การใช้สารสกัดเมมเบรนโปรตีนจากปรสิต *Cryptocaryon irritans* กระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว

A membrane protein extract from parasitic protozoa *Cryptocaryon irritans* induced immune response in white sea bass (*Lates calcarifer*)

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ[1*], สุพรรณี ลีโทชวลิต[1], นันทิกา คงเจริญพร[2] และ นารีรัตน์ ฤทธิรุตม์[1]

Janjarus Watanachote[1*], Supannee Leethochavalit[1], Nanthika Khongchareonporn[2] and Nareerat Rittirut[1]

บทคัดย่อ: การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ในการป้องกันการติดเชื้อปรสิต *Cryptocaryon irritans* โดยฉีดสารสกัดเมมเบรนโปรตีนที่สกัดจากปรสิตระยะธีรอนท์เข้าบริเวณช่องท้องของปลาและให้ปลากะพงขาวเผชิญกับเชื้อปรสิตระยะธีรอนท์มีชีวิต จากการตรวจวัดระดับแอนติบอดีโดยเทคนิค ELISA พบว่าปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงขาวที่ฉีดเมมเบรนโปรตีนต่อปริมาณแอนติบอดีของกลุ่มควบคุมสัปดาห์ที่ 1 มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ และเมื่อครบสัปดาห์ที่ 8 ระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อนำปลากะพงขาวที่ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันครบ 8 สัปดาห์แล้ว นำมาเผชิญต่อปรสิตระยะธีรอนท์มีชีวิตจำนวน 15,000 ตัวต่อปลาหนึ่งตัว (น้ำหนัก 15 กรัม) เป็นเวลา 9 วัน พบการตายของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนอยู่ที่ร้อยละ 0 ในขณะที่การตายของปลากะพงขาวในกลุ่มควบคุมอยู่ที่ร้อยละ 100

คำสำคัญ: เมมเบรนโปรตีน, ปรสิต, ภูมิคุ้มกัน, ปลากะพงขาว

ABSTRACT: The protective immunity of white sea bass (*Lates calcarifer*) against the *C. irritans* was examined. The fish were injected intraperitoneally with membrane protein extracted from theronts and were allowed to challenge with the lively theronts. Specific antibody of immunized fish serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The study found that fish immunized with membrane protein groups produced higher levels of antibody than the control group. The level of antibody was produced the highest at week 8 ($p < 0.05$). The average 15 g immunized and non-immunized fish were challenged to 15,000 lively theronts for 9 days. It was found that the vaccinated fish showed no mortality while the non-vacinated fish had 100% mortality.

Keywords: membrane protein, *Cryptocaryon irritans*, immunity, *Lates calcarifer*

[1] สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง จ.ชลบุรี
Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi

[2] สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok

* Corresponding author: janjarus@buu.ac.th

บทนำ

โรคจุดขาวน้ำเค็ม (marine white spot disease) ที่เกิดจากปรสิต *Cryptocaryon irritans* เป็นโรคที่พบได้บ่อยในปลาทะเล โปรโตซัวชนิดนี้มีวงจรชีวิตประมาณ 5-7 วัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา เป็นเชื้อที่แพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากเซลล์สืบพันธุ์สามารถให้เซลล์ลูกได้จำนวนมาก โดยระยะตัวอ่อนหรือธีรอนท์ (theront) จะว่ายน้ำเข้าไปเกาะบนผิวหนัง ตา หรือเหงือก แล้วพัฒนาไปเป็นระยะตัวเต็มวัย หรือโทรฟอนท์(trophont) ซึ่งจะกัดกินเนื้อเยื่อบุผิว ทำให้เกิดการระคายเคืองเฉียบพลัน เนื้อเยื่อโป่ง การหายใจเร็วขึ้น และระดับสมดุลในร่างกายผิดปกติ ปลาที่เกิดโรคสังเกตได้จากอาการคัน โดยปลาจะใช้ลำตัวถูกับวัสดุต่างๆ ภายในตู้ การว่ายน้ำที่ผิดปกติ ครีบแหว่ง ตาขุ่น เมื่ออาการรุนแรงขึ้นจะปรากฏจุดขาวๆ ที่ลำตัว โดยการเกิดโรคจุดขาวน้ำเค็มนี้มีความสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมต่างๆ รอบตัวปลา เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำ ระดับแอมโมเนีย ไนไตรท์และไนเตรทภายในตู้สูงขึ้น ระดับพีเอช (pH) และออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO) ต่ำ หรืออาจเกิดจากการเลี้ยงปลาแบบหนาแน่นเกินไป ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียด และติดโรคได้ง่ายขึ้น (Cheung et al.,1979; Burgess and Matthew, 1994)

การรักษาโรคจุดขาวน้ำเค็มนี้ ส่วนใหญ่ใช้สารเคมีในการรักษา เช่น ฟอร์มาลีน (formalin) คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulphate) ควินิน (quinine) หรือคลอโรควิน (chloroquine) เป็นต้น (Cardeilhac and Whitaker,1988; Dickerson, 2006) ซึ่งการใช้สารเคมีจำนวนมากทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงและปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมการเลี้ยงสัตว์น้ำให้มีความต้านทานโรคโดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการทำให้สัตว์น้ำมีสุขภาพดี งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวเพื่อให้มีการสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้น โดยใช้อิมมูโนเจนที่สกัดจากเมมเบรนโปรตีนของปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนท์ ฉีดกระตุ้นให้ปลาสร้างแอนติบอดีต่อปรสิต *C. irritans* เพื่อป้องกันไม่ให้มีการติดเชื้อตามธรรมชาติ หรือลดความรุนแรงของการติดเชื้อตามธรรมชาติ

วิธีการศึกษา

การเก็บรวบรวมปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคจุดขาวน้ำเค็ม

นำปลากะพงขาวที่ติดเชื้อโรคจุดขาวน้ำเค็ม *C. irritans* แช่ในน้ำทะเลเทียมความเค็ม 30 พีพีที (Oestmann and Lewis, 1995) เพื่อให้ปรสิตระยะโทรฟอนท์หลุดออกจากตัวปลา เก็บปรสิต *C. irritans* ระยะโทรฟอนท์ที่หลุดอยู่ก้นถังด้วยหลอดดูดปลายแหลม (pasture pipette) ล้างปรสิตด้วยน้ำทะเลเทียมที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอร์ริโอกำลังขยาย 40 ให้สะอาด ประมาณ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำ *C. irritans* ระยะโทรฟอนท์ที่ล้างสะอาด ใส่ในจานเพาะเลี้ยง (petri dish) ที่มีน้ำทะเล เพื่อให้ปรสิต *C. irritans* เข้าสู่ระยะโทมอนท์ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง และปรสิตจะเข้าสู่ระยะธีรอนท์ซึ่งใช้เวลาอีกประมาณ 3 วัน ในระหว่างนี้เปลี่ยนถ่ายน้ำทะเลทุกวัน เมื่อได้ปรสิตระยะธีรอนท์ให้เก็บไว้ในน้ำทะเลแล้วนำไปใช้ทันทีหรือแช่ใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (สุพรรณี และคณะ, 2554)

การเตรียมเมมเบรนโปรตีนจากปรสิตระยะธีรอนท์ (Dickerson et al., 1989)

นำ *C. irritans* ระยะธีรอนท์ ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงประมาณ 10^6 เซลล์ มาเติม 10 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 (Tris-HCl pH 7.5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และฟีนิลเมททิลซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ (phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride, PMSF) ความเข้มข้น 1 มล.ต่อมล. ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เมื่อจะสกัดให้ย้ายตัวอย่างจากหลอดขนาด 1.5 มล. ใส่ในหลอดขนาด 15 มล. และใส่ทริสบัฟเฟอร์ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 2 มล. จากนั้นเติมไตรตอน เอ็กซ์-114 เอกแทรกชั่น บัฟเฟอร์

(Triton X-114 extraction buffer) ที่แช่ไว้ในน้ำแข็ง ปริมาตร 2 มล. แล้วใส่ฟีนิลเมททิลซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ ความเข้มข้น 1 มล.ต่อมล. ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เครื่องเขย่า (vortex) แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปเขย่าและแช่ในน้ำแข็งอีกครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ส่วนที่เป็นตะกอนและส่วนใส นำส่วนใสที่ได้แช่ในน้ำแข็งเก็บไว้ สำหรับส่วนตะกอนเติมไตรตอน เอ็กซ์-114 เอกแทรกชั่น บัฟเฟอร์ (Triton X-114 extraction buffer) ลงไปปริมาตร 1 มล. เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เมื่อครบกำหนดเขย่าและแช่ในน้ำแข็งซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ส่วนที่เป็นตะกอนและส่วนใส นำส่วนใสที่ได้รวมกับส่วนใสแรกที่แช่ในน้ำแข็ง แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเติมซูโครสคูชั่น (sucrose cushion) ในปริมาตรที่เท่ากันกับส่วนใสที่ได้มา บ่มในอ่างน้ำอุ่น ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารสองส่วน คือ ส่วนล่างมีลักษณะหนืดและส่วนบน ย้ายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เก็บสารส่วนล่างแช่ในน้ำแข็ง นำสารส่วนบนที่ได้มาสกัดเมมเบรนโปรตีนอีกครั้งโดยเติมไตรตอน เอ็กซ์-114 เอกแทรกชั่น บัฟเฟอร์ (Triton X-114 extraction buffer) แล้วทำตามขั้นตอนข้างต้นอีกครั้ง แยกส่วนล่างไปรวมกับสารส่วนล่างที่แช่น้ำแข็งไว้ วัดปริมาณโปรตีนของสารสกัดตามวิธีของ Bradford (1976)

การศึกษาหน่วยย่อยของเมมเบรนโปรตีนที่สกัดได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจลพอลิอะคริลาไมด์ที่มีโซเดียมโดดีดิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

นำเมมเบรนโปรตีนที่สกัดได้ผสมกับ Sample buffer (ประกอบด้วย 0. 5 โมลาร์ Tris-HCl พีเอช 6.8, 2% SDS, 10% Glycerol , 0.0125% Bromophenol blue, 1.55% DTT) อัตราส่วนสารสกัดเมมเบรนโปรตีนต่อ Sample buffer เท่ากับ 1:1 นำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแยกรูปแบบโปรตีนโดยใช้โพลีอะคลิลาไมด์เจลที่มี 4% Stacking gel และ 12.5% Separating gel (552BR Mini-protein Tetra System, Bio-RAD) ย้อมสีโปรตีนด้วย Protein staining solution (PageBlue, Frementas Life sciences, USA)

การวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค LC-MS/MS และเปรียบเทียบชนิดโปรตีนโดยใช้ฐานข้อมูลโปรตีน

ตัดแถบโปรตีนจาก gel electrophoresis วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS (Thermo Electron Corporation) ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี ข้อมูล Mass spectrometry spectrum ของโปรตีนที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน nrFasta ใน NCBI โดยใช้โปรแกรม Biowork

การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลากะพงขาวด้วยสารสกัดเมมเบรนโปรตีน

นำปลากะพงขาวอายุประมาณ 3 เดือน มีน้ำหนักประมาณ 15 กรัม จากฟาร์มปลากะพง จังหวัดฉะเชิงเทรา เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 90 ตัว นำมากักกันโรคก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 15 วัน จากนั้นนำปลาใส่ในถังไฟเบอร์ที่มีปริมาตรน้ำ 90 ลิตรพร้อมระบบยังชีพสัตว์น้ำ จำนวน 30 ตัวต่อถัง อุณหภูมิน้ำประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส ความเค็ม 33 พีพีที พีเอช 7.9-8.0 ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลาด้วยสารสกัดเมมเบรนโปรตีนใน 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 (Phosphate buffer saline, PBS) ที่กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตรผสมกับ

ฟรันด์คอมพลีตแอดจูแวนท์ (Freund's complete adjuvant, FCA) ในอัตราส่วน 1:1 ให้ได้ความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนสุดท้ายเป็น 20 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อปลาหนัก 15 กรัม ฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของปลา แล้วฉีดกระตุ้นซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 2-6 ใช้เมมเบรนโปรตีนผสมกับฟรันด์อินคอมพลีตแอดจูแวนท์ (Freund's incomplete adjuvant, FIA) อัตราส่วน 1: 1เมื่อครบ สัปดาห์ที่ 1 2 4 6 และ 8 เก็บตัวอย่างซีรัมโดยการสุ่มดูดเลือดปลาครั้งละ 0.1 มล. จำนวน 30 ตัว โดยเป็นการสุ่มแบบซ้ำ

การตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยวิธีเอ็นไซม์-ลิงค์อิมมูโนซอร์เบ็นท์แอสเสย์หรืออีไลซา (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

จากการตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธีอีไลซาโดยเคลือบเพลทด้วยเมมเบรนโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อหลุม ใช้แอนติบอดีตัวที่ 1 เป็นแอนติบอดีของหนูเมาส์ที่จำเพาะต่อ IgM ปลาในอัตราส่วน 1:12000 (Mouse anti fished 1:12000) แอนติบอดีตัวที่สองเป็นแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อหนูเมาส์ ในเอนไซม์ฮอสราดิสเปอร์ออกซิเดส อัตราส่วน 1:5000 (Goat anti mouse horse-radish peroxidase conjugated 1:5000) ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบคือ ซีรัมปลากะพงขาวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันอัตราส่วน 1:100

การให้ปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเผชิญเชื้อ *C. irritans* มีชีวิตระยะธีรอนท์

ชุดทดสอบ นำปลากะพงขาวที่ผ่านการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดเมมเบรนโปรตีนเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จำนวน 30 ตัว สำหรับชุดควบคุมฉีดปลากะพงขาวด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) จำนวน 30 ตัว ใส่ในถังไฟเบอร์ที่มีปริมาตรน้ำ 90 ลิตรโดยที่ไม่ต้องต่อกับระบบยังชีพ จำนวน 30 ตัวต่อถัง อุณหภูมิน้ำประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส ความเค็ม 33 พีพีที พีเอช 7.9-8.0 จากนั้นใส่ปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนท์มีชีวิตลงไปจำนวน 15,000 ตัว ต่อน้ำหนักปลากะพงขาวประมาณ 15 กรัมต่อปลา 1 ตัว โดยวิธีการแช่ เป็นเวลา 9 วัน ระหว่างที่ทดสอบให้อาหาร และเริ่มเปลี่ยนถ่ายน้ำในวันที่ 2 สังเกตและบันทึกผลการทดลองโดยบันทึกอัตรารอดของปลากะพงขาวในแต่ละวัน

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงในสัปดาห์ที่ 2 4 6 และ 8 เทียบกับตัวอย่างซีรัมในสัปดาห์ที่ 1 วิเคราะห์ผลทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับแอนติบอดีโดยวิธี t- test ด้วยโปรแกรม SPSS

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ชนิดของเมมเบรนโปรตีนจากปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนท์

จากการแยกเมมเบรนโปรตีนที่สกัดได้จากปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนท์ โดยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าแถวที่ 2-3 มีแถบโปรตีนหลักที่มีน้ำหนักโมเลกุล 34 กิโลดาลตัน (**Figure 1**) เมื่อตัดแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 34 กิโลดาลตัน ไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนเพื่อตรวจหาชนิดของโปรตีนโดยใช้ LC-MS/MS พบว่าได้ลำดับกรดอะมิโนเป็น ALDDVATSSTT(Score = 99.9%) และ VTDMAD (Score = 100%) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล พบว่าตรงกับโปรตีน LPS-assembly protein (LPS = Lipopolysaccharide) ACCESSION Q8ZRWO และACCESSION Q145L4 ในฐานข้อมูล nrfasta ตามลำดับ

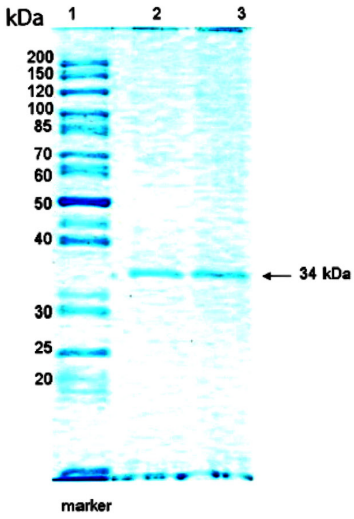

Figure 1 SDS-PAGE pattern of extracted membrane protein from *C. irritans*, theront stage. Lane 1, protein marker; Lane 2-3, extracted membrane protein (15 μg) using PageBlue protein coomassie staining solution

ปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดเมมเบรนโปรตีน

จากการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงขาวด้วยวิธี ELISA พบว่าปลามีการตอบสนองต่อการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเมมเบรนโปรตีน โดยตรวจพบอัตราส่วนปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงขาวที่ฉีดเมมเบรนโปรตีนต่อปริมาณแอนติบอดีของกลุ่มควบคุมสัปดาห์ที่ 1 มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ และเมื่อครบสัปดาห์ที่ 8 ระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (**Table 1**) ทั้งนี้เนื่องมาจากปลากระดูกแข็งมีระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune response) และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (acquired immune response) โดยมีการตรวจพบอิมมูโนโกลบูลินที่สำคัญ 2 ชนิดคือ IgM และ IgD การศึกษาความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองของแอนติบอดีโดยใช้ปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนท์ โทมอนท์ และโทรฟอนท์ ในปลาเก๋าจุดน้ำตาล (Bai et al., 2008) พบว่าปรสิตระยะธีรอนท์สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *C. irritans* ได้มากกว่าปรสิตระยะอื่น แสดง ว่า i-antigent (immobilization antigen) ที่อยู่บนผิวเซลล์ซึ่งรวมทั้งในเซลล์เมมเบรนและซีเลียมีความจำเพาะต่อปรสิตมากกว่าเมมเบรนโปรตีนของ *C. irritans* ระยะธีรอนท์จึงมีแนวโน้มที่สามารถพัฒนาเป็นวัคซีนต่อปรสิต *C. irritans* ได้

Table 1 Antibody levels in fish serum determined by ELISA

Time (Weeks)	Absorbance at 450 nm		
	Average	SD	Ratio of Test : Control
1(control)	0.195	0.01	1
2	0.241	0.12	1.2
4	0.293	0.06	1.5
6	0.295	0.17	1.5
8	0.548*	0.13	2.8

* significant difference ($p < 0.05$)

การรอดชีวิตของปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์และเผชิญกับปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนท์มีชีวิต

ปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเมมเบรนโปรตีนเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ และเผชิญกับปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนท์ ที่มีชีวิตจำนวน 15,000 ตัวต่อปลาหนึ่งตัว (15 กรัม) เป็นระยะเวลา 9 วัน พบว่าในวันที่ 2 ปลาที่นำมาทดสอบทั้ง 2 ชุดเริ่มมีการติดเชื้อปรสิต มีจุดขาวที่ตา กินอาหารน้อยลง และเมื่อปลาติดเชื้อปรสิตมากขึ้นในวันที่ 3 ปลาจะไม่กินอาหาร สังเกตเห็นจุดขาวขึ้นทั่วตัว หายใจถี่ขึ้น เมื่อถึงวันที่ 4 ปลาชุดควบคุมเริ่มตาย และตายทั้งหมดในวันที่ 6 ส่วนปลาชุดทดสอบที่ยังคงมีชีวิตในวันที่ 4 พบว่าพยาธิเริ่มหลุดจากตัวปลา วันที่ 5 เมื่อพยาธิหลุดออกจากตัวปลาที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การหายใจเริ่มเป็นปกติ และเริ่มกินอาหารได้ ดังนั้นเมื่อครบ 9 วัน การรอดของปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเมมเบรนโปรตีนจะอยู่ที่ร้อยละ 100 และกลุ่มควบคุมอยู่ที่ร้อยละ 0 ในการศึกษาการรอดชีวิตของปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันพบว่าให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Bai et al.(2008) ที่ศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาเก๋าจุดน้ำตาลโดยใช้สารสกัดโปรตีนจากปรสิตระยะโทรฟอนท์ โทมอนท์และธีรอนท์ พบว่าปรสิตระยะธีรอนท์กระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีและปลามีอัตราการรอดมากกว่าปรสิตระยะโทรฟอนท์ และโทมอนท์

สรุปและข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลากะพงขาวโดยการสกัดเมมเบรนโปรตีนจากปรสิตระยะธีรอนท์ซึ่งเป็นระยะที่สามารถเก็บปรสิตได้จำนวนมาก และเป็นระยะที่ว่ายลงเกาะบนตัวปลา เมมเบรนโปรตีนที่สกัดได้มีปริมาณมากเพียงพอสำหรับการทดลอง โดยปรสิต 1 ล้านตัวให้ปริมาณเมมเบรนโปรตีนประมาณ 7,500 ไมโครกรัม/มล. และการสกัดได้ปริมาตรของสารสกัด 1.5-2 มล. จากการทดลองพบว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวสามารถทำได้โดยใช้สารสกัดเมมเบรนโปรตีนจากปรสิตระยะธีรอนท์ ปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อปลาหนัก 15 กรัม เพื่อให้มีปริมาณแอนติเจนใกล้เคียงงานวิจัยอื่น ฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของปลา โดยฉีดกระตุ้นซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ สามารถทำให้ระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นได้ใน 8 สัปดาห์ ในงานวิจัยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาทะเลมีคณะนักวิจัยจำนวนมากพยายามทดลองหาแอนติเจน และวิธีการเพื่อให้ได้มาของแอนติเจนสำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลในต้านทานต่อปรสิต *C. irritans* ที่เหมาะสมต่อชนิดของปลา ซึ่งการเตรียมแอนติเจนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลานั้นมีการเตรียมแตกต่างกันหลายวิธีเช่น การสกัดโปรตีนโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงทำให้เซลล์ปรสิตแตก (Xu et al., 2009) การใช้ปรสิตเชื้อตาย(Yambot and Song, 2006) การสกัดเมมเบรนโปรตีน (Wang and Dickerson, 2002) จากข้อมูลของการศึกษาในครั้งนี้คณะผู้วิจัยจะได้มีการใช้เมมเบรนโปรตีนจากปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนท์เป็นแอนติเจน เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาทะเลเศรษฐกิจและปลาทะเลสวยงามชนิดอื่นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, นารีรัตน์ ฤทธิรุตม์, วีลยา แก่นจันทร์ และนันทิกา คงเจริญพร. 2554. การศึกษาโรคจุดขาวน้ำเค็มที่เกิดจากโปรโตซัว *Cryptocaryon* sp. ในปลาทะเลในประเทศไทย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

Bai, J. S., M. Q. Xie, A. X. Li, X. Q. Zhu, and X. M. Dan. 2008. Comparative studies on the immunogenicity of theronts, tomonts and trophonts of *Cryptocaryon irritans* in grouper. J. Parasitol. 102: 307-313.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and senditive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein bye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Burgess, P. J., and R. A. Matthews. 1994. A standardized method for the *in vivo* maintenance of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) using the grey mullet *Chelon labrosus* as an experimental host. J. Parasitol. 80: 288-292.

Cardeilhac, P.T., and B. R. Whitaker. 1988. Tropical fish medicine: copper treatments, use and precautions. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 18: 435-448.

Cheung, P.J., R. F. Nigrelli, and G. D. Ruggieri. 1979. Studies on cryptocaryoniasis in marine fish: effect of temperature and salinity on the reproductive cycle of *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951. J. Fish Dis. 2: 93-97.

Dickerson, H.W. 2006. *Ichthyopthririus multifilis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora) *In* 2nd ed. Fish diseases and disorders, Volume 1: Protozoan and metazoan infections. CAB International, UK.

Dickerson, H.W., T.G. Clark, and R.C. Findly. 1989. *Ichthyophthirius multifiliis* has membrane-associated immobilization antigens. J. Protozool. 36: 159-164.

Laemmli, U.K. 1970. Clevage of the head of Bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Oestmann, D.J., and D. H. Lewis.1995. A method for producing microbe-free *Amyloodinium Ocellatum* (Brown) with Percoll. *Veterinary Parasitology*. 59: 169-175.

Wang, X., and H. W. Dickerson. 2002. Surface immobilization antigen of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* elicits protective immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 9 (1):176-181.

Xu, D., P. H. Klesius, and C. A. Shoemaker. 2009. Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on serum and cutaneous antibody titers and survival against *Ichthyophthirius multifiliis*. Fish Shellfish Immunol. 26: 614-618.

Yambot, A.V., and Y.L. Song. 2006. Immunization of grouper, *Epinephelus coioides*, confers protection against a protozoan parasite, *Cryptocaryon irritans*. Aquaculture. 260: 1-9.