารถตรวจพบ biliverdin ในพลาสมาได้มากกว่า 1,000 µmol/L (Austin and Jessing, 1994)

2.3.5 การประเมินโปรตีนในซีรั่ม หรือพลาสมาในสัตว์เลื้อยคลาน

ค่าโปรตีนทั้งหมดในพลาสมา (plasma total protein) ปกติที่พบในสัตว์เลื้อยคลานอยู่ระหว่าง 3-7 g/dL (Stein, 2006) ในสัตว์เลื้อยคลานเพศเมียสามารถพบการเพิ่มสูงขึ้นของโปรตีนทั้งหมดในพลาสมา (hyperproteinemia) ในระยะที่มีการสร้างฟอลลิเคิล (active folliculogenesis) เนื่องจากการโน้มนำด้วยฮอร์โมนเอสโตเจน (estrogen-induced hyperproteinemia) มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของโปรตีนโกลบูลินปฐมภูมิ (vitellogenin) ซึ่งจำเป็นต่อการสร้างไข่แดง ซึ่งค่าโปรตีนทั้งหมดในพลาสมาจะลดลงสู่ค่าปกติเมื่อมีการตกไข่ (Thrall et al., 2004)

การทดสอบด้วยวิธี Biuret method เป็นวิธีที่มีความถูกต้องในการตรวจวัดค่าโปรตีนทั้งหมดในพลาสมา หรือซีรั่มมากกว่าการใช้ refractometer method ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และนิยมกว่า การตรวจค่าอัลบูมินในพลาสมา หรือซีรั่มในสัตว์เลื้อยคลานควรใช้วิธี protein electrophoresis ซึ่งเป็นการประเมินค่าที่มีความถูกต้องสูง และยังสามารถแยกประเภทของโปรตีนได้ละเอียด (Thrall et al., 2004)

การเกิดภาวะโปรตีนในเลือดสูงเกิน (hyperproteinemia) เกิดขึ้นเมื่อมีค่าโปรตีนทั้งหมดมากกว่า 7 g/dL ส่วนใหญ่ในสัตว์เลื้อยคลานจะเกิดจากภาวะขาดน้ำหรือภาวะโปรตีนโกลบูลินสูงเกิน (hyperglobulinemia) ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดโรคที่มีการอักเสบเรื้อรัง และการเพิ่มขึ้นของอัลฟา เบต้า และแกมมาโกลบูลิน เกิดขึ้นในโรคติดเชื้อ อย่างไรก็ตามค่าเหล่านี้แตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ (Campbell, 2006)

การเกิดภาวะโปรตีนในเลือดต่ำเกิน (hypoproteinemia) เกิดเมื่อมีค่าโปรตีนทั้งหมดน้อยกว่า 3 g/dL โดยส่วนใหญ่ในสัตว์เลื้อยคลานเกิดจากภาวะทุโภชนาการอย่างเรื้อรัง หรืออาจเกิดจากการดูดซึมอาหารและการย่อยที่ไม่ดี การสูญเสียโปรตีนในทางเดินอาหาร (protein-losing enteropathies) เช่นจากการมีปรสิตในทางเดินอาหาร การเสียเลือดมาก และพยาธิสภาพที่ตับหรือไตเรื้อรัง (Thrall et al., 2004)

2.3.6 การประเมินเมแทบอลิสมของกลูโคสในสัตว์เลื้อยคลาน

ค่ากลูโคสในเลือดปกติที่พบในสัตว์เลื้อยคลานอยู่ระหว่าง 60-100 mg/dL แต่อย่างไรก็ตามค่ามีความหลากหลายได้จากความแตกต่างทางสรีรวิทยา (Stein, 2006; Thrall et al., 2004) โดยขึ้นกับชนิดสัตว์ภาวะโภชนาการ และสภาพสิ่งแวดล้อม เช่น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิมีผลทำ

ให้เกิดภาวะกลูโคสในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ในเต่าน้ำ แต่ทำให้เกิดภาวะภาวะกลูโคสในเลือดสูง (hyperglycemia) ในอะลิเกเตอร์ (Stein, 2006; Coulson and Hernandez, 1964)

ค่า Normal oral glucose tolerance curves มีความแตกต่างกันไปตามชนิดสัตว์เลื้อยคลาน และอุณหภูมิ โดยในสัตว์เลื้อยคลาน insulin และ glucagon สร้างมาจากเบต้าและอัลฟาเซลล์ในตับอ่อนตามลำดับ เช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ ซึ่งฮอร์โมนนี้มีผลโดยตรงจากอุณหภูมิ (Kumar and Khanna, 1977)

การเกิดภาวะกลูโคสในเลือดต่ำในสัตว์เลื้อยคลาน พบได้บ่อยในสัตว์ที่ขาดอาหาร หรือมีภาวะทุโภชนาการ โรคของตับและท่อน้ำดี และการติดเชื้อในกระแสโลหิต อาการทางคลินิกที่สัมพันธ์กับการเกิดภาวะกลูโคสในเลือดต่ำ คือ ตัวสั่น (tremors) สูญเสียการตอบสนองอัตโนมัติในการผลิกตัวกลับ (righting reflex) เฉื่อยชา (torpor) และม่านตาขยายไม่มีการตอบสนองต่อแสง (Campbell, 2006)

การเกิดภาวะกลูโคสในเลือดสูงในสัตว์เลื้อยคลาน มักเกิดจากการให้กลูโคสที่มากเกินไป การมีกลูโคสในเลือดสูงอย่างต่อเนื่อง หรือยาวนาน อาจบ่งบอกถึงการเกิดโรคเบาหวาน (diabetes mellitus) ซึ่งพบได้น้อยในสัตว์เลื้อยคลาน หรือภาวะกลูโคสในเลือดสูงอาจเกิดจากการได้รับ glucocorticoid มากเกิน (Campbell, 2006)

2.3.7 การประเมินการบาดเจ็บของกล้ามเนื้อในสัตว์เลื้อยคลาน

Creatinine kinase (CK) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อกล้ามเนื้อ สามารถใช้เพื่อตรวจความเสียหายที่เกิดกับเซลล์กล้ามเนื้อได้ การเพิ่มขึ้นของค่าเอนไซม์ CK เกิดจากการบาดเจ็บของเซลล์กล้ามเนื้อ หรือการใช้กล้ามเนื้ออย่างมาก (exertion) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่าเอนไซม์ CK ในเลือดที่วัดได้อาจเพิ่มขึ้นจากการจับบังคับสัตว์ โดยที่สัตว์มีการดิ้นรนมาก หรือในสัตว์ที่มีอาการชักได้ การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ CK ความสัมพันธ์กับการบาดเจ็บของกล้ามเนื้อที่เกิดจาก การกระทบกระแทก การฉีดยาที่มีความระคายเคืองเข้ากล้ามเนื้อ (เช่น enrofloxacin) หรือการให้สารน้ำ รวมทั้งการติดเชื้อทางระบบที่มีผลต่อกล้ามเนื้อลาย หรือกล้ามเนื้อหัวใจ เอนไซม์เอนไซม์ CK พบมากในเนื้อเยื่อสมองเช่นกัน แต่ยังไม่มีการศึกษาว่าการเกิดรอยโรคที่สมองมีผลต่อค่าเอนไซม์ CK อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ (Thrall et al., 2004)

การบาดเจ็บของกล้ามเนื้อมีผลให้เกิดการสูงขึ้นของค่า AST และ LD เล็กน้อยถึงปานกลาง แต่เอนไซม์ทั้งสองนี้ไม่มีความจำเพาะต่อกล้ามเนื้อ และเพิ่มสูงเช่นกันในการเกิดโรคของตับและท่อน้ำดี ดังนั้นหากค่าเอนไซม์ AST และ LD สูงขึ้น โดยไม่มีความเปลี่ยนแปลงต่อค่าเอนไซม์ CK แสดงผลยืนยันต่อการเกิดโรคที่ตับและท่อน้ำดี อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของทั้งเอนไซม์ AST,

LD และ CK เกิดขึ้นได้พร้อมกันในกรณีการเสียหายจากการกระทบกระแทก และการติดเชื้อในกระแสเลือด (Campbell, 2006)

2.4 ค่าพิสัยอ้างอิง (Reference Interval)

มีรายงานของค่าเลือดในสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิดด้วยเทคนิคการใช้ที่แตกต่างกันไป ซึ่งการศึกษาที่ดีควรมีแนวทางในวิธีการตรวจที่เหมาะสม สำหรับการใช้เป็นค่าพิสัยอ้างอิง โดย Nicole et al. (2007) แนะนำว่ารายงานการศึกษาที่เป็นตัวอย่างที่ดี คือการศึกษาในประชากรเต่าทะเลทราย (desert tortoise; *Gopherus agassizii*) ในธรรมชาติ (Christopher et al., 1999) การศึกษาค่าพิสัยอ้างอิงของเม็ดเลือดอัดแน่น เคมีโลหิตและ plasma protein electrophoretogram fractions ในเต่าตนุ (green turtle; *chelonian mydas*) และเต่าหัวค้อน (loggerhead sea turtle; *Caratta coretta*) ในฟอริดา (Jacobson et al., 2007) ที่มีการใช้ตัวอย่างเลือดจำนวนมากพอ และมีการกำหนดปัจจัยชัดเจนทำให้มีค่าความเชื่อมั่นที่ดี

ตารางที่ 2.1 ค่าพิสัยโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตในเต่าปกติ (mean±SD)

ค่าพิสัย	เต่าหับตะวันออก (*T. caralina*) (Beck et al.,1995)	เต่าแก้มแดง (*T. scripta*) (Crawshaw and Holz, 1996)	เต่าตนุ (*Chelonia mydas*) (Bolten and Bjorndal, 1992)	เต่าเมดิเตอร์เรเนียน (*T. Hermanni*) (Neiffer et al., 2005)	เต่าบกรัสเซีย (*A.horsfieldi*) (Knotkovà et al., 2002)	เต่าบึงยุโรป (*E.orbicularis*) (Metin et al., 2006)	เต่า red-bellied cooter (*P. rubriventris*) (Innis et al., 2007
Hematology							
PCV (%)	20-38	29 (25-33)	35.2±3.2	26.67±4.36	-	-	19±4.1
RBC (10^6/µl)	0.3-0.8	0.3-0.8	-	0.74±0.16	-	-	-
Hb (g/dl)	5.0-8.5	8.0	-	-	-	-	-
MCV (fl)	309-587	310-1000	-	-	-	-	-
MCH (pg)	79-131	95-308	-	-	-	-	-
MCHC (g/dl)	25-32	31	-	-	-	-	-
WBC (10^3/µl)	7.5	-	-	7.95±1.55	-	-	15.55±7.29
Hete (10^3/µl)	0.83	-	-	2.76±0.67	-	-	1.43±0.90
Lymp(10^3/µl)	4.2	-	-	4.77±1.59	-	-	4.55±2.82
Mono(10^3/µl)	0.71	-	-	0.01±0.01	-	-	0.07±0.14
Azuro(10^3/µl)	-	-	-	0.02±0.05	-	-	-
Eosi (10^3/µl)	-	-	-	0.01±0.04	-	-	1.04±0.50
Baso (10^3/µl)	0.6	-	-	0.39±0.18	-	-	8.52±5.04

Hete= heterophils, Lymp=lymphocytes, Mono=monocytes, Azuro=arurophils, Eosi=eosinophils, Baso=basophils

ค่าพิสัย	เต่าหับตะวันออก (*T. caralina*) (Beck et al.,1995)	เต่าแก้มแดง (*T. scripta*) (Crawshaw and Holz, 1996)	เต่าตนุ (*Chelonia mydas*) (Bolten and Bjorndal, 1992)	เต่าเมดิเตอร์เรเนียน (*T. Hermanni*) (Neiffer et al., 2005)	เต่าบกรัสเซีย (*A. horsfieldi*) (Knotkovà et al., 2002)	เต่าบึงยุโรป (*Emys orbicularis*) (Metin et al., 2006)	เต่า red-bellied cooter (*P. rubriventris*) (Innis et al., 2007
Chemistries							
AP (U/L)	-	212 (81-343)	43±16	-	-	-	-
ALT (U/L)	-	-	6± 3	-	-	-	-
AST (U/L)	-	202 (0-419)	178± 50	-	66+18	128.4+40.8	69±15
BUN (mg/dl)	30	22	7±5	2.8±0.56	-	30.50±7.56	7.8±3
Ca (mg/dl)	1.3	14-15	9.1±2.1	9.9±0.9	10.0±3.6	9.3±1.48	9.8±0.6
P (mg/dl)	2.4	4.0 (3.7-4.3)	6.7±1.2	4.37±0.49	4.34+1.24	4.80±9.45	6.0±1.0
Chol (mg/dl)	-	-	217± 53	-	154.4±65.6	57.1±10.0	-
CT (mg/dl)	-	-	0.5±0.1	-	-	-	-
Glu (mg/dl)	36	67(20-113)	114±15	43.2±18.0	205.4±23.4	52.4±12.9	74±12
TP (g/dl)	4.5	5.3 (4.0-6.5)	5.1±0.8	3.4±0.7	4.5± 0.7	2.5±0.6	2.8±0.5
Albu (g/dl)	-	-	1.5±0.2	1.4±0.3	-	0.7±0.0	1.4±0.2
Glob (g/dl)	-	-	3.6±0.7	2.2±0.4	-	1.7±0.5	1.37±0.3
UA (mg/dl)	2	1	1.5±0.6	3.2±0.9	1.6±0.34	-	1.0±0.3

Chol= cholesterol, CT= creatinine, Glu=glucose, TP=total protein, Albu=albumin, Glob=globulin, UA= uric acid

จากความสำคัญของสถานภาพเชิงอนุรักษ์ของเต่าบัว และประโยชน์ในการศึกษาทางโลหิตวิทยาและเคมีโลหิต ดังกล่าว จึงเป็นเหตุจูงใจในการศึกษาที่มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาลักษณะเม็ดเลือด และจำแนกลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดต่างๆ ในกระแสเลือด รวมทั้งการศึกษาลักษณะโครงสร้างอย่างละเอียดของเม็ดเลือดแต่ละชนิดทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ประกอบกับการย้อมสีทางไซโตเคมี และค่าทางเคมีโลหิตที่สำคัญทางคลินิกในเต่าบัวโตเต็มวัย ซึ่งไม่มีการศึกษามาก่อน เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตโดยละเอียด และเนื่องจากประเทศไทยมีอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมในช่วงปีที่ใกล้เคียงกัน ประเมินแจกแจงตาม เพศ ขนาดน้ำหนัก และความยาวกระดองหลัง