บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เนื่องจากการเพิ่มของประชากรโลก ส่งผลให้ความต้องการอาหารโปรตีนเพิ่มมากขึ้น สัตว์น้ำเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่ดีของมนุษย์ แต่ทรัพยากรในแหล่งน้ำธรรมชาติลดน้อยลง ทำให้มีการพัฒนาและมีการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพิ่มมากขึ้น ปริมาณของผลผลิตสัตว์น้ำของโลกในปี 2545 มีปริมาณ 3.6 ล้านตัน ร้อยละ 84 ของผลผลิตทั้งหมดมาจากเอเชีย การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในเอเชียมีการขยายตัวร้อยละ 5 ต่อปี โดยเฉพาะการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นสินค้าส่งออกอันดับต้นๆ ของประเทศ แต่การเพาะเลี้ยงปลาก็เป็นอีกอุตสาหกรรมหนึ่งที่มีความสำคัญทั้งการเพาะเลี้ยงปลาทะเลและปลาน้ำจืด ผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกๆ ปี ปลาดุกนับเป็นปลาที่มีมูลค่าการผลิตสูง มีผลผลิตต่อพื้นที่สูงสุดและยังให้ผลผลิตต่อปีสูงสุดอยู่ในระดับ 1-3 ตลอดมา โดยมีผลผลิตเฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 40,000 ตันต่อปี (อุทัยรัตน์, 2544) ทั้งยังมีการส่งออกไปยังประเทศเพื่อนบ้าน ได้แก่ ลาว พม่า มาเลเซีย และอินโดนีเซียอีกด้วย โดยปกติประเทศไทยนิยมเลี้ยงในพื้นที่ปิด เลี้ยงแบบหนาแน่น (Intensive) ให้อาหารที่มากเกินไป ด้วยความพยายามที่จะเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ เพื่อหวังผลตอบแทนที่คิดว่าคุ้มค่า จึงส่งผลกระทบต่อสุขภาพของปลาที่เลี้ยง ลักษณะทางสรีระวิทยา และยังทำให้สามารถติดเชื้อได้ง่าย จึงทำให้ปลาดุกพันธุ์ผสมที่เลี้ยงมีปัญหาเรื่องโรคเพิ่มมากขึ้นก่อให้เกิดความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เลี้ยง และอาจส่งผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจ โรคหนึ่งที่ค้นพบเมื่อไม่นานมานี้ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในปลาดุกพันธุ์ผสมที่ใดมาก่อนคือ โรคที่เกิดจากเชื้อปรสิต trypanosome ตรวจพบโดยศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Trypanosome เป็นปรสิตที่พบในกระแสเลือด (blood parasite) ทำให้ปลามีอาการเหงือกซีด ตาลึก ตัวผอม เสียการทรงตัว ว่ายน้ำเฉียงๆ หรือว่ายน้ำวนรอบตัว การติดต่อจากสัตว์หนึ่งไปอีกสัตว์หนึ่งโดยปลิงเป็นพาหะนำเชื้อ ปลาที่ติดเชื้อปรสิตชนิดนี้อาจเกิดการอุดตันของเส้นเลือดฝอย (ปภาศิริ, 2538 และ ประไพสิริ, 2538) และเกิดโรคโลหิตจาง (สุนทร, 2537) เนื่องจากยังไม่มีรายละเอียดเกี่ยวกับการติดโรคปรสิต trypanosome ชนิดนี้ในปลาดุกพันธุ์ผสมมากนัก และจากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า ปรสิตชนิดนี้ส่งผลให้เกิดการตาย โดยอาการของโรคส่วนใหญ่ไม่ได้แสดงออกทางลักษณะภายนอกที่เห็นได้ชัดเหมือนการติดเชื้อแบคทีเรียและการรักษาก็ยังไม่มี

รายงานเมื่อเทียบกับการติดเชื้อชนิดอื่น เนื่องจากการรักษาโรคสัตว์น้ำมีการนำสารเคมีหลายชนิดมาใช้ ในการเพาะเลี้ยงปลามากว่า 20 ปีแล้ว จึงทำให้การใช้ยาต้านเชื้อจุลินทรีย์กลายมาเป็นปัญหาหลัก โดยยาปฏิชีวนะส่งผลให้เกิดการตกค้างของสารเคมีต่างๆ ทั้งในสิ่งแวดล้อมและในตัวสัตว์น้ำเอง ยาที่ตกค้างเหล่านี้อาจจะถ่ายทอดมาสู่มนุษย์ได้ และถูกจำกัดการใช้จากนักอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมในหลายประเทศเพราะเกรงว่าเชื้อโรคอาจมีการพัฒนาสายพันธุ์เพื่อต้านทานยาปฏิชีวนะ (Kruse and Sorum, 1994)ในปัจจุบันจึงมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรือการใช้วิธีทางชีวภาพ ได้แก่ การใช้จุลินทรีย์ ส่วนใหญ่ใช้ในการบำบัดน้ำและใช้เป็นโปรไบโอติก (probiotic) และการใช้วัคซีน

การศึกษาการผลิตวัคซีนเพื่อนำวัคซีนที่ผลิตได้มาใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาต่อเชื้อปรสิต นับได้ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่งในการป้องกันและควบคุมการระบาด และยังเป็นการลดการใช้ยาปฏิชีวนะลงด้วย เนื่องจากที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาการผลิตวัคซีนต่อปรสิต trypanosome ดังนั้นจึงทำการทดลองศึกษาการใช้แอนติเจนที่เตรียมจากตัวปรสิต trypanosome ไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาดุกพันธุ์ผสม เพื่อที่จะพัฒนาใช้เป็นวัคซีน และทำการศึกษาภูมิคุ้มกันในปลาภายหลังจากการได้รับแอนติเจน อีกทั้งได้ทำการศึกษาการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody) ต่อปรสิต trypanosome เพื่อใช้ในการทดสอบหาแอนติเจนของปรสิต trypanosome ในซีรัมปลา ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบปรสิตอีกวิธีหนึ่ง และเป็นการยืนยันว่าแอนติเจนที่ใช้สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในกระต่ายได้ โดยวิธีนี้จะสามารถตรวจสอบได้รวดเร็วและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปฏิบัติภาคสนามได้สะดวกกว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์ โดยการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นพื้นฐานของการศึกษาทางด้านระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ และนอกจากนี้ยังจะสามารถนำไปพัฒนาการศึกษาต่อไปในอนาคต รวมทั้งเป็นแนวทางในการลดอัตราการตายและเพื่อให้การเลี้ยงปลาชนิดนี้มีการพัฒนามากยิ่งขึ้น

การตรวจเอกสาร

1. Trypanosome

1.1 อนุกรมวิธานและลักษณะทั่วไป

Phylum Protozoa

Class Flagellata

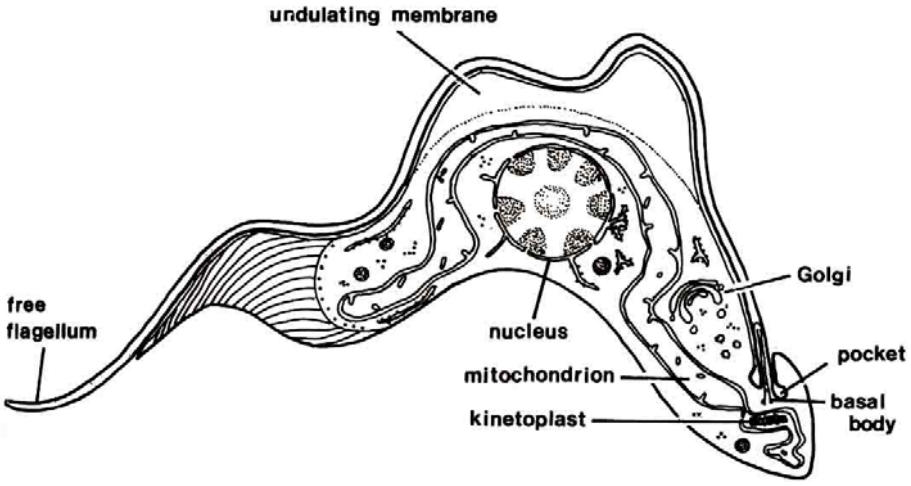
Order Protomonadina

Family Trypanosomatidae

Genus *Trypanosoma*

Trypanosome เป็นปรสิตที่พบในกระแสเลือด (blood parasite) มีลักษณะลำตัวเรียวยาว มีรูปร่างคล้ายใบไม้ มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ 1 อัน อยู่ตรงกึ่งกลางเซลล์ มีแฟลกเจลลา (flagella) 1 อัน โดยมีไคนีโตพลาสต์ (kinetoplast) เป็นจุดกำเนิดของแฟลกเจลลา จากจุดนี้มีเนื้อเยื่อบางๆ คล้ายครีบอยู่ตามด้านข้างของลำตัวเรียกแผ่นเยื่อบางๆ นี้ว่า อันดูเลตติ้ง เมมเบรน (undulating membrane) และมีแฟลกเจลลาทอดไปตามขอบนอกของอันดูเลตติ้ง เมมเบรน และส่วนปลายยื่นยาวออกไปเป็นเส้นนอกลำตัวทางส่วนหน้า เรียกว่า free flagella (Uilenberg, 1998)และบริเวณใกล้ฐานของแฟลกเจลลามีก้อนเล็กๆ เรียก ไคนีโตพลาสต์ อันดูเลตติ้ง เมมเบรนและแฟลกเจลลาทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่ ปลายด้านที่มีแส้จะแหลม อีกด้านหนึ่งค่อนข้างมนหรือแหลม มีขนาดความยาวลำตัวประมาณ 23-24 ไมครอน แฟลกเจลลายาวประมาณ 17-18 ไมครอน ขึ้นกับชนิด (รูปที่ 1) มีรูปร่างหลายแบบตามสภาพแวดล้อมที่อยู่ มีการขยายพันธุ์ด้วยการแบ่งตัวเป็นสองส่วน (binary fission) หรือแบ่งตัวซ้ำหลายครั้ง (ประไพสิริ, 2538 และปภาศิริ, 2538) การแบ่งเซลล์เป็นแบบไมโตซีส (mitosis) เริ่มจากสร้างแฟลกเจลลาเส้นใหม่ตามด้วยไคนีโตพลาสต์ และมีการแบ่งนิวเคลียส หลังจากแบ่งนิวเคลียส นิวเคลียส 1 อันจะเคลื่อนที่ไปทางด้านหลัง (posterior) จากนั้นเกิดการแบ่งเซลล์ตามแนวยาวโดยเริ่มจากส่วนหน้า (anterior) ส่วนใหญ่เป็นการแบ่งเซลล์แบบไม่เท่ากัน เซลล์ลูกที่เกิดใหม่มีขนาดเล็กกว่า ภายในแกรนูล (granules) มีไขมันอยู่ แต่ไม่พบพวกโพลีแซกคาไรด์ (polysaccharides) ส่วนตัวอ่อนของ trypanosome พบว่าภายในไซโตพลาสมิคแกรนูล (cytoplasmic granules) มีเอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatases) ภายในนิวเคลียสประกอบด้วย กรดนิวคลีอิค (nucleic acid) trypanosome เคลื่อนที่คล้ายตัวหนอน (Lom and Dykova, 1992) เคลื่อนที่ไปข้างหน้า โดยใช้การยืดหดของแฟลกเจลลาและอันดูเลตติ้ง เมมเบรน การเคลื่อนที่มีลักษณะพริ้วเป็นลอน อาหารของปรสิตชนิดนี้ได้แก่ น้ำเลือด น้ำเหลือง (lymph) และของเหลวต่างๆ ในไขสันหลัง รวมถึงส่วนที่เน่าเปื่อยและย่อยสลายของเซลล์เจ้าบ้าน

trypanosome ทำให้ปลามีอาการเหงือกซีด ตาลึก ตัวผอม เสียการทรงตัว ว่ายน้ำเฉียงๆ หรือว่ายน้ำวนรอบตัว การติดต่อจากสัตว์หนึ่งไปอีกสัตว์หนึ่งมีปลิงเป็นพาหะนำเชื้อ ปลาที่ติดเชื้อปรสิตชนิดนี้อาจเกิดการอุดตันของเส้นเลือดฝอย และเกิดโรคโลหิตจาง (ปภาศิริ, 2538 และ ประไพศิริ, 2538)



รูปที่ 1 ลักษณะและโครงสร้างทั่วไปของปรสิต trypanosome
ที่มา : Molyneux และ Ashford (1983)

1.2 การแพร่กระจาย

สามารถพบปรสิตชนิดนี้ได้ทั่วไปหลายแหล่งทั่วโลก เช่น ทวีปแอฟริกา อังกฤษ เวลซ์ เยอรมัน ฝรั่งเศส ไอร์แลนด์ นิวซีแลนด์ แอตแลนติกเหนือ บราซิล อเมริกา เม็กซิโก อินเดีย จีน อาร์เจนตินา รวมทั้งประเทศไทย

trypanosome เป็นปรสิตที่พบภายในร่างกายของเจ้าบ้านที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังทั้งหมดเป็นพวก extracellular เจริญอยู่ในระบบไหลเวียนของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยมีความถี่ในการพบสูง แต่ความหนาแน่นในการติดเชื้อต่ำ (Overath *et al*., 2001) และสามารถพบปรสิตชนิดนี้ได้ในกระแสเลือดและในเนื้อเยื่อของสัตว์มีกระดูกสันหลังเช่น ลำไส้ส่วนหน้า น้ำเหลือง ระบบประสาทส่วนกลาง ระบบทางเดินอาหาร (digestive tract) และต่อมน้ำลายของพาหะ ซึ่งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่นแมลง ปลิง (*Piscicola geometra* และ *Hemiclepsis marginata*) (Lom and Dykova, 1992) แต่ส่วนใหญ่พบในกระแสเลือดมากกว่า ปรสิตชนิดนี้จะก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์หลายชนิด ทำให้เกิดโรคเหงาหลับ (sleeping sickness) ในมนุษย์เช่น

Trypanosoma cruzi T. brucei T. gambiense และ *T. rhodesiense* เป็นต้น (Uilenberg, 1998) ในวัวควายที่ติดเชื้อปรสิต trypanosome เรียก Nagana (Overath *et al*., 2001; Baetselier *et al*., 2001) เช่น *T. vivax* และ *T. evansi* เป็นต้น การติดเชื้อปรสิตชนิดนี้มียุงเป็นพาหะ Overath (2001) กล่าวว่าระยะ amastigotes ของ *T. cruzi* จะแบ่งตัวในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian) ส่วนระยะ trypomastigote จะไม่แบ่งตัวในกระแสเลือด (extracellular) นอกจากนี้ Barta และ Desser (1984) ได้มีการตรวจพบ *T. fallisi* ในคางคกที่อเมริกาเป็นครั้งแรกในปี 1984 ปรสิตชนิดที่พบในปลา สามารถพบได้ทั้งในปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม แต่ทั่วไปจะพบในปลาน้ำจืด trypanosome น้ำจืดมีลักษณะรูปร่างเรียวยาว ไคนีโตพลาสต์อยู่ทางด้านปลายหรือค่อนไปทางปลาย มี free flagellum ยาว ส่วนการพัฒนาในปลิงจะพบระยะ epimastigote บ่อยครั้ง แต่ระยะ sphaeromastigote พบน้อย ปรสิต trypanosome ในปลาน้ำเค็มแตกต่างจากในปลาน้ำจืดตรงระยะการแบ่งตัวในปลิงพาหะ ในน้ำเค็มจะแบ่งตัวในระยะ amastigote ส่วนในน้ำจืดแบ่งตัวในระยะ epimastigote ปรสิต trypanosome ที่พบในปลาน้ำจืด แสดงในตารางที่ 1 และ ในปลาน้ำเค็ม แสดงในตารางที่ 2 ปรสิต trypanosome ในประเทศไทยสามารถพบได้ในปลาแรด จากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม (สุนทร, 2537.) ปลาช่อน (*Ophiocephalus stristus*) และปลากระดี่ (*Trichogaster trichopterus*) ที่ได้จากกรุงเทพฯ (Pearse, 1933; อ้างโดย Kabata 1985) แต่ trypanosome ที่ก่อโรคในปลาดุกพันธุ์ผสมที่พบโดยศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์นั้นยังไม่ได้จัดจำแนกสปีชีส์

ตารางที่ 1 ปรสิต trypanosome ที่พบในปลาน้ำจืด

ชื่อ	ชนิดของปลา	ขนาด (ไมครอน)	เอกสารอ้างอิง
T. danilewskyi	ปลาตะเพียน ปลาไน ปลาทอง (*Carassius auratus*) และ ปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*)	40	ประไพสิริ (2538); Nazrul และ Woo (1991)
T. carassii	ปลาคาร์พ (carp) และ ปลาทอง (*Carassius carassius*)	ยาว 21 กว้าง 2.3	Lom และคณะ (1986); Overath และคณะ (2001)
T. wincheniense	ปลาคาร์พในประเทศอังกฤษที่ส่งมาจากประเทศเยอรมัน (*Cyprinus carpio* L.)	-	Qadri (1962)
T channai	ปลา*Channa punctata* ประเทศอินเดีย	ยาว 23-44 กว้าง 1.5-9.6	Narasimhamurti และ Saratchandra (1980)
T. striati	ปลาช่อน (*Ophiocephalus striatus*) ประเทศอินเดีย และประเทศไทย	ยาว 32-54 กว้าง 2-8	Qadri (1955)
T.punctati	ปลา *Ophiocephalus punctatus*	ยาว 34 กว้าง 1.2	Hasan และ chasim (1962)
T. granulosum	ปลาไหลญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*) ปลาไหลยุโรป (*Anguilla anguilla*)	ยาว 20-80 กว้าง 2-4	Eiras (1988) ; Ribeiro และคณะ (1996) Davies และคณะ (1995) ; Zintl และคณะ (2000)
T. cobitis	ปลา *Misgurnus fossilis* และ ปลา *Noemacheilus barbatulus* ในยุโรป	ยาว 25-40 กว้าง 2-4.5	Snieszko และ Axelrod (1971)
T. catostomi	ปลา *Catostomus commersoni*	49.6	Daly และ De Guisti (1971)
T. minutum	ปลา *Erythroculter dabryi* ในประเทศจีน	ยาว 25 กว้าง 5	Chen และ Hsieh (1964)

ตารางที่ 2 ปรสิต trypanosome ที่พบในปลาน้ำเค็ม

ชื่อ	ชนิดของปลา	ขนาด (ไมครอน)	เอกสารอ้างอิง
T. rajae	ปลากระเบนน้ำเค็มสกุล Raja หลายชนิด *Taeniura lymna* (Forskal)	30-35	ประไพสิริ (2538)
T. granulosum	ปลาตูหนา (*Anguillu vulgaris*)	70-80	ประไพสิริ (2538)
T. giganteum	ปลากระเบน (*Raja oxyrhynchus*)	125-130	ประไพสิริ (2538)
T. muramanensis	ปลาคอด (*Gadus morhua*) ระยะ juvenile	-	ประไพสิริ (2538)
T. remaki	ปลา *Esox lucius*	-	ประไพสิริ (2538)
T. percae	ปลา *Perca fluviatilis*	45-50	ประไพสิริ (2538)
T. platamusi	ในปลากระบอก (*Mugil cephalus limmaeus*)	-	Eiras (1988); Ribeiro และคณะ (1996)
T. heptatretus	ปลา hagfish (*Heptatretus cirrhatus*) ในประเทศนิวซีแลนด์	ยาว 56-98 กว้าง10-26	Laird (1951)

1.3 อาการ

โรคที่เกิดจากปรสิต trypanosome นี้มีชื่อทั่วไปว่า Trypanosomiasis ซึ่งอาการของโรคจะไม่รุนแรงมากนัก ในระยะแรกของการติดเชื้อ แต่จะรุนแรงมากขึ้นเมื่อปรสิตเพิ่มจำนวน ซึ่งจะทำให้ปลาอ่อนแอ (สุนทร, 2537) ตัวผอม กินอาหารน้อยลง แสดงอาการขาดออกซิเจน บางครั้งปรสิตจะไปอุดตันบริเวณเส้นเลือดฝอย ทำให้เห็นเป็นตุ่มพองบริเวณครีบและผิวหนัง (ปภาศิริ, 2538 และ ประไพสิริ, 2538) Lom และ Dykova (1992) รายงานอาการทั่วไปของปลาที่เป็นโรคนี้ คือ มีอาการเหงือกซีด ว่ายน้ำเสียการทรงตัว และตัวที่ว่ายน้ำปกติจะพยายามลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำ นอกจากนั้นยังพบว่าปรสิตมีผลทำให้เกิดอาการอุดตันของเส้นเลือดฝอย ปลาตายได้เนื่องจากเส้นเลือดอุดตันและโลหิตจางประกอบกับปริมาณออกซิเจนในเลือดต่ำ มีการเปลี่ยนแปลงค่าต่างๆ ในเลือด เช่นค่าฮีมาโตคริต (haematocrit) ปริมาณซีรัมโปรตีน (serum protein) ลดลง จำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นแต่จำนวนเม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบิน (haemoglobin) ลดลง ปริมาณ globulin ในซีรัมเพิ่มขึ้น เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจจะเป็นแบบชั่วคราวหรือถาวรก็ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับของกรดแอสคอบิค (ascorbic acid) ในเลือดลดลง และของแอลโดเลส (aldolase) ในซีรัมเพิ่มขึ้น (Sharma and Saxena, 2001) และมีอาการ hypocholesterolemia (Tandon and Chandra, 1977) และสัตว์ที่ติดเชื้อปรสิต trypanosome มีการเปลี่ยนแปลงทาง

ชีวเคมีและพฤติกรรมภายในเวลา 24 ชั่วโมง (Ashman and Seed, 1973; Seed and Khalili, 1971; Seed and Varney, 1976 อ้างโดย Seed, 2001)

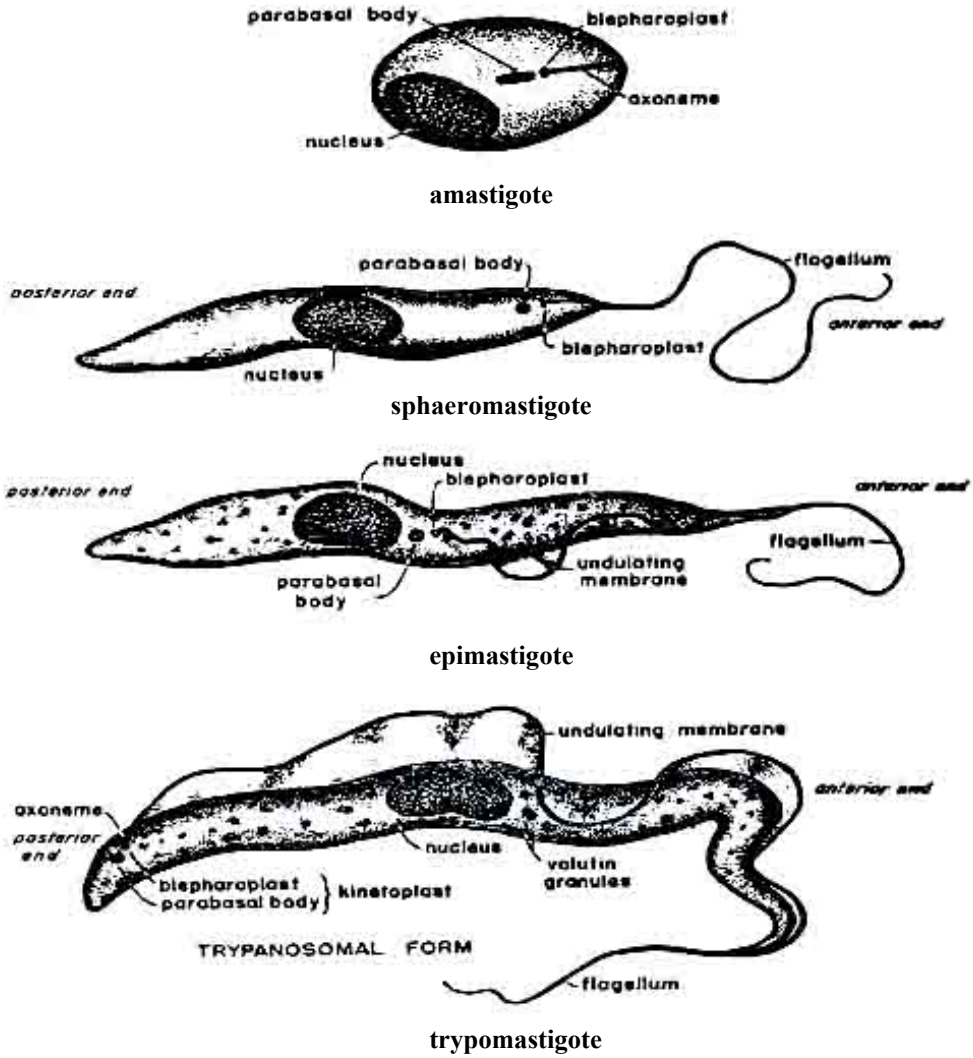
1.4 วงจรชีวิต

วงจรชีวิตของ trypanosome ปลา ที่พบในปลิงพาหะ (Lom and Dykova, 1992) จะพบปรสิตในทางเดินอาหาร (*Piscicola geometra* และ *Hemiclepsis marginata*) พบระยะต่างๆ ดังนี้ (ดังรูปที่ 2)

1. Amastigote
   - trypanosome ที่พบมีรูปร่างกลม หรือ รูปไข่ (Oval) มีขนาดต่างๆ กันแล้วแต่ชนิด
   - ไคนีโตพลาสต์ และ axoneme อยู่ด้านหน้านิวเคลียส
   - ไม่มี free flagellum และ อันดูเลตติ้ง เมมเบรน
2. Sphaeromastigote
   - รูปร่างยาวแบบ spindle shape (Molyneux and Ashford, 1983)
   - ลักษณะอื่นๆ เหมือนในระยะ amastigote แต่มี free flagellum 1 อันยื่นออกมานอกตัวจากด้านหน้าของ axoneme
3. Epimastigote (promastigote)
   - รูปร่างยาวแบบระยะ sphaeromastigote และลำตัวโค้งงอบิดเบี้ยวเล็กน้อยตามแนวยาวของลำตัว
   - ไคนีโตพลาสต์ และ axoneme ยังคงอยู่ด้านหน้านิวเคลียส
   - free flagellum คงมีอยู่เหมือนในระยะ sphaeromastigote
   - มี อันดูเลตติ้ง เมมเบรน เพิ่มขึ้นในระยะนี้ และอยู่ด้านหน้านิวเคลียส
4. Trypomastigote
   - รูปร่างยาวและใหญ่กว่าระยะ epimastigote
   - ไคนีโตพลาสต์, axoneme และ อันดูเลตติ้ง เมมเบรน ถอยร่นไปอยู่ด้านหลังนิวเคลียส

จากการศึกษาของ Martin และ Desser (1991) เกี่ยวกับระยะต่างๆ ของ *T. fallisi* ในปลิง (*Desserobdella picta*) พบว่า รูปร่างของไคนีโตพลาสต์เปลี่ยนแปลงได้แต่ปกติเป็นรูปสี่เหลี่ยมมุมฉาก ตรวจพบระยะ trypomastigotes ที่มีรูปร่างยาวเรียว (slender trypomastigotes หรือ slender form) ในอวัยวะปลิงทุกส่วนหลังจากได้รับปรสิต 4 วัน Lom และ Dykova (1992) รายงานว่า ปรสิตชนิดนี้มีการแบ่งตัวบริเวณกระเพาะอาหาร (crop) และ caeca ในขณะที่ metacyclic trypomastigote ไม่แบ่งตัวและสะสมอยู่บริเวณ proboscis sheath

การถ่ายเชื้อปรสิตสู่ตัวปลา เริ่มจากปลิงที่มีเชื้อปรสิตดูดเลือดปลาที่ไม่มีเชื้อ ในขณะดูดเลือดจะมีการถ่ายเลือดเกิดขึ้น ทำให้ปรสิตเข้าไปสู่ตัวปลา โดยระยะที่ติดเชื้อจะอยู่ในระยะ metacyclic trypomastigote หรือเรียกว่า metacyclic forms

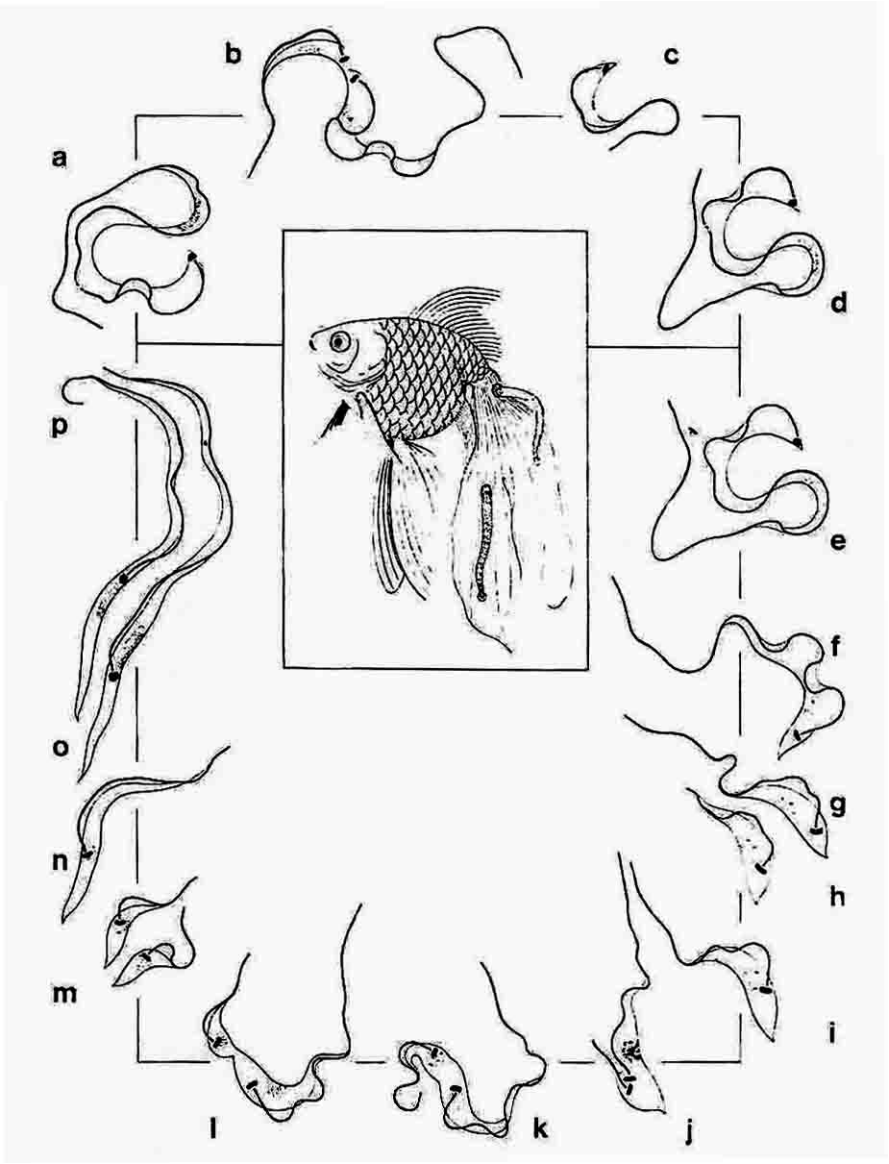


รูปที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ trypanosome ในระยะต่างๆ
ที่มา : Stover, 1965

วงจรชีวิตของ trypanosome ในปลามี 4 ระยะ (Lom and Dykova, 1992) ดังนี้ (รูปที่ 3)

1. prepatent period: ประมาณ 2-9 วันหลังจากถูกปลิงกัด เริ่มพบ flagellate ในกระแสเลือด
2. second phase-patent (parasitemia): มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในกระแสเลือด ปรสิตอาจแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากจนเป็นสาเหตุที่ทำให้เจ้าบ้านตายได้
3. indefinite period (chronic phase): เนื่องจากร่างกายของปลาสร้างภูมิคุ้มกันต่อปรสิต ทำให้ปรสิตในกระแสเลือดลดลง ระยะนี้จะไม่พบ parasitemia
4. final phase: ปรากฏ flagellates ที่สมบรูณ์ในเลือดปลา

สำหรับในปลาจะพบเฉพาะระยะ trypomastigote เท่านั้น มีการแบ่งตัวในเลือดและช่องว่างของเนื้อเยื่อ บางครั้งพบในอวัยวะขับถ่ายของตัวอ่อน อวัยวะช่วยหายใจ (pseudobranchia) และ rete mirabilis ของตา ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ trypanosome ในตัวปลา ได้แก่ ความเครียด การขาดแคลนอาหาร ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ ฤดูกาล ส่วนในแง่ของระบบภูมิคุ้มกันต่อตัวปลา การติดเชื้อปรสิตพบว่ามีภูมิคุ้มกันแบบ non-sterile immunity มากกว่าแบบ sterile immunity แต่มีรายงานเพียงไม่กี่ฉบับเท่านั้นที่กล่าวว่าในปลามีแอนติบอดีต่อปรสิต trypanosome วงชีวิตของปรสิตที่พบในปลาจะมีปลิงเป็นเจ้าบ้านตัวกลาง (intermediate host) (Jones and Woo, 1992)



รูปที่ 3 วงจรชีวิตของ *T. carassii* : a-d เป็นรูปร่างที่อยู่ในกระแสเลือด (bloodstreamforms) ; a คือระยะ metacyclic trypomastigotes; e-p เป็นการแบ่งตัวในปลิง; i คือระยะ epimastigote; o,p คือ long forms ของระยะ metacyclic trypomastigotes

ที่มา : Jone และ Woo (1992)

2. ปลาดุกพันธุ์ผสม

2.1 แหล่งกำเนิดและถิ่นอาศัย

ปลาดุกมีแหล่งกำเนิดอยู่ทั่วไปในน่านน้ำจืดในเขตร้อนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินเดีย พม่า ลาว ไทย กัมพูชา เวียดนาม อินโดนีเซีย และหมู่เกาะบอร์เนียว ฟิลิปปินส์ สำหรับในประเทศไทยถิ่นอาศัยของปลาดุกจะอยู่ตามลำคลอง หนอง บึง ทั่วทุกภาค (สรรค์, 2543) โดยธรรมชาติปลาดุกจะอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำซึ่งพื้นดินเป็นโคลนที่มีน้ำจืดสนิท และในแหล่งที่มีน้ำเพียงเล็กน้อยก็สามารถพบปลาดุก ทั้งนี้เพราะปลาดุกมีอวัยวะพิเศษที่ช่วยในการหายใจ จึงสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะน้ำที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย หรือในบริเวณน้ำกร่อยปลาดุกก็สามารถอาศัยอยู่ได้

2.2 ลักษณะทั่วไปของปลาดุก

ปลาดุกจัดอยู่ในครอบครัวแคริไอดี (Family Clariidae) ลักษณะทั่วไปเป็นปลาไม่มีเกล็ด รูปร่างยาวเรียว ลำตัวมีสีค่อนข้างเหลืองจนถึงสีเทาปนดำ อาจมีจุดประตามลำตัวหรือไม่มีก็ได้ ส่วนหัวแบน มีหนวด 4 คู่อยู่ที่ริมฝีปาก ซึ่งสามารถรับความรู้สึกต่างๆ ได้ดี ดังนั้นปลาดุกจึงใช้หนวดมากกว่าใช้ตาเมื่อหาอาหารตามหน้าดิน ขนาดของนัยน์ตาดูเล็กผิดส่วนเมื่อเทียบกับขนาดลำตัว ริมฝีปากบนยาวกว่าริมฝีปากล่าง มีรูจมูก 2 คู่ คู่หน้าเป็นท่อสั้นๆ อยู่หลังริมฝีปากบน ส่วนคู่หลังอยู่ติดกับหนวด ที่ส่วนหัวมีแผ่นกระดูกบางๆ ต่อกันเป็นชิ้นๆ ปกคลุมทั้งด้านบนและด้านล่าง ภายในกระโหลกศรีษะมีอวัยวะช่วยในการหายใจเรียกว่า อะโบเรสเซนต์ ออร์แกน (aborescent organ) มีลักษณะคล้ายพุ่มไม้สีขาว ช่วยให้ปลาดุกมีความอดทน สามารถอยู่ในที่ไม่มีน้ำหรือน้ำน้อยๆ ได้นาน ฟันเป็นซี่เล็กๆ รวมกันอยู่เป็นแถบ หนังปิดช่องเหงือกไม่ติดกับส่วนของซอกคอ กระดูกซี่กรองเหงือกมีจำนวน 13–30 อัน ครีบหลังไม่มีกระโดง ฐานครีบหลังยาวเกือบตลอดส่วนหลังอาจติดหรือไม่ติดกับครีบหาง และมีก้านครีบเล็กอยู่ประมาณ 48-106 อัน ครีบท้องยาวไม่มีกระโดงและมีก้านครีบ 6 อันรวมกันเป็นแถบ ฐานครีบก้นยาวมากกว่าครึ่งของฐานครีบหลัง มีเฉพาะก้านครีบเล็กๆ ประมาณ 40-95 อัน ครีบอกมีอยู่ทั้งซ้ายและขวาแต่ละข้างมีก้านครีบแข็งข้างละ 1 อัน เรียกว่า pectoral spine มีลักษณะสำคัญคือ อาจจะหยักเฉพาะด้านหน้าด้านเดียวหรือทั้งสองด้าน ซึ่งปลาดุกใช้เป็นอาวุธป้องกันตัว ส่วนครีบหางมีลักษณะแบนกลม (ประสิทธิ์, 2539)

ปลาดุกพันธุ์ผสม (hybrid catfish, *Clarias macrocephalus* Gunther x *Clarias gariepinus* Burchell) (Boonyaratpalin and Phromkunthong, 2001) เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) เพศผู้และปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) เพศเมีย (Tonguthai *et al*., 1993) สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดได้ดำเนินการศึกษาปลาดุกชนิดหนึ่ง

ซึ่งเกษตรกรนำเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทย พบว่าเป็นปลาในตระกูลปลาไม่มีเกล็ด (catfish) เช่นเดียวกับปลาดุกอุย แต่มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกามีชื่อว่า *Clarias gariepinus* (African sharptooth catfish) ต่อมาได้มีการนำเข้ามาในประเทศแถบทวีปยุโรปกันมาก โดยเฉพาะในประเทศเนเธอร์แลนด์ได้มีการทดลองเพาะขยายพันธุ์ (Van der Waal, 1985) ส่วนในประเทศไทยได้มีการเพาะเลี้ยงปลาดุกอัฟริกันในปี 2532 ในการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาดุกอุยและปลาดุกอัฟริกัน พบว่าลูกปลาที่เกิดจากแม่พันธุ์ปลาดุกอุยผสมกับพ่อพันธุ์ปลาดุกอัฟริกัน มีอัตราการฟักและรอดตายร้อยละ 84.5 ซึ่งดีกว่าการใช้พ่อพันธุ์ปลาดุกอุยผสมกับแม่พันธุ์ปลาดุกอัฟริกัน (สุจินต์ และคณะ, 2533) ดังนั้นปลาดุกพันธุ์ผสม จึงมีลักษณะของปลาดุกอุยและปลาดุกอัฟริกันรวมกันกล่าวคือ มีนิสัยอยู่กึ่งกลางระหว่างปลาดุกทั้งสองพันธุ์นี้ มีลักษณะภายนอกและนิสัยการกินอาหารคล้ายกับปลาดุกอุยมาก มีผิวค่อนข้างเหลือง โดยเฉพาะลำตัวและหาง เมื่อยังเล็กจะเห็นลายจุดประ สีขาวของปลาดุกอุยชัดเจนมาก เรียงขวางลำตัวด้านบนเป็นแถวๆ แต่ละแถวห่างกันมากกว่าปลาดุกอุยแต่จำนวนแถวน้อยกว่า แต่เมื่อโตขึ้นจุดประนี้จะหายไป ส่วนกระโหลกศรีษะท้ายทอยจะแหลมเป็นหยัก 3 หยักเช่นเดียวกับปลาดุกยักษ์ หัวมีขนาดใหญ่ และคอดหางมีจุดประสีขาวเรียงตามขวางในระยะที่ปลายังเล็ก ลำตัวมีสีเทาอมเหลืองและมีลักษณะด่างๆ ส่วนท้องใต้หัวถึงครีบท้องแนวกลาง ลำตัวเป็นสีขาว ด้านข้างเป็นสีเหลืองครีบอกมีก้านครีบใหญ่แข็งแรงหนึ่งอันยาวไม่เกินก้านครีบอ่อน ระบบทางเดินอาหารและอวัยวะต่างๆ พัฒนาสมบรูณ์เหมือนตัวเต็มวัยตั้งแต่อายุประมาณ 6-7 วัน เมื่ออายุมากขึ้นการพัฒนาของอวัยวะต่างๆ จะเพิ่มในด้านขนาดเท่านั้น (จงดี และคณะ, ม.ป.ป.) เป็นปลาที่เลี้ยงง่าย ทนทานต่อโรคพยาธิและสภาพแวดล้อมได้เป็นอย่างดีเช่นเดียวกับปลาดุกยักษ์ แต่มีเนื้อคล้ายปลาดุกอุยคือ เนื้อออกสีเหลือง นุ่ม รสชาติอร่อย กินอาหารได้แทบทุกชนิด เลี้ยงได้น้ำหนักมากในระยะเวลาอันสั้น ทำให้สามารถเลี้ยงได้หลายรุ่นในรอบ 1 ปี มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วมาก ในช่วงระยะเวลาการเลี้ยง 2–2.5 เดือน จะได้น้ำหนักประมาณ 200–300 กรัมต่อตัว หรือขนาด 4–5 ตัวต่อกิโลกรัม (ประสิทธิ์, 2539) โดยทั่วไปปลาดุกพันธุ์ผสมตัวเต็มวัยสีสันคล้ายปลาดุกอุยมาก สังเกตจากกะโหลกศรีษะซึ่งค่อนข้างตะปุ่มตะป่ำและหยักแหลม ปลาเล็กนั้นสังเกตความแตกต่างค่อนข้างยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างปลาดุกยักษ์กับปลาดุกพันธุ์ผสม (อุทัยรัตน์, 2538) การศึกษาเปรียบเทียบการเกิดอวัยวะและลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลาดุกลูกผสม (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) และปลาดุกอัฟริกันตั้งแต่อายุ 1-14 วัน พบว่ารูปร่างลักษณะภายนอกของปลาดุกอัฟริกันในช่วงวันที่ 1-2 มีการพัฒนาเร็วกว่าปลาดุกพันธุ์ผสมโดยเฉพาะในด้านขนาด ปลาดุกอัฟริกันมีขนาดใหญ่กว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่มีอายุเท่ากัน ส่วนการพัฒนาของอวัยวะและลักษณะ

ทางเนื้อเยื่อคล้ายกัน (จงดี และคณะ, ม.ป.ป.) ฤดูผสมพันธุ์ของปลาดุก อยู่ระหว่างเดือนมีนาคม–ตุลาคม ปลาดุกเพศเมียซึ่งใช้ปลาดุกอุย (Gunther catfish) เป็นแม่พันธุ์อายุที่เหมาะสมประมาณ 7-12 เดือน หรือน้ำหนักประมาณ 150-200 กรัม ส่วนปลาดุกเพศผู้ซึ่งใช้ปลาดุกอัฟริกัน (African catfish) ควรมีอายุน้อยกว่า 7 เดือน โดยทั่วไปปลาเจริญเติบโตเต็มที่ (mature) ที่อายุ 3-4 เดือน (Tonguthai *et al*., 1993) ฟาร์มเลี้ยงปลาดุกส่วนใหญ่อยู่ในภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดอ่างทอง สิงห์บุรี ฉะเชิงเทรา ปทุมธานี กรุงเทพฯ สมุทรปราการ เพชรบุรี ราชบุรี นครปฐม ภาคเหนือเป็นแหล่งที่เลี้ยงปลาดุกมากรองลงมาโดยเฉพาะอย่างยิ่งภาคเหนือตอนล่าง ได้แก่ จังหวัดนครสวรรค์ ชัยนาท อุทัยธานี สุโขทัย พิจิตร กำแพงเพชร พิษณุโลก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีเลี้ยงบ้างในจังหวัดศรีสะเกษ นครราชสีมา บุรีรัมย์ กาฬสินธุ์ เพชรบูรณ์ ส่วนภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดสตูล ปัตตานี ตรัง นครศรีธรรมราช สงขลา ระนอง และพังงา (ประสิทธิ์, 2539)

2.3 นิสัยการกินอาหาร

โดยปกติแล้วปลาดุกที่อาศัยอยู่ในแหล่งธรรมชาติมีนิสัยหากินตามพื้นหน้าดิน กินอาหารจำพวกตัวอ่อนของแมลงน้ำ ไรน้ำ แมลง กุ้ง และปลาเล็กๆ โดยใช้หนวดรับความรู้สึกมากกว่าตา ในการหาอาหาร นอกจากนี้ปลาดุกยังชอบกินอาหารประเภทโปรตีนที่เน่าเปื่อย แต่เมื่อนำปลาดุกมาเลี้ยงสามารถนำมาฝึกให้กินอาหารผสมที่มนุษย์ผลิตขึ้นได้ ได้แก่ รำข้าว ปลายข้าว กากถั่ว ปลาป่น หรืออาหารประเภทเนื้อ เช่น ปลาเป็ด ไส้ไก่ และอาหารสำเร็จรูป นอกจากนี้ยังสามารถฝึกให้ปลาดุกขึ้นมากินอาหารบริเวณผิวน้ำแทนการหาอาหารตามหน้าดินได้

นิสัยโดยทั่วไปของปลาดุก ค่อนข้างดุ ไม่ชอบอยู่ในที่มีแสงสว่างมากเกินไป จะเชื่องช้าในเวลากลางวันและกระฉับกระเฉงในที่มืด เป็นปลาหากินกลางคืน และอยู่ได้อย่างหนาแน่นในพื้นที่แคบๆ (ประสิทธิ์, 2539)

2.4 โรคที่พบ

โรคที่เกิดในปลาดุกพันธุ์ผสมเช่น โรคตัวด่าง ลักษณะแผลเหมือนน้ำร้อนลวกเกิดจากเชื้อ *Flexibacter columnaris* (Tonguthai et al., 1993; จิราพร และสิทธิ, 2527; ประสิทธิ์, 2539; สรรค์, 2543) โรคแผลหลุมที่เกิดจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ลักษณะแผลจะเป็นหลุมแดง และอาจมีอาการท้องบวม ครีบหูบวม และโปรโตซัวก็จัดเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญและส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำทั้งในด้านการเพาะเลี้ยงและที่อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำธรรมชาติเช่น เห็บปลา หนอนตัวแบน และอิฟิสไทลิส (Epistylis) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบปรสิต (Snieszko และ Axelrod, 1971) เช่น *Trichodina sp., Dactylogyrus sp*. และ *Ichthyophthirius sp.* เช่น *Ichthyophthirius multifilis* ที่เป็นสาเหตุของโรคจุดขาว (white spot) นอกจากนี้ยังพบปรสิตที่อยู่ในกลุ่ม Myxosporida ได้แก่ *Henneguya sp. Myxobolus sp*. และ *Myxidium sp.* (Te, 1998) การเกิด

โรคปรสิตในสัตว์น้ำนับได้ว่าเป็นปัญหาที่สำคัญปัญหาหนึ่ง พบมากในช่วงเดือนแรกและเดือนที่ 2 ของการเลี้ยง และทำให้ปลาดุกพันธุ์ผสมตายค่อนข้างมาก (กรรนิการ์, 2538) โดยส่วนใหญ่ประเทศไทยนิยมเลี้ยงปลาดุกพันธุ์ผสมแบบหนาแน่น จึงมักจะประสบปัญหาปลาเป็นโรคอยู่เสมอ ถ้าปลาได้รับความเครียดจากสภาวะแวดล้อม รวมทั้งมีอาการอ่อนแอ ก็จะมีโอกาสเป็นโรคได้มาก เช่นการติดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สามารถควบคุมได้โดยการแช่ในน้ำผสมกับยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ลิตร (ฮาวารียะห์และจิราพร, 2526 อ้างโดย กรรนิการ์, 2538) ส่วนปรสิต *Trichodina sp. Ichthyophthirius sp.* และ *Dactylogyrus sp*. กำจัดโดยใช้ฟอร์มาลินเข้มข้น 30-50 มิลลิกรัม/ลิตร ในขณะที่กรรนิการ์ (2538) พบว่าเพียง 30 มิลลิกรัม/ลิตร ก็สามารถกำจัดปรสิตได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะอีกหลายชนิดในการฆ่าเชื้อโรคและกำจัดหนอนพยาธิ ได้แก่ ฟอร์มาลิน ด่างทับทิม (โปแตสเซียมเปอร์มังกาเนต) จุนสี (คอปเปอร์ซัลเฟต) ดิพเทอร์เร็กซ์ มาลาไคท์กรีน ยาเหลือง (อะคริฟลาวิล) (สรรค์, 2543)

3. **ภูมิคุ้มกันในปลา** (Immunity in fish)

ปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มแรกๆ ระบบภูมิคุ้มกันในปลา เป็นระบบพื้นฐานที่มีความใกล้เคียงกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบด้วยภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ (humoral immunity) และภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cellular immunity) Vadstein (1997) กล่าวว่า ภูมิคุ้มกันปลามีการพัฒนาที่ไม่ดี ส่วนใหญ่สุขภาพของปลาจะขึ้นกับภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity หรือ natural immunity หรือ innate immunity) ภูมิคุ้มกันชนิดนี้ถือเป็นด่านแรกในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคต่างๆ และมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคหลายชนิด และได้ตั้งข้อสังเกตว่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะอาจจะเป็นภูมิคุ้มกันหลักในการป้องกันการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในปลาวัยอ่อน แม้ว่าภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) มีการพัฒนาช้ากว่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในการป้องกันการติดเชื้อในครั้งแรก แต่มีความจำ (immunological memory) ทำให้ปลาสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงมาก หากได้สัมผัสกับแอนติเจนหรือเชื้อโรคชนิดเดียวกันในครั้งต่อไป อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกภูมิคุ้มกันทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันได้อย่างสิ้นเชิง เพราะภูมิคุ้มกันทั้งสองระบบมีการทำงานร่วมกัน นอกจากนี้ปลายังมีสิ่งกีดขวางบริเวณผิวหนัง (skin barrier) ถือเป็นด่านนอกสุดของร่างกายและมักเป็นส่วนแรกที่พบจุลชีพซึ่งจัดเป็นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ สิ่งกีดขวางเหล่านี้ได้แก่ (Anderson, 1974)

เมือก (mucus) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการเกาะติดของปรสิตบนผิวหนังภายนอก การที่ปลาปล่อยเมือกออกมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดการป้องกันไม่ให้เกิดการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียอาจเนื่องจาก ในเมือกปลามีเอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzyme) และระดับความเป็นกรดด่าง (pH) ที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ Hass และ Ostrowski de Nunez (1988 อ้างโดย Buchmann and Lindenstrøm, 2002) พบว่าในเมือกปลามีกรดไซอะลิก (sialic acid) และ Lobb (1987) รายงานว่ามีแอนติบอดีในเมือกบริเวณผิวหนังของปลาหลายชนิด

เกล็ด (scales) ทำหน้าที่ปกคลุมผิวหนัง หากเกล็ดปลามีการหลุดออก ทำให้ผิวหนังบริเวณนั้นเกิดรอยถลอกหรือมีบาดแผล จึงมีโอกาสที่เชื้อก่อโรคจะเข้าสู่ตัวปลาได้

หนังกำพร้า (epidermis) มี mucous-secreting cell กระจายอยู่ พบว่าภายในหนังกำพร้าของกลุ่มปลาไม่มีเกล็ดอุดมไปด้วย หลอดเลือดและลิมโฟซัยท์ (lymphocyte) (Lobb,1987)

หนังแท้ (dermis) ผิวหนังชั้นนี้มีหลอดเลือด และภายในหลอดเลือดมีเส้นเลือดฝอย (capillaries) กระจายอยู่ สิ่งนี้มีประโยชน์ต่อระบบป้องกันด้านสารน้ำ

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เป็นการทำงานร่วมกันระหว่างอวัยวะต่างๆ และเซลล์ เซลล์ที่ทำหน้าที่นี้ได้แก่ ลิมโฟซัยท์ มาโครฟาจ (macrophages) พลาสมาเซลล์ (plasma cell) และ ฟาโกซัยท์ (phagocytes) ในปลาไม่มีต่อมน้ำเหลือง (lymph node) หรือไขกระดูก แต่มีอวัยวะที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันคือ ไตส่วนหน้า (anterior kidney) ม้าม (spleen) และไทมัส (thymus) ไทมัสเกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือด (hematopoiesis) เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว (Leukocytes หรือ white blood cell) (Anderson, 1974)

จากรายงานการศึกษาเม็ดเลือดขาวในปลาดุกด้านของชะลอ และคณะ (2530) พบว่า

ลิมโฟซัยท์ (Lymphocyte) เป็นเม็ดเลือดขาวที่ไม่มีแกรนูล (agranulocytes) ในไซโตพลาสซึม พบทั้งขนาดเล็กประมาณ 6 ไมครอน จนถึงขนาดใหญ่ประมาณ 11 ไมครอน นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ มีรูปร่างเว้าแหว่งและมีรูปร่างไม่แน่นอน มีไซโตพลาสซึมน้อยติดสีน้ำเงินอ่อน บางครั้งจะเห็นแวคคิวโอล (vacuoles) บางครั้งพบว่าผิวของลิมโฟซัยท์มีลักษณะคล้ายเท้าเทียม (pseudopodia) ยื่นออกมา ลิมโฟซัยท์มีหน้าที่ในการสร้างภูมิคุ้มกัน (แอนติบอดี) (ชะลอ และคณะ, 2530; Bayne and Gerwick, 2001; Anderson, 1974) และมัก

พบว่ามีการเคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเยื่อบุผิวได้ สามารถพบลิมโฟซัยท์ได้บริเวณหนัง กำพร้าและกระแสเลือด (Lobb, 1987)

ทรอมโบซัยท์ (Thrombocytes) ในปลาดุกด้านมีรูปร่างหลายแบบ อาจจะเป็นรูปรี (elongate) กลม หรือรูปกระสวย (fusiform) พบจำนวนมากที่สุดในเม็ดเลือดขาวด้วยกัน ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดต่างๆ ของทรอมโบซัยท์ยังไม่ทราบ แต่ Weinberg *et al.* (1972 อ้างโดย ชะลอ และคณะ, 2530) กล่าวว่าทรอมโบซัยท์ที่มีรูปร่างรีเป็นระยะที่ยังเจริญไม่เต็มที่ ทรอมโบซัยท์มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแข็งตัว (clotting) ของเลือด

ทรอมโบซัยท์ที่มีลักษณะกลมมักจะเป็นกลุ่ม และมักมีรูปร่างเป็นเหลี่ยมบ้าง ขนาดเซลล์ประมาณ 3-6 ไมครอน นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ ไซโตพลาสซึมมีเพียงเล็กน้อย อาจจะมองไม่เห็น ย้อมติดสีชมพูอ่อน หรือน้ำเงินอ่อน นิวเคลียสติดสีทึบ

ทรอมโบซัยท์ชนิดที่มีรูปร่างรี เป็นกลุ่มที่มีจำนวนมากที่สุด มีขนาดประมาณ 4x7 ไมครอน ถึง 5x11 ไมครอน นิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้ม ไซโตพลาสซึมมีจำนวนน้อยมากติดสีชมพูอ่อนล้อมรอบนิวเคลียส

ทรอมโบซัยท์ที่มีรูปร่างแบบกระสวย นิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงินเข้มเกือบเต็มเซลล์ ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูหรือน้ำเงินอ่อนยื่นออกมาจากข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้าง ไซโตพลาสซึมด้านข้างของเซลล์มีน้อยมากอาจจะมองไม่เห็น ขนาดของทรอมโบซัยท์ชนิดนี้ประมาณ 4x7 ไมครอน ถึง 5x13 ไมครอน ทรอมโบซัยท์ที่พบมากจะมีรูปร่างกลม และยาวรี แต่ทรอมโบซัยท์จำนวนมากมีรูปร่างแบบกึ่งกลางระหว่างรูปกลมและรูปรี แสดงให้เห็นว่ารูปร่างอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับระยะของการเจริญพัฒนา หรือปัจจัยอื่นๆ นอกจากนี้ทรอมโบซัยท์รูปกลมและลิมโฟซัยท์ที่มีขนาดเล็กอาจจะมีส่วนที่คล้ายคลึงกันมากจากการย้อมสี Wright&Giemsa แต่อย่างไรก็ตาม สามารถหาความแตกต่างระหว่างเม็ดเลือดทั้งสองชนิดนี้ได้คือ ทรอมโบซัยท์รูปร่างกลมมักจะมีขนาดเล็กกว่า มีนิวเคลียสที่รวมกันแน่นกว่า และไซโตพลาสซึมมักจะมองไม่เห็น ถ้าสามารถมองเห็นมักจะมีสีชมพูอ่อนหรือใส ในขณะที่ลิมโฟซัยท์ขนาดเล็กมีไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงิน

นิวโตรฟิล (Neutrophils) เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูลในไซโตพลาสซึม (granulocytes) มีลักษณะคล้ายกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบมากรองจาก ทรอมโบซัยท์ มีขนาดประมาณ 9-13 ไมครอน รูปร่างกลมหรือรี ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินหรือสีชมพูจางๆ ภายในเห็นแกรนูลชัดเจน นิวเคลียสติดสีม่วงมีสองพู เป็นลักษณะของนิวโตรฟิลที่มีอายุมาก ส่วนนิวโตรฟิลที่ยังเจริญไม่เต็มที่มีขนาดเล็กกว่าที่เจริญเต็มที่ และนิวเคลียสค่อนข้างกลม อยู่ทางด้านใดด้านหนึ่ง

ของเซลล์ ในไซโตพลาสซึมเห็นแกรนูลไม่ชัดเจน Roberts (1978 อ้างโดย ชะลอ และคณะ, 2530) กล่าวว่า นิวโตรฟิลทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ แต่ไม่พบลักษณะการจับกินแบบกลืนกินที่ชัดเจน แต่จากรายงานการศึกษาของชนกันต์ (2545) กล่าวว่านิวโตรฟิลทำหน้าที่ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม

โมโนซัยท์ (Monocytes) เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุดที่พบในปลาดุกด้าน มีขนาด 10-14 ไมครอน รูปร่างค่อนข้างกลม นิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอน และมักอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ติดสีม่วง ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงิน ภายในมีแวคคิวโอล (vacuoles) เห็นชัดเจน โมโนซัยท์เป็นเซลล์ระยะสุดท้ายที่จะเจริญไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่กินสิ่งแปลกปลอม (Roberts, 1978 อ้างโดย ชะลอ และ คณะ, 2530; Jenkins and Ourth, 1993) เม็ดเลือดขาวที่มีลักษณะเมื่อพบในกระแสเลือดเรียก โมโนซัยท์ แต่จะเรียก มาโครฟาจเมื่อพบอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ไตส่วนหน้า และ ม้าม

จากการศึกษาของ Nakanishi และคณะ (2002) พบว่าในปลามี ลิมโฟซัยท์ major histocompatibility complex (MHC) T-cell receptors อิมมูโนโกลบูลิน (immunogloobulins) (Pilström and Petersson, 1991; Uchida *et al*., 2002) และ cytotoxic T cells ซึ่งทำหน้าที่ด้านภูมิคุ้มกันคล้ายคลึงกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (Nakanishi *et al*., 2002) ปลาสามารถผลิตเซลล์ที่เรียกว่า nonspecific cytotoxic cell (NCC) ซึ่งทำหน้าที่คล้ายกับ NK cell ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีความสามารถในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสหรือเซลล์มะเร็ง (Evans and Jaso-Friedmann, 1992) เมื่อไม่นานมานี้ได้มีรายงานเกี่ยวกับทรานเฟอริน (tranferrin) ซึ่งเป็น non-cytokine serum protein ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดขบวนการฟาโกไซโตซีส (phagocytosis) (Stafford and Belosevic, 2003) นอกจากนี้ Stafford และคณะ (2001) พบว่าทรานเฟอรินเป็นตัวกระตุ้นตัวแรกของมาโครฟาจในปลา และเหนี่ยวนำให้มีการผลิตไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ส่วนในปลากระดูกแข็ง (Teleosts) มีเซลล์มาโครฟาจ นิวโตรฟิล NK cell และมี T lymphocyte และ B lymphocyte ด้วย นอกจากนี้มีระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ เช่น คอมพลีเมนต์ (complement) ช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม ทำให้จุลชีพถูกทำลายได้ง่ายขึ้น รวมทั้งทำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย ไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย ฮีโมไลซิน (hemolysin) ทรานเฟอริน C–reactive protein ในซีรัมทำหน้าที่ร่วมกับคอมพลีเมนต์ และพบไซโตไคน์ (cytokines) ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณในการกระตุ้นและยับยั้งการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ ได้แก่ อินเตอร์เฟอรอน (interferon) อินเตอร์ลูคิน 2 (interleukin2), macrophage activating factors และ Abelli และคณะ (1997 อ้าง

โดย Scapigliati *et al*., 2002) กล่าวว่าในส่วนของ gut-associated lymphoid tissue ของปลากระดูกแข็งมี T-cell อยู่จำนวนมาก และในปัจจุบันนี้มีการแสดงให้เห็นว่าทางเดินอาหารของปลา (gut) เป็นขั้นแรกในวิวัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันด้านสารเมือก (adaptive mucosal immune system) ในปลาเทราท์ (trout) พบว่า นิวโตรฟิล เบโซฟิล และ อีโอสิโนฟิล มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (Anderson,1974) นอกจากนี้ Dexiang และ Ainsworth (1991) กล่าวว่าในไตส่วนหน้าของปลาไม่มีเกล็ด มีเซลล์ฟาโกซัยท์ และพบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ซึ่งผลิตโดยเซลล์บริเวณนี้ นอกจากนี้ Graves และคณะ (1985) กล่าวว่า NCC จากปลากดอเมริกัน (channel catfish, *Ictalurus punctatus*) สามารถฆ่า *Tetrahymena pyriformis* ซึ่งเป็นปรสิตฉวยโอกาสในปลา ส่วนการทดลองในหลอดทดลองพบว่า NCC จะใช้เวลาประมาณ 10 ชั่วโมง ในการทำให้เซลล์ของ *T. pyriformis* แตกสลาย

ปรสิตมีวงจรชีวิตที่ซับซ้อน มีการพัฒนาหลายระยะ (stage) และแต่ละระยะมีองค์ประกอบของผิวเซลล์แตกต่างกัน ดังนั้นแอนติเจนของปรสิตจึงมีมากมายหลายแบบ การติดเชื้อปรสิตมักจะเรื้อรัง (Mkunza *et al.,* 1995) รวมทั้งในวงจรชีวิตมีกลไกในการหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านได้เป็นอย่างดี Murrell และคณะ (1986) กล่าวว่าปรสิตมีความสามารถในการกดระบบภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) ทำให้เจ้าบ้านไม่เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunological unresponsiveness) และมีการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในระหว่างการติดเชื้อปรสิต (Immunomodulation during parasitism) รวมทั้งปรสิตสามารถเปลี่ยนคุณสมบัติความเป็นแอนติเจน (antigenic modulation) (Raper *et al*., 2001; Overath *et al*., 2001) ซึ่ง trypanosome เป็นตัวอย่างที่ดีสำหรับคุณสมบัติข้อนี้ กล่าวคือบริเวณผิวของแอนติเจนสามารถที่จะเปลี่ยนสภาพไปจากเดิมแล้วเปลี่ยนกลับสู่สภาพเดิม จนกระทั่งกลายเป็นแอนติเจนตัวใหม่ได้ ซึ่งจีนที่มีลักษณะดังกล่าวมีอยู่ประมาณ 300-1000 จีน

4. วัคซีน (vaccine)

วัคซีนหมายถึง สารที่เมื่อให้เข้าไปในร่างกายจะให้ผลกระตุ้นและชักนำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อสารนั้นๆ ขึ้นมา เป้าหมายของการผลิตวัคซีนทั้งของสัตว์บก และสัตว์น้ำ มีไว้เพื่อป้องกันการเกิดและการระบาดของโรค การใช้วัคซีนกับมนุษย์และสัตว์ชั้นสูงอื่นๆ ให้ผลดีมากในแง่ของการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคต่างๆ แต่กับสัตว์น้ำยังไม่เป็นผลสำเร็จเหมือนกับมนุษย์และสัตว์บก เพราะสัตว์น้ำเป็นสัตว์เลือดเย็น (Poeikilotherm) (Bayne and Gerwick, 2001) มีสภาพแวดล้อม คืออุณหภูมิเข้ามามีบทบาทสำคัญในการสร้างภูมิต้านทาน นอกจากนี้ภูมิคุ้มกันของสัตว์

น้ำยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายๆ อย่างเช่น ชนิดของสัตว์ ขนาด เพศ พันธุกรรม อาหารที่ได้รับ ปริมาณและวิธีการให้วัคซีนโดย Bayne และ Gerwick (2001) กล่าวว่า ในปลาคาร์พ (carp) และปลาไม่มีเกล็ด การตอบสนองของน้ำเหลือง (lymphoid) จะได้ผลดีเมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิต่ำสุดปกติที่สามารถอยู่ได้ในธรรมชาติ ระดับของอิมมูโนโกลบูลินเพิ่มขึ้นตามอายุและขนาด และถ้าในน้ำทะเลมีปริมาณออกซิเจนมากกว่าระดับปกติจะส่งผลให้ระดับของอิมมูโนโกลบูลินเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า นอกจากนี้ยังกล่าวว่าระดับอิมมูโนโกลบูลินในปลาโตเต็มวัยจะมีความผันแปรในฤดูวางไข่ Bisset (1946 อ้างโดย Ainsworth, 1991) รายงานว่าปลาที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง มีการกำจัดแบคทีเรียในอัตราเร็วกว่าปลาที่เลี้ยงในอุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้พบว่าเมื่ออุณหภูมิลดลงเปอร์เซ็นต์ฟาโกซัยโตซีส ก็จะลดลงด้วย และการทำงานของนิวโตรฟิลที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้การตอบสนองถูกกดไว้ (Scott and Klesius, 1981; Scott *et al*., 1985 อ้างโดย Ainsworth, 1991) จากการทดลองของ Ainsworth (1991) พบว่าที่อุณหภูมิ 24 18 และ 10 องศาเซลเซียส มีค่าฟาโกซัยซีส เท่ากับ 80 70 และ 50 ตามลำดับ นอกจากนี้ Lillehaug (1997) ได้ทดลองเลี้ยงปลาแอตแลนติคแซลมอนหลังจากได้รับวัคซีนที่อุณหภูมิ 2 และ 10 องศาเซลเซียส พบว่าปลาที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสมีปริมาณแอนติบอดีน้อยกว่าปลาที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ปริมาณที่เหมาะสมของวัคซีนจะขึ้นอยู่กับขนาดของปลา จากการทดลองของ Hansen และคณะ (1991) พบว่าปลาคาร์พที่มีอายุน้อยและโตเร็วจะมีระดับการแสดงออกของจีนที่สร้างเอนไซม์ chloramphenical acetyltransferase มากกว่าปลาอายุมาก การแสดงออกของจีนในปลาขนาดโตจะอยู่เฉพาะบริเวณที่ฉีดเท่านั้น (Boudinot *et al*., 1998) ในขณะที่ปลาขนาดเล็ก การแสดงออกของจีนสามารถตรวจสอบได้ในหลายอวัยวะเช่น เหงือก ม้าม ไต และกล้ามเนื้อบริเวณที่ฉีด (Heppel *et al*., 1998)

การใช้วัคซีนในสัตว์น้ำเริ่มมากว่า 40 ปีก่อน แต่ได้รับการพัฒนาให้ดีขึ้นในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา โดยได้รับความสำเร็จในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคบางชนิดของปลาในเขตหนาวและเขตอบอุ่น เช่น โรคฟูรันคูโรซีส (furunculosis), โรควิบริโอซีส (vibriosis) (ชนกันต์, 2544; Melingen and Wergeland, 2002) และโรคจุดขาว ที่เกิดจากเชื้อ *I. multifilis* เป็นต้น (Wang *et al*., 2002) วัคซีนที่นำมาใช้ทางการค้าในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น โรควิบริโอซีส โรคฟูรันคูโรซีส และ RedMouth Disease ตลอดจนวัคซีนที่ป้องกันโรคติดเชื้อไวรัส เช่น Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) และ Infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) เป็นต้น แต่ผลที่ได้รับเป็นเพียงการทดลองในห้องปฏิบัติการเป็นส่วนใหญ่ การนำไปใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคของสภาพการเลี้ยงจริง ยังไม่ประสบผลดีเท่าที่ควร การใช้วัคซีนกับสัตว์น้ำใน

อนาคตมีแนวโน้มเป็นไปได้มากขึ้น โดยพิจารณาถึงหลักใหญ่ๆ คือวิธีการเตรียมวัคซีนให้มีประสิทธิภาพเพียงพอในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรค และวิธีการให้วัคซีนแก่สัตว์น้ำในแง่ของ mass immunization เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้ได้ในฟาร์มเลี้ยงปลาขนาดใหญ่ โดยวัคซีนอาจเตรียมจากตัวเชื้อจุลชีพหรือส่วนประกอบของเชื้อที่ได้รับการดัดแปลงหรือเป็นสารสังเคราะห์ วัคซีนที่ใช้อยู่ในปัจจุบันแบ่งเป็น 3 ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่

1. วัคซีนตัวเป็น (living antigen vaccine, live attenuated vaccine) เป็นวัคซีนที่มีส่วนประกอบเป็นเชื้อจุลชีพที่มีชีวิตแต่ถูกทำให้อ่อนฤทธิ์แต่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้

2. วัคซีนตัวตาย (non-living antigen vaccine, killing vaccine, inactivated vaccine) เป็นวัคซีนที่ประกอบด้วยเชื้อจุลชีพที่ทำให้ตายด้วยสารเคมีบางชนิด เช่นฟอร์มาลีน (formalin) หรือด้วยความร้อน

3. วัคซีนที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพ ปัจจุบันมีการใช้ดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมของแบคทีเรียหรือพลาสมิด (plasmid) เป็นพาหะเพื่อใช้ในการผลิตสารที่ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือแอนติเจนให้ได้ปริมาณที่เพียงพอ โดยใช้กระบวนการทางวิธีการจัดระเบียบใหม่ของดีเอ็นเอ (recombinant DNA technology) ส่วนใหญ่วัคซีนพวกนี้สร้างขึ้นเพื่อป้องกันการเกิดโรคจาก ไวรัส โรคมาลาเรียที่เกิดจากปรสิต และวัคซีนดีเอ็นเอนี้ได้รับความสำเร็จจากการทดลองในสัตว์หลายชนิดเช่น หนู ไก่ วัว ม้า และปลา วิธีการเตรียมวัคซีนเริ่มจาก การแยกจีนที่น่าสนใจและคิดว่าน่าจะสร้างโปรตีนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาได้มาเพิ่มปริมาณให้ได้มากเท่าที่ต้องการ ซึ่งขบวนการดังกล่าวนี้เรียกว่า การโคลนจีน (gene cloning) เช่น การโคลนจีนที่สร้างไกลโคโปรตีน (glycoprotein) จากไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค viral haemorrhagic septicemia (VHS) (McLauchlan *et al*., 2003) และ infectious haematopoietic necrosis (IHN) จากปลาเรนโบว์เทราท์ แล้วใส่เข้าไปใน *Escherichia coli* เพื่อให้ *E. coli* ซึ่งทำหน้าที่เป็นเจ้าบ้านสร้างโปรตีนดังกล่าว ต่อมาจึงนำโปรตีนที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์แล้วจึงฉีดเข้าสู่ปลา พบว่าปลาเทราท์สามารถสร้างแอนติบอดีที่สามารถทำให้ไวรัสไม่สามารถก่อให้เกิดโรคในปลา (neutralizing antibodies) ได้ในระดับปานกลาง (Noonan *et al*., 1995 อ้างโดย ชนกันต์, 2544) อย่างไรก็ตามคุณภาพและปริมาณโปรตีนแอนติเจนที่ได้ไม่คงที่ บางครั้งมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ไม่ดี (poor immunogenicity) เนื่องมาจากขบวนการสร้างโปรตีนใน *E. coli* ต่างกับโปรตีนจากตัวเชื้อโรคเดิม เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว มีการคิดค้นวัคซีนดีเอ็นเอ (DNA vaccine) ขึ้นมา วิธีนี้เริ่มจากการโคลนจีนที่คิดว่าสร้างโปรตีนแอนติเจนเช่นกัน จากนั้นนำไปตัดต่อใส่ในพลาสมิด

แล้วนำไปใช้เป็นวัคซีนสำหรับปลา เมื่อวัคซีนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของปลา จะมีการสร้างโปรตีนแอนติเจนซึ่งถูกควบคุมจากส่วนของลำดับเบสที่มีหน้าที่ในการเปิดปิดการทำงานของจีน (eukaryotic promoter) วิธีนี้ไม่ต้องใช้วัคซีนปริมาณมาก เนื่องจากเซลล์ในร่างกายปลาจะสามารถผลิตแอนติเจนเอง รวมทั้งโปรตีนแอนติเจนที่ได้จะมีลักษณะเหมือนโปรตีนที่สร้างโดยไวรัส นอกจากนี้วัคซีนดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าวัคซีนรุ่นเก่าคือ วัคซีนมีจีนเพียงชนิดเดียวเท่านั้น จึงไม่มีปัญหาเรื่องการเปลี่ยนกลับเป็นสายพันธุ์อันตราย และมีการสร้างภูมิคุ้มกันหลายชนิดเช่น ระบบภูมิคุ้มกันสารน้ำ เซลล์ที่ช่วยในการพัฒนาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่น (T-helper cell) และ เซลล์ที่มีกลไกสำคัญในการกำจัดเชื้อไวรัสและเซลล์มะเร็ง เนื่องจากพลาสมิดที่ใช้เป็นพาหะได้จากแบคทีเรีย รวมทั้งมีความคงทนต่ออุณหภูมิที่สูงและต่ำ ทำให้ง่ายต่อการเก็บรักษา และไม่จำเป็นต้องใช้แอดจูแวนท์ (adjuvant) (ชนกันต์, 2545) จากรายงานวิจัย พบว่า พลาสมิดมีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ แล้วทำหน้าที่เป็นแอดจูแวนท์ในการเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนได้ (Kanellos *et al*., 1999)

การให้วัคซีนแก่สัตว์น้ำมีด้วยกันหลายวิธีคือ การฉีด (injection) การผสมอาหาร (oral administration) และการแช่ (immersion) (เจษฎา, 2540) ซึ่งการให้วัคซีนโดยวิธีใดนั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่าง ปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ ชนิดของสัตว์น้ำ เนื่องจากสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อวิธีการให้วัคซีนที่แตกต่างกัน การให้วัคซีนโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือการฉีดเข้าช่องท้อง วิธีนี้ให้ผลในการสร้างภูมิคุ้มกันดีที่สุดและรู้อัตราการให้ที่แน่นอน รวมทั้งจะกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปริมาณสูงและยาวนาน แต่มีข้อเสียคือ ก่อนการให้วัคซีนต้องวางยาสลบปลา การจับปลาจะทำให้ปลาเกิดความเครียด ไม่สามารถใช้กับปลาที่มีน้ำหนักน้อยกว่า 15 กรัม วิธีการนี้ทำให้ปลาเครียดได้ง่าย สิ้นเปลืองแรงงานและเวลา ไม่เหมาะสมสำหรับปลาขนาดเล็กและปลาราคาถูก ส่วนการให้วัคซีนโดยการผสมอาหารนั้นเป็นวิธีที่น่าสนใจ เพราะสามารถใช้กับปลาเป็นจำนวนมากและทุกขนาด โดยปลาไม่เกิดอาการเครียดเนื่องจากการจับ มีข้อเสียคือ ต้องใช้วัคซีนปริมาณมากทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูงและปริมาณวัคซีนที่ปลาแต่ละตัวได้รับไม่แน่นอน เนื่องจากปลากินอาหารไม่เท่ากันทุกตัว อีกทั้งวิธีการนี้ให้ผลในการป้องกันโรคค่อนข้างต่ำ อาจเป็นผลมาจากแอนติเจนบางชนิดถูกทำลายโดยกรดในกระเพาะและลำไส้ส่วนหน้าของปลา (ชนกันต์, 2544) สำหรับวิธีสุดท้ายคือ การแช่เป็นวิธีที่มีการพัฒนาใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะสามารถทำได้กับสัตว์น้ำทุกขนาดและสะดวก โดยวิธีการแช่สัตว์น้ำลงในวัคซีนโดยตรง ซึ่งนิยมใช้กันมากในฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำ ระยะเวลาในการแช่นั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของวัคซีนที่ใช้ และอีกวิธีหนึ่งคือแช่สัตว์น้ำลงในสารละลายเกลือ 0.85-8.0 เปอร์เซ็นต์ ก่อนเพื่อทำให้ปลามีการสูญเสียน้ำออกจาก

ร่างกาย แล้วนำไปแช่ในสารละลายวัคซีน ทำให้วัคซีนซึมเข้าสู่ตัวปลาเพิ่มขึ้นมากกว่าการแช่ปลาในวัคซีนโดยตรง (เจษฎา, 2540) อย่างไรก็ตามมีการทดลองว่า ไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการดังกล่าว เพราะอาจมีอันตรายต่อเหงือกปลา (Horne, 1997) เพียงแต่ให้มีการใช้ปริมาณของวัคซีนที่มากพอหรือยืดเวลาในการสัมผัสกับวัคซีนมากขึ้น Palm และคณะ (1998 อ้างโดย ชนกันต์, 2545) แนะนำว่า การให้วัคซีนสัตว์น้ำในเชิงพาณิชย์ ควรใช้วิธีการแช่หรือผสมในอาหาร แม้ว่าวิธีการแช่จะให้ระดับการป้องกันโรคน้อยกว่าวิธีการฉีด แต่ก็เป็นวิธีที่ดีกว่าการให้แบบผสมอาหาร และ Ellis (1998) กล่าวว่าการให้วัคซีนทางปากเป็นวิธีการที่ให้ผลดีน้อยที่สุด แสดงว่าเหงือกและผิวหนังปลาเป็นส่วนสำคัญในการรับวัคซีนเข้าสู่ร่างกาย จากการทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลากดอเมริกันด้วยวิธีการจุ่มปลาที่สลบใน dinitrophenylated-horse serum albumin (DNP_{16}-HoSA) ซึ่งเป็นแอนติเจน ปริมาณ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที พบว่าวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ไม่มีประสิทธิภาพพอจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลากดอเมริกันได้ อาจเนื่องจากการสลบจึงทำให้การเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกถูกชะงัก รวมทั้งอาจได้รับบาดแผลเนื่องจากถูกตาข่าย (Lobb, 1987) ปัจจัยอีกประการหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนในการป้องกันโรคสัตว์น้ำยังไม่ค่อยได้ผลคือ ชนิดของเชื้อโรคที่ใช้ทำวัคซีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียชนิด *A. hydrophila* เชื้อชนิดนี้มีความหลากหลายทางด้านสายพันธุ์มาก แต่ละสายพันธุ์สามารถทำให้เกิดโรครุนแรงไม่เท่ากัน เนื่องจากมีองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษต่างกัน ทำให้ภูมิคุ้มกันที่สัตว์น้ำสร้างขึ้นหลังจากได้รับวัคซีนของเชื้อสายพันธุ์หนึ่ง ไม่สามารถป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้ออีกสายพันธุ์หนึ่งได้ (เจษฎา, 2540) ชนกันต์ (2544) รายงานว่าในประเทศไทยมีการทดลองผลิตวัคซีนโดยใช้ฟอร์มาลินฆ่าเชื้อ *A. hydrophila* แล้วฉีดให้กับปลาช่อน ปลาดุกและปลานิล พบว่า มีค่าเบี่ยงเบนของแอนติบอดีไตเตอร์สูง อาจเนื่องจากความแตกต่างทางพันธุกรรม ภาวะความสมบูรณ์ของตัวปลา ความเครียดก็อาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้ภูมิต้านทานแบบจำเพาะทำงานได้ไม่ดีเพื่อขจัดปัญหาการเปลี่ยนจากเชื้อที่ไม่รุนแรงเป็นเชื้อที่มีความรุนแรง จึงคิดค้นการผลิตวัคซีนโดยใช้บางส่วนของเชื้อโรคที่มีความสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลามาเป็นวัคซีนแทน การตรวจวิเคราะห์หาปัจจัยที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรง (virulence factor) เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ดีที่สุดในการพัฒนาวัคซีนให้มีประสิทธิภาพ จากการวิจัยพบว่าส่วนของเชื้อโรคสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำได้ ได้แก่ โปรตีนที่อยู่บริเวณผิวด้านนอก (outer membrane protein) และส่วนของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ (lipopolysaccharide, LPS) เป็นต้น Clem และคณะ (1985) กล่าวว่า LPS สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ B lymphocyte ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดี และยังกระตุ้นการเพิ่มผลผลิตของโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายอินเตอร์ลูคิน 1 จากเซลล์โมโนซัยท์ของ

ปลากดอเมริกัน หลังจากนั้น Thuvander และคณะ (1987) ได้ทำการหาระดับของภูมิคุ้มกัน (protective immunity) ในปลาเรนโบว์เทราท์ โดยการให้วัคซีนชนิด bivalent แบบฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *V. anguillarum* serotype 1 และ 2 โดยแบ่งปลาเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้วัคซีนโดยวิธีการแช่ (direct immersion) ในวัคซีนที่เจือจาง 1:10 นาน 20 วินาที และกลุ่มที่ให้วัคซีนโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal) หลังจากให้วัคซีนเป็นเวลา 3 7 17 34 และ 46 สัปดาห์ แบ่งปลาแต่ละชุดการทดลองเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ทำการทดสอบความต้านทานโรคโดยแช่เชื้อ *V. anguillarum* serotype 1 ความเข้มข้น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แก่ปลาทั้งสามชุดการทดลอง แล้วบันทึกอัตราการตายเป็นเวลา 14 วัน ปลากลุ่มที่ 2 เก็บตัวอย่างเลือดและนำไปหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี ELISA ผลการทดลองพบว่า หลังจากแช่เชื้อให้แก่ปลาทั้ง 3 กลุ่มแล้ว พบว่าวัคซีนสามารถกระตุ้นให้ปลาสร้างภูมิคุ้มกันได้นาน 46 สัปดาห์ โดยปลาที่ได้รับวัคซีนทั้งสองวิธีมีอัตราการรอดสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญ และวิธีการให้วัคซีนทั้งสองวิธีให้ผลในการคุมโรคไม่แตกต่างกัน จากการหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี ELISA พบว่า สัดส่วน seropositive ในปลาที่ได้รับวัคซีนมีค่าสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนเลย และปลาจะให้ค่าไตเตอร์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 7 โดยสัดส่วนของปลาที่ให้ผล seropositive ในชุดที่ได้รับวัคซีนโดยวิธีการฉีด (90% seropositive) จะสูงกว่าที่ได้รับวัคซีนโดยวิธีการแช่ (55% seropositive) และหลังจากนั้นค่าไตเตอร์จะค่อยๆ ลดลงจนถึง 46 สัปดาห์ และยังพบข้อดีของการตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี ELISA คือสามารถตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีน้อยๆ ได้ หลังจากในสหรัฐได้รับความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรงจากโรค enteric septicemia of catfish (ESC) ในการเลี้ยงปลากดอเมริกันเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *Edwardsiella ictaluri* นักวิทยาศาสตร์ชาวสหรัฐได้หาทางแก้ไขอย่างเร่งด่วน Plumb และ Vinitnantharat (1993) ทดลองวัคซีนที่เตรียมจากแบคทีเรียดังกล่าวที่ฆ่าเชื้อด้วยสารละลายฟอร์มาลิน 0.8 เปอร์เซ็นต์ นำไปให้ลูกปลากดอเมริกันขนาดประมาณ 0.1 กรัม โดยจุ่มในวัคซีน 2 นาที สามเดือนต่อมาได้ตรวจสอบความสามารถในการป้องกันการตายของปลา โดยการใส่เชื้อแบคทีเรียที่มีความรุนแรงลงในน้ำ พบว่าปลาดังกล่าวมีอัตราตายเพียงร้อยละ 6.7 เมื่อเทียบกับปลาในชุดควบคุมตายสูงถึงร้อยละ 96.7 ได้นำวัคซีนดังกล่าวไปผลิตเชิงพาณิชย์ แต่ผลการใช้วัคซีนยังมีความแปรปรวนสูง อาจจะมีสาเหตุจากอายุและความสมบูรณ์ของปลาที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ Sakai (1999) ผลิตวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *V. anguillarum* เป็นวัคซีนที่ได้ผลดีมากที่สุดสำหรับปลาแซลมอน ไม่ว่าจะเป็นการให้โดยการฉีด การให้ทางปาก และการจุ่ม และได้รายงานต่อว่า ปลาเรนโบว์เทราท์ที่จุ่มในวัคซีนชนิดนี้ยังสามารถเพิ่มความต้านทานต่อการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp.

แสดงให้เห็นว่า วัคซีนนอกจากจะกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะแล้วยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะด้วย และจากการทดลองของ Kawai และคณะ (1999) ศึกษาวัคซีนที่อยู่ในรูปแคปซูลของเชื้อ *Lactococcus garvieae* ในปลาสำลี (*Seriola quiqueradiata*) พบว่าแอนติเจนจะถูกปลดปล่อยออกมาในช่วงความเป็นกรดด่างที่เป็นกลาง และแบคทีเรียจะแสดงคุณสมบัติของแอนติเจน (antigenicity) สูงเมื่อ inactivated ด้วยสารละลายฟอร์มาลิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ หรือใช้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แต่ Klesius และ Shoemaker (1999 อ้างโดย ชนกันต์, 2544) ชี้ว่าการใช้แบคทีเรียที่อ่อนกำลังลง น่าจะเป็นวิธีที่ดีกว่า เนื่องจากไม่ต้องเตรียมวัคซีนในปริมาณมาก วัคซีนดังกล่าวจะช่วยกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี กระตุ้นการทำงานของเซลล์ที่มีหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม และสามารถป้องกันการตายของปลาจากการติดเชื้อของแบคทีเรียชนิดนี้ และได้รับการอนุมัติจากกระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกาให้ทดลองใช้วัคซีนดังกล่าวในภาคสนาม และจากการทดลองของ Wise (2000) ในการให้วัคซีนตัวเป็นต่อเชื้อ *Edwardsiella Ictaluri* ปริมาณ $1x10^7$ CFU กับปลากดอเมริกัน ระยะปลานิ้ว (72 วันหลังจากฟัก) ซึ่งเป็นโรค enteric septicemia พบว่าอัตราการรอดอยู่ระหว่างร้อยละ 67.1–100 และอัตราการตายมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างวงศ์ (Families) กลุ่มที่ให้วัคซีน และกลุ่มที่ไม่ให้วัคซีน และพบว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนจะมีอัตราการตายสูงที่สุด

วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อปรสิตนั้นมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยได้ทำการศึกษากันมากว่า 50 ปี แต่ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากปรสิตมีการพัฒนาหลายระยะภายในตัวเจ้าบ้าน และมีการเคลื่อนตัวไปตามอวัยวะหรือเนื้อเยื่อ จากคุณสมบัติเหล่านี้ของตัวปรสิตมีผลเหนี่ยวนำทำให้ภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านต่ำ (Overath *et al*., 2001) คุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของปรสิตมีชีวิต (live parasites) เมื่อเทียบกับปรสิตที่ผ่านการสกัด พบว่าที่ผ่านการสกัดมีความเสถียรและความเข้มข้นของแอนติเจนต่ำลง แม้ว่าวัคซีนตัวเป็นและวัคซีนที่ใช้ตัวปรสิตมีชีวิตจะประสบผลสำเร็จ แต่ก็ยังไม่ได้มีการนำมาผลิตในทางการค้า อาจเป็นผลมาจากการที่แอนติเจนของปรสิตมีความหลากหลายและโดยเฉพาะตัวปรสิตเองก็มีการพัฒนาหลายระยะ ดังนั้นเราจึงควรพัฒนาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยอาจจะพัฒนาวิธีการแยกส่วนที่เป็นแอนติเจนของปรสิต วัคซีนต่อปรสิตในปลาที่ศึกษากันมากได้แก่ วัคซีนต่อเชื้อ *I. multifilis* (Wang *et al*., 2002) ส่วนวัคซีนต่อปรสิต trypanosome มีการศึกษากันไม่มากนัก โดยทั่วไปวัคซีนสำหรับโรค trypanosomiasis มีความสำคัญในการควบคุมโรคและกำจัดปรสิต แต่ตัวปรสิตสามารถกดระบบภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) นอกจากนี้ปรสิต trypanosome ยังมีความสามารถที่เป็นเอกลักษณ์อีกประการหนึ่งคือ สามารถเปลี่ยนแปลงความเป็นแอนติเจนหรือมีแอนติเจนหลายรูปแบบ

(antigenic variation) ที่ผิวเซลล์ ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะทำให้ trypanosome สามารถหลบหลีกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านได้ (Olenick *et al*., 1981; Raper *et al*., 2002; Lubega *et al*., 2002; Donelson, 2003) ทำให้เป็นปัญหาในการพัฒนาทางด้านวัคซีน กลยุทธ์หนึ่งที่จะเอาชนะอุปสรรคนี้คือ ต้องหาชุดของ epitopes ที่คงที่ Beat และคณะ (1984) กล่าวว่า ไซโตโซลิคแฟลกชั่น (cytosolic fractions) ของ trypanosome มีความเป็นแอนติเจนที่คงที่ แต่มักจะเป็น immunogen ที่ไม่ดี และ Gull และคณะ (1986 อ้างโดย Lubega *et al*., 2002) กล่าวว่า pellicular และ microtubules ในแฟลกเจลลาของปรสิต trypanosome มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างภูมิคุ้มกันที่ค่อนข้างชัดเจน โดย pellicular และ microtubules ถูกเชื่อมเข้าด้วยกันและเชื่อมอยู่กับ plasma membrane โดย microtubule associate protein (MAPs) มีความยืดหยุ่นสูง มีกลไกที่ คงที่ และเคลื่อนที่ไปสู่เซลล์ microtubule พบได้ในแฟลกเจลลา แอนติเจนของ trypanosome ที่ทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำให้เกิด protective immunity มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนและมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 60,000-65,000 ดาลตัน (daltons) ซึ่งขึ้นกับชนิดของปรสิต (Murray *et al*., 1983) membrane antigen ที่แยกได้จากระยะในกระแสเลือดของ *Trypanosoma brucei rhodesiense* แสดงความสามารถในการป้องกันโรคของระบบภูมิคุ้มกันในหนู กระต่าย และแกะ Donelson (2003) กล่าวว่า variant surface glycoprotein (VSG) บนผิวเซลล์ของปรสิต trypanosome สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ ซึ่งส่วนนี้เป็น antigenic variation โดยจะมี 1,000 VSG gene และ pseudo-VSGs กระจัดกระจายอยู่บนจีโนม (genome) ของตัวปรสิต เช่นเดียวกับ Pays และ Nolan (1998) กล่าวว่าแอนติเจนบนผิวเซลล์ที่นำมาใช้ผลิตวัคซีนเป็นไกลโคโปรตีน 2 ชนิดคือ VSG จากระยะที่อาศัยอยู่ในกระแสเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และโพรไซคลิน (procyclin) จากระยะโพรไซคิก (procyclic forms) ที่อยู่ในพาหะที่เป็นแมลง แต่โพรไซคลินไม่ได้รับความสนใจที่จะนำมาพัฒนาผลิตเป็นวัคซีน เมื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเกิดการติดเชื้อ trypanosome เป็นครั้งแรก พบว่า มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ดี กล่าวคือ ก่อนที่ร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะกำจัดปรสิตออกหมด จะมีการผลิต protective antibody ต่อ VSGs ของปรสิตในระยะที่อยู่ในกระแสเลือด Mkunza *et al*. (1995) ได้ทำการทดลองให้แอนติเจนที่ได้จาก flagellar pocket ของ *T. brucei rhodesiense* และให้เชื้อ *T. congolense* และ *T. vivax* ในวัว เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับวัคซีน โดยแบ่งเป็น 3 การทดลอง การทดลองที่1 พบว่ากลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมมีการติดเชื้อร้อยละ 58 กลุ่มที่ 2 ได้รับ samorin พบว่ามีการติดเชื้อ ร้อยละ 43 กลุ่มที่ 3 ได้รับวัคซีนโดยมี bovine serum albumin (BSA) เป็น carrier และมี alum เป็นแอดจูแวนท์ พบว่ามีการติดเชื้อร้อยละ 26 การทดลองที่ 2 กลุ่มควบคุมมี

การติดเชื้อร้อยละ 22 ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีการติดเชื้อร้อยละ 9 และการทดลองที่ 3 จะใช้ ovalbumin เป็น carrier หลังจาก 15 เดือน พบว่าในกลุ่มควบคุมมีการกลับมาติดเชื้อร้อยละ 13 แต่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีเพียงร้อยละ 0.9 เท่านั้น ผลการทดลองครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกในเรื่องของ heterologous immunoprotection ต่อโรค trypanosomiasis ในวัว และ ILRI (1998 อ้างโดย Lubega *et al*., 2002) พบว่าหนูที่ได้รับ flagella pocket fractions ของ *T. rhodesiense* สามารถป้องกันได้เพียงบางส่วน (partial protection) ส่วนการป้องกันแบบสมบรูณ์ (complete protection) ได้มีรายงานจากการใช้ชิ้นส่วนแฟลกเจลลาจาก *T. brucei* ซึ่งประกอบด้วย microtubule associated protein (MAP 52) และ 2 glycosomal enzymes (Balaban *et al*., 1995 อ้างโดย Lubega *et al*., 2002) จากการทดลองของ Lubega และคณะ (2002) รายงานว่า ทูบูลิน (tubulin) ที่สกัดจาก *T. brucei* นำไปฉีดให้หนูทดลอง หลังจากนั้นฉีดเชื้อ *T. brucei* *T. congolense* หรือ *T. rhodesiense* พบว่า Renatured *T. brucei* tubulin สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการป้องกันในหนูทั้งหมดที่ทดสอบ (ร้อยละ 60-80) ส่วน Denatured *T. brucei* tubulin เป็นการทำให้ tubulin เสียสภาพ โดยการนำ Renatured *T. brucei* tubulin ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ synthetic tubulin peptides รวมทั้ง ทูบูลินจากสมองหนู ให้ระดับแอนติบอดีต่ำกว่า จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า ทูบูลินสามารถใช้เป็นสารที่สามารถมีปฏิกริยาสร้างภูมิคุ้มกันตอบได้ (immunogen) และคาดว่าจะเป็นเป้าหมายหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาพัฒนาในเรื่องความจำเพาะของปรสิต (parasite-specific) และมีความหวังว่าจะพัฒนาทำเป็นวัคซีนได้ นอกจากนี้ Dustin (1984) กล่าวว่า ทูบูลินเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นแบบ heterodimer พบได้ในเซลล์ eukaryotic ทั้งหมด ทูบูลินในปรสิต trypanosome มีน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน มี 2 isoform คือ 1- และ 3- tubulin คุณสมบัติทางชีวเคมี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดวงจรชีวิตและทูบูลินสามารถสร้างภูมิคุ้มกัน (immunotherapeutic) ต่อ *Brugia pahangi* และทำให้อัตรารอดของ microfilaraemia และหนอนตัวเต็มวัย (adult worm) ในสัตว์ทดลองลดลง (Bughio *et al*., 1993)

ในการศึกษาภูมิคุ้มกันของโรคติดเชื้อปรสิต trypanosome ในปลา เช่นการตรวจหาระดับแอนติบอดี (antibody) หรือการสร้างภูมิคุ้มกันโดยการฉีดวัคซีนจำเป็นที่จะต้องมีสารแอนติเจน (antigen) ซึ่งสามารถเตรียมได้จากตัวปรสิต trypanosome จากการศึกษาของ Evans และ Lumsden (1979 อ้างโดย Bienek *et al*., 2002) รายงานว่า ปลาทองที่ได้รับ trypanosome ที่ฆ่าด้วยความร้อนไม่ประสบผลสำเร็จในการป้องกัน แต่การศึกษานี้ไม่ได้ตีพิมพ์ ขณะที่ Wang และ Belosevic (1994) ใช้แอนติเจนของ *T. danilewskyi* ที่แยกจากเลือดปลาทองโดยใช้ Ficoll–paque อาศัยน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกัน นอกจากนี้ Cotlrell (1977) ใช้ *T. platessae* ที่เลี้ยงในห้อง

ปฏิบัติการ ฉีดเข้าเส้นเลือดปลา plaice พบว่าระดับของ β-globulin ในซีรัมปลาเพิ่มขึ้น และคาดว่าอาจเกี่ยวข้องกับการหลั่งแอนติบอดีต่อปรสิต การตอบสนองต่อการติดเชื้อพวก hemoflagellate จะคล้ายกับสัตว์มีกระดูกสันหลังซึ่งภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นภายหลัง (acquired immunity) จะมีทั้งภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำและภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ ปรสิต trypanosome จะเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ และปลาจะผลิต neutralizing antibodies ในระหว่างการติดเชื้อและปริมาณแอนติบอดี (antibody) จะสลายภายใน 3 สัปดาห์หลังจากไม่ปรากฏ trypanosome ในกระแสเลือด (Barrow, 1954 อ้างโดย Woo, 1981) แต่ปลาที่รอดชีวิตจากการติดเชื้อจะมีภูมิคุ้มกันเป็นระยะเวลานาน (Woo,1981) และไม่กลับมาติดเชื้อชนิดเดิมอีก (re-infected) (Lom, 1973 อ้างโดย Woo, 1981) นอกจากนี้ Woo (1981) พบว่า ปลาทองที่ได้รับ trypanosome ในปริมาณต่ำทำให้มีเวลาเพียงพอที่ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถตอบสนองต่อปรสิตและกำจัดปรสิตจากกระแสเลือดในเวลาประมาณ 70 วัน ปริมาณ trypanosome ที่ปล่อยออกมาในกระแสเลือดทีละน้อย จะไปกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของ Woo และคณะ (1991) กล่าวว่าปลาส่วนใหญ่ที่มีปรสิต trypanosome หลงเหลืออยู่ และต่อมาเมื่อได้รับปรสิตชนิดเดิมจะสามารถป้องกันได้อย่างน้อย 89 วัน โดยระบบภูมิคุ้มกันเป็นแบบ non-sterile อาจอยู่ได้ถึง 190 วัน (Woo, 1981) นอกจากนี้ Overath *et al*. (1999) กล่าวว่าการติดเชื้อปรสิต trypanosome ในช่วงแรกจะมีปริมาณ trypanosome ในกระแสเลือดสูงหลังจากนั้นจะลดลงอย่างฉับพลัน โดยในปลาคาร์พบางชนิดไม่สามารถตรวจพบ trypanosome ทั้งในกระแสเลือดและอวัยวะภายใน ในขณะที่ปลาชนิดอื่นใช้ระยะเวลามากกว่า 1 ปี ยังสามารถตรวจพบ trypanosome ในกระแสเลือดได้ แต่มีปริมาณต่ำ (Chronic phase) จากการทดลองในเรื่อง passive immunization ด้วย IgM บริสุทธิ์ ที่ได้จาก ซีรัมของปลาคาร์พที่ได้รับ trypanosome ชี้ให้เห็นว่าการติดเชื้อถูกควบคุมโดยแอนติบอดี โดยระดับของแอนติบอดีที่ต่อต้านปรสิตในปลาคาร์พยังคงมีระดับที่สูงอยู่เป็นเวลาหลายเดือน ถึงแม้ว่าจะเป็นระดับที่ต่ำมากโดย IgM มีครึ่งชีวิต (half life / $t_{1/2}$) เท่ากับ 22.5 วัน Bienek *et al*. (2002) รายงานว่าภูมิคุ้มกันของปลาต่อปรสิต *T. danilewskyi* ในแง่ของประสิทธิภาพของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยสารคัดหลั่ง (excretory-secretory product, ES) จาก trypanosome ได้ทำการศึกษาการแพร่กระจายของการติดเชื้อ ความอุดมสมบูรณ์ของปรสิต และปริมาณแอนติบอดี ฉีด ES ES ผสม Freund's complete adjuvant (FCA ; เชื้อตายของ mycobacterium ใน water-in-oil emulsion, ES-FCA) และ ES ผสม Freund's incomplete adjuvant (ES-FIA) เข้าบริเวณช่องท้อง (intraperitoneal) ของปลาทอง พบว่าปลาทองที่ได้รับ ES-FCA สามารถป้องกันการติดเชื้อ *T. danilewskyi* ได้ ($p<0.05$) ส่วนปลาทองที่ได้รับ ES และ

ES-FIA ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่า หลังจากกระตุ้นครั้งที่ 2 และ 3 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของแอนติบอดีในซีรัมเพิ่มขึ้น 20 เท่าเมื่อเทียบกับซีรัมก่อนทดลอง จากผลการทดลองนักวิจัยสรุปว่า ES จาก trypanosome เพิ่มความต้านทานเชื้อ *T. danilewskyi* โดย ES-FCA สามารถป้องกันได้มากที่สุด ซึ่งการตอบสนองด้านเซลล์มีบทบาทในการป้องกันการติดเชื้อ

Hebert และคณะ (2000) ทดลองใช้ Clolera toxin เป็นแอดจูแวนท์ (แอดจูแวนท์ คือ สารที่ผสมกับแอนติเจนแล้วจะทำให้เกิดภูมิคุ้มกันได้มากกว่าเมื่อฉีดด้วยแอนติเจนเพียงอย่างเดียว) โดยฉีดเข้าบริเวณภายในช่องท้องปลากดอเมริกัน พบว่าการใช้ chloera toxin และ non–toxic B subunit ของ chloera toxin เป็นแอดจูแวนท์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการหลั่งแอนติบอดีได้ การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าแอนติเจนที่รวมกับแอดจูแวนท์แอนติเจน conjugate ด้วยแอดจูแวนท์ หรือแอนติเจนในแคปซูลจะเพิ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลากดอเมริกัน เมื่อได้รับทางปาก (orally) ลำไส้ตรง (rectally) หรือช่องท้อง นอกจากนี้มีรายงานว่า แอดจูแวนท์เพียงอย่างเดียวจะเหนี่ยวนำให้เกิดการต้านทานเชื้อสูงขึ้น และสันนิษฐานว่า แอดจูแวนท์จะทำหน้าที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) (Olivier *et al*., 1985; Kodama *et al*., 1989) และในระหว่างปี 1984–1995 ได้มีการระบาดของ โรคฟูรันคูโรซีส ในฟาร์มเลี้ยงปลาของประเทศนอร์เวย์ (Norway) และประเทศสกอตแลนด์ (Scotland) จึงได้มีการทดลองใช้ oil-adjuvanted vaccines (OAVs) พบว่าส่วนของประเทศสกอตแลนด์ มีการลดลงของโรคฟูรันคูโรซีส เมื่อได้รับ OAVs มาก่อน ในขณะที่ประเทศนอร์เวย์เวลาที่ให้ OAVs กับการลดลงของโรคฟูรันคูโรซีสใกล้เคียงกัน (Smith and Hiney, 2000) และจากการทดลองฉีดวัคซีนจากเชื้อ *A. hydrophila* กับปลาดุกอุย ที่มีขนาดความยาวและน้ำหนักเฉลี่ย 15.6 เซนติเมตรและ 92.8 กรัม ตามลำดับ พบว่าในการฉีดครั้งแรก ปลาดุกอุยที่ถูกฉีดด้วยวัคซีนผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) ในอัตราส่วน 1:1 เข้าทางช่องท้อง มีการสร้างแอนติบอดีในซีรัมสูงสุด (50.0 โดยเฉลี่ย) ส่วนการฉีดเข้าช่องท้องด้วยวัคซีนปกติ การฉีดเข้ากล้ามเนื้อด้วยวัคซีนผสม FCA การฉีดเข้ากล้ามเนื้อด้วยวัคซีนปกติ และกลุ่มควบคุม การฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 ทั้ง 5 ประเภทให้ผลคล้ายคลึงกับครั้งแรก แต่จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีในปริมาณที่สูงกว่า ปลาที่ได้รับวัคซีนทั้งหมดมีความต้านทานต่อเชื้อ A. *hydrophila* โดยระดับแอนติบอดีจะสูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 และเริ่มลดลงต่ำสุดในสัปดาห์ที่ 9 (นนทวิทย์ และคณะ, 2532) เช่นเดียวกับการทดลองของจิตต์เกษมและคณะ (2536; อ้างโดยชนกันต์, 2544) ใช้ FCA ผสมกับเชื้อ A. *hydrophila* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลีนในอัตราส่วน 1:1 แล้วฉีดเข้าช่องท้องของปลาช่อน พบว่าปลาให้ค่าแอนติบอดีไตเตอร์

สูงสุดหลังจากการให้ครั้งแรก และปลาที่ฉีดวัคซีนผสมแอดจูแวนท์จะมีปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ที่สูงกว่าวัคซีนที่ไม่ผสมแอดจูแวนท์ อย่างไรก็ตามปริมาณแอนติบอดีจะลดลงหลังจากให้วัคซีนครั้งที่สองและสาม อาจสืบเนื่องจากกลไกการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งที่ลดการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกายหลายๆ ครั้ง (suppressor T-lymphocyte)

และจากการทดลองของวงศ์ทิพา (2541) พบว่า หลังจากฉีดเชื้อปรสิต trypanosome จำนวน $2.1x10^6$ ตัว/ปลา ในปลาปกติพบว่า โดยเฉลี่ยแล้ววันที่ 4 ปรสิตจะเพิ่มจำนวนได้มากที่สุดจนทำให้ปลาตาย ซึ่งจะเห็นได้ว่าปรสิตชนิดนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และจากการทดลองฉีด *T. carassii* ปริมาณ 500 ตัว เข้าทางช่องท้องของปลาทอง พบว่าเข้าสู่ระยะ prepatent โดยเฉลี่ยประมาณ 5-7 วัน และปริมาณปรสิตจะขึ้นสูงหลังจากได้รับเชื้อ 21 วัน โดยมีความหนาแน่นของเชื้อ $1.6x10^6$ ตัว/ลูกบาศก์เมตร ทำให้ปลาส่วนใหญ่เกิดการตาย (Lom, 1979 อ้างโดย Lom and Dykova, 1992)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีเตรียมแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นวัคซีนต่อปรสิต trypanosome
2. เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody) ต่อปรสิต trypanosome ที่สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัย