บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งของประเทศได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็ว ทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิต การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) ก็เป็นอีกธุรกิจหนึ่ง ที่ได้รับความสนใจจากเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง รองลงมาจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากปลากะพงขาวเป็นปลาที่มีรสชาดดีเป็นที่นิยมของผู้บริโภคและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศได้แก่ ประเทศสิงคโปร์ มาเลเซีย ฮ่องกง และไต้หวัน ทำให้ราคาจำหน่ายค่อนข้างสูงกล่าวคือ ปลามีชีวิตขนาดน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ราคาประมาณ 140-160 บาท ปลาตายสภาพสดขนาด 600-800 กรัม ราคากิโลกรัมละ 120-140 บาท เนื่องจากระดับราคาและผลตอบแทนที่ค่อนข้างสูงทำให้เกษตรกรสนใจและนิยมเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะแถบจังหวัดชายทะเลในภาคใต้ เช่น จังหวัดพังงา กระบี่ ตรัง สตูล ปัตตานี และสงขลา เป็นต้น

กรมประมง ประสบความสำเร็จในการวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวได้อย่างครบวงจร และสามารถผลิตลูกปลาได้ปริมาณมากตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520 และได้ถ่ายทอดเทคโนโลยีการเพาะพันธุ์ปลาสู่ภาคเอกชนตั้งแต่ปี พ.ศ. 2523 เป็นต้นมา จนสามารถผลิตลูกปลาขนาดต่างๆออกจำหน่ายทั้งภายในและภายนอกประเทศ แต่ปัญหาที่ผู้ประกอบธุรกิจโรงเพาะและอนุบาลลูกปลาประสบอยู่เสมอ คือการตายของลูกปลากะพงขาววัยอ่อน ซึ่งจะเกิดขึ้นขณะลูกปลามีอายุระหว่าง 15-22 วัน (นิเวศน์ เรืองพานิชย์ และเจนจิต คงกำเนิด, 2535) โดยเฉพาะในช่วง 6-7 ปีที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบัน ปัญหาการตายของลูกปลาวัยอ่อนดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น สร้างความเสียหายแก่ผู้ประกอบธุรกิจการเพาะและอนุบาลลูกปลากะพงขาวเป็นอย่างมาก รวมทั้งส่งผลกระทบต่อธุรกิจการเลี้ยงปลากะพงขาวทั้งระบบ เนื่องจากปัญหาการขาดแคลนพันธุ์ปลาที่มีสุขภาพดี ลูกปลาอ่อนแอติดเชื้อโรคได้ง่าย สิ้นเปลืองยาและสารเคมีในการป้องกันรักษา ต้นทุนการผลิตสูง ทำให้

เกษตรกรผู้เลี้ยงประสบกับภาวะการขาดทุนอยู่เสมอ เป็นผลทำให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวไม่สามารถขยายตัวและพัฒนาให้เป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ได้

ลักษณะอาการผิดปกติของลูกปลาดังกล่าวจะไม่กินอาหาร ลำตัวลีบแบนและเปลี่ยนเป็นสีดำ ว่ายน้ำผิดปกติ มีอาการเกร็ง ชอบหลบแสงและซ่อนตัวรวมกันเป็นกลุ่มบริเวณมุมบ่อหรือที่มืดก่อนจะลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำและตายเป็นจำนวนมากจนเกือบหมดบ่อภายในระยะเวลา 3-4 วัน สาเหตุการตายยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาปัจจัยบางประการที่เหมาะสมเพื่อป้องกันและลดอัตราการตายของลูกปลากะพงขาวดังกล่าวของ นิเวศน์ เรืองพานิชย์ และเจนจิต คงกำเนิด (2535) สันนิษฐานได้ว่าน่าจะเกิดจากสาเหตุการติดเชื้อไวรัส แต่ยังไม่สามารถยืนยันได้อย่างแน่นอน เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการพิสูจน์ยืนยันข้อสมมุติฐานดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยการศึกษาทางไวรัสวิทยา

การศึกษาโรคไวรัสสามารถทำการศึกษาได้หลายวิธี แต่วิธีที่ได้รับการยอมรับและนิยมใช้โดยทั่วไปคือ การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์เนื้อเยื่อหรือเซลล์ไลน์ (cell line) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัส ศึกษาลักษณะและคุณสมบัติทางชีววิทยา รวมถึงการเพิ่มจำนวนไวรัส เพื่อใช้ในการผลิตแอนติบอดีและวัคซีนป้องกันโรคด้วย แต่วิธีดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยเซลล์ไลน์ที่มีความสามารถในการยอมรับและเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสชนิดนั้นๆ ได้ เนื่องจากไวรัสโดยทั่วไปจะมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) กับชนิดของสัตว์น้ำที่เป็นเจ้าบ้าน (host)

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการผลิตเซลล์ไลน์จากปลากะพงขาว เพื่อใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค การแยกเชื้อไวรัส การศึกษาลักษณะคุณสมบัติทางชีววิทยาและทางเคมีของเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นสาเหตุการตายของลูกปลากะพงขาวในโรงเพาะฟัก ตลอดจนการประยุกต์ใช้เซลล์ไลน์ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส เพื่อการผลิตแอนติบอดี (antibody) สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคและศึกษาลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อ เพื่อประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคในอนาคต

การตรวจเอกสาร

ประเทศไทยมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งมาอย่างต่อเนื่อง เป็นระยะเวลานานนับสิบปี สามารถสร้างอาชีพและเพิ่มรายได้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ธุรกิจการส่งออกสัตว์น้ำยังสามารถนำเงินตราเข้าประเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปี

Central Library
Prince of Songkla University

ปลากะพงขาวเป็นสัตว์น้ำชายฝั่งอีกชนิดหนึ่งซึ่งรัฐบาล โดยกรมประมง ได้ดำเนินการศึกษาและส่งเสริมให้เกษตรกรมีการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นในพื้นที่ตามแนวชายฝั่งของประเทศ เพื่อทดแทนสัตว์น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งนับวันจะมีปริมาณลดน้อยลงอันเนื่องจากปัญหาการจับสัตว์น้ำมากเกินควร

1. ชีววิทยาของปลากะพงขาว

ปลากะพงขาว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* Bloch จัดเป็นปลาน้ำกร่อยขนาดใหญ่ที่สุดในบรรดาปลากะพงทุกชนิด จนได้ชื่อสามัญว่า "giant seaperch" แต่โดยทั่วไปนิยมเรียกว่า seabass และยังมีชื่อพ้องอีกหลายชื่อเช่น white seabass, silver seabass, giant perch, plamer, cock-up, baramundi และ two-finned seabass (Rabanal and Soesanto, 1982) สำหรับประเทศไทยมีชื่อเรียกทั่วไปว่าปลากะพง ปลากะพงขาวและปลากะพงน้ำจืด ตามสภาพที่อยู่อาศัย (Chomdej, 1986)

1.1. อนุกรมวิธาน

Nelson (1976) ได้จัดลำดับอนุกรมวิธานของปลากะพงขาวดังนี้

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata

Class Pisces

Subclass Teleostomi

Oder Percomorphi

Family Centropomatidae

Genus *Lates*

Species *calcarifer*

1.2. ถิ่นอาศัย

ปลากะพงขาวเป็นปลาที่มีการแพร่กระจายในภูมิภาคเขตอบอุ่นถึงเขตร้อน คือ สามารถพบได้ตั้งแต่บริเวณตอนใต้ของประเทศจีนจนถึงอ่าวเปอร์เซีย และยังพบแพร่กระจายตามหมู่เกาะ

ต่างๆ ได้แก่ ฟิลิปปินส์ บอร์เนียว ซาราวัค นิวกินี อินโดนีเซีย และศรีลังกา จึงเป็นปลาที่รู้จักแพร่หลายใน ภูมิภาคแถบนี้ สำหรับประเทศไทยพบว่ามีการแพร่กระจายโดยทั่วไปตามแนวชายฝั่งทะเลทั้งด้านอ่าวไทยและมหาสมุทรอินเดีย มีความชุกชุมในบริเวณปากแม่น้ำลำคลองและเขตทะเลสาบ สามารถอาศัยและเจริญเติบโตได้ในน้ำจืดจึงจัดเป็นปลาสองน้ำ ซึ่งสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มได้ในช่วงกว้าง (0-35 ppt) (Chomdej, 1986)

1.3. ลักษณะภายนอก

ปลากะพงขาวเป็นปลาที่มีลำตัวสั้นป้อมแต่แบนด้านข้างเล็กน้อย จึงมีส่วนลึกของลำตัวพอประมาณแนวขอบหลังโค้ง และมีส่วนลาดที่บริเวณหัวตั้งแต่ไหล่ถึงปลายปาก ขอบปากบนเป็นแผ่นใหญ่แยกแนวเป็นตอนต้นและตอนท้ายชัดเจน ร่องปากเฉียงลงเล็กน้อย และมุมปากยาวเลยแนวขอบหลังของลูกตา ปลายปากล่างยื่นเลยปากบนเล็กน้อย มีฟันเล็กละเอียดบนขากรรไกรบนและล่างและที่เพดานปาก แผ่นแก้มขนาดใหญ่ที่ขอบหลังเป็นหนามแหลมคม ตามีขนาดใหญ่อยู่ชิดกันบนหัว มีครีบหลังสองอันเชื่อมต่อกันที่ฐานครีบ ครีบหลังอันที่หนึ่งมีก้านแหลมแข็ง 7-8 ก้าน ครีบหลังอันที่สองมีแต่ก้านอ่อน ครีบหูและครีบอกยาวไม่ถึงรูก้น ครีบก้นมีก้านแหลมแข็ง 3 อัน ข้อหางสั้น ครีบหางกลม เกล็ดบนลำตัวขนาดปานกลางและสากมือ เส้นข้างตัวโค้งไปตามแนวสันหลัง มีเกล็ดบนเส้นข้างตัวจำนวน 52-61 เกล็ด ปลากะพงขาวไม่มีอวัยวะเพศภายนอก (Chomdej, 1986) (รูปที่ 1)

1.4. ฤดูผสมพันธุ์และวางไข่

โดยธรรมชาติปลากะพงขาวจะวางไข่ก่อนถึงฤดูฝนเล็กน้อยฤดูกาลวางไข่ตรงกับเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน ในท้องที่ภาคใต้ฝั่งมหาสมุทรอินเดีย และในระหว่างเดือน กรกฎาคม ถึงเดือนตุลาคมในท้องที่ชายทะเลฝั่งอ่าวไทย ความแตกต่างนี้เกิดขึ้นเพราะอิทธิพลฤดูมรสุมทั้งสองครั้งในรอบปี ฤดูผสมพันธุ์จะเริ่มขึ้นประมาณกลางฤดูร้อน พ่อแม่ปลาวัยเจริญพันธุ์จะเดินทางจากแหล่งน้ำจืดสู่แหล่งน้ำกร่อยไปอาศัยในทะเล และจะคงอยู่ในทะเลจนถึงฤดูวางไข่ ก็จะอพยพกลับเข้ามายังปากแม่น้ำหรือปากทะเลสาบ ซึ่งในระยะนี้ระดับน้ำภายในแม่น้ำสูงขึ้น ความแรงของกระแสน้ำเพิ่มขึ้น แล้วจะผสมพันธุ์กันบริเวณปากแม่น้ำหรือเขตติดต่อกับทะเล ซึ่งมีความเค็มปานกลาง (25-32 ppt) ในการผสมพันธุ์พ่อแม่ปลาจะรวมฝูงกันบริเวณกลางน้ำอัตราส่วนเพศเมีย 1 ตัว ต่อเพศผู้ 3-5 ตัว ช่วงการผสมพันธุ์มักเป็นขณะน้ำทะเลเริ่มไหลขึ้น เวลาผสมพันธุ์ระหว่าง 19.00-

รูปที่ 1 รูปร่างลักษณะภายนอกของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch)

22.00 น. การฟักเป็นตัวของไข่ใช้เวลา 17-18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 27-29 องศาเซลเซียส ลูกปลาเมื่อแรกฟักเป็นตัวมีขนาด 1.2 มิลลิเมตร ลอยตัวที่ผิวตามกระแสน้ำเข้าไปอาศัยในบริเวณแอ่งน้ำชายฝั่ง รวมทั้งบริเวณป่าแลนที่น้ำทะเลท่วมถึง (สุจินต์ มณีวงค์ และคณะ, 2524)

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) และการผลิตเซลล์ไลน์

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนับเป็นวิทยาการอีกแขนงหนึ่ง ที่มีความสำคัญและได้รับการพัฒนาขึ้น เพื่อการศึกษาทางไวรัสวิทยา (virology)โดยเฉพาะ เนื่องจากไวรัสมีอนุภาคขนาดเล็ก ซึ่งจะสามารถดำรงชีวิตและเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเท่านั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป็นปัจจัยขั้นพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการศึกษาวิจัยทางด้านโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส เช่น การใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัย (diagnostic) การแยกเชื้อไวรัส (virus isolation) การทดสอบคุณสมบัติและจัดจำแนกเชื้อ (identification) และการผลิตวัคซีน (vaccine) เพื่อป้องกันโรค เป็นต้น (Wolf, 1988) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางชีววิทยาของเซลล์ (cell biology) เช่น การศึกษาจำนวนโครโมโซม และการศึกษาทางพิษวิทยา (toxicology) (กิจการ ศุภมาตย์, 2529) เป็นต้น

Wolf (1988) ได้กล่าวว่าผู้ประสบความสำเร็จในการศึกษาทางด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) ของปลาเป็นคนแรกคือ L. Grutzner นักวิทยาศาสตร์ของ Germany's Robert Koch Institute ใน ปี ค.ศ. 1955 และนับจากนั้นเป็นต้นมาการเพาะเลี้ยงเซลล์ปลาก็ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในปลาหลายชนิด เช่น ปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) ปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) (Noga and Hartmann, 1981) และปลาไน (*Cyprinus carpio*) (Fijan *et al.*, 1983) เป็นต้น สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ปลาไว้หลายชนิดแต่ส่วนใหญ่จะเป็นปลาน้ำจืด เช่น ปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) (กิจการ ศุภมาตย์ และเริงชัย ตันสกุล, 2524) ปลาช่อน (*Ophicephalus striatus*) (จิราพร เกษรจันทร์ และคณะ, 2531) ปลาดุกบิ๊กอุย (*Clarias gariepinus* x *C. macrocephalus*) (Kanchanakhan and Frerichs, 1995) เป็นต้น มีเพียงจำนวนน้อยที่ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์จากปลาทะเล โดยเฉพาะปลาทะเลเศรษฐกิจที่นิยมเพาะเลี้ยงเชิงพานิชย์ เช่น ปลากะพงขาว และปลากะรัง

กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2530) ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์จากครีบหางของปลากะพงขาว (*Lates calcarife* Bloch) และปลากะพงแดง (*Lutianus argentimaculatus* Forskal) พบว่า

เซลล์จากครีบหางของปลาทั้ง 2 ชนิด สามารถเจริญได้ดีในอาหารสังเคราะห์ (synthetic media) 2 ชนิดคือ MEM (minimum essential medium) และ L-15 (Leibovitze-15) ซึ่งมีส่วนผสมของเกลือแกง 8,000-15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และเซลล์ปลากะพงแดงสามารถจะเจริญได้ดี เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแกงในอาหารสังเคราะห์สูงขึ้น

จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์ (2537) ได้เพาะเลี้ยงเซลล์จากครีบหางปลากะรัง (*Epinephelus malabaricus*) ซึ่งเป็นปลาทะเลเขตร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง พบว่าอาหารสังเคราะห์ L-15 ให้ผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM และ M-199 (medium-199) สอดคล้องกับการศึกษาของ Chen และ Kou (1987) ซึ่งรายงานว่าเซลล์ปลาในเขตร้อนสามารถเจริญได้ดีในอาหารสังเคราะห์ L-15 นอกจากนี้การศึกษาดังกล่าวยังพบว่าความเข้มข้นของเกลือแกงในอาหารสังเคราะห์ L-15 ซึ่งมีอยู่เดิม (8,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีปริมาณเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ปลาทะเล สอดคล้องกับการศึกษาของ Nicholson และคณะ (1987) และ เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ (2538)

2.1. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ชั้นต้น (primary cell culture)

Freshney (1988) ได้นิยามความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่า เป็นการแยกเซลล์ออกจากชิ้นเนื้อโดยวิธีกลหรือการใช้เอนไซม์ช่วยและนำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในสภาวะนอกร่างกาย (*in vitro*) ที่มีการควบคุมปัจจัยในการเจริญเติบโตให้เหมาะสม

Freshney (1988) ได้จำแนกเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ชั้นต้นออกเป็น 3 วิธี คือ

2.1.1. primary explant technique เป็นวิธีแรกที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ โดยการตัดชิ้นเนื้อที่ต้องการเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วนำไปเลี้ยงในฟลาสต์ (tissue culture flask) เซลล์จะมีการเจริญจากรอบๆ ชิ้นเนื้อ และเคลื่อนตัวแผ่ออกจนเต็มพื้นฟลาสต์เกิดเป็นเซลล์ชั้นเดียว (mono layer)

2.1.2. enzymatic disaggregation วิธีการนี้พัฒนาขึ้นจากวิธี primary explant technique โดยอาศัยเอนไซม์ย่อยชิ้นเนื้อที่มีขนาดเล็กๆให้หลุดเป็นเซลล์เดี่ยว นำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงในฟลาสต์ เอนไซม์ที่ใช้ส่วนใหญ่นิยมใช้เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าชิ้นเนื้อที่ต้องการย่อยมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันธ์มากจะใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) ข้อควรระวังคือ ต้องไม่ให้เอนไซม์สัมผัสกับชิ้นเนื้อนานเกินไปเพราะจะทำให้เซลล์ที่แยกตัวออกจากชิ้นเนื้อตาย

2.1.3. mechanical disaggregation เป็นวิธีการกดชิ้นเนื้อผ่านอุปกรณ์ที่ทำจากสแตนเลส ซึ่งมีลักษณะเป็นตะแกรงที่มีรูขนาดเล็ก (sieve) เมื่อชิ้นเนื้อโดนกดผ่านจะมีขนาดเล็กลงวิธีนี้จะทำให้ได้ชิ้นเนื้อขนาดเล็กรวดเร็วกว่าการใช้ใบมีดผ่าตัด และลดความเสี่ยงจากกรณีที่ชิ้นเนื้อสัมผัสกับเอนไซม์นานเกินไป

2.2. ชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อตั้งต้นที่สามารถนำมาเลี้ยงในสภาวะนอกร่างกายนั้น อาจจำแนกออกได้เป็น 2 ลักษณะคือ ได้จากเนื้อเยื่อปกติ และเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ เช่น เนื้องอก เป็นต้น

2.2.1. เนื้อเยื่อปกติ สามารถนำมาเลี้ยงได้ทั้งเนื้อเยื่อจากอวัยวะภายนอก และอวัยวะภายในของปลาสำหรับขนาดและอายุของปลาที่นำมาใช้เป็นเนื้อเยื่อตั้งต้น มีตั้งแต่ลูกปลาวัยอ่อน (larvae) จนถึงปลาเต็มวัยที่สมบูรณ์เพศพร้อมจะเจริญพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

2.2.2. เนื้อเยื่อที่ผิดปกติ โดยใช้เนื้องอกซึ่งเกิดจากไวรัสในกลุ่ม Herpes ได้แก่ เซลล์ EPC (epithelioma papulosum of cyprini) (Fijan *et al.*, 1983) ซึ่งพัฒนาจากเนื้องอกของปลาไนและเซลล์ EPG (epithelioma papulosum gold fish) ซึ่งสร้างจากเนื้องอกของปลาทอง (Fernandez *et al.*, 1993)

2.3. อาหาร

โดยทั่วไปอาหารที่จะใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อปลาจะประกอบด้วย 2 ส่วนคือ

2.3.1. อาหารสังเคราะห์ มีองค์ประกอบหลักคือ เกลืออนินทรีย์ กรดอะมิโน วิตามิน และสารอื่นๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) ฟีนอลเรด (phenol red) ซึ่งอาหารจะมี 2 รูปแบบ คือแบบผงจะต้องนำมาละลายน้ำและกรองผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมครอนก่อนใช้ แบบน้ำสามารถใช้ได้ทันที (Freshney, 1988) อาหารที่สามารถใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อของปลาได้มีหลายสูตร ได้แก่ MEM, BME, M-199 และ L-15 ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมจะอยู่ที่ 7.4–7.6 เพราะเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตเซลล์จะขับของเสียจากกระบวนการเมตาโบลิซึม (metabolism) ทำให้ระดับ pH ลดต่ำลง สำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่นำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลาทะเลจะต้องเติมเกลือแกง (NaCl) 0.41 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ลิตร เพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญและการดำรงชีวิตของเซลล์ (Wolf, 1988)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติของปลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

Source	Organ	Author
ปลาช่อน (snake-head fish)		
Chana striatus	ไต	Chen และ Kou (1987)
Chana moculata	หัวใจ	
ปลาไน (common carp)		
Cyprinus carpio	ครีบ, เหงือก, อวัยวะสืบพันธุ์,	Chen และ Kou (1987)
	เยื่อหุ้มสมอง	
	ต่อมใต้สมอง	Ribeiro และ Ahne (1982)
ปลาเฉา (grass carp)		
Ctenopharynyodon idella	ครีบ, ถุงลม, จงอยปาก	Lu และคณะ (1990)
ปลา Japanese flounder		
Paralichthys olivaceus	ครีบ	Meguro และคณะ (1991)
ปลา Japanese striped knife jaw		
Oplegnathus fasciatus	รังไข่	Fernandez และคณะ (1993)
ปลา amberjack		
Seriola dumerili	ผิวหนัง	Fernandez และคณะ (1993)

2.3.2. ซีรัม (serum) เป็นอาหารที่จำเป็นในการเจริญและดำรงชีวิตของเซลล์ เพราะในซีรัมเป็นแหล่งของปัจจัยการเจริญที่ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้ ได้แก่ ฮอร์โมน (hormone) และปัจจัยที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต (growth factor) เป็นต้น ปริมาณซีรัมที่เติมลงในอาหารเพื่อให้เซลล์มีการเจริญที่ดีจะอยู่ในช่วง 10-20 เปอร์เซ็นต์ และ 2-5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการดำรงชีวิตและการเจริญอย่างช้าๆ (Freshney, 1988) Cheng และคณะ (1993) ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากตับและไตของปลา lake trout ในอาหารซึ่งมีซีรัมเป็นส่วนผสมเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ แต่มีการเติมปัจจัยในการเจริญเติบโตอื่นๆ ได้แก่ epidermal growth factor, bovine serum albumin, cholera toxin, insulin, transferin และ selenium ลงในอาหาร ปรากฏว่าเนื้อเยื่อส่วนตับและไตของปลา lake trout สามารถเจริญได้ดีและถ่ายเลี้ยงเซลล์ได้ถึง 32 ครั้ง

2.4. รูปร่างและลักษณะของเซลล์

รูปร่างของเซลล์ที่ทำการเลี้ยงได้จะมี 2 แบบคือ

2.4.1. เซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) มีรูปร่างเป็นเหลี่ยมไม่เรียวยาว และเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนจะพบลักษณะของเดสโมโซม (desmosome) บริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์ (Kanchanakhan and Frerichs, 1995)

2.4.2. เซลล์รูปกระสวย (fibroblastic cell) มีรูปร่างเรียวยาวและเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนจะไม่พบลักษณะของเดสโมโซม (Wolf and Mann, 1980) แต่ในบางครั้งอาจจะพบเนื้อเยื่อที่เลี้ยงได้มีเซลล์ทั้ง 2 แบบอยู่ร่วมกัน (Chen and Kou, 1987)

2.5. การถ่ายเลี้ยงเซลล์ (subculture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้เป็นเซลล์ไลน์นั้น จำเป็นต้องถ่ายเลี้ยงเซลล์นั้นให้ได้ไม่ต่ำกว่า 70-75 ครั้ง เสียก่อนจึงจะยอมรับได้ว่าเป็นเซลล์ไลน์ (Bowser and Plumb, 1980 ; Noga and Hartmann, 1981) ปัจจุบันมีเซลล์ของปลาหลายชนิดที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นเซลล์ไลน์ และนิยมใช้ในการศึกษาโรคไวรัสในห้องปฏิบัติการ เช่น FHM (fathead minnows, *Pimephales promelas*) (Gravell and Malsburger, 1965), BB (brown bullhead, *Ictalurus nebulosus*) (Wolf and Quimby, 1966) และ CCO (channel catfish, *Ictalurus punctatus* ovary) (Bowser and Plumb, 1980) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างเซลล์ที่ได้มีการศึกษาและพัฒนาจนเป็นที่ยอมรับว่าเป็นเซลล์ไลน์แล้วอีกหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เซลล์ไลน์ที่นิยมใช้ในการศึกษาโรคไวรัส

Cell	Medium	Source	Author
FHM	MEM	fathead minnow	Gravell และ Malsburger (1965)
BF-2	MEM	blue gill fin	Wolf และ Quimby (1966)
BB	MEM	brown bullhead	Wolf และ Quimby (1966)
CCO	L-15	chanal catfish ovary	Bowser และ Plumb (1980)
RSBF	MEM	red sea bream fry	Watanabe และคณะ (1981)
YTK	MEM	yellow tail kidney	Watanabe และคณะ (1981)
EPC	MEM	epithelioma papulosum of cyprini	Fijian และคณะ (1983)
PL	MEM	perch liver	Nichoson และคณะ (1987)
BGF	MEM	banded grouper fin	Chen และ Kou (1987)
BGK	MEM	banded grouper kidney	Chen และ Kou (1987)
SBK	L-15	sea bream kidney	Yoshimizu และคณะ (1988)
SBF	L-15	sea bass fin	Yoshimizu และคณะ (1988)
RSF	L-15	red snapper fin	Yoshimizu และคณะ (1988)
SHF	L-15	snake-head fin	จิราพร เกษรจันทร์ และคณะ (2531)
GCF	MEM	grass carp fin	Lu และคณะ (1990)
GCS-2	MEM	grass carp snout	Lu และคณะ (1990)
GCSB	MEM	grass carp swim bladder	Lu และคณะ (1990)
BPK	MEM	black porgy kidney	Tung และคณะ (1991)
BPS-1	MEM	black porgy spleen	Tung และคณะ (1991)
EPG	L-15	epithelioma papulosum gold fish	Fernandez และคณะ (1993)

การถ่ายเลี้ยงเซลล์จะกระทำเมื่อเซลล์เจริญหรือเพิ่มจำนวนเต็มพื้นที่ของฟลาสต์ ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์จะหยุดแบ่งตัว จึงจำเป็นต้องมีการลดจำนวนเซลล์ในฟลาสต์ลง เพื่อให้เซลล์ที่ทำการถ่ายเลี้ยงได้รับอาหารใหม่และมีพื้นที่พอเพียงจึงจะเริ่มแบ่งเซลล์ได้ใหม่ (Freshney, 1988) ในการถ่ายเลี้ยงเซลล์นั้นสามารถทำได้ในอัตราส่วน เซลล์เก่าต่อเซลล์ใหม่ เริ่มที่ 1:2 ถึง 1:6 ตามชนิดของเซลล์ เช่น

- เซลล์ BF-2 สามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ได้ในอัตราส่วน 1:2 ถึง 3
- เซลล์ BB สามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ได้ในอัตราส่วน 1:3 ถึง 4
- เซลล์ FHM สามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ได้ในอัตราส่วน 1:4 ถึง 6

ในการถ่ายเลี้ยงเซลล์จำเป็นต้องใช้สารละลายที่มีส่วนประกอบของเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเวอร์ซีน (versine) ซึ่งมีส่วนประกอบของสารไดโซเดียมเวอร์ซีเนต (disodium versenate) 0.02 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ เติมลงในฟลาสต์เพื่อทำให้เซลล์ที่ยึดเกาะกันเองและยึดเกาะกับพื้นของฟลาสต์หลุดเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และสามารถแยกเซลล์ไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ใหม่ได้ (Wolf and Quimby, 1976)

2.6. การป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากเนื้อเยื่อ

ในการผลิตเซลล์เนื้อเยื่อชั้นต้น การปนเปื้อนของจุลินทรีย์นับเป็นปัญหาที่สำคัญ ดังนั้นการกำจัดจุลินทรีย์ออกจากชิ้นเนื้อที่จะนำมาเลี้ยงจึงมีความสำคัญมาก โดยทั่วไปการป้องกันและกำจัดจุลินทรีย์ออกจากเนื้อเยื่อชั้นต้นนี้มี 2 วิธี คือ

2.6.1. การใช้สารเคมีในการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากภายนอกของชิ้นเนื้อ ซึ่งสารเคมีที่นิยมใช้มีหลายชนิดได้แก่

2.6.1.1. สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (sodium hypochloride) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แช่ชิ้นเนื้อนาน 1 นาที (Gravel and Malsburger, 1965)

2.6.1.2. สารละลายไอโอดีน (iodine) ความเข้มข้น 50 ส่วนในล้านส่วน (ppm) แช่ชิ้นเนื้อนาน 15 นาที (Fernandez *et al.*, 1993)

2.6.1.3. สารละลายเบนซาโคเนียมคลอไรด์ (benzakonium chloride : BKC) ความเข้มข้น 1 : 1,000 ส่วน แช่ชิ้นเนื้อนาน 5 นาที (Wolf and Quimby, 1976)

ชิ้นเนื้อที่ผ่านการแช่ในสารเคมี ต้องนำมาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (phosphate buffer saline : PBS) ในปริมาณที่มากพอจนแน่ใจว่าจะไม่มีการตกค้างของสารเคมีแล้ว จึงนำไปผ่านขั้นตอนอื่นๆ ต่อไป

2.6.2. การใช้ยาปฏิชีวนะและยาต้านจุลชีพ โดยแช่ชิ้นเนื้อในอาหารสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (penicillin) 1,000 IU สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) 1,000 ไมโครกรัม แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) 5 ไมโครกรัมและเจนตามัยซิน (gentamicin) 25 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร (สมเกียรติ์ กาญจนาคาร และ Frerichs, 2536)

นอกจากนี้การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สามารถพบได้ในระหว่างการเลี้ยง เช่น ขณะทำการถ่ายเลี้ยงเซลล์หรือในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นต้น เมื่อมีการปนเปื้อน จุลินทรีย์ต่างๆ สามารถจะเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่พบอยู่ภายนอกเซลล์ได้แก่ เชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถทำให้เซลล์ตายได้โดยตรงและโดยอ้อมคือแย่งใช้อาหารในการเจริญ นอกจากนี้ยังมีเชื้อจุลินทรีย์ที่พบอยู่ภายในเซลล์ได้แก่ ไวรัสและไมโคพลาสมา (mycoplasma) ซึ่งสามารถทำให้เซลล์อ่อนแอลงหรืออาจทำให้เซลล์ตายได้โดยตรง สำหรับแหล่งที่มาของการปนเปื้อนได้แก่ อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อตั้งต้นที่นำมาเลี้ยง ขั้นตอนการทำงาน และบรรยากาศ นอกจากนี้การปนเปื้อนของไมโคพลาสมาอาจมาจาก ซีรัม อาหารเลี้ยงเซลล์ เอนไซม์ทริปซิน และผู้ปฏิบัติงาน เป็นต้น (Freshney, 1988)

3. คุณลักษณะของเซลล์ไลน์

3.1. ความสามารถในการยอมรับเชื้อไวรัส

สำหรับการศึกษาทางไวรัสวิทยา ความสามารถในการยอมรับเชื้อไวรัสนับเป็นคุณลักษณะที่มีความสำคัญยิ่ง เนื่องจากไวรัสแต่ละชนิดมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นเซลล์เนื้อเยื่อที่ดีจะมีความสามารถหรือมีประสิทธิภาพในการยอมรับเชื้อไวรัสได้มากชนิด และสามารถเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ดีอีกด้วย

จิราพร เกษรจันทร์ และคณะ (2531) ได้ทำการผลิตเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนครีบหางของปลาช่อน (SHF) พบว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ที่ผสมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เซลล์ที่ได้เป็นเซลล์รูปกระสวย มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 42 และพบว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถยอมรับเชื้อไวรัสได้หลายชนิดเช่น sand goby virus

(SGV), spring viremia of carp virus (SVCV) และ snake-head rhabdovirus (SHRV) ซึ่งเป็นสาเหตุร่วมของโรคระบาดปลาช่อนในประเทศไทยได้อีกด้วย

จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์ (2537) ได้ทำการผลิตเซลล์จากเนื้อเยื่อครีบหางปลากะรัง พบว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถใช้ในการแยกเชื้ออิริโดไวรัส (GIV-1 : grouper iridovirus-1) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคครีบดำในปลากะรังขนาด 1.0-1.5 เซนติเมตรที่อนุบาลในโรงเพาะฟัก (จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์, 2539) และเชื้ออิริโดไวรัส (GIV-2 : grouper iridovirus-2) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแผลพุพอง (blister disease) ในปลากะรัง (เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ, 2540)

Kanchanakhan และ Frerichs (1995) ทำการผลิตเซลล์จากเนื้อเยื่อไตส่วนต้นและครีบหางของปลาดุกบิ๊กอุย พบว่าเซลล์ HCK และ HCT สามารถยอมรับเชื้อไวรัส IPNV, SGV, GSV และ CRV ได้ดี นอกจากนี้เซลล์ HCK ยังสามารถยอมรับเชื้อรีโอไวรัส (reovirus) ซึ่งแยกได้จากปลา tench (*Tinca tinca*) และปลา European chub (*Leuciscus cephalus*) และเชื้อแรบโดไวรัส (rhabdovirus) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค epizootic ulcerativesyndrome (EUS) ในปลาช่อน (*Channa striatus*) อีกด้วย

3.2. ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์

นับเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์อีกประการหนึ่ง เนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ดีที่ระดับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน และมีความสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับอุณหภูมิในช่วงที่แตกต่างกัน ซึ่งจะเป็นข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์สำหรับการศึกษาโรคไวรัสแต่ละชนิดด้วย เช่น เนื้อเยื่อจากปลาแซลมอนจะเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะเจริญได้เล็กน้อยและไม่มีการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Fernandez *et al.*, 1993) สำหรับเซลล์ซึ่งเพาะเลี้ยงจากปลาในเขตร้อน เช่น ปลาเฉา สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 24-36 องศาเซลเซียส โดยจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และไม่มีการเจริญถ้าอุณหภูมิเท่ากับหรือต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (Lu *et al.*, 1990) ส่วนเซลล์ที่พัฒนามาจากอวัยวะภายนอกกับอวัยวะภายในของปลาจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญใกล้เคียงกัน เช่น เซลล์เนื้อเยื่อซึ่งสร้างจากครีบหางของปลาช่อนสามารถเจริญได้ดีในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส (จิราพร เกษรจันทร์ และคณะ, 2531) เช่นเดียวกับเซลล์ซึ่งสร้างจากหัวใจปลาช่อน สามารถเจริญได้ดีในช่วง 20-25 องศาเซลเซียส (Fernandez *et al.*, 1993)

3.3. การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

เซลล์ที่ดีควรปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น เชื้อไวรัส และไมโคพลาสมา ซึ่งอาจแฝงอยู่ภายในเซลล์โดยไม่ทำให้เซลล์ตาย แต่ทำให้คุณลักษณะบางประการของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป และอาจส่งผลกระทบต่อการศึกษาหรือการใช้ประโยชน์จากเซลล์นั้นได้

3.4. การเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำ

เป็นคุณลักษณะประการหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการเก็บรักษาเซลล์ไว้ขณะไม่ใช้ประโยชน์หรือเก็บสำรองไว้ป้องกันการปนเปื้อน โดยทั่วไปจะทำการเก็บรักษาเซลล์ไว้ที่ระดับอุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส หรือในไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ –196 องศาเซลเซียส

Meguro และคณะ (1991) รายงานว่าสามารถเก็บรักษาเซลล์ FF-11 ไว้ที่ระดับอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสได้อย่างน้อย 1 ปีโดยเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ที่ผสมด้วยซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ และ dimethyl sulphoxide (DMSO) 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารสำหรับแช่แข็งเซลล์

Kanchanakhan และ Frerichs (1995) รายงานการเก็บรักษาเซลล์ที่ระดับอุณหภูมิต่ำว่าเซลล์จากเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าและครีบหางของปลาดุกลูกผสมสามารถมีชีวิตรอดและเจริญได้ภายหลังการเก็บเซลล์ไว้ที่ระดับอุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียสและในไนโตรเจนเหลว

4. ประโยชน์จากเซลล์เนื้อเยื่อ

เซลล์เนื้อเยื่อของปลาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลายทาง เช่น

4.1. การศึกษาการติดเชื้อไวรัสในปลาและสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ

วัตถุประสงค์หลักของการเพาะเลี้ยงเซลล์คือใช้ในการแยกเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในปลา ใช้ในการศึกษาทางซีรัมวิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยาของปลาต่อเชื้อไวรัส รวมถึงการประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค (Ahne, 1981 อ้างโดย จิราพร เกษรจันทร์ และคณะ, 2531) ใช้เพิ่มจำนวนไวรัสเพื่อการผลิตวัคซีน (Wolf, 1988) และมีเนื้อเยื่อของปลาบางชนิดที่ยอมรับการติดเชื้อจากไวรัสซึ่งก่อให้เกิดโรคในกุ้งได้ เช่น เซลล์ EPC สามารถยอมรับเชื้อ infectious

hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) ซึ่งเป็นสาเหตุและก่อให้เกิดโรคในกุ้งกลุ่ม penaeus (Loh *et al.*, 1990)

4.2. การศึกษาทางพิษวิทยา

Borenfreund (1987) อ้างโดย กิจการ ศุภมาตย์ (2529) กล่าวว่าได้มีการประยุกต์ใช้เซลล์ FHM ในการศึกษามลพิษทางน้ำ

4.3. การศึกษาจำนวนโครโมโซม และรูปร่างของโครโมโซมของปลา

สามารถทำการศึกษาจำนวนและรูปร่างของโครโมโซมของปลาจากเนื้อเยื่อชั้นต้นที่เลี้ยงได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษาเม็ดเลือดขาวของปลา (Wolf, 1988) อีกด้วย

4.4. การศึกษาวิจัยทางชีววิทยาการแพทย์

สามารถนำเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงได้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยด้านนี้เช่นกัน เช่น การศึกษาการขนถ่ายไอออน ความเครียดของเซลล์จากการช็อคด้วยความร้อนและการศึกษาชีววิทยาของเนื้อร้าย (Hightower and Renfro, 1988)

4.5. การศึกษาเกี่ยวกับต่อมไร้ท่อ และการหลั่งฮอร์โมน จากต่อมไร้ท่อ

Ribeiro และ Ahne (1982) ได้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต่อมใต้สมองปลาไน เพื่อศึกษาการหลั่งฮอร์โมน gonadotropin ในสภาพ *in vitro*

5. โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสครอบครัวอิริโดไวริดี (Iridoviridae)

ไวรัสครอบครัวอิริโดไวริดี เป็นเชื้อไวรัสอีกกลุ่มหนึ่งที่ทำให้เกิดการระบาดในสัตว์หลายชนิดทั้งในแมลง สัตว์น้ำจืดและน้ำเค็มหลายชนิด และสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น กบ เป็นต้น (Walker, 1962) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 โรคระบาดที่เกิดจากเชื้อไวรัสครอบครัวอิริโดไวริดี และคุณสมบัติบางประการ

Host	Enveloped	shape	Nucleic	Size (nm.)	Temperature of Incubate (°C)	Propagation Cell lines	Selected Reference
Frog (*Limnodynastes ornatus*)	+	icosahedral	DNA	128	25	AS, BB, BF-2 FHM, RTG	Speare และ Smith (1992)
White sturgeon (*Acipenser transsmontanus*)	+	icosahedral	DNA	262	nd	nd	Hedrick และคณะ (1990)
Turbot fry (*Scophthalmus maximus*)	+	icosahedral	DNA	170	nd	nd	Bloch และ Larsen (1993)
Red fin perch (*Perca fluviatilis*)	+	icosahedral	DNA	148-167	nd	BF-2	Langdon และคณะ (1986)
Sheat fish (*Silurus glanis*)	+	icosahedral	DNA	141-163	nd	BF-2	Ahne และคณะ (1989)
Cat fish (*Ictalurus melas*)	+	icosahedral	DNA	141-163	15-25	EPC, BF-2, CCO	Pozet และคณะ (1992)
Red sea bream (*Pagrus major*)	+	icosahedral	DNA	170	20	RTG-2, BF-2, FHM CHSE-214, RSBK-2	Nakajima และ Sorimachi (1994)
Grouper (*E. malabaricus*)	+	icosahedral	DNA	120	26-28	EPC, GF	Kasornchandra และ Khongpradit (1997)

Remark : + = sensitive nd = no data

Francki และคณะ (1991) รายงานลักษณะโดยทั่วไปของไวรัสครอบครัวอิริโดไวริดีดังนี้

ชื่อภาษาอังกฤษ icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses

ลักษณะรูปร่าง - รูปหกเหลี่ยม

- ขนาด 125 - 300 นาโนเมตร

- น้ำหนักโมเลกุลของไวริออน (virion) 500-2000 x 10^6

- มีเปลือกหุ้ม

กรดนิวคลีอิก - ดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA)

โปรตีน - 13-35 structural polypeptides

ไขมัน - มีไขมันเป็นองค์ประกอบ 5-9 เปอร์เซ็นต์ (ไม่รวมเปลือกหุ้ม)

คาร์โบไฮเดรต - ไม่ปรากฏรายงาน

การแพร่กระจาย - จากตัวปลาสู่ตัวปลาและจากแม่ผ่านไข่มายังลูก (horizontal and vertical)

วงศ์ (Genera)

- small iridescent insect virus group	*Iridovirus*
- large iridescent insect virus group	*Chloriridovirus*
- frog virus group	*Ranavirus*
- lymphocystis disease virus group	*Lymphocystisvirus*
- goldfish virus group	*Gold fish virus 1*

โรคที่พบและรู้จักกันดีก็คือ โรคลิมโฟซิสทิส (lymphocystis) ซึ่งพบรายงานการระบาดครั้งแรกในปลากะพงขาว (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และคณะ, 2526 ; ประดิษฐ์ ชนชื่นชอบ และคณะ, 2530) (รูปที่ 2) และปลาทะเลอื่นๆ อีกหลายชนิดเช่น ปลาตะกรับ และปลากระบอก เป็นต้น

รูปที่ 2 ลักษณะปลากะพงขาวที่เป็นโรคลิมโฟซิสทิส (Lymphocystis) (ลูกศรชี้) ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสครอบครัว (Family) Iridoviridae Genus *Lymphocystisvirus*

ลักษณะอาการที่สามารถสังเกตุได้ง่ายของปลาที่เป็นโรคคือ ตัวปลาและครีบจะปรากฏตุ่มคล้ายหูด อาจเป็นเซลล์เดียวหรือปรากฏเป็นกลุ่มใหญ่มีสีขาวจนถึงขาวปนเทา เมื่อสัมผัสจะอ่อนนุ่ม ลักษณะของตุ่มเกิดจากไวรัสไปทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นและปรากฏ inclusion body ในเซลล์ ตุ่มอาจแตกออกและปล่อยเชื้อไวรัสลงสู่แหล่งน้ำ ผิวหนังบริเวณนั้นจะหายเป็นปกติ เมื่อเวลาผ่านไป สภาพแวดล้อมรอบตัวปลาสะอาดขึ้นก็สามารถหายได้เอง (ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์, 2538)

การระบาดที่รุนแรงสามารถสร้างความเสียหายแก่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย เช่น ปลากะรัง ซึ่ง เยาวนิตย์ ดนยดล และคณะ (2537) ได้รายงานการระบาดของเชื้ออิริโดไวรัสในปลากะรังที่เลี้ยงในกระชัง บริเวณชายฝั่งภาคใต้ตอนล่างในเขตจังหวัดสงขลา สตูล ตรัง กระบี่ พังงาและภูเก็ตและยังพบว่าเชื้อดังกล่าวได้แพร่ระบาด สร้างความสูญเสียแก่การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากะรังและปลากะพงขาวซึ่งมีอายุประมาณ 6-10 ปี อีกด้วย ซึ่งนับเป็นความเสียหายที่ไม่อาจประเมินค่าได้ นอกจากนี้ยังพบรายงานการเกิดโรคครีบดำในลูกปลากะรังขนาด 1.0-1.5 เซนติเมตร ในโรงเพาะฟักระหว่างปี พ.ศ. 2536-2537 (จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์, 2539) ซึ่งลูกปลาที่ติดเชื้อมีอาการเฉื่อยชา ไม่กินอาหาร ลำตัวเปลี่ยนเป็นสีดำ โดยเฉพาะครีบและส่วนหาง ว่ายน้ำผิดปกติ มีอาการเกร็งและตายในที่สุด การศึกษาพบว่าโรคดังกล่าวเกิดจากเชื้อไวรัสซึ่งมีรูปร่างแบบหกเหลี่ยม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 120-130 นาโนเมตร และมีกรดนิวคลีอิกเป็นชนิดดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งจัดอยู่ในครอบครัวอิริโดไวริดี และให้ชื่อไวรัสที่แยกได้ดังกล่าวว่า "grouper iridovirus-1 (GIV-1)"

เรวัตร คงประดิษฐ์ และจิราพร เกษรจันทร์ (2539) รายงานสาเหตุการตายของลูกปลากะพงขาวขนาด 1.0-1.5 เซนติเมตร อายุ 25-35 วัน ขณะอนุบาลในโรงเพาะฟัก สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา ซึ่งมีอัตราการตายสูง 80-95 เปอร์เซ็นต์ โดยลูกปลาจะกินอาหารลดลง ลำตัวลีบแบน เปลี่ยนเป็นสีดำ ว่ายน้ำผิดปกติ มีอาการเกร็ง ก่อนลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำและตายในที่สุด (รูปที่ 3) จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเกิดจากเชื้อไวรัสตรอบครัวอิริโดไวริดี ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 200-220 นาโนเมตร และตั้งชื่อไวรัสดังกล่าวว่า " seabass iridovirus (SIV)"

รูปที่ 3 ลักษณะอาการของลูกปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ seabass iridovirus (SIV) ในโรงเพาะฟัก สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา ซึ่งบริเวณลำตัวมีลักษณะลีบแบน เปลี่ยนเป็นสีดำ ว่ายน้ำผิดปกติและมีอาการเกร็ง

เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ (2540) รายงานการระบาดของโรคแผลพุพองในปลากะรังที่เลี้ยงในกระชัง บริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน เขตพื้นที่ จ.ตรัง และ จ.สตูล ช่วงกลางปี พ.ศ. 2538 ลักษณะอาการโดยทั่วไป ปลาจะไม่กินอาหาร เกิดตุ่มนูนบริเวณลำตัวและครีบ ตุ่มนูนจะขยายใหญ่ขึ้นและแตกออกเป็นแผลภายใน 3-5 วัน การศึกษาพบว่าเกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่มอิริโดไวริดี ซึ่งมีรูปร่างแบบหลายเหลี่ยม มีผนังหุ้ม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 180-200 นาโนเมตรและมีกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอ (DNA) สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีในเซลล์ EPC, BF-2 และ GF ให้ชื่อไวรัสที่แยกได้ว่า "grouper iridovirus-2 (GIV-2)"

6. การประยุกต์ใช้เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยแอนติบอดี

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ (2529) ได้ให้นิยามหรือคำจำกัดความต่างๆไว้ดังนี้

6.1. แอนติเจน (antigen : Ag) คือสารซึ่งสามารถชักนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีได้ และสามารถทำปฏิกริยาจำเพาะกับแอนติบอดีนั้นๆ

6.1.1. คุณสมบัติของแอนติเจนที่สำคัญ 2 ประการคือ

6.1.1.1. immunogenicity คือความสามารถตามธรรมชาติที่จะชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดี

6.1.1.2. specific reactivity คือความสามารถในการทำปฏิกริยาจำเพาะกับแอนติบอดีที่มันทำให้เกิดขึ้น

6.1.2. คุณสมบัติของสารที่มีความสามารถชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้

6.1.2.1. เป็นสิ่งแปลกปลอม โดยปกติจะไม่พบอยู่ในร่างกายหรืออาจเป็นสิ่งอยู่ในร่างกายแต่ไม่เคยได้สัมผัสกับระบบภูมิคุ้มกัน

6.1.2.2. คุณสมบัติทางฟิสิก

ก. ขนาด แอนติเจนที่ดีต้องเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน (dalton) ขึ้นไป

ข. โครงสร้าง แอนติเจนที่มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อนสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี

ค. ประจุ การเป็นสารชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีไม่ขึ้นกับประจุ แต่จะมีผลต่อประจุของแอนติบอดีที่เกิดขึ้น

ง. ทางที่สามารถเข้าถึงได้ การเรียงตัวของแอนติเจนที่หนาแน่นเกินไปอาจทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถเข้าไปรับรู้ได้

6.1.2.3. คุณสมบัติทางเคมี สารอินทรีย์ทั้งหลายรวมทั้งจุลินทรีย์ และผลผลิตของจุลินทรีย์ เช่น พิษ หรือแม้แต่สารสังเคราะห์บางชนิดที่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น สามารถเป็นแอนติเจนได้ และพบว่าโปรตีนเป็นแอนติเจนได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับคาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก และไขมัน

6.1.2.4. คุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับเจ้าบ้าน การเป็นสารชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีจะต้องเกี่ยวข้องกับเจ้าบ้าน ซึ่งจะแตกต่างกันเมื่อต่างชนิด หรือแม้แต่ชนิดเดียวกันก็ต่างกันในแต่ละบุคคล ขึ้นกับพันธุกรรม อายุ และอาหาร เช่นแอนติเจนบางชนิดอาจไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายเลยแต่กลับไปกระตุ้นได้ดีในหนู

6.1.2.5. สารแอดจูแวนท์ (adjuvant) เป็นสารที่เมื่อให้เข้าสู่ร่างกายพร้อมกับแอนติเจนแล้ว จะช่วยเสริมให้ร่างกายมีการตอบสนองต่อแอนติเจนนั้นได้ดีขึ้น โดยอาจไปยืดเวลาการอยู่ในร่างกายของแอนติเจนให้นานขึ้นทำให้ระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนมากขึ้น เช่น Freund's adjuvant ซึ่งแบ่งเป็น

6.1.2.5.1. incomplete Freund's adjuvant เป็น water in oil emulsion

6.1.2.5.2. complete Freund's adjuvant เป็น water in oil emulsion ที่มี *Mycobacterium tuberculosis* ที่ถูกฆ่าด้วยความร้อนแล้วรวมอยู่ในชั้นของน้ำมันด้วย ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีได้ดีกว่าแบบแรก

6.2. แอนติบอดี (antibodies : Ab) เป็นสารกลุ่มไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ (polypeptide) 82-96 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต 4-18 เปอร์เซ็นต์ เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแอนติเจนหรือสิ่งแปลกปลอม และสามารถทำปฏิริยาจำเพาะกับแอนติเจนนั้นๆ ซึ่งเป็นกลไกในการกำจัดสารพิษ จุลชีพ หรือสิ่งแปลกปลอมอื่นๆ ออกจากร่างกาย และปฏิกริยาจำเพาะดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ไม่ว่าจะเป็นในร่างกายหรือหลอดทดลอง ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคได้ (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ, 2529 ; Ahne, 1981 อ้างโดย จิราพร เกษรจันทร์ และคณะ, 2531)

แอนติบอดีสามารถกระตุ้นหรือผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดดังตารางที่ 4 แต่ที่นิยมใช้ในการผลิตแอนติบอดีต่อไวรัส (viral antibodies) ได้แก่ กระต่ายสายพันธุ์นิวซีแลนด์ และหนูขาว (mice) เป็นต้น ส่วนรูปแบบของแอนติเจน ปริมาณ และความเข้มข้นของสารขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ที่ใช้ในการผลิตแอนติบอดี

สำหรับกระต่ายโดยทั่วไปนิยมใช้กระต่ายเพศผู้ ซึ่งมีอายุประมาณ 12 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 2.0–2.5 กิโลกรัม ส่วนหนูขาว นิยมใช้หนูเพศเมีย อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ (Harlow and Lane, 1988) โดยจะกระตุ้นด้วยสารซึ่งมีรูปแบบและความเข้มข้นของสารแตกต่างกัน ดังตารางที่ 5, 6 และ 7

6.3. ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

แบ่งตามลักษณะการทำปฏิกริยาที่ใช้ในการทดสอบได้ 5 กลุ่ม คือ

6.3.1. การทดสอบที่ใช้ปฏิกริยาการลบล้างฤทธิ์ (neutralization)

เทคนิคการทดสอบที่ใช้ปฏิกริยาการลบล้างฤทธิ์ เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้โดยทั่วไปในการทดสอบชนิดของเชื้อไวรัส (Rovozzo and Bruke, 1973) โดยแอนติบอดีจะเข้าจับกับโปรตีนบริเวณผิวของอนุภาคไวรัส ทำให้ไวรัสไม่สามารถเข้าจับและเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ (Van Regenmortel, 1981) ดังนั้นการทดสอบจึงเป็นการตรวจดูว่าฤทธิ์ของไวรัสถูกลบล้างไปหรือไม่

ในการทดสอบหาระดับแอนติบอดี แอนติเจน หรือ คอมพลีเมนต์ โดยอาศัยปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีนั้น หน่วยของการวัดระดับแบบหนึ่งที่นิยมคือค่า"ไตเตอร์ (titer)" ซึ่งบอกถึงความเจือจางสูงสุดของสิ่งที่ต้องการตรวจนั้น ซึ่งยังคงมีแอนติบอดี แอนติเจน หรือคอมพลีเมนต์ในระดับสูงพอที่จะก่อให้เกิดปฏิกริยาที่สามารถตรวจพบได้

6.3.2. การทดสอบที่ใช้ปฏิกริยาการตกตะกอน (precipitation)

เป็นการตรวจปฏิกริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่เป็นสารละลาย ซึ่งจะทำให้เกิดการรวมตัวเป็น antigen-antibody complex ซึ่งตกตะกอนให้เห็นได้ และอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่ใช้ในปฏิกริยามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเกิดตะกอน (precipitation) ของ antigen-antibody complex

ตารางที่ 4 ชนิดของสัตว์ทดลองและความเหมาะสมสำหรับการผลิตแอนติบอดี

Animal	Maximal amount of sera (ml)	Comments
Rabbits	500	Often best choice for polyclonal antibody production even when antigen limiting
Mice	2	Often best choice for monoclonal antibody production, excellent genetics of immune responce
Rats	20	Good choice for monoclonal antibody production
Hamsters	20	Good choice for polyclonal antibody production when antigen limiting
Guinea Pigs	30	Hard to bleed
Chickens	50	Good for highly conserved mammalian antigens

ที่มา : Harlow และ Lane (1988) หน้า 93

ตารางที่ 5 รูปแบบและความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแอนติบอดีในกระต่าย

Form of Antigen	Examples	Possible routes	Dose (μg)
Soluble Proteins	Enzymes	sc [a]	50-1000
	Carrier proteins conjugated w/ peptides	im [b]	
	Immune complexes	id [c]	
		iv [d]	
Particulate proteins	Viruses (killed)	sc	50-1000
	Yeast (killed)	im	
	Bacteria (killed)	id	
	Structural proteins		
Insoluble proteins	Bacterially produced form inclusion	sc	50-1000
	bodies	im	
	Immunopurified proteins bound to beads	id	
Carbohydrates	Polysaccharides	sc	500-1000
	Glycoproteins	im	
		id	
		iv	
Nucleic Acids	Carrier proteins conjugated w/ N.A.	sc	500-1000
		im	
		id	
		iv	

[a] Subcutaneous, [b] Intramuscular, [c] Intradermal, [d] Intravenous

ที่มา : Harlow และ Lane (1988) หน้า 101

ตารางที่ 6 วิธีการ ชนิดและปริมาณของสารสำหรับการฉีดกระตุ้นกระต่ายในการผลิตแอนติบอดี

Route	Abbr	Maximum volume	Adjuvant	Immunogen requirement	Comments
Subcutaneous	sc	800 µl per site, 10 site/rabbit	+/-	Soluble or insoluble	Easy injections
Intramuscular	im	0.5 ml	+/-	Soluble or insoluble	Slow release
Intradermal	id	100 µl per site, 40 site/rabbit	+/-	Soluble or insoluble	Injections more difficult, slow release
Intravenous	iv	1 ml	No Freund's	Soluble, ionic detergent < 0.2% Nonionic detergent < 0.5% Salt < 0.3 M Urea < 1 M	Not effective for primary immunizations
Lymph Node	-	Special uses	No Freund's	Soluble/ or insoluble	Good applications for experienced workers
Intraperitoneal	ip				Normally not recommended for rabbits

ที่มา : Harlow และ Lane (1988) หน้า 102

ตารางที่ 7 ชนิด รูปแบบและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแอนติบอดีจากหนูขาว (mice)

Form of antigen	Examples	Primary injections and boosts			Final boosts		
		Possible routes	Dose	Adjuvant	Possible routes	Dose	Adjuvant
Soluble Proteins	Enzymes	ip [a]	5-50 μg	+	iv [c]	5-50 μg	-
	Carrier proteins conjugated with peptides	sc [b]					
	Immune complexes						
Particulate	Viruses (killed)	ip	5-50 μg	+	iv	5-50 μg	-
Proteins	Yeast (killed)	sc					
	Bacteria (killed)						
	Structural proteins						
Insoluble	Bacterially produced for inclusion bodies	ip	5-50 μg	+	ip	5-50 μg	-
Proteins	Immunopurified proteins bound to beads	sc					
Live Cells	Mammalian cells	ip	10^5-10^7 cells	-	iv	10^6 cells	-
Live Tumorigenic Cells	Oncogenic mammalian cells	ip	10^4-10^6 cells	-	iv	10^6 cells	-
		sc					
Carbohydrates	Polysaccharides	ip	10-50 μg	+/-	iv	10-50 μg	-
	Glycoproteins	sc					
Nucleic Acids	Carrier proteins conjugated with N. A.	ip	10-50 μg	+	iv	10-50 μg	-

[a] Intraperitoneal [b] Subcutaneous [c] Intravenous

ที่มา : Harlow และ Lane (1988) หน้า 152

6.3.3. การทดสอบที่ใช้ปฏิกริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination)

เป็นการใช้แอนติบอดีทำปฏิกริยากับแอนติเจนที่อยู่บนผิวของอนุภาค เช่น แอนติเจนบนผิวของเม็ดเลือดแดง แบคทีเรีย เชื้อรา เป็นต้น ซึ่งแอนติบอดีสามารถเชื่อมโยงทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคที่เกิดจากการทำปฏิกริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของอนุภาคนั้น สำหรับปัจจัยที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับปฏิกริยาการเกาะกลุ่ม คือความเข้มข้นของ แอนติบอดี กล่าวคือ กรณีที่แอนติบอดีมีความเข้มข้นมากเกินไป แอนติเจนแต่ละอนุภาคก็จะถูกจับด้วยแอนติบอดีหลายโมเลกุล โอกาสที่แอนติบอดีโมเลกุลหนึ่งจะจับกับอนุภาคหลายๆ อันย่อมเป็นไปได้ยาก จึงไม่มีปฏิกริยาเกาะกลุ่มเกิดขึ้น

6.3.4. การทดสอบที่ใช้ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่ต้องอาศัยคอมพลิเมนต์ร่วมด้วย (complement dependent reaction)

เมื่อแอนติบอดีทำปฏิกริยากับแอนติเจนจะสามารถก่อให้เกิดการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ได้ คอมพลีเมนต์ที่กระตุ้นแล้วนี้จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพกับเซลล์ชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ว่ามีปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดขึ้น

6.3.5. การทดสอบที่ใช้แอนติเจนติดฉลากหรือใช้แอนติบอดีติดฉลาก (method with labelled antigen or labelled antibody)

เป็นการทดสอบที่อาศัยสารบางอย่างเป็นเครื่องช่วยบ่งชี้ว่ามีปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเกิดขึ้น โดยการนำสารนั้นไปติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดี การทดสอบส่วนใหญ่จะใช้การติดฉลากแอนติบอดี สารที่นำมาใช้ในการติดฉลากได้แก่ สารกัมมันตภาพรังสี (radioactive) เอนไซม์ สารเรืองแสง (fluorescent substance หรือ fluorochrome) และเฟอร์ริติน (ferritine) หลังจากติดฉลากแล้วแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้สามารถทำปฏิกริยาเหมือนเดิมและสารที่นำมาติดฉลากก็ยังมีคุณสมบัติที่สามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ปฏิกริยาให้ทดสอบได้ ซึ่งวิธีการนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

6.3.5.1. immunohistochemical techniques วิธีการนี้ใช้ตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่อยู่ในเนื้อเยื่อ

ก. immunofluorescence เป็นการใช้สารเรืองแสงเป็นสารติดฉลาก โดยทั่วไปจะใช้แอนติบอดีติดฉลากเพื่อตรวจหาแอนติเจน สารเรืองแสงที่นิยมใช้คือ fluorescein และ

rhodamine ซึ่งอยู่ในรูปของ fluorescein isothiocyanate (FITC) และ tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) ตามลำดับ ซึ่งโดยหลักการสามารถแบ่งการทดสอบออกได้เป็น 2 วิธีคือ

(1) direct immunofluorescence หลักการคือการนำแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหามาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง และให้ทำปฏิกริยากับเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจหาแอนติเจนก่อนล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกแล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง

(2) indirect immunofluorescence หลักการคือให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบทำปฏิกริยากับแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่จำเพาะและใช้แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบุลินซึ่งติดฉลากไว้ด้วยสารเรืองแสงแล้ว เป็นตัวทำปฏิกริยาอีกตัวหนึ่งซึ่งเป็นตัวบ่งบอกว่ามีปฏิกริยาที่ต้องการทดสอบเกิดขึ้นหรือไม่

ข. การทดสอบซึ่งใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ เป็นวิธีการที่ใช้หลักการเดียวกันกับวิธีแรกแต่ใช้เอนไซม์แทนสารเรืองแสง โดยตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของ substrate ซึ่งใส่ลงไปทำปฏิกริยากับเอนไซม์ สำหรับเอนไซม์ที่นิยมใช้ ได้แก่ horseradish peroxidase (HRP) เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกริยากับ hydrogen peroxide และ diaminobenzidine จะเกิดสีดำขึ้นตรงตำแหน่งที่มีเอนไซม์นี้อยู่

ค. การทดสอบซึ่งใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยเฟอร์ริตินมีหลักการเช่นเดียวกับการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง แต่วิธีการตรวจหาตำแหน่งที่มีเฟอร์ริตินอยู่ใช้การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ง. autoradiography เป็นการตรวจสอบโดยการใช้สารกัมมันตภาพรังสี เช่น ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{125}I เป็นสารติดฉลากแอนติบอดี การตรวจใช้การเคลือบทับบนแผ่นกระจกด้วย nuclear emulsion ซึ่งมี silver halide เป็นส่วนประกอบ สารกัมมันตภาพรังสีที่เปล่งออกมาทำให้ silver halide ตรงตำแหน่งนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น silver หลังทำปฏิกริยาด้วยสารที่เหมาะสมจะปรากฏเป็นจุดสีดำ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาหรือกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

6.3.5.2. immunoassay เป็นวิธีการตรวจสอบหาแอนติเจนที่อยู่ในสภาพสารละลาย สารที่นิยมนำมาติดฉลากเพื่อใช้ในการตรวจสอบตามวิธีการนี้ได้แก่ สารกัมมันตภาพรังสี เอนไซม์ หรืออาจเป็นสารเรืองแสงก็ได้

ก. radioimmunoassay (RIA) ซึ่งเป็นวิธีการใช้สารกัมมันตภาพรังสีในการติดฉลาก และมีการแบ่งย่อยตามปฏิกริยาออกเป็น competitive binding technique และ noncompetitive binding technique

ข. enzyme immunoassay เป็นการทดสอบโดยใช้เอนไซม์เป็นสารติดฉลาก ซึ่งอาจจะนำมาติดฉลากแอนติเจน หรือ haptan หรือแอนติบอดีก็ได้ การทดสอบแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ

(1) homogeneous enzyme immunoassay หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า enzyme multiply immunoassay technique (EMIT)

(2) heterogeneous enzyme immunoassay ส่วนใหญ่ที่นิยมใช้เป็นชนิด solid phase assay เรียกว่า enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งยังสามารถแบ่งออกได้อีกเป็น 2 วิธีคือ competitive ELISA และ noncompetive ELISA

ปัจจุบันเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยปฏิกริยาแอนติบอดี ได้รับความนิยมเป็นอย่างสูงเนื่องจากมีความถูกต้องแม่นยำสูงและรวดเร็ว ซึ่งจะช่วยป้องกัน และลดความสูญเสียจากการเกิดโรคได้ แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของเทคนิคการตรวจวินิจฉัยดังกล่าวยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดหรือวิธีการผลิตแอนติบอดี ชนิดของแอนติเจน และวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสม ซึ่งการทดสอบที่ใช้แอนติเจนติดฉลากหรือใช้แอนติบอดีติดฉลาก เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน เช่น fluorescent antibodies technique (FAT), radioimmunoassay (RIA) และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นต้น

Nakajima และคณะ (1995) ได้รายงานการผลิต monoclonal antibody ต่อเชื้อ RSIV สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี indirect immunofluorescence พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจโรคระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังพบว่ายังสามารถใช้ในการจำแนก (classification) ระดับวงศ์ (Genera) ของเชื้อไวรัสครอบครัว Iridoviridae ได้อีกด้วย (Nakajima and Sorimachi, 1995)

7. การควบคุมและป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส

เนื่องจากไวรัสมีขนาดอนุภาคที่เล็กมาก อาศัยและเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยองค์ประกอบสารพันธุกรรมและโครงสร้างอื่นๆ เช่น ผนังหุ้ม (envelope) จากสิ่งมีชีวิตซึ่งเป็นเจ้าบ้าน ทำให้กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายสิ่งมีชีวิต และการรักษาโรคเป็นไปได้ยาก จึงมักปรากฏอยู่เสมอว่าโรคระบาดที่เกิดจากเชื้อไวรัส มีความรุนแรงสูงและสร้างความเสียหายอย่างมิอาจประเมินค่าได้ ดังนั้นมาตรการควบคุมและป้องกันโรคที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

7.1. แนวทางการควบคุมโรค

7.1.1. ทางกายภาพ เป็นการควบคุมโรคระบาดโดยอาศัยปัจจัยทางกายภาพของสิ่งแวดล้อม เช่นอุณหภูมิ ความเค็ม และ pH เป็นต้น ซึ่งวิธีการดังกล่าวเป็นการสร้างสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ ลดการแพร่ระบาดได้ ซึ่งวิธีนี้อาจรวมถึงการสร้างสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Amend (1970) พบว่าสามารถป้องกันลูกปลาที่ติดเชื้อไวรัส IHNV ไม่ให้ตายได้โดยการเพิ่มอุณหภูมิน้ำที่อนุบาลลูกปลาให้สูงขึ้นโดยอยู่ที่ระดับ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 วัน แต่วิธีการดังกล่าวต้องดำเนินการภายใน 24 ชั่วโมงหลังการตรวจพบการติดเชื้อ ซึ่ง Wolf (1988) ได้ให้ความเห็นในกรณีดังกล่าวว่าการเพิ่มอุณหภูมิไม่ใช่เป็นการขจัดเชื้อไวรัส แต่การเพิ่มอุณหภูมิในระดับที่ลูกปลาสามารถทนได้เป็นการลดการแพร่ของเชื้อไวรัสลงและการเพิ่มอุณหภูมิควรต้องเพิ่มก่อนที่จะมีการติดเชื้อไวรัส

ในทำนองเดียวกัน Oseko และคณะ (1988)ได้ทำการทดสอบฉีดเชื้อ rhabdovirus ให้กับปลาซีกเดียว (Japanese flounder, *Paralichtys olivaceus*) และนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่าปลาที่เลี้ยงในระดับอุณหภูมิต่ำ 5-10 องศาเซลเซียส มีอัตราการตายสูง ซึ่งพบค่าการติดเชื้อไวรัสสูงสุดในปลาที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ในขณะที่ปลาซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดตายสูงสุดและไม่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส ซึ่งได้ข้อสรุปว่าอุณหภูมิสูงจะช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าอุณหภูมิต่ำ

7.1.2. ทางเคมี (chemical control) สารเคมีที่นิยมใช้ในการควบคุมการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสมี 2 กลุ่มคือ

7.1.2.1. คลอรีน (chlorine) อาจอยู่ในรูปของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรด์ (calcium hypochloride ซึ่งเป็นผง หรือสารคลอร็อก (chlorox) ซึ่งเป็นน้ำก็ได้

7.1.2.2. ไอโอดีน (iodine) ซึ่งอาจอยู่ในรูปของสารประกอบ เช่น โพวิโดนไอโอดีน (povidon iodine) หรือ ไอโอดีนเกล็ดซึ่งละลายได้ดีในแอลกอฮอล์

อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีดังกล่าว ส่วนใหญ่มีวัตถุประสงค์ เพื่อป้องกันหรือลดการแพร่กระจายของโรคเท่านั้น มิใช่เพื่อการรักษา ส่วนชนิดและปริมาณที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับข้อจำกัดทางสภาพแวดล้อม ขนาดและชนิดของสัตว์น้ำเป็นสำคัญ

7.2. แนวทางการป้องกันโรค

อาจกล่าวได้ว่าโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเป็นโรคที่มีความรุนแรงสูง และสร้างความเสียหายแก่ระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ถึงแม้จะมีการพัฒนาเทคนิควิธีการศึกษา การตรวจวินิจฉัยโรคอย่างมีประสิทธิภาพแล้วก็ตาม แต่การรักษาโรคยังคงทำได้ยาก เนื่องจากข้อจำกัดหลายประการ อย่างไรก็ตามปัจจุบันได้มีความพยายามในการพัฒนาเทคนิคการป้องกันโรคที่รู้จักในรูปของวัคซีนขึ้น เพื่อใช้ป้องกันการระบาดของโรคไวรัสในสัตว์น้ำ เช่นเดียวกับที่ได้ประสบความสำเร็จในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียมาแล้ว เช่น โรค furunculosis ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Aeromonas salmonisida* โรค enteric redmouth disease ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Edwardsiella tarda* และโรค vibriosis ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* sp. เช่น *Vibrio anguillarum* เป็นต้น (เจษฎา อินทุเศรษฐ, 2540)

วัคซีน คือเชื้อโรคที่ถูกทำให้อ่อนแอหรือเชื้อโรคที่ตายแล้ว ซึ่งเมื่อสัตว์น้ำได้รับเข้าไปจะสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิต้านทานต่อโรคชนิดนั้นๆ ซึ่งป้องกันมิให้ปลาป่วยเป็นโรคนั้นอีกเมื่อได้รับเชื้อดังกล่าวในครั้งต่อไป ปัจจุบันวัคซีนที่ใช้มีอยู่ด้วยกัน 2 ประเภทคือ

7.2.1. วัคซีนเชื้อตาย (killed vaccine หรือ inactivated vaccine) เป็นวัคซีนที่ผ่านการฆ่าเชื้อหรือองค์ประกอบของเชื้อโดยใช้ความร้อนหรือสารเคมี เช่น ฟอร์มาลีน (formalin) เป็นต้น

7.2.2. วัคซีนเชื้อเป็น (attenuated vaccine) ประกอบด้วยเชื้อที่มีชีวิตอยู่แต่ทำให้อ่อนฤทธิ์ลงไม่ทำให้เกิดโรครุนแรงเมื่อเข้าสู่ร่างกาย แต่สามารถเพิ่มจำนวนในตัวสัตว์และกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้

การให้วัคซีนแก่สัตว์น้ำมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น การฉีด การผสมอาหาร และการแช่ ซึ่งการให้วัคซีนโดยวิธีการใดนั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่าง ซึ่งปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ ชนิดของสัตว์น้ำ เนื่องจากสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อวิธีการให้วัคซีนที่แตกต่างกัน (เจษฎา อินทุเศรษฐ, 2540)

นอกจากนี้ยังมีข้อควรปฏิบัติอื่นๆ ในการป้องกันและควบคุมการระบาดของโรค ได้แก่

- ควรคัดเลือกลูกปลาที่มีสุขภาพดี แข็งแรง และปลอดโรค
- ใช้อาหารที่สด คุณภาพดี จากแหล่งที่ไม่มีการระบาดของโรค
- ปล่อยปลาในอัตราที่เหมาะสม

- ดูแลและจัดการสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม เช่น คุณภาพน้ำ การทำความสะอาดกระชังเพื่อให้น้ำสามารถไหลเวียนได้ดี ซึ่งช่วยกำจัดเศษเหลือของอาหารได้อีกทางหนึ่ง และควรกำหนดพื้นที่การเลี้ยง ความหนาแน่นของกระชังให้เหมาะสมกับศักยภาพของแหล่งน้ำ

- หลีกเลี่ยงฤดูกาลเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์จากปลากะพงขาว
2. เพื่อศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ที่ผลิตได้จากปลากะพงขาว
3. เพื่อประยุกต์ใช้เซลล์ในการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อไวรัส SIV
4. เพื่อประยุกต์ใช้เซลล์ในการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SIV สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค