

การผลิตและลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Perkinsus olseni*  
ในหอยลาย *Paphia undulata*



นางสาวสิริรัตน์ แก้วสลับนิล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST  
*Perkinsus olseni* IN UNDULATED SURF CLAMS *Paphia undulata*

Miss Sirirat Kaewsalabnil



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดี
	ต่อ <i>Perkinsus olseni</i> ในหอยลาย <i>Paphia undulata</i>
โดย	นางสาวสิริรัตน์ แก้วสลับนิล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร.จันทร์จรัส วัฒนะโชติ)

สิริรัตน์ แก้วสลัสนิล : การผลิตและลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Perkinsus olseni* ในหอยลาย *Paphia undulata* (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST *Perkinsus olseni* IN UNDULATED SURF CLAMS *Paphia undulata* ) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. นันทิกา คงเจริญพร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, 85 หน้า.

โรคเพอร์คินซิส (Perkinsosis) เป็นโรคปรสิตในหอยสองฝาที่มีความสำคัญเชิงพาณิชย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหอยลาย (undulated surf clam, *Paphia undulata*) โดยมีสาเหตุมาจากเชื้อปรสิต *Perkinsus olseni* การติดเชื้อที่รุนแรงทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อและการตายของหอยจำนวนมากซึ่งส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคม จุดประสงค์ในงานวิจัยนี้จึงมีเพื่อผลิตและศึกษา ลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อ *P. olseni* ในหอยลาย *P. undulata* ภูมิคุ้มกันของหนูทดลองถูกกระตุ้นด้วย *P. olseni* ที่อยู่ในระยะ zoospore และ hypnospore หลังจากการหลอมรวม เซลล์และการคัดกรองจะได้มอนอโคลนทั้งหมด 11 โคลน จากการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของ มอนอโคลนอลแอนติบอดี พบว่าความไวในการตรวจหา *P. olseni* ระยะ zoospore ด้วยวิธี dot blotting จะอยู่ในช่วง  $2.6 \times 10^7$  ถึง  $3.3 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และระยะ hypnospore อยู่ในช่วง  $1.6 \times 10^5$  ถึง  $2.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้มีความสามารถในการจับ กับระยะต่างๆของ *P. olseni* ได้แตกต่างกัน มอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 1 จะจับแบบจำเพาะ ต่อระยะ zoospore ในขณะที่หมายเลข 12 จะจับแบบจำเพาะต่อระยะ hypnospore ส่วนมอนอ โคลนอลแอนติบอดีที่เหลือจะจับ *P. olseni* ที่อยู่ในทั้ง 2 ระยะ เมื่อตรวจสอบไอโซไทป์พบว่ามือนอ โคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 1, 9, 15, 17, 19 และ 22 เป็นชนิด IgG<sub>1</sub> ขณะที่หมายเลข 7, 12, และ 20 เป็นชนิด IgG<sub>2b</sub> และหมายเลข 5 และ 24 เป็นชนิด IgM ทำการคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีมา ทั้งหมด 7 โคลนโดยอาศัยวิธี dot blotting เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในเนื้อเยื่อ หอยลายที่มีรายงานและไม่มีรายงานการติดเชื้อ หอยนางรม หอยแครง และหอยแมลงภู่ ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกมาจับกับเชื้อปรสิต *P. olseni* เฉพาะในหอยลายที่มี รายงานการติดเชื้อ แต่ไม่จับกับเนื้อเยื่อของหอยลายที่ไม่มีรายงานการติดเชื้อและเนื้อเยื่อหอยชนิดอื่นที่ ถูกทดสอบ นอกจากนี้เมื่อนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, 12 และ 20 มาผสมใช้ร่วมกัน พบว่าประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อปรสิตในเนื้อเยื่อหอยลายจะเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากมอนอ โคลนอลแอนติบอดีทั้งสามจับที่อิพิโทปต่างกัน

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5472261023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: MONOCLONAL ANTIBODY / PERKINSUS OLSENI / PERKINSOSIS / UNDULATED SURF CLAMS / PAPHIA UNDULATA

SIRIRAT KAEWSALABNIL: PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST *Perkinsus olseni* IN UNDULATED SURF CLAMS *Paphia undulata* . ADVISOR: NANTHIKA KHONGCHAREONPORN, Ph.D., CO-ADVISOR: KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., 85 pp.

Perkinsosis is a disease in commercially important bivalves, especially undulated surf clams *Paphia undulata*, caused by the protozoa *Perkinsus olseni*. Severe infection leads to tissue inflammation and mortality of the bivalves, thus affecting economic and society. The aim of this research was to produce and characterize the monoclonal antibody against *P. olseni* in undulated surf clams *P. undulata*. Mice were immunized by using zoospore and hypnospore of *P. olseni* as the antigen. After conventional cell fusion and screening, 11 monoclones were obtained. Characterizations of monoclonal antibodies (MAbs) from these clones revealed that the sensitivity of *P. olseni* zoospore detection by dot blotting method was found in the range of  $2.6 \times 10^7$  -  $3.3 \times 10^9$  cells/ml while that of hypnospore was found in the range of  $1.6 \times 10^5$  -  $2.0 \times 10^7$  cells/ml. The obtained MAbs can differently bind to different stages of *P. olseni*. MAbs No. 1 can bind only to the zoospore stage where as MAbs No. 12 can bind specifically to the hypnospore stage while the other MAbs can bind to *P. olseni* at both stages. Isotype of each monoclonal antibody was determined. MAb No. 1, 9, 15, 17, 19 and 22 are IgG<sub>1</sub> while MAb No. 7, 12, and 20 are IgG<sub>2b</sub>, and MAb No. 5 and 24 are IgM. Based on dot blotting method, 7 MAbs were selected to detect *P. olseni* in infected and uninfected clam, oysters, cockles and mussels using immunohistochemistry method. The results showed that the selected MAbs only bind to *P. olseni* in the infected clam tissues but do not bind to the uninfected clam tissue and other tested tissues. In addition, MAbs No. 7, 12 and 20 were mixed and applied. Surprisingly, the detection efficiency increased because the MAbs bound to the different epitopes.

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature .....

Academic Year: 2014

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร และ อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า และดร.จันทร์จรัส วัฒนะโชติ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ข้อคิดเห็น คำแนะนำ แก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สุพรรณิ ลิขิตพลิต สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้ให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้บริหาร และคณาจารย์ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน สำหรับคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ คุณทรงจันทร์ ภูทอง คุณอนุมาศ บัวเขียว และคุณอุมาพร พิมพิทักษ์ และเจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่ได้ให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี รวมถึงพี่ๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการทุกคน ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการสนับสนุนทุนงานวิจัยจาก “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอน้อมรำลึกถึงคุณบิดามารดา ที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณสัตว์ทดลองทุกชีวิตในการทำวิจัยของข้าพเจ้า ขอนำเอาผลประโยชน์อันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่หนุทดลองที่ได้สละชีวิตในการทำวิจัยของข้าพเจ้า

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	13
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	13
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	15
1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย.....	16
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	16
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	17
2.1.1 หอยลายในประเทศไทย.....	17
2.1.2 ลักษณะทั่วไปของหอยลาย (Undulated surf clam).....	17
2.1.3 การเจริญเติบโตของหอยลายในประเทศไทย.....	18
2.1.4 การประมงหอยลายในประเทศไทย.....	18
2.1.5 โรคติดเชื้ในหอย.....	19
2.1.6 โรคนิวโรซินซิส (Perkinsosis).....	20
2.1.7 วงจรชีวิตและการแพร่ระบาดของเชื้อปรสิต <i>P. olsenii</i> .....	23
2.1.8 ระบบภูมิคุ้มกันของหอยลายต่อเชื้อปรสิต <i>Perkinsus</i> .....	25
2.1.9 การตรวจวินิจฉัยโรคนิวโรซินซิส.....	26
2.1.9.1 เทคนิค Ray's fluid thioglycollate (RFTM).....	26

2.1.9.2 เทคนิคการตรวจวินิจฉัยทางโมเลกุล.....	26
2.1.10 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.....	27
2.1.10.1 แอนติเจน (Antigen, Ag).....	27
2.1.10.2 แอนติบอดี (Antibody, Ab).....	29
2.1.11 มอนอโคลนอลแอนติบอดี.....	31
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	35
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	38
3.1 สัตว์ทดลอง เซลล์ และปรสิตที่ใช้ในงานวิจัย.....	38
3.2 สารเคมี.....	38
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	40
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	43
3.4.1 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต <i>P. olsenii</i> .....	43
3.4.2 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ ปรสิต <i>P. olsenii</i> .....	43
3.4.2.1 การเตรียมเซลล์มัยโอโลมา.....	43
3.4.2.2 การเตรียมเซลล์ม้าม.....	44
3.4.2.3 การหลอมรวมเซลล์.....	44
3.4.3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต <i>P. olsenii</i> .....	45
3.4.3.1 การคัดเลือกเซลล์โดยวิธี dot blotting.....	45
3.4.3.2 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution.....	45
3.4.3.3 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว.....	45
3.4.3.4 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง.....	46



3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดี.....	46
3.4.4.1 การทดสอบความไวและความสามารถในการจับกับแอนติเจนของมอนอโคลนอลแอนติบอดี.....	46
3.4.4.2 การตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี.....	46
3.4.5 การตรวจหาเชื้อปรสิตในหอยลายโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี.....	47
3.4.6 การตรวจสอบอิพิโทปด้วยวิธี indirect ELISA .....	49
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	50
4.1 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต <i>P. olsenii</i> .....	50
4.2 การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต <i>P. olsenii</i> ..	52
4.3 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดี.....	54
4.2.1 ผลการทดสอบความไวและความสามารถในการจับกับแอนติเจนของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต <i>P. olsenii</i> .....	54
4.2.2 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี.....	56
4.4 การตรวจหาเชื้อปรสิตในหอยโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี.....	57
4.5 การตรวจสอบอิพิโทปด้วยวิธี indirect ELISA.....	69
บทที่ 5 วิจัยผลการทดลอง .....	70
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	75
รายการอ้างอิง .....	76
ภาคผนวก ก.....	80
ภาคผนวก ข.....	82
ภาคผนวก ค.....	84
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	85

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 <i>Perkinsus</i> spp. ที่ถูกค้นพบทั่วโลก.....	22
ตารางที่ 4.1 แสดงระดับแอนติบอดีของหนูทดลองที่มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ด้วยวิธี dot blotting.....	52
ตารางที่ 4.2 สรุปรูปการหลอมรวมเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ เชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> .....	53
ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความไวและความสามารถในการจับกับเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ของ มอโนโคลนอลแอนติบอดี .....	56
ตารางที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงของมอโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการตรวจสอบไอโซไทป์.....	57
ตารางที่ 4.5 ผลการตรวจหาเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ในตัวอย่างหอยลาย ( <i>Paphia undulata</i> ) ที่มี รายงานว่ามีปรสิตติดเชื้อปรสิต .....	59
ตารางที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสงของมอโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละตัวและคูโคลน.....	69

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของ <i>P. olseni</i> ในหอยลายมะนิลา .....	24
รูปที่ 2.2 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี .....	30
รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดย denovo pathway และ salvage pathway .....	33
รูปที่ 2.4 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาใน HAT medium .....	34
รูปที่ 3.1 การทดสอบอิมมูโนฮิสโตเคมี .....	48
รูปที่ 4.1 ผล dot blotting เพื่อวัดระดับแอนติบอดีต่อ <i>P. olseni</i> ของซีรัมหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้น .....	51
รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ด้วยวิธี dot blotting .....	55
รูปที่ 4.3 การตรวจหาเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารของหอยลายที่มีรายงานการติดเชื้อ .....	60
รูปที่ 4.4 การตรวจหาเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารของหอยลายที่มีรายงานการติดเชื้อ .....	61
รูปที่ 4.5 การตรวจหาเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อของหอยลายที่ไม่มีรายงานการติดเชื้อ .....	62
รูปที่ 4.6 การตรวจหาเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกของหอยแมลงภู่ .....	63
รูปที่ 4.7 การตรวจหาเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารของหอยแครง .....	64
รูปที่ 4.8 การตรวจหาเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกของหอยนางรม .....	65
รูปที่ 4.9 การตรวจหาเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหาร และเหงือกของหอยลาย .....	66

รูปที่ 4.10 การตรวจหาเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณทางเดิน อาหารของหอยลายที่ไม่มีรายงานการติดเชื้อ และทางเดินอาหารและไข่ของ หอยนางรม.....	67
รูปที่ 4.11 การตรวจหาเชื้อปรสิต <i>P. olseni</i> ด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ของ หอยแครง และทางเดินอาหารของหอยแมลงภู่.....	68



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากปริมาณหอยสองฝาราวๆ 300,000 ตันที่ถูกเก็บและนำไปค้าขายในแต่ละปีของประเทศไทย ชนิดของหอยสองฝาส่วนใหญ่ที่สำคัญ ได้แก่ หอยลาย (*Paphia undulata*), หอยแครง (*Anadara granosa*), หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) และหอยนางรม (*Crassostrea commercialis* และ *C. lugubris*) โดยการประมงหอยลายส่วนใหญ่ได้จากธรรมชาติ ไม่มีการเพาะเลี้ยงในท้องถื่นทั่วไป อาศัยการจับของชาวประมง ดังนั้นการเพิ่มปริมาณผลผลิตจึงขึ้นอยู่กับการอนุรักษ์พื้นที่อยู่อาศัยของหอยลาย แตกต่างจากหอยสองฝาที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดอื่นที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในประเทศไทย และมีบางส่วนที่ได้จากการจับตามธรรมชาติ สำหรับหอยลายสายพันธุ์ *Paphia undulata* ถูกพบมากทั้งในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน โดยธรรมชาติหอยลายอาศัยอยู่ในพื้นที่ดินโคลนใต้ทะเลห่างจากชายฝั่งประมาณ 3-7 กิโลเมตร ดังนั้นหลายๆจังหวัดในประเทศไทยที่มีพื้นที่ติดชายฝั่งทะเลก็จะมีประชากรหอยลายอาศัยอยู่และสามารถเก็บผลผลิตได้ตลอดทั้งปี ซึ่งหากเกิดโรคระบาดในหอยลายจะส่งผลกระทบต่อชาวประมงท้องถื่นและอุตสาหกรรมหอยลายเป็นอย่างมาก เนื่องจากผลผลิตที่ได้คุณภาพส่วนใหญ่ได้มาจากการเก็บเกี่ยวตามธรรมชาติ สำหรับประเทศไทยมีรายงานการค้นพบโรคเพอร์คินซิส (Perkinsosis) ในหอยลายและหอยนางรม โดยทำการสำรวจหาปรสิตด้วยวิธี Ray's Fluid Thioglycollate medium (RFTM) [1]

โรคเพอร์คินซิสเกิดจากปรสิตใน Genus *Perkinsus* โดยพบรายงานการก่อให้เกิดโรคในหอยทะเลที่สำคัญทางเศรษฐกิจทั่วโลกโดยเฉพาะหอยสองฝา เช่น หอยนางรม หอยลาย หอยเป่าฮื้อ และหอยเชลล์ การติดเชื้อที่รุนแรงทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อและการตายของหอยเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันเชื้อปรสิต *Perkinsus* ถูกค้นพบหลายสปีชีส์ในหอยทะเลทั่วโลก แต่มีสองสปีชีส์ถูกจัดเข้าไว้ในบัญชีของเอกสารอ้างอิงเกี่ยวกับสุขภาพสัตว์ระหว่างประเทศ (The Aquatic Animal Health Code) ขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organization for Animal Health หรือ Office International des Epizooties; OIE) คือ *Perkinsus marinus* และ *Perkinsus olseni* สำหรับองค์กร OIE เป็นองค์กรระหว่างประเทศที่ดูแลในส่วนของสุขภาพสัตว์และขึ้นทะเบียนเกี่ยวกับโรคระบาดในสัตว์ นั้นหมายความว่าหากค้นพบเชื้อ *P. marinus* หรือ *P. olseni* ในหอย ต้องรายงาน

ไปยังหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง สำหรับประเทศไทยมีหน่วยงานที่รับผิดชอบ 4 หน่วยงาน ได้แก่ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กรมประมง กรมปศุสัตว์ และกรมวิชาการเกษตร [2] โดยในประเทศไทยพบเชื้อ *P. olseni* ในหอยลาย (*Paphia undulata*) และหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea* sp.) [3]

วงจรชีวิตของปรสิต *Perkinsus* มีทั้งหมดสามระยะ โดยระยะ trophozoite และ hypnospore เป็นระยะที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อหอย ส่วนระยะ zoospore เป็นระยะที่อยู่ภายนอกเนื้อเยื่อหอย ระยะ trophozoite จะแบ่งตัวภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของหอยและเป็นระยะที่พบมากที่สุด ในหอยที่ติดเชื้อ สำหรับ hypnospore สังเกตได้ยากภายในเนื้อเยื่อหอยแต่จะพบปริมาณมากเมื่อบ่มเนื้อเยื่อของหอยที่ติดเชื้อใน fluid thioglycollate medium (FTM) ซึ่งเลียนแบบสภาวะเสมือนปรสิตอยู่ในเนื้อเยื่อหอย เมื่อนำเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อมาในอาหาร trophozoite จะหยุดการแบ่งตัวและขยายขนาดเป็น hypnospore ( 50-100  $\mu\text{m}$ ) หลังจากย้าย hypnospore ลงสู่น้ำทะเล จะเกิดการแบ่งนิวเคลียส (karyokinesis) และแบ่งไซโทพลาสซึม (cytokinesis) เปลี่ยนเป็น zoosporangia ที่มี biflagellated zoospore จำนวนมากอยู่ใน สำหรับหอยนางรมพบว่าสามารถติดเชื้อปรสิต *P. marinus* จากการทดลองได้ทั้งระยะ trophozoite และ hypnospore ส่วนระยะ zoospore ก็ถูกเชื่อว่าเป็นหนึ่งในระยะแพร่เชื้อ ในขณะนี้ยังไม่พบรายงานการทดลองว่า ระยะ trophozoite หรือ hypnospore แพร่เชื้อสู่หอยลาย แต่อย่างไรก็ตามพบรายงานว่ามีการติดเชื้อในหอยลายจากรยะ zoospore ของ *P. olseni* [4]

สำหรับการวินิจฉัยโรคเพอร์คินซิสในเนื้อเยื่อหอยมีด้วยกันหลายวิธี เช่น Histology and electron microscopy โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการนำเอาเนื้อเยื่อของหอยนางรม *Crassostrea virginica* มาตรวจสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่เกี่ยวข้องกับปรสิต *Dermocystidium marinum* ด้วยการย้อมสี hematoxylin และ eosin [5] และเทคนิค fluid thioglycollate medium (FTM) โดยมีการนำเอาเนื้อเยื่อของหอยนางรมบ่มใน FTM เพื่อเปลี่ยนระยะของปรสิตจาก trophozoite เป็นระยะ hypnospore จากนั้นจึงย้อมด้วยลูกอลไอโอดีน (Lugol's iodine) เพื่อนำไปศึกษาปริมาณและความถี่การกระจายตัวของปรสิต [6] โดยหลักการของลูกอลไอโอดีน เป็นการย้อมเนื้อเยื่อที่กระทำต่อไกลโคเจนบนผนังเซลล์ วิธีการคือ หยดสารละลายไอโอดีนลงบนสไลด์ ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ทิ้งไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาทีและนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกคือเห็นเซลล์เป็นสีน้ำตาลไหม้หรือสีช็อคโกแลต ในขณะที่

เทคนิค PCR assay โดยมี DNA เป้าหมายคือ non-transcribed spacer (NTS) region ขนาด 307 bp พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูงกว่าเทคนิค FTM ในการจำแนก *P. marinus* ออกจาก *Perkinsus* spp.อื่น [7] เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา เป็นเทคนิคที่ใช้เวลาน้อยกว่าเทคนิค FTM และมีความจำเพาะสูงเช่นเดียวกับการ PCR assay โดยไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญหรือเครื่องมือและอุปกรณ์จำนวนมากในการปฏิบัติงาน แต่อาศัยการใช้แอนติบอดีซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อปรสิต *Perkinsus* ในการตรวจวินิจฉัยโรคปรสิตในเนื้อเยื่อหอยเท่านั้น โดยแอนติบอดีที่ใช้มี 2 แบบ คือ พอลิโคลนอลแอนติบอดีและมอนอโคลนอลแอนติบอดี เช่น การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ *P. marinus* ระยะเวลา hypnospore ที่ได้จากการบ่มเนื้อเยื่อหอยนางรมในอาหารเลี้ยงเชื้อ FTM [8] แต่พอลิโคลนอลแอนติบอดีพบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับสาหร่ายจำพวก dinoflagellate ที่อาศัยอยู่ในหอยทะเลได้เช่นเดียวกัน สำหรับมอนอโคลนอลแอนติบอดีซึ่งมีความจำเพาะและความไวสูง พบรายงานการผลิตต่อเชื้อปรสิตในระยะ trophozoite โดยมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับ *P. marinus* ได้ทุกระยะ [9] ต่างจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีระยะ hypnospore แต่ไม่สามารถจับกับระยะอื่นได้ [10]

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับกับเชื้อปรสิต *P. olseni* ภายในเนื้อเยื่อหอยลายอย่างจำเพาะ นอกเหนือจากวิธีเดิมคือการย้อมด้วยสารละลายลูกกลไอโอดีนซึ่งใช้ในการตรวจหาระยะ hypnospore โดยวิธีนี้ยังต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญเพื่อจำแนกชนิดของปรสิตภายในตัวหอย ดังนั้นมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตภายในเนื้อเยื่อหอยได้โดยวิธีการย้อมพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) ซึ่งเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจและเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการระบาดของโรคปรสิตในหอยทะเลต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

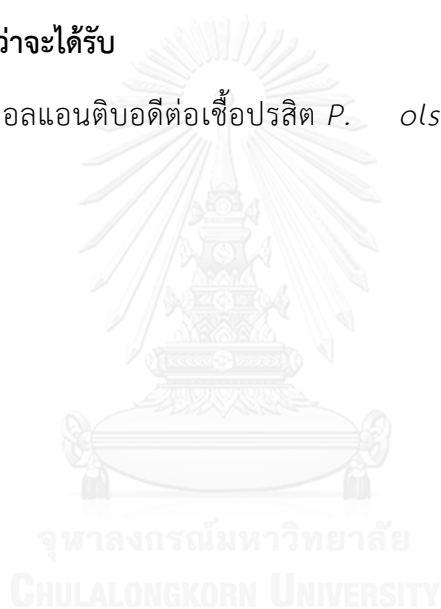
1. ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olseni* ในหอยลาย *Paphia undulata*
2. ศึกษาลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olseni*
3. เพื่อประเมินความสามารถของมอนอโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

### 1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ค้นคว้า ศึกษาและรวบรวมข้อมูลสำหรับการทำวิจัย
2. กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูทดลอง
3. การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olsenii*
4. ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดี
5. ตรวจสอบหาเชื้อปรสิตในหอยลายโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี
6. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง เผยแพร่ผลงานวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้มอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olsenii* และนำไปตรวจสอบหาเชื้อปรสิต *P. olsenii* ในหอยลายได้





## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แนวคิดและทฤษฎี

##### 2.1.1 หอยลายในประเทศไทย

Undulated surf clam เป็นชื่อสามัญของหอยลายสายพันธุ์ *Paphia* spp. โดยหอยลายชนิดนี้มีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ Undulated clam, Short-necked surf, Surf clam, Carpet clam และ Venus shell โดยในทางอุตสาหกรรมจะนิยมเรียก Baby clam เป็นชื่อทางการค้า และ Asari เป็นชื่อที่กำหนดโดยกรมศุลกากรสำหรับใช้ในการส่งออก

อนุกรมวิธาน [11]

Phylum Mollusca

Class Bivalvia

Order Eulamellibranchiata

Family Veneridae

Genus *Paphia*

หอยลาย (Undulated surf clam, *Paphia* spp.) ถูกพบทั้งหมด 3 สปีชีส์ในประเทศไทย ได้แก่ *Paphia undulata*, *Paphia alapapilionis* และ *Paphia crassisulca* โดยสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจต่อไทยคือ *Paphia undulata* [12]

##### 2.1.2 ลักษณะทั่วไปของหอยลาย (Undulated surf clam)

หอยลายเป็นหอยสองฝาชนิดหนึ่ง เปลือกของหอยลายจะมีรูปร่างเป็นรูปไข่ สีน้ำตาลอ่อน เปลือกบางและสมมาตรกันทั้งฝาบนและฝาล่าง ผิวชั้นนอกเรียบมันวาว มีเส้นรอยหยักสีน้ำตาลเข้มตลอดความยาวของเปลือก [12] ส่วนผิวเปลือกชั้นในเรียบ มีสีขาว ในส่วนของบานพับ (Hinge) ที่เป็นส่วนต่อระหว่างฝาทั้งสอง มีลักษณะคล้ายฟันซี่เล็กๆ ฝาละ 3 ซี่ [11] หอยลายกินแพลงก์ตอนเป็นอาหารรวมถึงสารที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ ได้แก่ ซากพืช ซากสัตว์ จุลินทรีย์ เป็นต้น นักชีววิทยาบางส่วนจัดหอยลายให้อยู่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตกินแพลงก์ตอน (Planktivore) โดยหอยจะดูดเอาน้ำที่มีอนุภาคของ

อาหารผ่านอวัยวะที่เป็นตัวกรอง นั่นก็คือเหงือก (Gill) ซึ่งได้รับการพัฒนาให้มีกลไกที่สามารถกรองอาหารและแลกเปลี่ยนแก๊สได้ เรียกกลไกนี้ว่า Lamellibranch โดยลักษณะของเหงือกจะเป็นส่วนที่ใช้ในการจำแนกชนิดของหอยสองฝา [12]

### 2.1.3 การเจริญเติบโตของหอยลายในประเทศไทย

การศึกษาการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของหอยลายที่ผ่านมา พบว่าข้อมูลทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์มีความแตกต่างกันไปตามแหล่งที่อยู่ เช่น จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบค่าสัมประสิทธิ์การเจริญเติบโตสูงที่สุด 1.74 ต่อปี แต่ในพื้นที่อื่น ๆ มีค่าใกล้เคียงกัน 0.9 ต่อปี โดยทั่วไปฤดูสืบพันธุ์ของหอยลายในประเทศไทยพบว่ามีสองช่วงในแต่ละปี คือ เดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม และเดือนสิงหาคมถึงเดือนพฤศจิกายน แต่สำหรับหอยลายที่อาศัยอยู่บริเวณรอบๆ อ่าวมหาชัย จังหวัดสมุทรสาครมีฤดูสืบพันธุ์เพียงช่วงเดียวคือ เดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคม ซึ่งแตกต่างจากแหล่งที่อยู่อื่น โดยนักวิจัยสันนิษฐานว่าเกิดจากการไหลบ่าของน้ำจืดจากแม่น้ำท่าจีน ในช่วงเดือนพฤศจิกายนของทุกๆปีและเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของหอยลายจำนวนมาก นอกจากนั้นพ่อแม่พันธุ์ของหอยลายยังมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการสืบพันธุ์ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม [12]

### 2.1.4 การประมงหอยลายในประเทศไทย

หอยลายเป็นสิ่งมีชีวิตหน้าดินถูกจัดอยู่ในกลุ่ม อินฟานา (infauna) คืออาศัยอยู่ในพื้นดินบริเวณที่อาศัยตลอด ซึ่งหอยลายมักจะพบบริเวณรอบอ่าวและปากแม่น้ำของไทยที่ความลึกของน้ำ 3-15 เมตร จากการวิเคราะห์ตัวอย่างตะกอนดินที่จังหวัดตราด พบว่าบริเวณพื้นดินที่หอยลายอาศัยอยู่มีธาตุอาหารสูง ร้อยละค่าเฉลี่ยของสารอินทรีย์รวมเป็น 2.06-3.23% และองค์ประกอบของตะกอนดิน ได้แก่ ดินทรายแป้ง 44.35% ดินเหนียว 38.19% และทราย 17.12% [12]

กรมประมงได้ทำการสำรวจแหล่งที่อยู่อาศัยของหอยลายในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน โดยใช้เรือวิจัย มีรายละเอียดจังหวัดในประเทศไทยที่พบแหล่งที่อยู่ของหอยลายดังนี้ [12]

อ่าวไทย ได้แก่ ตราด, สมุทรปราการ, สมุทรสาคร, สมุทรสงคราม, เพชรบุรี, ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี, นครศรีธรรมราช, สงขลา และปัตตานี

ทะเลอันดามัน ได้แก่ ระนอง, พังงา, ภูเก็ต, กระบี่, ตรัง และสตูล

### 2.1.5 โรคติดเชื้อในหอย

เนื่องจากหอยมีลักษณะการกินอาหารเป็นแบบกรองกิน ทำให้สามารถได้รับทั้งสารเคมีที่เป็นอันตรายและเชื้อก่อโรคได้ง่าย ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาต่อการควบคุมประชากรของหอยและโรคที่เกิดขึ้นในมนุษย์ อีกทั้งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมยังส่งผลกระทบต่อหอยโดยเฉพาะที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำเค็ม เช่น การเปลี่ยนแปลงของความเค็มและอุณหภูมิ น้ำ ลักษณะของคลื่นตามฤดูกาล และตำแหน่งที่มีโอกาสแตกต่างกันในการสัมผัสกับมลภาวะทั้งจากในเมืองและอุตสาหกรรมที่ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ โรคของหอยที่เกิดขึ้นในธรรมชาติจะไม่สามารถรักษาได้เนื่องจากเลี้ยงในระบบเปิด ทำให้ไม่สามารถใช้ยา รักษาโรคได้ แต่โรคที่เกิดขึ้นกับหอยในโรงเพาะเลี้ยงสามารถให้ยารักษาโรคได้ ยกเว้นโรคที่เกิดจากไวรัสบางโรค อีกทั้งโรคที่เกิดขึ้นกับหอยในโรงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการตีพิมพ์ยังมีน้อยเมื่อเทียบกับโรคของปลาและกุ้ง โรคของหอยที่พบว่ามีการศึกษามากที่สุดและมีข้อมูลตีพิมพ์อย่างกว้างขวางมักเป็นโรคปรสิตที่เกิดขึ้นกับหอยนางรมหรือหอยตะไกรในธรรมชาติ โรคเหล่านี้มักก่อให้เกิดความเสียหายมาก และไม่สามารถแก้ไขได้นอกจากย้ายสถานที่เลี้ยง หรือนำหอยชนิดอื่นที่ต้านทานโรคมะเร็งแทน [13]

หอยนางรม หอยลาย หอยแครง หอยเชลล์ และหอยแมลงภู่ เป็นหอยสองฝาส่วนใหญ่ที่พบครอบคลุมอุตสาหกรรมการผลิตและเพาะเลี้ยงหอยทั่วโลก โดยทั่วไปหอยสองฝาสายพันธุ์เหล่านี้จะถูกเพาะเลี้ยงในระบบที่มีความหนาแน่นสูงซึ่งใช้พื้นที่ในการเลี้ยงน้อย แต่อย่างไรก็ตามระบบการเลี้ยงแบบแออัดและมีพื้นที่จำกัดส่งผลให้ง่ายต่อการติดโรคระบาด การระบาดของโรคในหอยเป็นข้อจำกัดที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการค้าขาย ส่งผลกระทบต่อการพัฒนาเศรษฐกิจรวมไปถึงรายได้ทางเศรษฐกิจและสังคม ปัจจุบันมีการรายงานรายชื่อโรคระบาดในหอยทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยองค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) ได้แก่ Bonamiosis, Marteilioidosis, Haplosporidiosis, Marteilioidosis และ Perkinsosis สำหรับในน่านน้ำทะเลทวีปเอเชีย รายงานโรคระบาดที่พบบ่อยในหอยทะเล คือ โรคที่เกี่ยวข้องกับ *Perkinsus olseni* ซึ่งเป็นเชื้อปรสิตก่อโรค โดยพบว่าเป็นสาเหตุการตายหอยลายสายพันธุ์ *Ruditapes* จำนวนมาก ในชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียนและมหาสมุทรแอตแลนติกของยุโรป สำหรับประเทศไทยพบการติดเชื้อปรสิตชนิดนี้ในหอยลายสายพันธุ์ *Paphia undulata* [14]

### 2.1.6 โรคเพอร์คินซิส (Perkinsosis)

การศึกษาโรคเพอร์คินซิสครั้งแรกเริ่มในปี 1946 เมื่อพบการตายของหอยนางรมเป็นจำนวนมากในรัฐหลุยส์เซียน่า (อ่าวเม็กซิโก, สหรัฐอเมริกา) และเนื่องจากความสำคัญทางเศรษฐกิจของทรัพยากรหอย ทำให้กลุ่มวิจัยต่างๆ ได้ก่อตั้งขึ้นเพื่อระบุสาเหตุของปัญหา ในช่วงแรกมีการมุ่งเน้นไปที่น้ำมันดิบที่รั่วไหลลงสู่แหล่งน้ำจากบริษัทน้ำมันแห่งหนึ่งซึ่งอยู่ใกล้ชายฝั่ง แต่หลังจากนั้น 2 ปี A.W. Collier, J.G. Mackin และ H.M. Owen ได้ค้นพบสิ่งมีชีวิตรูปร่างกลมในหอยนางรมที่เป็นโรค แต่ไม่พบในหอยปกติ การทำงานร่วมกันของ 3 นักวิจัยเป็นผลให้เกิดการตั้งชื่อสิ่งมีชีวิตที่พบว่าเป็น *Dermocystidium marinum* (Dermo) หรือ *Perkinsus marinus* [14]

มีการศึกษาและจำแนกอนุกรมวิธานของเชื้อปรสิตที่ในปัจจุบันคือ *P. marinus* [14] ได้ดังนี้

Phylum Apicomplexa

Class Perkinsea

Order Perkinsida

Family Perkinsidae

Genus *Perkinsus*

*P. marinus* ถูกพบในหอยนางรมพื้นเมือง *Crassostrea virginica* ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแอตแลนติกของประเทศสหรัฐอเมริกาและเม็กซิโก ตั้งแต่รัฐเมนซึ่งอยู่ทางตะวันออกเฉียงสุดของอเมริกาจนถึงรัฐตาบัสโกของเม็กซิโก และยังพบในอ่าวเม็กซิโกอีกด้วย นอกจากนี้ *P. marinus* ยังมีการค้นพบ *Perkinsus* sp. สปีชีส์อื่นอีกหลายสปีชีส์ (ตารางที่ 2.1)

*P. olseni* จากรายงานพบในหอยทะเลทั่วโลก โดยเฉพาะในทวีปเอเชีย ได้แก่ หอยเป่าชื่อ *Halotis ruber* บริเวณภาคใต้ของประเทศออสเตรเลีย, หอยมุก *Pinctada maxima*, หอยหลายสายพันธุ์ในประเทศออสเตรเลีย, หอยลายมะนิลา *Tapes philippinarum* ประเทศเกาหลีใต้, หอยลาย ประเทศญี่ปุ่น, หอยลาย *Ruditapes philippinarum* ประเทศจีน และหอยลาย *Paphia undulata* ประเทศไทย

Azevedo (1989) ได้รายงานการติดเชื้อปรสิต *Perkinsus* ในหอยลาย *R. decussatus* ในโปรตุเกสและให้ชื่อสายพันธุ์ใหม่นี้ว่า *P. atlanticus* [15] โดยยังได้รับรายงานในหอยลายหลายชนิด เช่น *T. decussatus*, *T. philippinarum*, *Venerupis pullastra* และ *Paphia aurea* บริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแอตแลนติกและเมดิเตอร์เรเนียนของสเปน นอกจากนี้ยังพบรายงานปรสิตคล้าย

*Perkinsus* sp. ในโซนยุโรปหลายประเทศ เช่น ฝรั่งเศส อิตาลี และสเปน อีกทั้งยังพบในหอยลาย *T. decussatus* และ *T. philippinarum* ที่ชายฝั่งเมดิเตอร์เรเนียนของแอฟริกาเหนือ จากข้อมูลรายงานทางพันธุกรรมพบว่า *P. olsenii* และ *P. atlanticus* เป็นชนิดเดียวกัน ความเหมือนทางพันธุกรรมของ *Perkinsus* sp. ทั้งสองสปีชีส์นั้น สนับสนุนสมมติฐานที่ว่ามีการเคลื่อนย้ายปรสิต *P. olsenii* จากทวีปเอเชียไปทวีปยุโรปโดยการขนส่งหอยลาย *T. philippinarum* ที่ติดเชื้อ ต่อมา มีการยืนยันว่าพบ *Perkinsus* ในหอยเจ้าบ้านอย่างกว้างขวาง

*P. qugwadi* เป็นสาเหตุให้หอยเชลล์ญี่ปุ่น *Patinopecten yessoensis* ตายเป็นจำนวนมากในรัฐบริติชโคลัมเบีย ประเทศแคนาดา

*P. chesapeaki* ถูกพบในหอยลาย *Mya arenaria* บริเวณอ่าวเชซาพีค

*P. andrewsi* ได้รับรายงานในหอยลายบอลลติก *Macoma balthica* จากอ่าวเชซาพีค เช่นเดียวกัน และยังพบในหอยนางรม *C. virginica* หอยลาย *Macoma mitchelli* และ *Mercenaria mercenaria*

*P. mediterraneus* เป็นสปีชีส์ล่าสุดที่พบในหอยนางรมยุโรป *Ostrea edulis* บริเวณหมู่เกาะแบลีแอริกในทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศสเปน

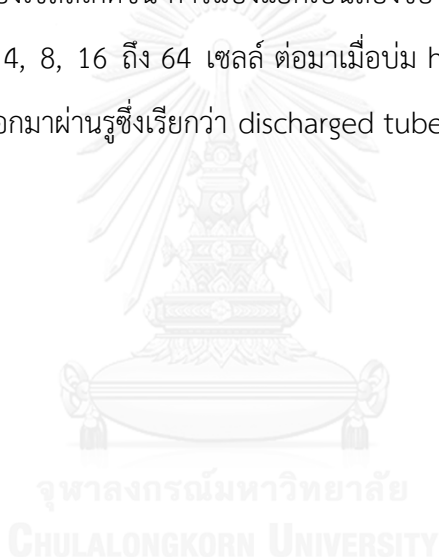
โรคเพอร์คินซ์สส่งผลกระทบต่อหอยหลากหลายชนิดทั่วโลก เช่น หอยนางรม หอยเป่าฮื้อ หอยลาย หอยเชลล์ หอยมุก หอยแครง หอยแมลงภู่ เป็นต้น โดยในบรรดาโรคติดเชื้อในหอย โรคเพอร์คินซ์สทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่รุนแรงมากที่สุด ดังนั้นนักวิจัยจากทั่วโลกจึงให้ความสำคัญกับการศึกษาปรสิต *Perkinsus*

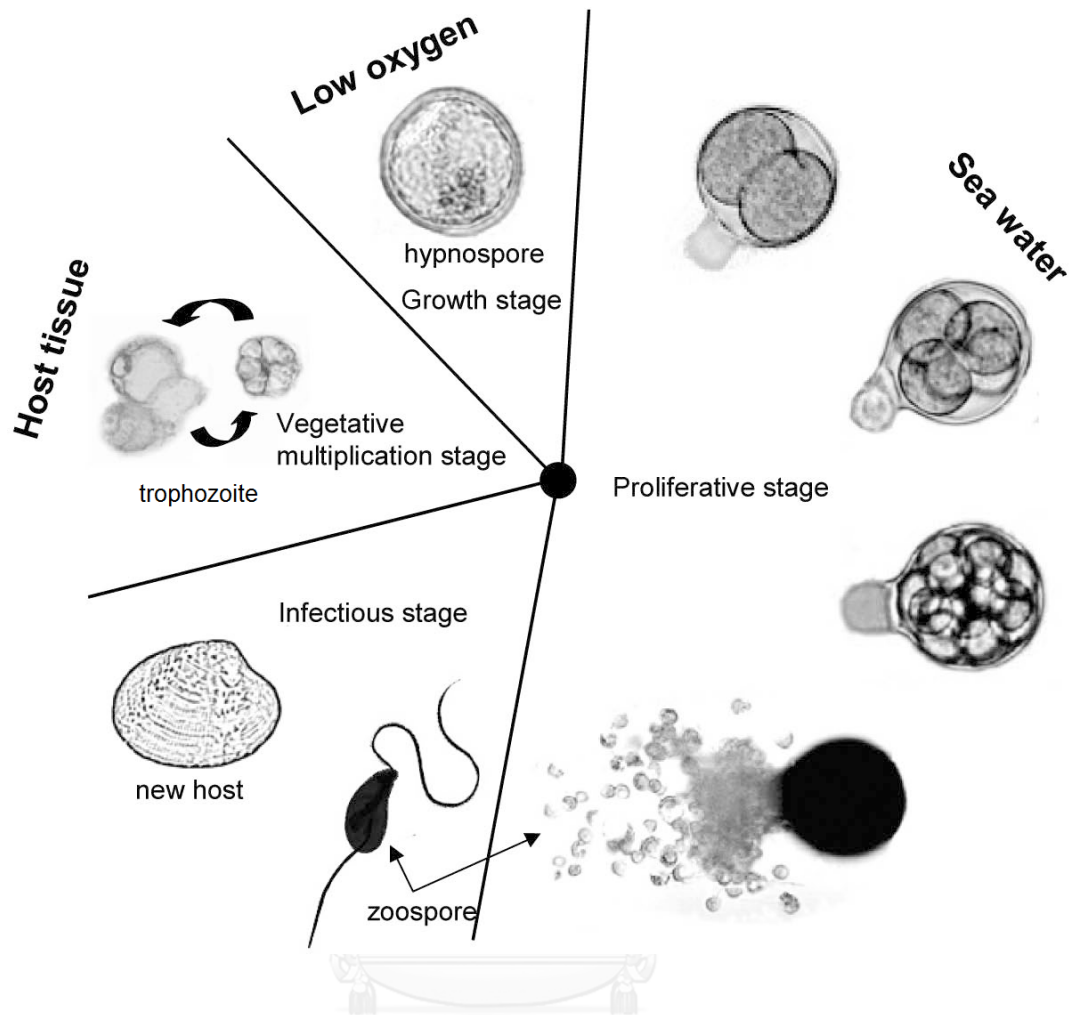
ตารางที่ 2.1 *Perkinsus* spp. ที่ถูกค้นพบทั่วโลก [1]

Species	Synonyms	Location	Hosts	Reportable Disease
<i>Perkinsus marinus</i>	<i>Dermocystidium marnum</i> , <i>Labymithomyxa marina</i>	Eastern coast of U.S. & coastal Gulf of Mexico	<i>Crassostrea virginica</i> (Eastern oyster), <i>C. ariakensis</i> (Asian oyster), <i>C. rhizophorae</i> (Mangrove oyster)	Yes
<i>Perkinsus olseni</i>	<i>Perkinsus atlanticus</i>	France, Portugal, Galicia (NW Spain), Huelva coast (SW Spain), Mediterranean Sea, and coast of Uruguay. West and south coasts of Korea; in Kumamoto and Hiroshima Prefectures of Japan; and along the northern coast of the Yellow Sea in China. Great Barrier Reef, South Australia and northern Western Australia. Gulf of Thailand in Chonburi Province, Thailand	Many bivalve molluscs, esp. clams: <i>Tapes decussatus</i> , <i>Tapes (Tapes) aureus</i> , <i>Tapes pulliastrea</i> , <i>Venerupis philippinarum</i> , <i>Pitar rostrata</i> , <i>Tridacna gigas</i> , <i>Tridacna maxima</i> , <i>Tridacna crocea</i> , <i>Anadara trapezia</i> , <i>Katelysia rhytiphora</i>	Yes
<i>Perkinsus chesapeakei</i>	<i>Perkinsus andrewsi</i>	Virginia and Maryland (Chesapeake Bay)	<i>Mya arenaria</i> (soft shell clam) and <i>Macoma balthica</i> (Baltic clam)	No
<i>Perkinsus qudwadi</i>		British Columbia, Canada	<i>Patinopecten yessoensis</i> (scallop)	No
<i>Perkinsus mediterraneus</i>	(Closely related to a distinct sister clade of <i>P. olseni</i> )	Mediterranean coast of Spain and France	<i>Ostrea edulis</i> (European flat oyster) and possibly <i>Crassostrea angulata</i> (Portuguese oyster)	No
<i>Perkinsus</i> sp.		Japan	<i>Patinopecten yessoensis</i> (scallop)	No
<i>Perkinsus</i> sp.		Northern Western Australia	<i>Paphai undulata</i>	No
<i>Perkinsus</i> sp.		Brazil	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	No
<i>Perkinsus</i> sp.		Eastern coast of U.S.	<i>Mercenaria mercenaria</i> (Northern hard clam)	No
<i>Perkinsus honshuensis</i>		Japan	<i>Venerupis philippinarum</i> (Manila clam)	No
<i>Perkinsus beihaiensis</i>		China	<i>Crassostrea hongkongensis</i> , <i>C. ariakensis</i> , <i>Pinctada margaritifera</i> , <i>P. martensii</i>	No

### 2.1.7 วงจรชีวิตและการแพร่ระบาดของเชื้อปรสิต *P. olseni*

*P. olseni* มีวงจรชีวิตทั้งหมด 3 ระยะ ได้แก่ ระยะ trophozoite, hypnospore และ zoospore ในเนื้อเยื่อหอยลาย (รูปที่ 2.1) trophozoite มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวที่มีหลายนิวเคลียส อยู่ภายใน เมื่อ trophozoite อยู่ในสภาวะไม่มีออกซิเจน เช่น ใน fluid thioglycollate medium (FTM) หรือในเนื้อเยื่อตาย (necrotic tissues) จะพัฒนาเข้าสู่ระยะ hypnospore หรือระยะ prezoosporangia ซึ่งเซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นและผนังเซลล์หนา ทำให้สามารถย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม หรือสีน้ำตาลของลูกบอลไอโอดีนได้ เมื่อบ่ม hypnospore ในน้ำทะเลที่มีการให้ออกซิเจน พบว่าจะเกิดกระบวนการ zoosporulation จากนั้นหลังบ่ม hypnospore 2-3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จะเกิดรูที่บริเวณเซลล์ และมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น การแบ่งแยกเป็นสองของนิวเคลียสทำให้ได้ bi-flagellated zoospore เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 4, 8, 16 ถึง 64 เซลล์ ต่อมาเมื่อบ่ม hypnospore ต่อเป็นเวลา 2-3 วัน zoospore จะถูกปล่อยออกมาผ่านรูซึ่งเรียกว่า discharged tube [16]





รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของ *P. olseni* ในหอยลายมะนิลา [16]

CHULALONGKORN UNIVERSITY

การแพร่ระบาดของเชื้อปรสิตเกิดขึ้นโดยไม่ผ่านโฮสต์ตัวกลาง ในปี 1987 White และคณะ ได้รายงานเกี่ยวกับการแพร่ระบาดของเชื้อปรสิต *P. marinus* สู่หอยนางรมปกติจากปรสิตภายนอกของหอยทาก *Boonea impressa* ที่ใช้เลี้ยงหอยนางรมที่ติดเชื้อ อย่างไรก็ตามการแพร่ระบาดเกิดในพื้นที่ที่ไม่มีหอยทาก ดังนั้นปรสิตภายนอกของหอยทากจึงไม่มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการแพร่ระบาด โดยทุกระยะของ *Perkinsus* ผ่านการทดสอบมาแล้วว่าเป็นสาเหตุของการก่อโรคเพอร์คินซิส ยกตัวอย่างเช่น หอยนางรมที่ฉีดเชื้อปรสิต *P. marinus* ระยะ trophozoite เข้าไปทำให้เกิดการแพร่ระบาดที่สูงและมีความรุนแรงมากกว่าฉีดด้วยระยะ hypospore แต่อย่างไรก็ตามระยะ trophozoite ก็ยังไม่ใช่วิธีที่สำคัญหรือมีประสิทธิภาพในการแพร่เชื้อสู่ธรรมชาติ เซลล์ *P. marinus* ที่มีชีวิตจะถูกปล่อยจากหอยนางรมติดเชื้อที่มีชีวิตผ่านผนังหลอดเลือดหรือผ่านอุจจาระ ดังนั้นหอยติดเชื้อที่มีชีวิต



จึงเป็นแหล่งแพร่เชื้อต่อเนื่องของระยะ trophozoite และหากวัฏจักรสมมุติที่อธิบายข้างต้นเกิดในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ การตายของหอยไม่สามารถยับยั้งการแพร่ระบาดได้ เนื่องจากมีการเปลี่ยนรูปเป็นระยะ hypnospore ซึ่งสามารถแพร่เชื้อโดยตรงหรือปล่อย zoospore โดยเมื่อเร็ว ๆ นี้พบอัตราการระบาดสูงที่สุดของ *P. marinus* สังเกตได้จากการตายของหอยนางรม *C. virginica* จำนวนมากเนื่องจากปรสิตชนิดนี้ [17]

### 2.1.8 ระบบภูมิคุ้มกันของหอยลายต่อเชื้อปรสิต *Perkinsus*

ระบบภูมิคุ้มกันของหอยสองฝาขึ้นอยู่กับระบบ nonlymphoid เป็นส่วนใหญ่เนื่องจากหอยสองฝาเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยกลไกการป้องกันภายในของหอยมีทั้งแบบ cellular component ได้แก่ phagocytosis และ encapsulation ด้วยการทำลายเชื้อก่อโรคผ่านเอนไซม์ และ oxygen metabolite แบบ humoral component ประกอบด้วย lectin (agglutinin และ opsonin), lysosomal enzyme (phosphatase acid, lysozyme และ hydrolytic enzyme), antimicrobial peptide และ protease inhibitor เป็นต้น

เลคติน (lectin) เป็นกลุ่มของไกลโคโปรตีนที่มีความหลากหลายสามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตและลิแกนด์อื่นๆได้ ได้แก่ โปรตีน, ไชมัน และกรดนิวคลีอิก มีการทำงานหลายรูปแบบในระบบภูมิคุ้มกันสำหรับการป้องกันเชื้อโรคแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune response) และการป้องกันการเกิดอาการแพ้ภูมิคุ้มกันตัวเอง (autoimmune reaction) โดยจากการศึกษาหน้าที่ของเลคตินในระบบภูมิคุ้มกันสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังพบว่า สามารถเหนี่ยวนำเซลล์เม็ดเลือดให้เกิดกระบวนการกลืนกินเซลล์ (phagocytosis) เมื่อมีเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ตัวสัตว์ เลคตินจึงเป็นสารที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลัง เปรียบเทียบหน้าที่คล้ายแอนติบอดีในระบบภูมิคุ้มกันแต่ต่างกันตรงที่เลคตินไม่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม จากการศึกษาเลคตินของหอยลายมะนิลา (Manila clam) ที่ตรวจพบระหว่างการติดเชื้อ *P. olseni* แสดงให้เห็นว่า หอยลายมะนิลาจะสังเคราะห์ C-type lectin ที่เรียกว่า Manila clam lectin (MCL) ระหว่างการติดเชื้อปรสิตชนิดนี้ โดยเลคตินที่แยกได้นั้นสามารถจับกับบริเวณผิวเซลล์ของ *Perkinsus* ได้ โดย MCL จะถูกหลั่งเข้าสู่ hemolymph ของหอยและเข้าไปล้อมรอบปรสิต *P. olseni* เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดของหอยตรวจพบได้และเกิดกระบวนการ phagocytosis เพิ่มขึ้น [3]

สำหรับขบวนการเกิด encapsulation ต่อเซลล์ปรสิต จะพบได้ง่ายในสไลด์ทางด้านพยาธิสภาพ [3]

### 2.1.9 การตรวจวินิจฉัยโรคเพอร์คินซัส

#### 2.1.9.1 เทคนิค Ray's fluid thioglycollate (RFTM)

วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อปรสิต *Perkinsus* คือ การนำเนื้อเยื่อของหอยบ่มใน fluid thioglycollate medium (FTM) เทคนิคนี้ถูกค้นพบโดย Ray ในปี 1950 สำหรับการตรวจวินิจฉัยจะทำการใช้ antibiotic กับเนื้อเยื่อหอย ก่อนบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปรสิต RFTM เพื่อความปลอดภัย หลังจากนั้น 48 ชั่วโมง เซลล์ปรสิตจะมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยสามารถสังเกตได้ง่ายขึ้นจากการย้อมด้วยลูกบอลไอโอดีน และส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นเป็นลักษณะวงแหวนสีน้ำเงินดำ แต่เทคนิคนี้จะไม่จำเพาะต่อสปิซิสของเชื้อปรสิต *Perkinsus* [18]

#### 2.1.9.2 เทคนิคการตรวจวินิจฉัยทางโมเลกุล

เมื่อหลายปีมานี้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาและเทคนิคทางโมเลกุลถูกพัฒนาเพื่อเป็นทางเลือกนอกจากเทคนิค RFTM ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยโดยเจาะจงไปที่สปิซิสของ *Perkinsus* โดยงานวิจัยที่ผ่านมาของ Choi และคณะ (1991) ได้มีการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *P. marinus* ระยะ hypnospore พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับระยะอื่นของปรสิตได้ ซึ่งให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของอิพิโทปของระยะต่างๆ ระหว่างการเจริญของผนังเซลล์ของ hypnospore [8] เช่นเดียวกับงานวิจัยที่เกิดขึ้นในมอนอโคลนอลแอนติบอดี [10] ตรงกันข้ามกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกพัฒนาให้สามารถจับกับทุกระยะของ *P. marinus* และจดจำสารโมเลกุลเล็กที่อยู่ในเนื้อเยื่อโฮสต์ โดยพบว่ายังสามารถจดจำเชื้อปรสิต *P. olseni* หรือ *P. atlanticus* และสปิซิสอื่นของ *Perkinsus* ได้เช่นกัน ต่อมาแอนติบอดีเหล่านี้มีการศึกษาว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ dinoflagellate สำหรับเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ที่ใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ extracellular product ใน *P. marinus* พบว่ามีความไวมากกว่าเทคนิค RFTM [19]

สำหรับเทคนิค PCR ที่มีเป้าหมายคือลำดับดีเอ็นเอที่ non-transcribed spacer (NTS) region ของ *P. marinus* โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วน 307 bp พบว่ามีความไวและ

จำเพาะมากกว่าเทคนิค RFTM ในการแยก *P. marinus* ออกจากสปิชีส์อื่นของ *Perkinsus* [7] ต่อมา มีการออกแบบ PCR primer บนลำดับดีเอ็นเอ ITS region เพื่อตรวจหาเชื้อปรสิต *Perkinsus* ทุกสปิชีส์ ยกเว้น *P. qugwadi* [20]

## 2.1.10 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

### 2.1.10.1 แอนติเจน (Antigen, Ag)

แอนติเจน คือ สิ่งแปลกปลอมหรือสารที่ไม่มีอยู่ในร่างกายเมื่อเข้าสู่ร่างกายสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ โดยทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนนั้นได้ๆ โดยแอนติเจนต้องมีคุณสมบัติ 2 ประการ คือ

1.) Immunogenicity คือ ความสามารถของแอนติเจนต่อการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response) ในร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์ หรืออีกนัยหนึ่ง คือความสามารถในการเหนี่ยวนำ humoral immune response และ cell mediated immune response สารที่สามารถกระตุ้นให้เกิด immune response เรียกว่า immunogen

2.) Specific reactivity หรือ antigenicity คือ ความสามารถของแอนติเจนในการทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะกับแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นของแอนติเจนนั้นๆเอง บนแอนติเจน 1 โมเลกุลประกอบด้วยหน่วยย่อยบนโมเลกุลหรือตำแหน่งย่อยๆบนผิวของแอนติเจนที่จะเป็นตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเรียกหน่วยย่อยเหล่านั้นว่า antigenic determinant หรือ อีพิโทป (epitope) โดยแอนติเจน 1 ตัวสามารถมีหลายอีพิโทปและแอนติเจนแต่ละชนิดจะมีอีพิโทปไม่เท่ากัน

คุณสมบัติโดยทั่วไปของแอนติเจน

1.) Foreignness ต้องเป็นสิ่งแปลกปลอม โดยจะต้องไม่พบในเซลล์ร่างกาย หรือเป็นสิ่งที่อยู่ในร่างกายแต่ไม่เคยสัมผัสกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ตัวอสุจิ, กระจกตา เป็นต้น หากเกิดการเสียดลอดออกมา ระบบภูมิคุ้มกันจะจัดเป็นสิ่งแปลกปลอมเช่นกัน

2.) Molecular size สารที่เป็นแอนติเจนที่ดีต้องมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ขึ้นไป สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 มักเป็นแอนติเจนที่ไม่ดีหรือไม่สามารถเป็นแอนติเจนได้

3.) Chemical complexity ถ้าแอนติเจนมีโครงสร้างซับซ้อนจะกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้

ดี เช่น กรดอะมิโนที่เป็นโมเลกุลเดี่ยว (monomer) จะไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน แต่ถ้าโปรตีนประกอบด้วยโมเลกุลหลายโมเลกุล (polymer) จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้

4.) Charge ความเป็นแอนติเจนที่ดีไม่ขึ้นกับประจุของแอนติเจนนั้นๆ แต่มีผลต่อแอนติบอดีที่เกิดขึ้น เช่น การกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่มีประจุบวก แอนติบอดีที่เกิดขึ้นจะเป็นประจุลบ

5.) Accessibility การเรียงตัวที่เหมาะสมของอีพีโทป จะทำให้เกิดแอนติบอดีได้ เนื่องจากการเรียงตัวที่หนาแน่นเกินไปอาจทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถเข้าไปรับรู้ได้

6.) Chemical composition สารอินทรีย์ทั้งหมดรวมถึงจุลินทรีย์และผลผลิตของจุลินทรีย์ เช่น พิษ (toxin) หรือแม้แต่สารสังเคราะห์บางอย่างก็สามารถเป็นแอนติเจนได้ ระหว่างโปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิกและไขมัน โปรตีนจัดเป็นแอนติเจนที่ดีที่สุด

7.) Metabolizable สารที่เป็นแอนติเจนที่ดีต้องถูก macrophage จับกินและย่อยได้ในเซลล์ของ macrophage แต่สารบางชนิด เช่น polystyrene ที่ถูก macrophage กินแต่ไม่ถูกย่อยก็สามารถเป็นแอนติเจนได้แต่ไม่ดีนัก และถ้าถูกย่อยจนหมดไปก็จะไม่เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

8.) Responding host ความเป็นแอนติเจนที่ดีก็ขึ้นกับคุณสมบัติของ host ซึ่งจะแตกต่างกันเมื่อต่าง species หรือแม้แต่ species เดียวกันก็ต่างกันในแต่ละบุคคล นอกจากนั้นก็มีเรื่องของ อายุ เพศ พันธุกรรม อาหาร ปริมาณแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกาย (dose) น้อยหรือมากเกินไป รวมทั้งทางที่แอนติเจนเข้าสู่ร่างกายอีกด้วย (route)

Adjuvant เป็นสารที่เมื่อให้เข้าสู่ร่างกายพร้อมกับแอนติเจนจะช่วยให้ร่างกายมีการตอบสนองต่อแอนติเจนนั้น ๆ ได้ดียิ่งขึ้น โดยอาจจะไปยืดระยะเวลาของแอนติเจนให้อยู่ในร่างกายได้นานขึ้น ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนได้มากขึ้นหรือทำให้เกิดการอักเสบบริเวณที่ได้รับซึ่งจะทำให้มีการรวมตัวของเม็ดเลือดขาวบริเวณนั้นจำนวนมาก ก็จะมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้น ตัวอย่างของ Adjuvant ที่นิยมใช้ ได้แก่ Freund's adjuvant ซึ่งแบ่งเป็น Complete Freund's adjuvant เป็น water-in oil emulsion ที่มีเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่ฆ่าด้วยความร้อนแล้วอยู่ในชั้นของน้ำมันด้วย โดย complete Freund's adjuvant จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้ดีกว่า แต่มักจะเกิด granuloma หรือมีการอักเสบรุนแรงบริเวณที่ฉีด โดยทั่วไปการฉีดสัตว์ทดลองครั้งแรก (primary immunization) มักจะใช้ complete Freund's adjuvant แต่ครั้งต่อ ๆ มา (booster) ก็จะใช้ incomplete Freund's adjuvant ข้อควรระวัง Freund's adjuvant ใช้กับสัตว์ทดลองเท่านั้น ถ้าฉีดในมนุษย์จะทำให้เกิดการอักเสบที่รุนแรง

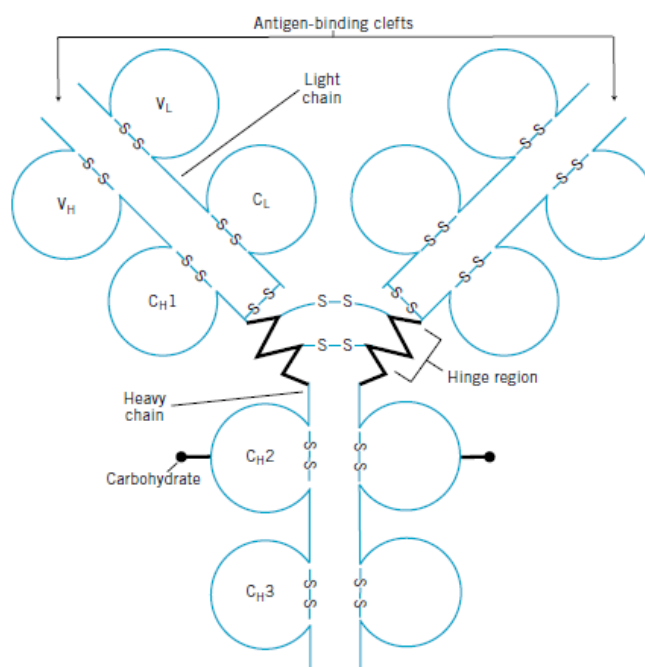
และเรื้อรัง และถ้าเข้าตาอาจทำให้ตาบอดได้ สำหรับ Incomplete Freund's adjuvant มีลักษณะเป็น water-in-oil emulsion เช่นกัน แต่ไม่มีเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

แอนติเจนบางชนิดมีคุณสมบัติไม่ครบถ้วน คือมีความจำเพาะแต่ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ เรียกแอนติเจนนั้นว่า แฮปเทน (hapten) หรือ incomplete antigen หากจับกับสารที่มีโมเลกุลใหญ่กว่าที่เรียกว่า carrier จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้ เช่น arsanilic acid เป็นแฮปเทนเมื่อรวมกับโปรตีน (carrier) จะสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีต่อ arsanilic acid ได้ [21]

#### 2.1.10.2 แอนติบอดี (Antibody, Ab)

แอนติบอดีอยู่ในกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) คือโปรตีนที่สร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิด บี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) ที่เปลี่ยนแปลงเพื่อทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีเรียกว่า พลาสมาเซลล์ (plasma cell) โดยแอนติบอดีมีความสามารถจับกับ antigenic determinant หรืออีพิโทปของแอนติเจนที่เป็นตัวกระตุ้นได้อย่างจำเพาะ

โครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีเป็นรูปตัววาย (รูปที่ 2.2) ประกอบด้วยสายโพลีเพปไทด์ 4 สาย คือ โปรตีนสายยาวและมีน้ำหนักโมเลกุลมาก (heavy chain, H) 2 สายที่เหมือนกันและอีก 2 สายที่เป็นโปรตีนสายสั้นและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (light chain, L) ซึ่งมีลักษณะเหมือนกันทั้ง 2 สายเช่นเดียวกัน H-chain และ L-chain ทั้ง 4 สายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (interchain disulfide bonds) ปลายข้างหนึ่งของแต่ละสายจะเป็นกรดอะมิโน เรียกว่า amino terminal หรือปลาย -N หรือ -NH<sub>2</sub> ส่วนปลายอีกข้างจะเป็นคาร์บอกซิลิก เรียกว่า carboxy terminal หรือปลาย -C หรือ -COOH โดยทั้ง 4 สายจะหันปลาย -NH<sub>2</sub> หรือ -COOH ไปทางเดียวกัน โดยจะมี hinge region อยู่ตรงกลางระหว่าง H-chain และ L-chain เป็นบานพับที่ยับเปลี่ยนรูปร่างได้ ทำให้แอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนได้หลายแบบและได้จำนวนสูงสุด ซึ่งบริเวณนี้สามารถยืดหยุ่นได้ทำให้แขนทั้ง 2 ข้างยืดห่างกัน และจับแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น



รูปที่ 2.2 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี [22]

แอนติบอดีสามารถแบ่งได้ 5 class ตามความแตกต่างของ H-chain คือ IgG, IgM, IgA, IgD และ IgE โดย H-chain เป็น gamma ( $\gamma$ ), mu ( $\mu$ ), alpha ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ) และ epsilon ( $\epsilon$ ) ตามลำดับ H-chain แต่ละ class จะมีความแตกต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุล การเรียงตัวของกรดอะมิโน ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต antigenic determinant คุณสมบัติทางชีวภาพและการเคลื่อนที่เมื่อทำ electrophoresis ส่วน L-chain สามารถแบ่งได้เป็น 2 type คือ kappa ( $\kappa$ ) และ lambda ( $\lambda$ ) โดยในมนุษย์สัดส่วน  $\kappa$  และ  $\lambda = 60:40$  โดยแอนติบอดี 1 โมเลกุล จะประกอบด้วย L-chain ชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น เช่น IgG kappa หรือ IgG lambda [23]

คุณสมบัติของแอนติบอดีแต่ละชนิด [24]

1. IgG เป็นแอนติบอดีชนิดที่พบมากที่สุดในร่างกายประมาณ 80% ของแอนติบอดีทั้งหมด เป็นแอนติบอดีที่สามารถถ่ายทอดจากมารดาไปสู่ทารกได้ผ่านสายรก มีส่วนจับแอนติเจน 2 ตำแหน่ง IgG จะมีการสร้างเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการกระตุ้นด้วยแอนติเจนเดิมครั้งที่สองหรือครั้งต่อไป IgG มี 4 subclass คือ IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> และ IgG<sub>4</sub> โดย IgG สามารถตรึงคอมพลีเมนต์ได้ โดยเฉพาะ IgG<sub>3</sub> มีความสามารถสูงสุด

2. IgA เป็นแอนติบอดีชนิดที่พบมากในซีรัมและสารคัดหลั่ง จัดเป็นภูมิคุ้มกันเฉพาะที่ (local immunity) IgA ส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลเดี่ยว (monomer) มี IgA ประมาณ 10-15% ที่อยู่ในรูป polymer เช่น dimer (2 โมเลกุล) หรือ trimer (3 โมเลกุล) สำหรับ IgA ที่พบในซีรัมส่วนใหญ่จะเป็นชนิด monomer และ IgA มี 2 subclass คือ IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>

3. IgM เป็นแอนติบอดีที่มีขนาดใหญ่ที่สุดประกอบด้วย 5 หน่วย (pentamer) เชื่อมต่อกันด้วย J chain จึงมีบริเวณที่จับกับแอนติเจนได้ 10 ตำแหน่ง IgM เป็นแอนติบอดีชนิดแรกที่ร่างกายสร้างขึ้นหลังจากมีการปฏิสนธิเพียง 10 สัปดาห์ IgM เป็นแอนติบอดีที่สามารถตรึงคอมพลีเมนต์ได้ และเมื่อทดสอบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) กับแอนติเจน พบว่าจะมีการเกาะกลุ่มที่ดีกว่าแอนติบอดีชนิดอื่นเนื่องจากมีบริเวณที่จับกับแอนติเจนได้มากกว่า Ig class อื่นๆ IgM ไม่มี subclass

4. IgD เป็นแอนติบอดีที่ไม่ทราบคุณสมบัติทางชีวภาพที่ชัดเจน เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงการผลิต H-chain ชนิดต่างๆบนผิวของ B lymphocyte ส่วนใหญ่จะเป็น IgD (surface Ig) ที่หลุดออกมาจากผิวของ B lymphocyte และพบได้น้อยในซีรัม IgD ไม่มี subclass

5. IgE เป็นแอนติบอดีที่พบปริมาณมากในผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับภูมิแพ้หรือติดเชื้อปรสิต มีส่วน Fc ที่สามารถจับได้กับเซลล์เม็ดเลือดขาวบางชนิด IgE ไม่มี subclass

เมื่อร่างกายถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่างกัน โดย IgM จะเป็นแอนติบอดีชนิดแรกที่ถูกสร้างขึ้น และมี IgG สร้างขึ้นภายหลังในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่าเป็นการตอบสนองขั้นต้น (primary immune response) และเมื่อได้รับแอนติเจนซ้ำอีกครั้งจะพบว่ามี การตอบสนองโดยสร้าง IgG เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นกว่าการตอบสนองครั้งแรก ในขณะที่ IgM จะมีปริมาณน้อยกว่า และปริมาณของแอนติบอดีรวมเมื่อมีการกระตุ้นครั้งที่สองจะสูงกว่าครั้งแรก

#### 2.1.11 มอนอโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตแอนติบอดีในสิ่งมีชีวิตจะเริ่มจากการที่ร่างกายได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนที่มักมีอิทธิพลจำนวนมาก จากนั้นกระบวนการทางภูมิคุ้มกันของร่างกายจะทำการตอบสนองต่อแอนติเจนนั้น โดยแต่ละอิทธิพลของแอนติเจนจะกระตุ้นบีเซลล์พร้อมกันหลายเซลล์หรือหลายโคลน แอนติบอดี

ที่สร้างขึ้นจากหลายๆโคลนของบีเซลล์จะมีความจำเพาะต่ออีพิโทปที่หลากหลาย เรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) อย่างไรก็ตามการสร้างแอนติบอดีเพื่อใช้ในงานวิจัยหรือการตรวจวินิจฉัยโรค สามารถสร้างและคัดเลือกแอนติบอดีที่มาจากโคลนเดียวหรือจำเพาะต่ออีพิโทปใดอีพิโทปหนึ่งของแอนติเจนนั้น ซึ่งจะทำให้ได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง เรียกแอนติบอดีนี้ว่า มอนอโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody)

การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีจะเริ่มต้นเช่นเดียวกับการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี ขั้นตอนแรกคือการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยสามารถเลือกกระตุ้นได้ทั้งแบบ *in vivo* และ *in vitro* สำหรับการกระตุ้นแบบ *in vivo* ทำได้โดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสัตว์ทดลอง เช่น หนูสายพันธุ์ BALB/c ถูกฉีดด้วยแอนติเจนที่ผสมด้วย adjuvant ในปริมาณที่เหมาะสม สำหรับการตรวจว่าหนูทดลองสร้างภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนหรือไม่ จะทำโดยการนำเอาเลือดของหนูมาทดสอบทั้งก่อนกระตุ้นและหลังกระตุ้นผ่านเทคนิค ELISA ก่อนขั้นตอนการหลอมรวมเซลล์จากม้ามหนู ในส่วนของ *in vitro* การกระตุ้นภูมิคุ้มกันจะไม่เกิดในสัตว์ทดลอง แต่เกิดจากการเพาะเลี้ยง แยกบีเซลล์ออกจากม้ามของสัตว์ทดลองที่ไม่ผ่านการกระตุ้นใดๆ และนำมาเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 หรือ DMEM ที่ไม่เติมซีรัม จากนั้นจึงผสมกับแอนติเจน แอนติบอดีจะถูกสร้างหลังบ่ม 4-5 วัน การกระตุ้นแบบนี้จะประหยัดเวลาและใช้แอนติเจนน้อยกว่าการกระตุ้นแบบ *in vivo* แต่ไม่ว่าอย่างไรก็ตามเทคนิค *in vivo* ก็ยังเป็นที่ยอมรับมากกว่า เพราะเทคนิค *in vitro* สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น

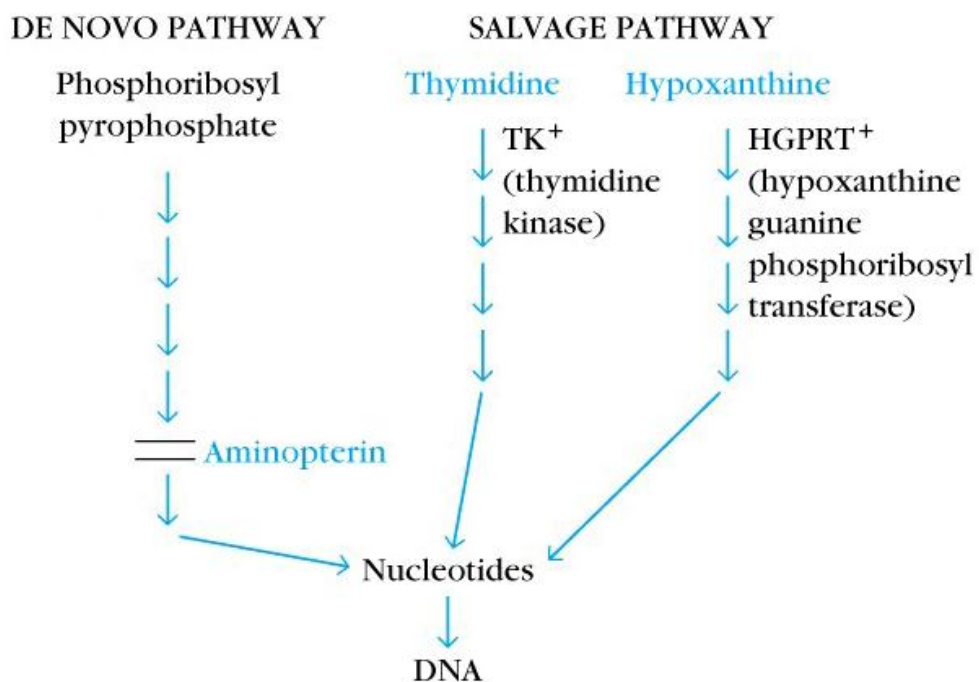
ขั้นตอนการหลอมรวมเซลล์จะเริ่มจากการแยกบีเซลล์จากม้ามแล้วนำมาหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมาในอัตราส่วน 1:1 และ 2:1 (B-cell : myeloma cells) ขั้นตอนนี้ใช้เวลาประมาณ 1 นาที ในอาหารที่ไม่มีซีรัมโดยเติมพอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) หลังจากหลอมรวมแล้วจะได้เซลล์ไฮบริดหรือเซลล์ไฮบริโดมา สำหรับการคัดเลือกจะใช้อาหาร HAT medium (hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium) พื้นฐานจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 แบบ คือ de novo pathway และ salvage pathway (รูปที่ 2.3) โดย aminopterin จะยับยั้งเอนไซม์ใน de novo pathway เมื่อ de novo pathway ถูกยับยั้งเซลล์ก็จะเปลี่ยนมาใช้ salvage pathway เอนไซม์ที่ใช้ใน salvage pathway คือ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และ thymidine kinase (TK) การเกิด mutation ของเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะยับยั้งการใช้ salvage pathway ดังนั้นเซลล์ที่ขาดเอนไซม์ HGPRT หรือ TK



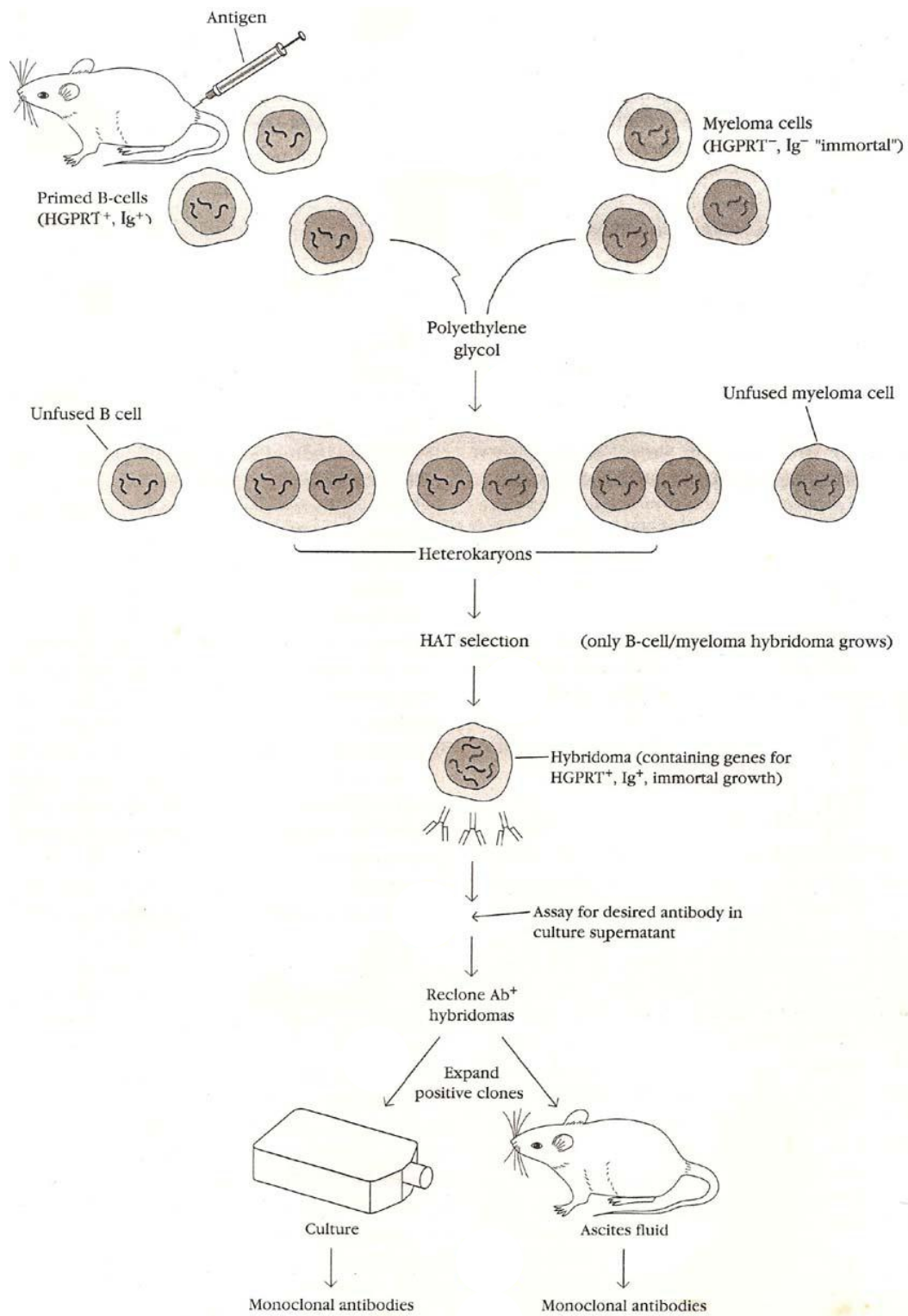
จะตายใน HAT medium (รูปที่ 2.4) เพราะไม่สามารถใช้ salvage pathway ในการสังเคราะห์ นิวคลีโอไทด์สำหรับสร้าง DNA หรือ RNA

สำหรับการคัดเลือกโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่มีการสังเคราะห์แอนติบอดีที่ต้องการจะใช้ เทคนิค ELISA และเมื่อได้โคลนที่ต้องการแล้วเข้าสู่ขั้นตอนการโคลนซ้ำ (recloned) อย่างน้อยสอง ครั้งเพื่อเป็นการยืนยันว่ากลุ่มโคลนที่ได้มาจากโคลนเดียวเท่านั้น เรียกเทคนิคนี้ว่า limiting dilution เป็นการทำให้ในหนึ่งหลุมของ microtiter plate มีเซลล์ไฮบริโดมาเพียงเซลล์เดียว

โคลนที่ถูกเลือกจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ *in vitro* โดยเซลล์ไฮบริโดมาผลิตแอนติบอดี ออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาสามารถนำมาใช้ได้ทั้งแบบไม่ทำให้บริสุทธิ์ หรือทำให้บริสุทธิ์แล้ว เทคนิคในการเพิ่มปริมาณของมอนอโคลนอลแอนติบอดีสามารถใช้เทคนิค ascites ซึ่งเป็นการฉีดเซลล์ไฮบริโดมาเข้าไปทางช่องท้องของหนูและทำให้เกิดการผลิตแอนติบอดีขึ้น ในนั้น (*in vivo*) แต่เทคนิคนี้อาจจะไม่สามารถทำได้ในบางประเทศเนื่องจากกฎหมายห้าม [25]



รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดย denovo pathway และ salvage pathway [26]



รูปที่ 2.4 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาใน HAT medium [27]

## 2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Choi และคณะ (1991) ได้ทำการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. marinus* ระยะ hypnospore ที่ได้จากการบ่มเนื้อเยื่อหอยนางรมในอาหารเลี้ยงเชื้อ FTM พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reactivation) กับ *P. marinus* ระยะอื่น โดยใช้เทคนิค ELISA และผลจากการทำ immunofluorescence พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีสามารถจดจำแอนติเจนที่อยู่บนพื้นผิวของผนังเซลล์ hypnospore ได้ [8]

Romestand และคณะ (2001) ได้ทำการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. marinus* ระยะ trophozoite โดยได้จากการนำไอโซเลต *Perkinsus* 1 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ JLODP1 เมื่อนำไปฉีดในหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c พบว่าระดับแอนติบอดีอยู่ที่ 480,000 และได้มอนอโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 2 โคลน (17B<sub>2</sub>D<sub>5</sub> และ 19G<sub>3</sub>H<sub>6</sub>) จากการศึกษาลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีพบว่าทั้ง 2 โคลนเป็นไอโซไทป์ IgG<sub>1</sub> และสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *P. marinus* ทุกระยะ ได้แก่ hypnospore และ zoospore แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อ hemolymph ของหอยนางรม *Crassostrea gigas* และ *C. virginica*, ปรสิต *Banamia ostrea* และ *Marteilia refringens* [9]

Leethochavalit และคณะ (2004) ได้รายงานการแพร่ระบาดของเชื้อปรสิต *Perkinsus* ในหอยลายบริเวณอ่าวไทยเป็นครั้งแรก ในการสำรวจหอยลายใช้เทคนิค fluid thioglycollate medium (FTM) โดยเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคมถึงธันวาคม ปี 2544 พบความชุกชุมรายเดือนเฉลี่ย 84.7% (n=360) โดยความชุกชุมรายเดือนของหอยลายที่ติดเชื้อสูงสุดอยู่ที่ 100%, ความชุกชุมต่ำอยู่ที่ 66.7% ในเดือนพฤษภาคม และไม่พบการติดเชื้อในเดือนกันยายน จากการเลี้ยงปรสิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ FTM ขนาดของ prezoosporangia หรือ hypnospore จะขยายเพิ่มขึ้นเส้นผ่าศูนย์กลางจาก 25-75  $\mu\text{m}$  ต่อมาเมื่อบ่มในน้ำทะเลที่มีการเติมอากาศเป็นเวลาหลายวัน พบว่า hypnospore จะแบ่งเซลล์เป็นสองส่วนและเกิดเป็น zoospore ขนาดความยาว 2-5  $\mu\text{m}$  โดย zoospore ถูกปล่อยสู่น้ำทะเลผ่าน discharge tube สำหรับเนื้อเยื่อหอยลายที่ตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อแบบอัลตราไทม์ (semi-thin section) ความหนา 1-4  $\mu\text{m}$  พบ trophozoite ขนาด 3-6  $\mu\text{m}$  ภายในเหงือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ต่อมเพศ และโดยเฉพาะในต่อมสร้างน้ำย่อยของหอย จากรายละเอียดความแตกต่างของวงจรชีวิตของสปิซิสปรสิต *Perkinsus* ในประเทศไทยใกล้เคียงกับ *P. olseni* (=

*P. atlanticus*) ที่พบรายงานในประเทศออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ เกาหลี ญี่ปุ่น สเปน และโปรตุเกส [28]

Earnhart และคณะ (2004) ได้ทำการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อ extracellular product (ECP) ของ *P. marinus* โดย ECP มีส่วนเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของก่อโรค (virulence) และความสามารถของ ECP สามารถเปลี่ยนแปลงได้ด้วยการเติม oyster tissue homogenate ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้ปรสิตเปลี่ยนแปลงจากระยะ trophozoite เป็นระยะ hypnospore โดยไม่ต้องบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ RFTM จากการศึกษาพบว่าได้มอนอโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 5 โคลน แต่มีเพียง 1 โคลน (5A2) ที่สามารถจับกับ *P. marinus* ระยะ trophozoite ในเนื้อเยื่อหอยนางรมที่ผ่านเทคนิคการย้อมขึ้นเนื้อด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) ในขณะเดียวกันก็ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อหอยนางรมที่ไม่ติดเชื้อ, *P. atlanticus* และ dinoflagellate *Hematodinium perezii* [29]

Kim และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะ การแสดงออกของเนื้อเยื่อ และการหาตำแหน่งของ MCL3 ซึ่งเป็น C-type lectin ที่หอยลายมะนิลา (Manila clam) สังเคราะห์ระหว่างการติดเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี เลคตินเป็นโปรตีนด่านแรกที่ผลิตออกมาเพื่อป้องกันและทำลายสิ่งแปลกปลอม (humoral defence protein) จากการศึกษาได้ทำรีคอมบิแนนท์ MCL3 ที่แสดงออกใน *Escherichia coli* M15 ให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาฉีดกระตุ้นในกระต่าย จากนั้นจึงนำซีรัมของกระต่ายมาวัดการผลิตแอนติบอดีที่มีต่อ cell lysate จาก MCL3-transformed *E. coli* ด้วยเทคนิค Western blot และนำ anti-rMCL3 มายืนยันตำแหน่งของ MCL3 ในเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆของหอยลายมะนิลาที่ติดเชื้อ *Perkinsus* ได้แก่ หัว, ต่อมสร้างน้ำย่อย, ต่อมเพศ, เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน, เหงือก, แมนเทิล, ลำไส้ และกระเพาะอาหาร MCL3 จะพบมากในต่อมสร้างน้ำย่อย โดยเฉพาะบริเวณทางเดินอาหาร และพบน้อยบริเวณผนังทางเดินอาหาร จากการย้อมเนื้อเยื่อพบว่ามี MCL3 มากในเหงือก แมนเทิลและลำไส้ ถัดมาเป็นบริเวณเท้าและกระเพาะอาหารของหอย แต่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและต่อมเพศพบ MCL3 น้อย [30]

Park และคณะ (2010) ได้ทำการแยกเชื้อ (isolation) และตรวจพิสูจน์เชื้อ (identification) *P. olseni* จากอุจจาระของหอยลายมะนิลา และตะกอนดินในทะเลโดยการใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาและเทคนิคทางโมเลกุล โดยทำการกระตุ้นหนูด้วยโปรตีนสกัดจากปรสิตระยะ hypnospore จากนั้นจึงนำแอนติซีรัมของกระต่ายมาทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค ELISA สำหรับแอนติบอดีที่

สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามจะถูกแยกออกไปโดยการใช้ immunoadsorbent ที่เตรียมจากเนื้อเยื่อหอยลายมะนิลาที่ไม่ติดเชื้อ ต่อมา anti- *P. olseni* IgG หรือพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ *P. olseni* ที่มีไอโซไทป์ IgG จะถูกทำให้ตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต จากการศึกษา immunofluorescent พบว่า anti- *P. olseni* IgG มีความจำเพาะกับ *P. olseni* ทุกระยะ ได้แก่ ระยะ trophozoite, hypnospore และ zoospore และพบว่าสามารถแยกเซลล์ที่มีรูปร่างคล้าย *P. olseni* ระยะ hypnospore จากตะกอนดินที่เก็บจาก Hwangdo ชายฝั่งตะวันตกของเกาหลีซึ่งเป็นบริเวณที่มีการตายของหอยลายที่ติดเชื้อ *P. olseni* จำนวนมาก พบว่าเซลล์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ให้ผลบวกต่อการทำ immunofluorescent เป็นการยืนยันการพบเชื้อปรสิต *P. olseni* เป็นครั้งแรกในตะกอนดินใต้ทะเล และยังพบว่าหอยลายจะปล่อย hypnospore 1-2 เซลล์ต่อวันผ่านอุจจาระโดยการศึกษผ่านเทคนิค PCR ดังนั้นจากข้อมูลทั้งหมดจึงสามารถสรุปการแพร่ระบาดของเชื้อปรสิต *P. olseni* ได้สองทางคือ ผ่านอุจจาระและผ่านการสลายตัวของเนื้อเยื่อหอยลายที่ติดเชื้อ [31]

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สัตว์ทดลอง เซลล์ และปรสิตที่ใช้ในงานวิจัย

- หนูทดลองสายพันธุ์ ICR (outbred strain) เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
- เซลล์มัยอีโลมา P3-X63Ag8 ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร-วิโรฒ ประสานมิตร กรุงเทพฯ
- *Perkinsus olseni* ระยะ zoospore และ hypnospore ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

#### 3.2 สารเคมี

- |  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| - 3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)                           | Sigma-Aldrich, USA                  |
| - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)                                     | Sigma-Aldrich, USA                  |
| - 30% Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )                   | Merck, Germany                      |
| - Aminopterin  | Sigma-Aldrich, USA                  |
| - Bovine serum albumin (BSA)   | Sigma-Aldrich, USA                  |
| - Butanol  | Ajex finechem pty Ltd., New Zealand |
| - Citric acid  | Merck, Germany                      |
| - Cobalt (III) chloride hexahydrate (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O) | Sigma-Aldrich, USA                  |
| - Dimethyl sulfoxide (DMSO)  | Fluka, Switzerland                  |
| - di-Sodium hydrogen phosphate   | Merck, Germany                      |
| - Eosin  | POCH S.A., Poland                   |
| - Ethanol  | Merck, Germany                      |

- Fetal calf serum (FCS)	Biowest, South America
- Freund's complete adjuvant (FCA)	Sigma-Aldrich, USA
- Freund's incomplete adjuvant (FIA)	Sigma-Aldrich, USA
- Gentamycin	T.P. drug laboratories (1969) Co., LTd, Thailand
- Hematoxylin	Bio optica, Italy
- Horseradish peroxidase-conjugate goat anti mouse IgG (GAM-HRP)	Jackson Immuno, USA
- Hypoxanthine	Sigma-Aldrich, USA
- L-glutamine	Sigma-Aldrich, USA
- Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit	Sigma-Aldrich, USA
- Permouting medium	Bio optica, Italy
- Penicilline G	Sigma-Aldrich, USA
- Peroxidase labeled Goat Anti-Mouse IgG (Fab Specific)	Sigma-Aldrich, USA
- Polyethylene glycol (PEG)	Sigma-Aldrich, USA
- Potassium chloride (KCl)	Merck, Germany
- Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Germany
- RPMI 1640 medium	Biochrome AG, Germany
- Skim milk	บริษัท ฟอนเทียร์ว่า แบรอนด์ส (ประเทศไทย) จำกัด
- Sodium chloride	Merck, Germany
- Sodium carbonate	Merck, Germany

- Sodium pyruvate (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Na)	Sigma-Aldrich, USA
- Streptomycin	Sigma-Aldrich, USA
- Sulfuric acid (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Germany
- Thimerosol	Sigma-Aldrich, USA
- Thymidine	Sigma-Aldrich, USA
- Tween 20	Riedel-de Haën, UK
- Xylene	Bio optica, Italy

### 3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- กระดาษกรอง	Whatman, Germany
- กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Japan
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon, Japan
- เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro, Thailand
- ขวดแก้ว	Boro, Germany
- เครื่องกวนสาร (stirrer)	เบคไทย, Thailand
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)	Udono-RII memmert, Japan
- เครื่องปั๊ม (pump)	Iwaki, Japan
- เครื่องผสมสาร (vortex)	Scientific Industries, Inc., USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	Hettich Zentrifugen, Germany



- เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) Metter Toledo, USA
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microtiterplate reader) Titertek multiskan, Finland
- จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม Corning, USA
- จานเลี้ยงเซลล์ ชนิด 96 หลุม, 48 หลุม และ 24 หลุม Costar, USA
- จานเลี้ยงเซลล์ (Petri dish) Hycon, Germany
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 °C และ -70 °C Sanyo, Japan
- ตู้บ่มอุณหภูมิต่ำ 37 °C 5% CO<sub>2</sub> (model 3111) Thermo Scientific, USA
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
- ถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) Harsco Corporation, USA
- ถังมือยางธรรมชาติ (Chulalongkorn University) ต็อกเตอร์ ปู จำกัด, Thailand
- ทิป Axygen, USA
- ปีกเกอร์ขนาด 50-500 มิลลิลิตร Boro, Germany
- ปิเปตแก้ว HBG, Germany
- ปิเปตอัตโนมัติ (automatic pipette) Gilson, France
- ไมโครปิเปต (micropipette) Eppendorf Co., Ltd., Thailand
- ไมโครปิเปตชนิดมัลติชาแนล (multichannel micropipette) PZ HTL S. A., Poland
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (eppendorf) Axygen, USA

- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร Axygen, USA
- หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์ (cryotube) Corning, Mexico
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) Memmert, Germany



### 3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.4.1 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olsenii*

แอนติเจนที่ใช้การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบ่งออกเป็นสองระยะ คือ *P. olsenii* ระยะ zoospore ( $2.0 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และ *P. olsenii* ระยะ hypnospore ( $2.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ในรูปของสภาพ (4% paraformaldehyde fixation) ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้งโดยแต่ละครั้งจะผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ครั้งละ 5 นาที เพื่อล้างเอาฟอร์มาลีนออกจากนั้นจึงผสมแอนติเจนกับ Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูสายพันธุ์ ICR เพศเมียอายุ 6 สัปดาห์ เข้าช่องท้อง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้ง โดยฉีดซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ด้วยแอนติเจนเดิมที่ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ในครั้งที่ 2, 3 และ 4 จากนั้น 1 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งที่ 4 เจาะเลือดจากหางหนูมาตรวจหาการตอบสนองของแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting (หัวข้อ 3.4.3.1) เมื่อได้ระดับแอนติบอดีที่สูงพอแล้ว จะทำการกระตุ้นครั้งสุดท้ายด้วยแอนติเจนของ *P. olsenii* ก่อนการหลอมรวมเซลล์ (สำหรับการดูแลหนูทดลองเป็นไปตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ และผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการแล้ว)

#### 3.4.2 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต

*P. olsenii*

##### 3.4.2.1 การเตรียมเซลล์มัยอิโลมา

ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์นำเซลล์มัยอิโลมา P3X เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีซีรัมจากลูกวัว (fetal calf serum: FCS) ความเข้มข้น 10% (v/v) และบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% โดยในวันหลอมรวมเซลล์ นำเซลล์มัยอิโลมาที่มีระยะการเติบโตสูงสุด (log phase) มารวมไว้ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตรและบ่มไว้ที่ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนเตรียมหลอมรวมกับเซลล์ม้ามที่เตรียมไว้

### 3.4.2.2 การเตรียมเซลล์ม้าม

ทำการสลบหนูทดลองที่ให้ค่าระดับแอนติบอดีต่อ *P. olsenii* ที่สูง (ข้อ 3.4.1) โดยใช้ ไดเอทิลอีเธอร์ (diethylether) เจาะเลือดจากหัวใจเพื่อเก็บเป็นซีรัมไว้ใช้ต่อไป ทำการเปิดช่องท้อง โดยวิธีปลอดเชื้อเพื่อนำม้ามของหนูออกมา แช่ในอาหาร RPMI 1640 ที่มี gentamycin เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงใช้กรรไกรตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆบนตะแกรงลวด แล้วใช้ตามของ หลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร บดม้ามเบาๆให้ละเอียด เมื่อได้เซลล์ม้ามแล้วให้นำมาปั่นล้างในอาหาร RPMI 1640 ที่มี gentamycin ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งส่วนใส เติมอาหารปริมาตร 35 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปหลอมรวมเซลล์กับเซลล์มัยอ-โลมาต่อไป

### 3.4.2.3 การหลอมรวมเซลล์

นำเซลล์ม้ามและเซลล์มัยอโลมาที่เตรียมไว้ผสมให้เข้ากันเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและเขย่าเบาๆเพื่อไม่เซลล์เกาะกลุ่มกันเป็นก้อน ค่อยๆหยดพอลิเอทิลีนไกลคอล ซึ่งเป็นสารที่มีมวลโมเลกุล 3,000-3,700 ดาลตัน ความเข้มข้น 50% (v/v) เป็นสารที่ช่วยในการหลอมรวมเซลล์ทั้งสอง ลงไปพร้อมกับหมุนหลอดทดลอง จากนั้นจึงเคาะหลอดทดลองเบาๆ โดยควบคุมอัตราการหยดพอลิเอทิลีนไกลคอล 1 มิลลิลิตร ให้หมดภายใน 1 นาที เติมอาหาร RPMI 1640 ที่มี gentamycin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 35 มิลลิลิตรลงไปนำเซลล์ที่ได้ไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำเซลล์มาเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิเปตต์กระจายเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเป็นเวลา 10-14 วัน เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญเติบโต ประมาณ 25% ของพื้นที่หลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมไปทดสอบว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อ *P. olsenii* หรือไม่ โดยวิธี dot blotting

### 3.4.3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต

#### *P. olsenii*

##### 3.4.3.1 การคัดเลือกเซลล์โดยวิธี dot blotting

นำ *P. olsenii* ระยะ zoospore ( $6.6 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หรือ ระยะ hypnospore ( $2.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) มาหยดลงบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตร ต่อจุด อบอุ่นที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แช่ใน 5% skim milk เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS ที่มี Tween 20 (PBS-T) เข้มข้น 0.05% (v/v) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาหรือซีรัมของหนู แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (หรือบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วเติม แอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti-mouse IgG ที่เชื่อม horseradish peroxidase (GAM-HRP) ที่ความเจือจาง 1:3000 ใน PBS บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (หรือบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) แล้วล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายผสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) 0.006%, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 0.03% และโคบอลต์คลอไรด์ ( $CoCl_2$ ) 0.05% ใน PBS หากเกิดการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดีจะเกิดจุดสีดำ

##### 3.4.3.2 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

เพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมาได้นั้นมาจากต้นกำเนิดเซลล์เพียงเซลล์เดี่ยวเท่านั้น นำเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ *P. olsenii* จากการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting มาทำเจือจาง 1 เซลล์ต่อหลุมเพื่อทำให้เป็นโคลนีเดี่ยว เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเป็นโคลนีเดี่ยวในหลุมประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจสอบว่ามีการผลิตแอนติบอดีต่อ *P. olsenii* หรือไม่ ถ้าเซลล์ยังมีการสร้างแอนติบอดีต่อ *P. olsenii* ให้ทำการขยายเซลล์เพิ่มจำนวน แล้วนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ในการทดสอบต่อไป

##### 3.4.3.3 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการเก็บมาเลี้ยงต่อในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 10% (v/v) ให้อยู่ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด (log phase) มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์

ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำดูอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง และเติมอาหาร RPMI 1640 ที่มีไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) ความเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้พลาสติกเจอร์ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับอาหารสำหรับแช่แข็งเซลล์ ก่อนถ่ายเซลล์ลงในหลอดเก็บเซลล์ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสข้ามคืน หลังจากนั้นย้ายลงในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

#### 3.4.3.4 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวมาแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทันที เมื่ออาหารสำหรับแช่แข็งเซลล์ในหลอดละลายหมดแล้ว ให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 10% (v/v)

### 3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

#### 3.4.4.1 การทดสอบความไวและความสามารถในการจับกับแอนติเจนของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ใช้วิธี dot blotting โดยการทำการเจือจางแอนติเจนของ *P. olsenii* ที่ระดับความเข้มข้น  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำตามวิธีในข้อ 3.4.3.1 สังเกตจุดสีดำนี่เกิดขึ้น โดยค่าความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีจะขึ้นกับความเข้มข้นของแอนติเจนที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดจุดสีดำ

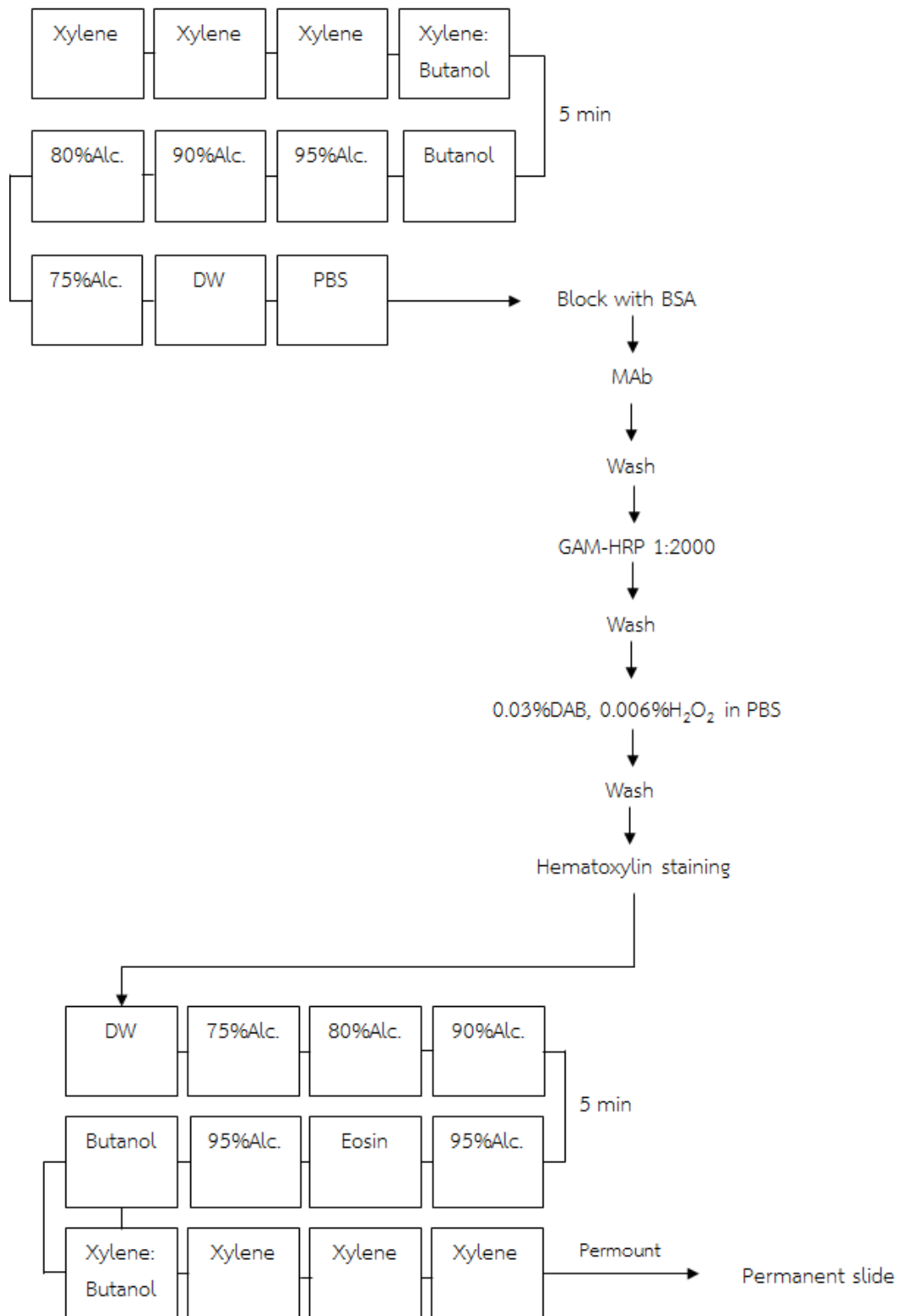
#### 3.4.4.2 การตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป โดยตรึงกันหลุมด้วย isotyping specific antibody (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgA, และ IgM) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วเติมมอนอโคลนอลแอนติบอดีปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อ

หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ Fab ที่เจือจางใน PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายสับสเตรต ซึ่งประกอบด้วย TMB และ  $H_2O_2$  ละลายในซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงเติมกรดซัลฟิวริก ( $H_2SO_4$ ) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

### 3.4.5 การตรวจหาเชื้อปรสิตในหอยลายโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

สไลด์เนื้อเยื่อหอยได้รับความอนุเคราะห์จากงานวิจัยก่อนหน้า ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับโรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย [3] โดยนำมาผ่านกระบวนการอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยวิธี indirect immunoperoxidase มีวิธีโดยย่อดังนี้ rehydrate เนื้อเยื่อโดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene จากนั้นผ่านลง butanol และ แอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ตั้งแต่ 95%, 90%, 80%, 75%, น้ำ และ PBS ตามลำดับ หยดมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ลงบนเนื้อเยื่อ บ่มข้ามคืนที่ 4 °C ล้างและบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:2,000 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นแช่ในสารละลายสับสเตรตประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006%  $H_2O_2$  ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมด้วย haematoxylin ดึงน้ำด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ตั้งแต่ 75%, 80%, 90%, 95% ย้อมซ้ำด้วย eosin จากนั้นล้าง eosin ส่วนเกินออกด้วยแอลกอฮอล์ 95% ต่อด้วย butanol ทำให้ใสใน xylene ทำเป็นสไลด์ถาวร โดยใช้ permount และ ปิดทับด้วย cover glass บริเวณที่มอนอโคลนอลแอนติบอดีจับกับเชื้อปรสิตจะปรากฏเป็นสีน้ำตาล (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 การทดสอบอิมมูโนฮิสโตเคมี [32]



### 3.4.6 การตรวจสอบอิมูโนโพลีเมอร์ด้วยวิธี indirect ELISA

วิธีการตรวจสอบแอนติเจนแอนติบอดีว่าจับอิมูโนโพลีเมอร์เดียวกันบนแอนติเจนหรือจับคนละอิมูโนโพลีเมอร์นั้นอ้างอิงจาก Wilsa และคณะ (2008) โดยจะทำการตรึง *P. olsenii* ระยะ hypnospore ความเข้มข้น  $8.00 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ที่ไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง แล้วเติม 5% skim milk ใน PBS (300 ไมโครลิตรต่อหลุม) บ่มที่ไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากล้างด้วย PBST เติมแอนติเจนแอนติบอดี (ความเข้มข้น 1:2 ใน PBS) ลงไปในหลุมและบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST จากนั้นจึงเติม GAM-HRP เจือจาง 1:10,000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร และบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากล้างด้วย PBST เติมสารละลายสับสเตรต TMB 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงระหว่างแอนติเจนแอนติบอดีแบบเดียวกับแบบคู่ หากผลต่างมากกว่า 0.2 หน่วย แสดงว่าแอนติเจนแอนติบอดีทั้งสองโคลนมีแนวโน้มจับที่อิมูโนโพลีเมอร์ของแอนติเจนที่ต่างกัน

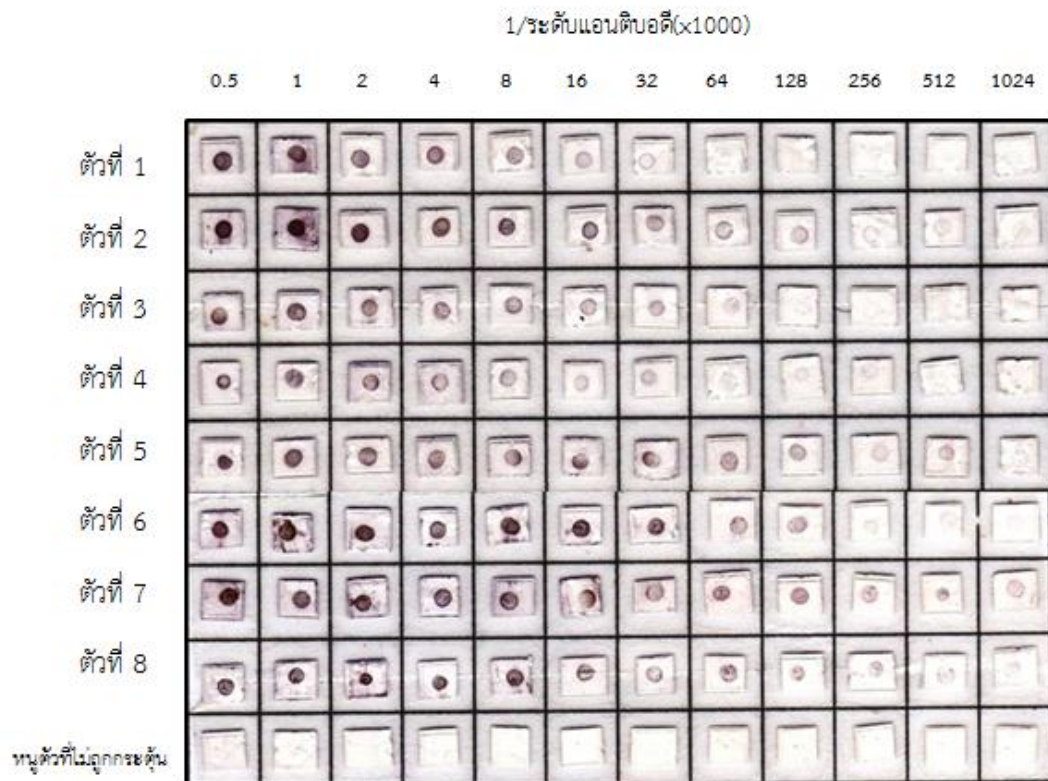
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olsenii*

ทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลองทั้งหมด 8 ตัว โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มที่ฉีดด้วยแอนติเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วย *P. olsenii* ระยะ zoospore (จำนวน 5 ตัว) และกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วย *P. olsenii* ระยะ hypnospore (จำนวน 3 ตัว) ซึ่งหนูทดลองทั้งหมดเป็นหนูสายพันธุ์ ICR (outbred strain) เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ โดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นจำนวน 4 ครั้ง หลังจากกระตุ้นครั้งสุดท้ายเจาะเลือดบริเวณหางเพื่อเก็บซีรัมจากหนูทดลองทั้งหมดเพื่อนำมาทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อ *P. olsenii* ในระยะเดียวกับที่ใช้ฉีดกระตุ้นด้วยวิธี dot blotting และนำหนูทดลองที่ให้ระดับแอนติบอดีที่เหมาะสมนำมาใช้หลอมรวมเซลล์สำหรับผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

จากการทดสอบระดับแอนติบอดีของหนูทดลองด้วยวิธี dot blotting ได้ผลดังรูปที่ 4.1 โดยเลือกระดับแอนติบอดีที่ความเจือจางที่น้อยที่สุดที่ให้ความเข้มของจุดสีดำเมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมจากหนูทดลองที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้น พบว่าหนูทดลองทั้งหมด 8 ตัว สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ *P. olsenii* ได้ โดยจากผลการทดลอง พบว่ากลุ่มที่ฉีดด้วย zoospore ให้ค่าระดับแอนติบอดีอยู่ระหว่าง 32,000 ถึง 512,000 และกลุ่มที่ฉีดด้วย hypnospore พบว่าให้ค่าระดับแอนติบอดีอยู่ระหว่าง 128,000 ถึง 1,024,000 (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ผล dot blotting เพื่อวัดระดับแอนติบอดีต่อ *P. olseni* ของซีรัมหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้น (ตัวที่ 1-8) และซีรัมหนูทดลองที่ไม่ได้รับการกระตุ้น โดยหนูตัวที่ 1-5 ฉีดกระตุ้นด้วย zoospore ( $2.0 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และหนูตัวที่ 6-8 ฉีดกระตุ้นด้วย hypnospore ( $2.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

ตารางที่ 4.1 แสดงระดับแอนติบอดีของหนูทดลองที่มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธี dot blotting

หนูตัวที่	แอนติเจนที่ใช้ฉีดกระตุ้น	ระดับแอนติบอดี
1	zoospore	32,000
2	zoospore	128,000
3	zoospore	32,000
4	zoospore	32,000
5	zoospore	512,000
6	hypnospore	128,000
7	hypnospore	1,024,000
8	hypnospore	512,000

#### 4.2 การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olseni*

นำเซลล์ม้ามจากหนูทั้งหมด 8 ตัวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย *P. olseni* ทั้ง 2 ระยะ คือ zoospore และ hypnospore มาหลอมรวมกับเซลล์มัยอิโลมา (P3X) หลังจากนั้นเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ คุณลักษณะของเซลล์ไฮบริโดมาที่เกิดขึ้นผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ โดยจะเห็นเซลล์รูปร่างกลมใสขนาดเล็กเกาะกลุ่มกันเป็นโคโลนีภายในหลุม เมื่อมีการเจริญเติบโตประมาณ 1 ใน 4 ของหลุม นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมามาคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ *P. olseni* ได้ ด้วยวิธี dot blotting หลังจากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอน limiting dilution พบว่าได้มอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olseni* ทั้งหมด 11 โคลน แบ่งออกเป็น 3 โคลนที่ได้จากการกระตุ้นด้วยระยะ zoospore และอีก 8 โคลนที่ได้จากการกระตุ้นด้วยระยะ hypnospore ได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 สรุปการหลอมรวมเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ  
 ปรสิิต *P. olsenii*

ครั้งที่	ระดับแอนติบอดี	จำนวนหลุมตั้งต้น	จำนวนหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมา	จำนวนหลุมที่เซลล์ไฮบริโดมาผลิตแอนติบอดี	จำนวนหลุมที่แอนติบอดีจับกับ <i>P. olsenii</i>	รหัสมอโนโคลนที่ได้
1	32,000	1056	528	12	0	-
2	128,000	1056	1056	11	1	2/B4/A2 (1)
3	32,000	1056	634	51	0	-
4	32,000	1056	739	14	1	8/H11/B5 (5)
5	512,000	864	864	20	1	3/F3/G6/G3 (24)
6	128,000	1056	1056	5	0	-
7	1,024,000	1056	1056	777	7	106/D10/C8 (7), 128/D6/C1 (9), 67/G7/E3 (12), 114/B1 (17), 74/C6 (19), 136/F10/B2 (20), 137/G4/D10 (22)
8	512,000	864	864	163	1	24/E11/H4 (15)

- ไม่ได้โคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อ *P. olsenii* จากการหลอมรวมเซลล์
- วงเล็บหลังรหัสโคลนคือหมายเลขตัวแทนโคลนนั่นๆ

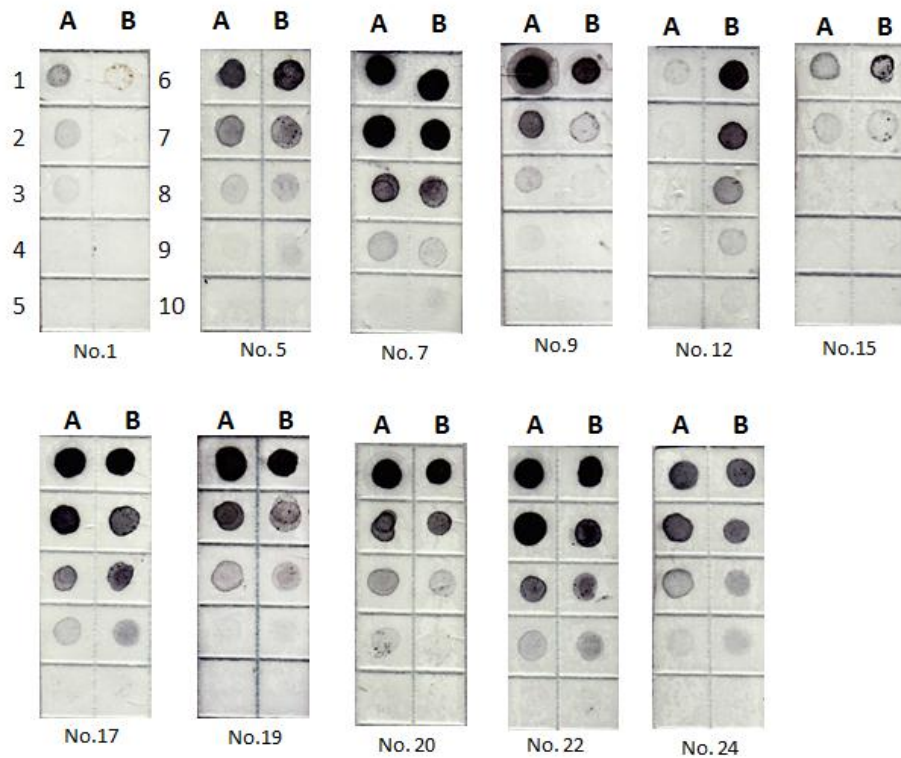
### 4.3 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของมอโนโคลนอลแอนติบอดี

4.2.1 ผลการทดสอบความไวและความสามารถในการจับกับแอนติเจนของมอโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olseni*

มอโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ระยะเวลา zoospore และ hypnospore โดยวิธี dot blotting ได้ในระดับความไวที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.2) โดยจากตารางที่ 4.3 สามารถอ่านผลการทดลองได้ดังตัวอย่างมอโนโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 1 ดังนี้

มอโนโคลนอลแอนติบอดี หมายเลข 1 ที่ผลิตจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย *P. olseni* ระยะเวลา zoospore สามารถจับกับระยะเวลา zoospore ได้เพียงระยะเดียว ที่ระดับความเข้มข้น  $6.6 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

สรุปผลการทดสอบความไวและความสามารถในการจับกับ *P. olseni* ดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยพบว่ามอโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ส่วนใหญ่จับกับ *P. olseni* ได้ทั้ง 2 ระยะ จับกับระยะเวลา zoospore อยู่ในช่วงความไว  $2.6 \times 10^7$  ถึง  $3.3 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และจับกับระยะเวลา hypnospore อยู่ในช่วงความไว  $1.6 \times 10^5$  ถึง  $2.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ยกเว้นมอโนโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 1 และหมายเลข 12 จับกับระยะเวลา zoospore และ hypnospore เพียงระยะเดียว ตามลำดับ



รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดเชื้อปรสิตในระยะ zoospore (A) และ hypnospore (B) ที่ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่  $3.3 \times 10^9$  ถึง  $3.2 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด และบ่มในมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ความเข้มข้นของ *P. olseni* ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

แถว 1 : $3.3 \times 10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร	แถว 6 : $2.0 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
แถว 2 : $6.6 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร	แถว 7 : $4.0 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
แถว 3 : $1.3 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร	แถว 8 : $8.0 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
แถว 4 : $2.6 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร	แถว 9 : $1.6 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
แถว 5 : $5.3 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร	แถว 10 : $3.2 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความไวและความสามารถในการจับกับเชื้อปรสิต *P. olsenii* ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

MAb no.	ความสามารถในการจับกับแอนติเจน		ความไว (cell/ml)	
	zoospore	hypnospore	zoospore	hypnospore
1	✓	X	$6.6 \times 10^8$ (+)	X
5	✓	✓	$1.3 \times 10^8$ (++)	$8.0 \times 10^5$ (++)
7	✓	✓	$2.6 \times 10^7$ (+++)	$1.6 \times 10^5$ (+++)
9	✓	✓	$1.3 \times 10^8$ (++)	$4.0 \times 10^6$ (++)
12	X	✓	X	$1.6 \times 10^5$ (++)
15	✓	✓	$3.3 \times 10^9$ (+)	$2.0 \times 10^7$ (+)
17	✓	✓	$2.6 \times 10^7$ (+++)	$1.6 \times 10^5$ (+++)
19	✓	✓	$1.3 \times 10^8$ (++)	$8.0 \times 10^5$ (++)
20	✓	✓	$1.3 \times 10^8$ (+++)	$8.0 \times 10^5$ (+++)
22	✓	✓	$2.6 \times 10^7$ (+++)	$1.6 \times 10^5$ (+++)
24	✓	✓	$1.3 \times 10^8$ (++)	$8.0 \times 10^5$ (++)

<sup>a</sup> ผลการทดสอบความไวและความสามารถในการจับกับ *P. olsenii* ด้วยเทคนิค dot blotting โดยการหยดเชื้อปรสิต *P. olsenii* ระยะ zoospore และ hypnospore ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ค่าความเข้มของผล dot blotting เพื่อดูความแรงของมอนอโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับแอนติเจน ใช้สัญลักษณ์ +++; เข้มมาก, ++; เข้มปานกลาง และ +; เข้มน้อย

#### 4.2.2 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

การตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงจากมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.4 โดยไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีถูกระบุด้วยตัวหนังสือหนา พื้นหลังสีเทา มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์เป็นชนิด IgG<sub>1</sub> 6 โคลน, ชนิด IgG<sub>2b</sub> 3 โคลน และชนิด IgM 2 โคลน



ตารางที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการตรวจสอบไอโซไทป์

MAb	$A_{450}^a$						ไอโซไทป์
	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2a</sub>	IgG <sub>2b</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgM	IgA	
1	<b>2.942</b>	0.135	0.117	0.122	0.165	0.114	IgG <sub>1</sub>
5	0.115	0.114	0.099	0.102	<b>1.265</b>	0.144	IgM
7	0.149	0.156	<b>1.849</b>	0.154	0.197	0.124	IgG <sub>2b</sub>
9	<b>3.110</b>	0.207	0.137	0.230	0.339	0.155	IgG <sub>1</sub>
12	0.132	0.135	<b>1.838</b>	0.131	0.158	0.120	IgG <sub>2b</sub>
15	<b>2.369</b>	0.131	0.110	0.107	0.168	0.114	IgG <sub>1</sub>
17	<b>2.361</b>	0.173	0.150	0.133	0.184	0.124	IgG <sub>1</sub>
19	<b>2.252</b>	0.145	0.130	0.133	0.198	0.116	IgG <sub>1</sub>
20	0.144	0.168	<b>1.571</b>	0.147	0.205	0.126	IgG <sub>2b</sub>
22	<b>2.546</b>	0.145	0.119	0.127	0.248	0.134	IgG <sub>1</sub>
24	0.102	0.350	0.095	0.172	<b>3.588</b>	0.160	IgM

<sup>a</sup> $A_{450}$  ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

#### 4.4 การตรวจหาเชื้อปรสิตในหอยโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

เพื่อการยืนยันว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความสามารถในการจับกับเชื้อปรสิตในสภาพธรรมชาติได้หรือไม่ จึงได้ทำการตรวจหาเชื้อปรสิตในหอยลายโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี จากเนื้อเยื่อหอยลายจำนวน 10 ตัวที่ได้รับรายงานว่ามี การติดเชื้อปรสิตและไม่มีรายงานการติดเชื้อ[3] โดยคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีจากผลการทดลอง dot blotting (รูปที่ 4.2) ที่แสดงจุดสีเข้มได้มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่นำมาทดสอบ 7 โคลน ได้แก่ มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับกับระยะ hypnospore ได้เพียงระยะเดียว คือ หมายเลข 12 และมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับกับระยะ zoospore และระยะ hypnospore ได้ทั้งสองระยะ ได้แก่ มอนอโคลนอลแอนติบอดี หมายเลข 7, 9, 17, 19, 20 และ 22 ซึ่งทั้งสองกลุ่มมีไอโซไทป์เป็น IgG ทั้งหมด จากผลการทดลองในเนื้อเยื่อหอยลายที่ได้รับรายงานการติดเชื้อจาก 10 ตัวที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 4.5) พบว่าเมื่อใช้

มอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, 17 และ 19 มีเพียงหอย 1 ตัวที่ให้ผลบวก ในขณะที่หมายเลข 12 และ 20 มีหอย 6 ตัว และ 5 ตัว ที่ให้ผลเป็นบวกตามลำดับ แสดงว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีมีความสามารถในการจับกับเชื้อปรสิต *P. olsenii* ในสภาพธรรมชาติได้ ตัวอย่างเช่น รูปที่ 4.3 แสดงความสามารถในการจับกับ *P. olsenii* ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 20 และรูปที่ 4.4 แสดงความสามารถในการจับกับ *P. olsenii* ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 12 และ 20 ในขณะที่เมื่อใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 9 และ 22 ไม่พบเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อปรสิต *P. olsenii* นั้นแสดงว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองไม่มีความสามารถในการจับกับเชื้อปรสิตในสภาพธรรมชาติได้ ในเนื้อเยื่อหอยหลายที่ได้รับรายงานว่าไม่มีการติดเชื้อ 10 ตัว (ตัวอย่างรูปที่ 4.5) เมื่อนำเนื้อเยื่อปมด้วยมอนอโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 7 ตัว พบว่าให้ผลเป็นลบ ไม่พบการติดสื่อน้ำตาลบริเวณเนื้อเยื่อทดสอบ เช่นเดียวกับในเนื้อเยื่อหอยชนิดอื่น (รูปที่ 4.6-4.8)

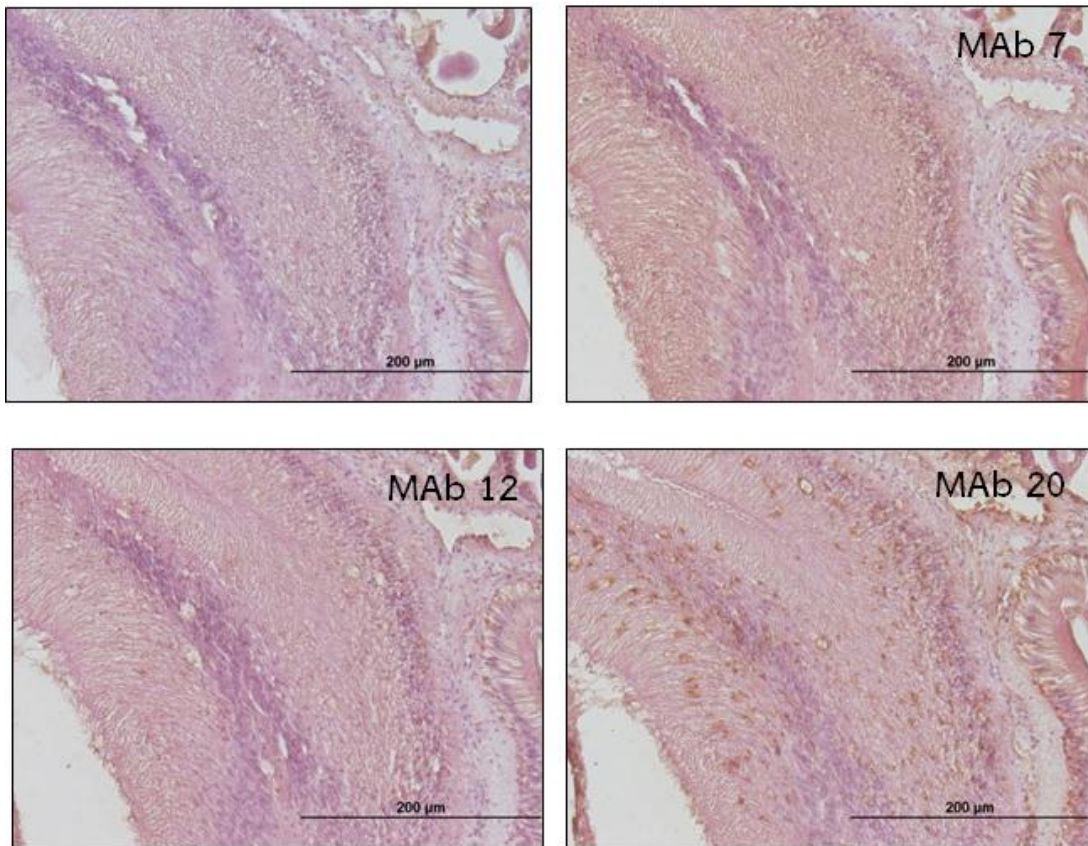
จากผลการทดลองเบื้องต้นได้นำมอนอโคลนอลแอนติบอดี 3 โคลน คือ หมายเลข 7, 12 และ 20 มาผสมกัน แล้วนำไปทดสอบกับเนื้อเยื่อหอยหลายที่มีรายงานและไม่มีรายงานการติดเชื้อเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่ หอยแครง และหอยนางรมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีอีกครั้ง เมื่อใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีผสมกัน ในเนื้อเยื่อหอยหลายพบว่าการติดสื่อน้ำตาลเข้มข้น เมื่อเทียบกับการใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดี 1 ชนิดในการตรวจหาเชื้อปรสิต และไม่ติดสื่อน้ำตาลในเนื้อเยื่อหอยหลายที่ไม่มีรายงานการติดเชื้อ เช่นเดียวกับหอยชนิดอื่นๆที่นำมาทดสอบ (รูปที่ 4.9-4.11) และเมื่อเทียบกับการพอลิโคลนอลแอนติบอดีมีการติดสีในระดับสีใกล้เคียงกัน รูปที่ 4.9 แสดงการใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีในรูปแบบผสม เพิ่มประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อปรสิตในเนื้อเยื่อหอยหลายได้

ตารางที่ 4.5 ผลการตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ในตัวอย่างหอยลาย (*Paphia undulata*) ที่มีรายงานว่ามีปรสิตติด

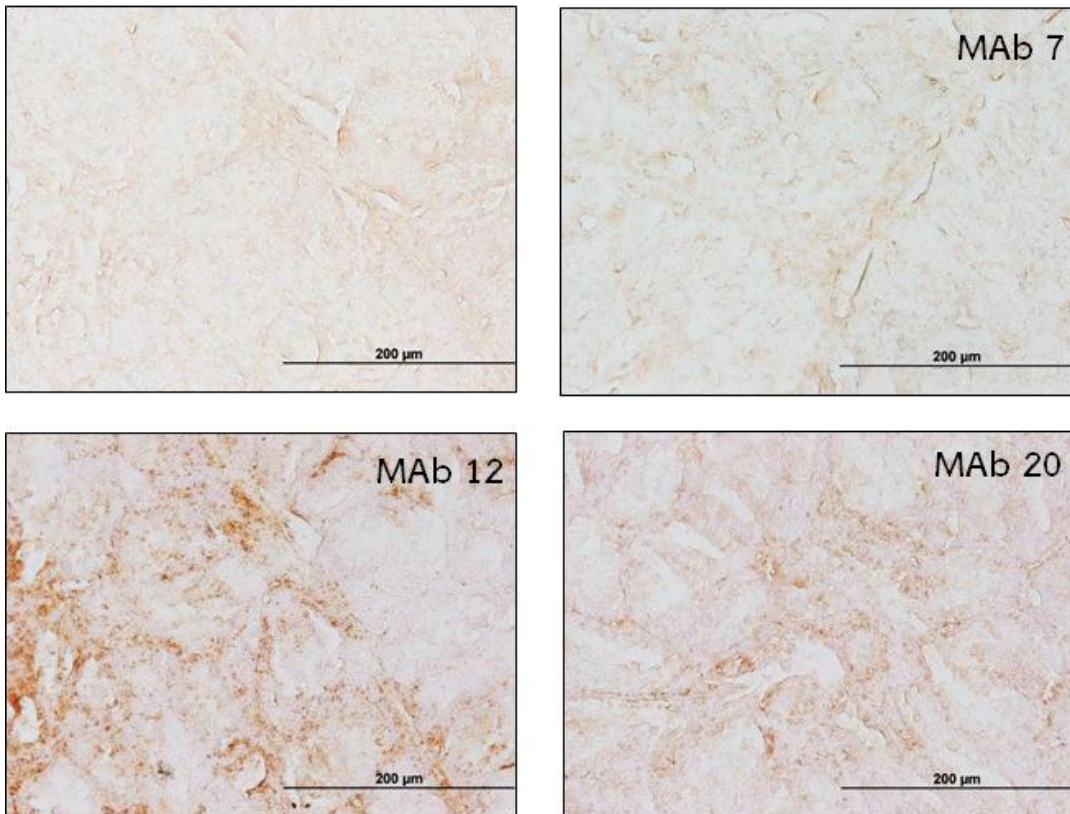
หอย ตัวที่	MAb						
	7	9	12	17	19	20	22
1	-	-	-	-	-	+	-
2	-	-	+	-	-	-	-
3	-	-	+	-	-	-	-
4	-	-	+	-	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	-
6	-	-	-	-	-	+	-
7	+	-	-	-	-	+	-
8	-	-	+	-	-	-	-
9	-	-	-	-	+	+	-
10	-	-	+	-	-	+	-

+ พบการติดเชื้อปรสิต *P. olseni*

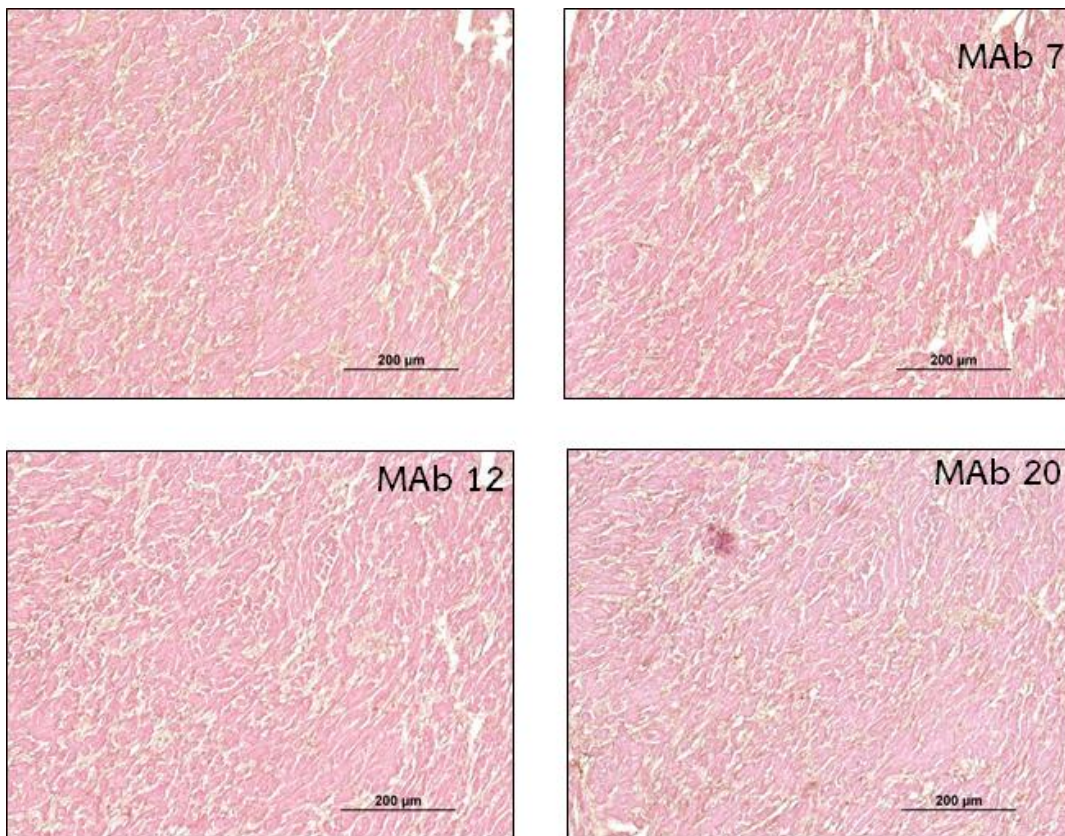
- ไม่พบการติดเชื้อปรสิต *P. olseni*



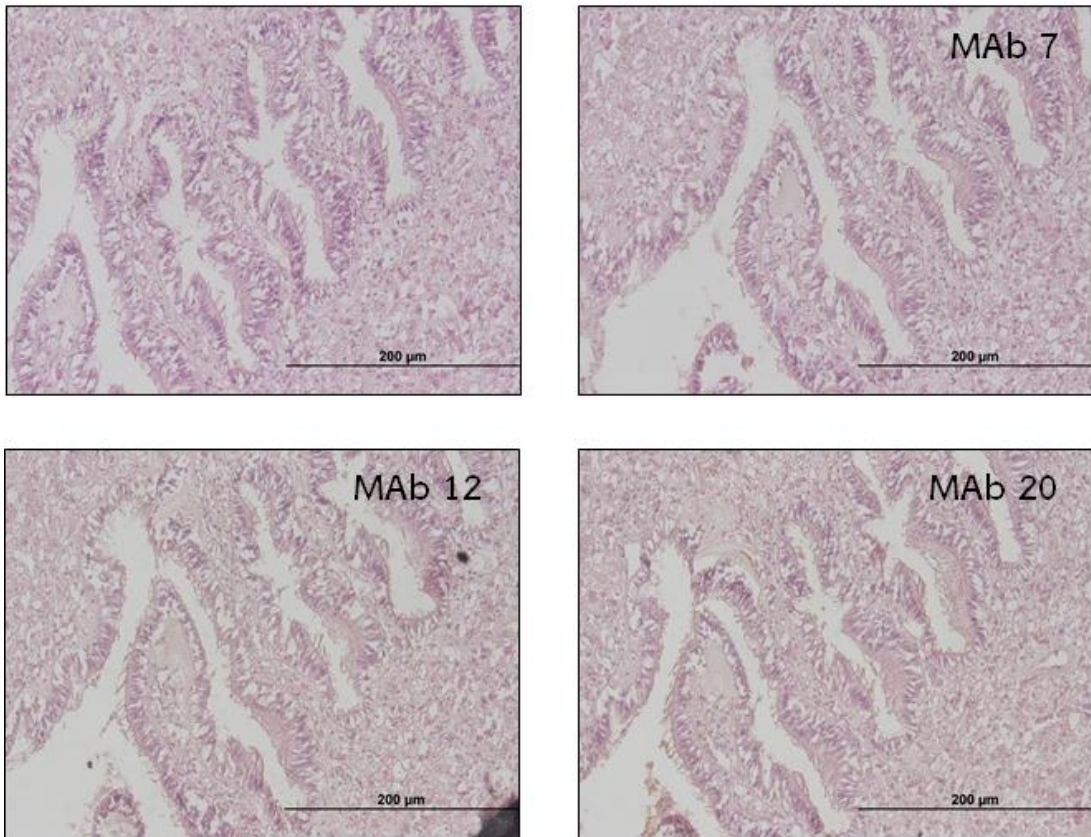
รูปที่ 4.3 การตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olsenii* ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารของหอยลายที่มีรายงานการติดเชื้อ โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไม่ได้บ่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดี และเนื้อเยื่ออีกส่วนนำไปบ่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, หมายเลข 12 และหมายเลข 20 ย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin (กำลังขยาย 40x)



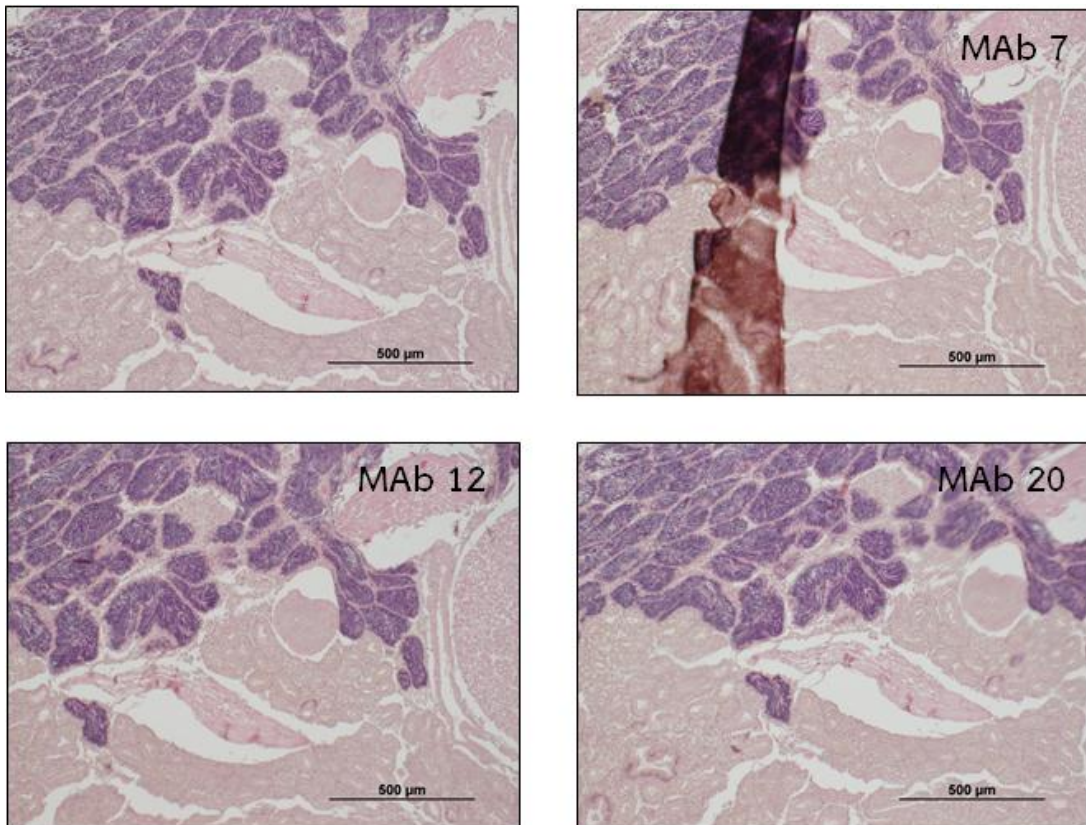
รูปที่ 4.4 การตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olsenii* ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารของหอยลายที่มีรายงานการติดเชื้อ โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไม่ได้บ่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดี และเนื้อเยื่ออีกส่วนนำไปบ่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, หมายเลข 12 และหมายเลข 20 ย้อมด้วยสี eosin (กำลังขยาย 40x)



รูปที่ 4.5 การตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อของ หอยลายที่ไม่มีรายงานการติดเชื้อ โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไม่ได้บ่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดี และเนื้อเยื่ออีกส่วนนำไปบ่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, หมายเลข 12 และหมายเลข 20 ย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin (กำลังขยาย 20x)

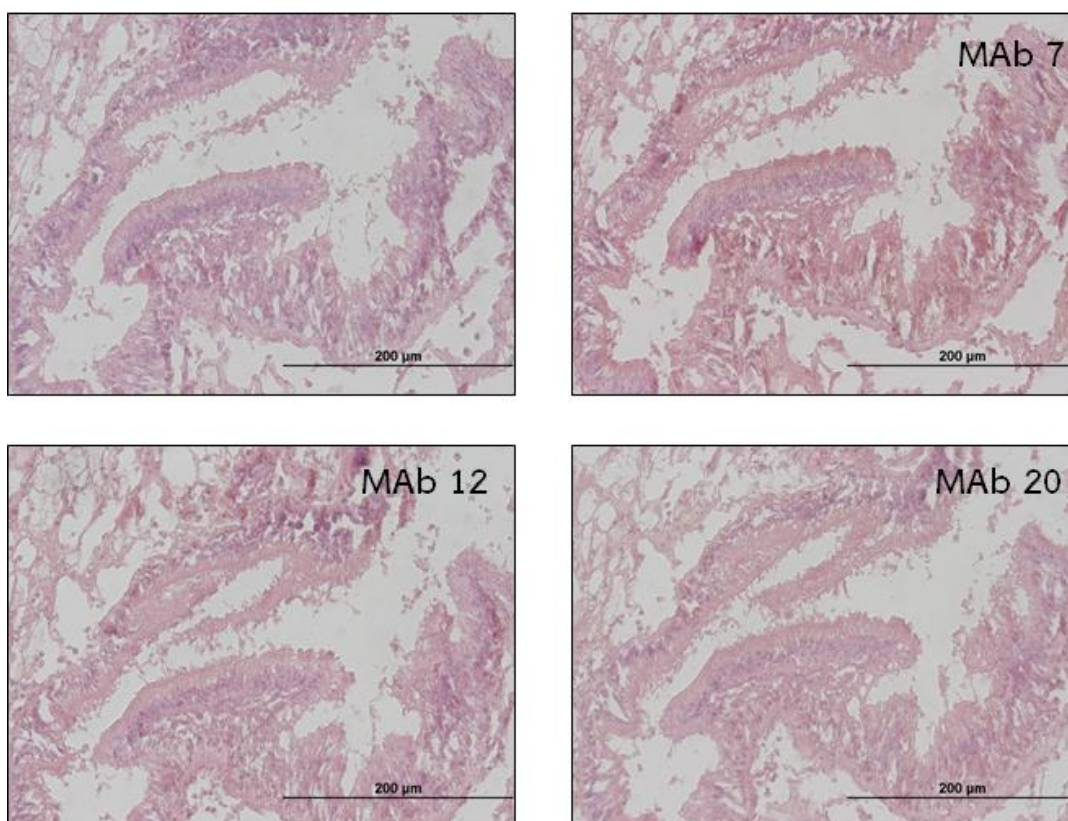


รูปที่ 4.6 การตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olsenii* ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกของ หอยแมลงภู่ โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไม่ได้บ่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดี และเนื้อเยื่ออีกส่วนนำไป บ่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, หมายเลข 12 และหมายเลข 20 ย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin (กำลังขยาย 40x)



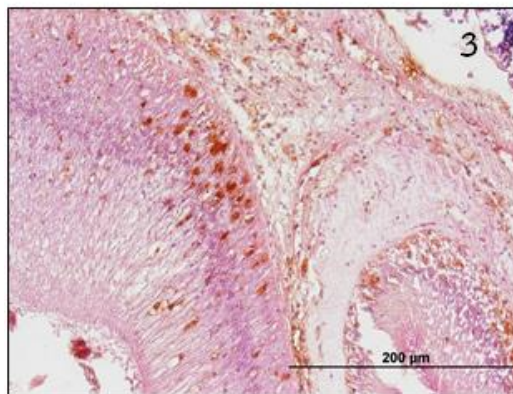
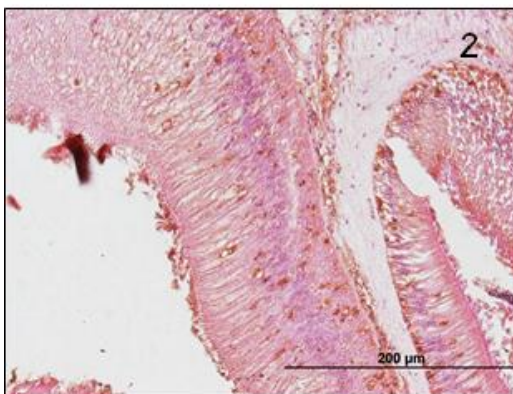
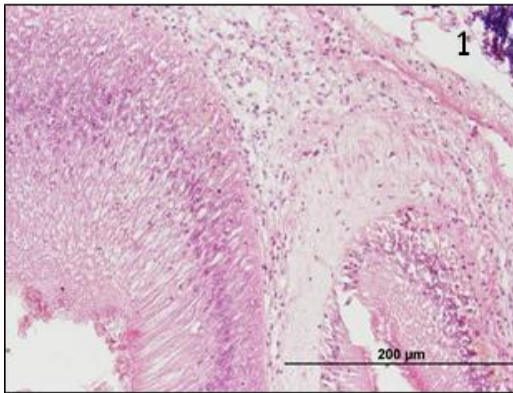
รูปที่ 4.7 การตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารของหอยแครง โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไม่ได้ป่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดี และเนื้อเยื่ออีกส่วนนำไปป่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, หมายเลข 12 และหมายเลข 20 ย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin (กำลังขยาย 10x)



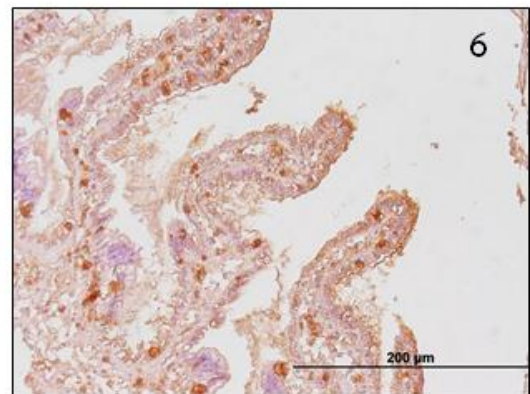
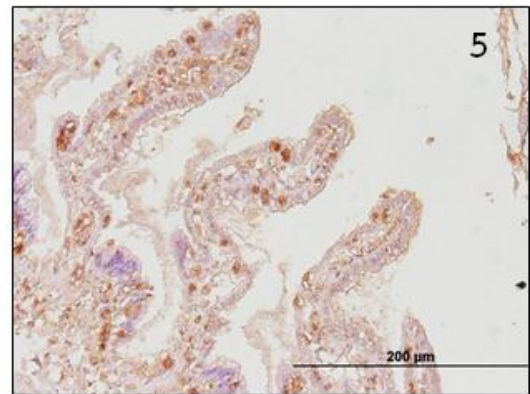
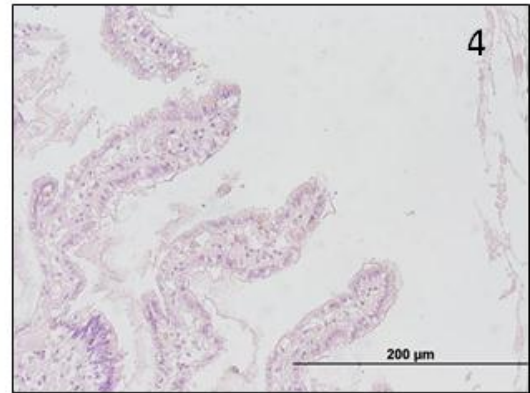


รูปที่ 4.8 การตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olsenii* ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกของหอยนางรม โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไม่ได้บ่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดี และเนื้อเยื่ออีกส่วนนำไปบ่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, หมายเลข 12 และหมายเลข 20 ย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin (กำลังขยาย 40x)

## ทางเดินอาหารหอยลาย

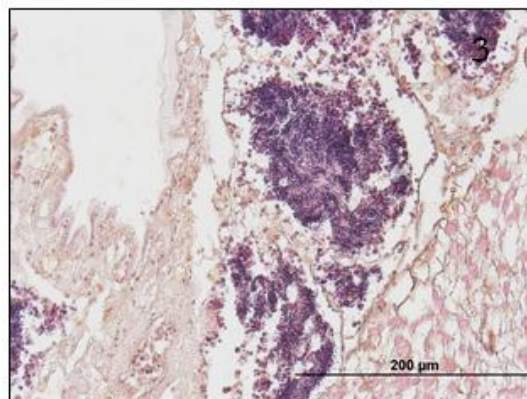
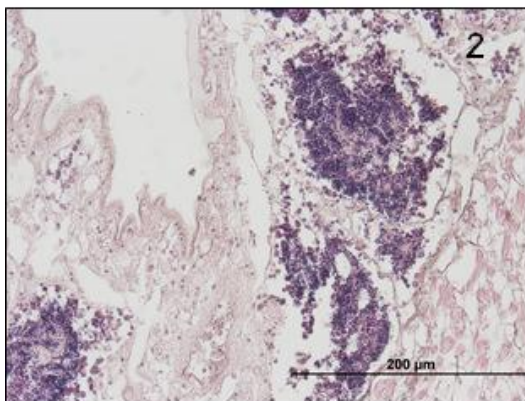
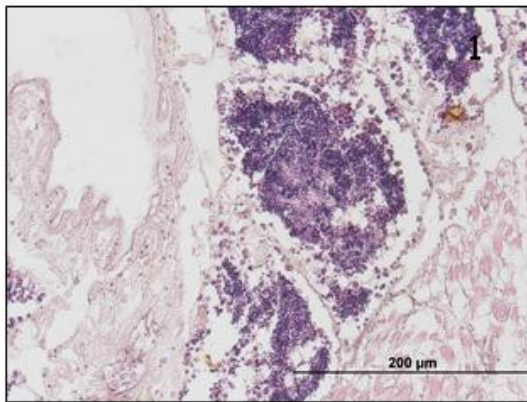


## เหงือกของหอยลาย

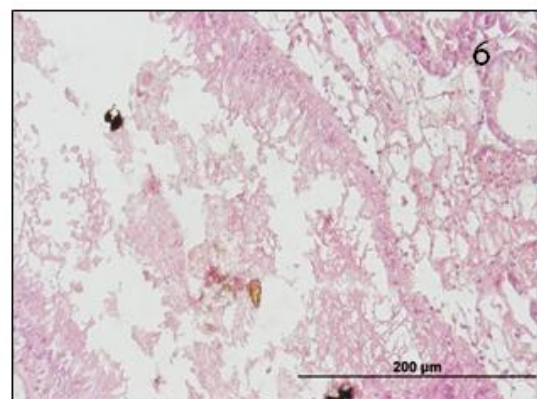
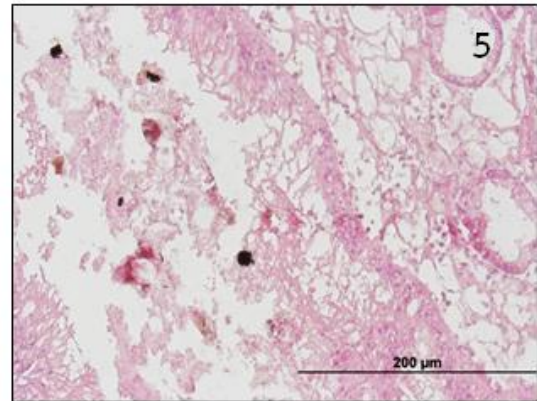
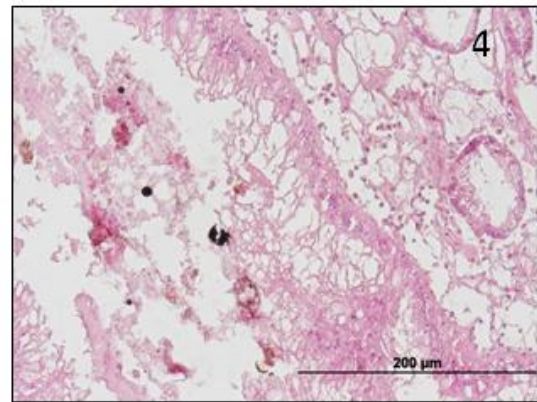


รูปที่ 4.9 การตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหาร (1-3) และเหงือก (4-6) ของหอยลาย โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไม่ได้บ่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดี (1 และ 4) เนื้อเยื่ออีกส่วนนำไปบ่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีผสมระหว่างหมายเลข 7, 12 และ 20 (2 และ 5) และพอลิโคลนอลแอนติบอดี (3 และ 6) ย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin (กำลังขยาย 40x)

ทางเดินอาหารของหอยลาย

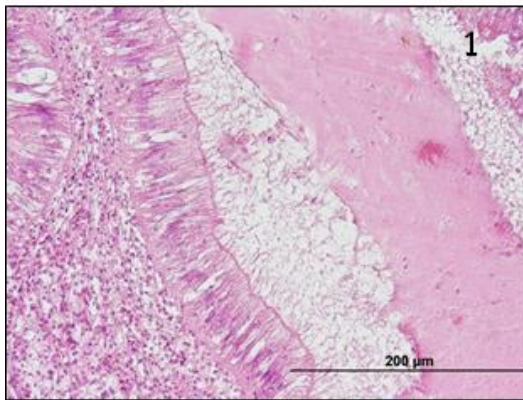


ทางเดินอาหารและไข่ของหอยนางรม

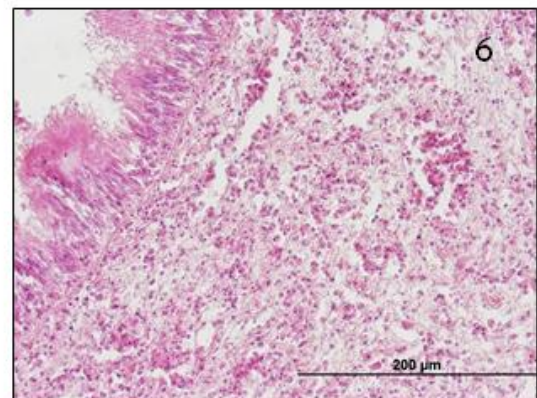
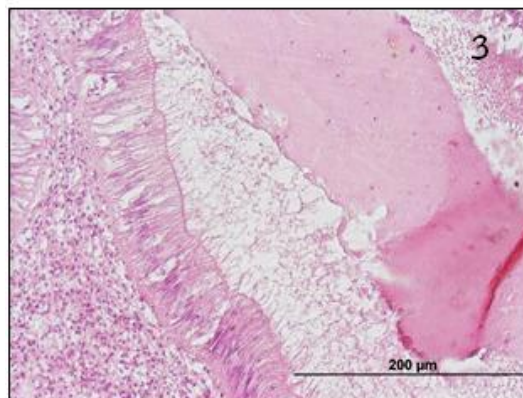
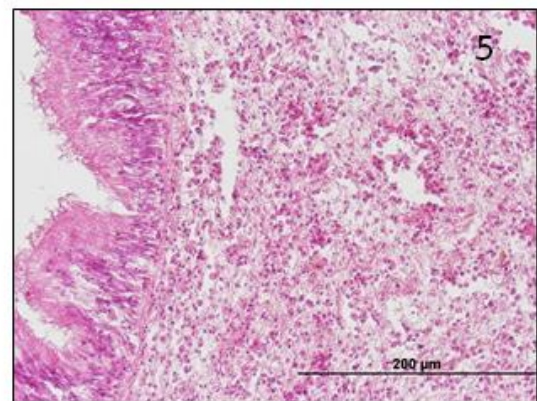
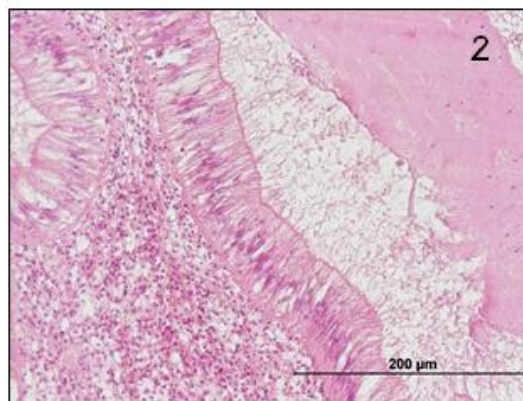
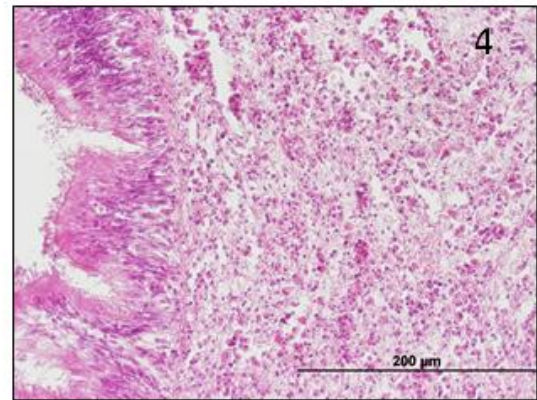


รูปที่ 4.10 การตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารของหอยลายที่ไม่มีรายงานการติดเชื้อ (1-3) และทางเดินอาหารและไข่ของหอยนางรม (4-6) โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไม่ได้ปัมกับมอนอโคลนอลแอนติบอดี (1 และ 4) เนื้อเยื่ออีกส่วนนำไปปัมกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีผสมระหว่างหมายเลข 7, 12 และ 20 (2 และ 5) และพอลิโคลนอลแอนติบอดี (3 และ 6) ย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin (กำลังขยาย 40x)

ลำไส้ของหอยแครง



ทางเดินอาหารของหอยแมลงภู่



รูปที่ 4.11 การตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ของหอยแครง (1-3) และทางเดินอาหารของหอยแมลงภู่ (4-6) โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไม่ได้ป่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดี (1 และ 4) เนื้อเยื่ออีกส่วนนำไปป่มกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีผสมระหว่างหมายเลข 7, 12 และ 20 (2 และ 5) และพอลิโคลนอลแอนติบอดี (3 และ 6) ย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin (กำลังขยาย 40x)

#### 4.5 การตรวจสอบอิมูโนโพรตีนด้วยวิธี indirect ELISA

จากผลการทดลองเพื่อตรวจสอบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, 12 และ 20 จับที่อิมูโนโพรตีนเดียวกันหรือไม่ ตารางที่ 4.6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละโคลนและค่าการดูดกลืนของโคลนที่จับคู่กัน (ช่องสี่เทา) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของคู่โคลนหมายเลข 7 กับ 12 กับค่าการดูดกลืนแสงของมอนอโคลนอลแอนติบอดีแบบเดี่ยวของทั้งสองโคลน โดยค่าการดูดกลืนแสงของมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7 ถูกใช้เป็นค่าเปรียบเทียบ เนื่องจากมีค่ามากที่สุด พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของคู่โคลนหมายเลข 7 กับ 12 มีค่ามากกว่าค่าการดูดกลืนแสงของมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7 ประมาณ 0.2 หน่วย แสดงว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7 กับ 12 มีแนวโน้มจับที่อิมูโนโพรตีนต่างกันบนแอนติเจน เช่นเดียวกับค่าการดูดกลืนแสงของคู่โคลนหมายเลข 12 กับ 20 และคู่โคลนหมายเลข 7 กับ 20 ที่มีค่ามากกว่าค่าการดูดกลืนแสงแบบเดี่ยวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มากที่สุด โดยมีผลต่างมากกว่า 0.2 หน่วย จากผลการทดลองสรุปได้ว่า มอนอโคลนอลแอนติบอดีทั้งสามมีความสามารถในการจับกับอิมูโนโพรตีนที่แตกต่างกันบนแอนติเจน

ตารางที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสงของมอนอโคลนอลแอนติบอดีแต่ละตัวและคู่โคลน<sup>a</sup>

MAbs <sup>c</sup>	A <sub>450</sub> <sup>b</sup>		
	7	12	20
7	2.184	2.385	3.018
12		0.646	3.038
20			2.775

<sup>a</sup> ความเข้มข้นของ *P. olsenii* ระยะ hyphospore ที่ใช้เป็น coating antigen คือ  $8.00 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

<sup>b</sup> ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

<sup>c</sup> ความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดีเจือจางที่ 1:2

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olsenii* ในหอยลาย *Paphia undulata* ด้วยวิธีหลอมรวมเซลล์ม้ามซึ่งได้จากหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันกับเซลล์มัยอิโลมา P3X พบว่าการกระตุ้นหนูทดลองด้วยระยะ hypnospore ให้ค่าระดับแอนติบอดีอยู่ระหว่าง 128,000 ถึง 1,024,000 ซึ่งตอบสนองได้ดีกว่าการกระตุ้นด้วยระยะ zoospore ที่ให้ค่าระดับแอนติบอดีอยู่ระหว่าง 32,000 ถึง 512,000 เนื่องจาก hypnospore มีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนที่ดีกว่า zoospore เพราะมีขนาดของโมเลกุลที่ใหญ่ ทำให้มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immunogenicity) ได้ดี โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hypnospore อยู่ที่ 50-100  $\mu\text{m}$  [4] และ zoospore มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณส่วนหัวเฉลี่ยอยู่  $4.55 \pm 0.90 \mu\text{m}$  [33]

หลังจากการหลอมรวมเซลล์ และคัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี dot blotting พบว่าได้มอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olsenii* ทั้งหมด 11 โคลน แบ่งออกเป็น 3 โคลนที่ได้จากการกระตุ้นด้วยระยะ zoospore และอีก 8 โคลนที่ได้จากการกระตุ้นด้วยระยะ hypnospore จากผลการทดลองศึกษาลักษณะเบื้องต้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ พบว่าสามารถแบ่งมอนอโคลนอลแอนติบอดีได้เป็น 3 กลุ่มจากผลการจับกับ *P. olsenii* ระยะ zoospore และ hypnospore ได้แก่ มอนอโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 สามารถจับกับระยะ zoospore ได้เพียงระยะเดียว คือ หมายเลข 1, มอนอโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 สามารถจับกับระยะ hypnospore ได้เพียงระยะเดียว คือ หมายเลข 12 และมอนอโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 สามารถจับได้ทั้งระยะ zoospore และ hypnospore มีทั้งหมด 9 โคลน ได้แก่ หมายเลข 5, 7, 9, 15, 17, 19, 20, 22 และ 24 จากงานวิจัยก่อนหน้าที่ใช้ *P. marinus* ระยะ trophozoite เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c พบว่าได้มอนอโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 2 โคลน และสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับระยะ hypnospore และ zoospore [9] ในขณะที่เมื่อใช้ extracellular product (ESP) ที่ได้จาก *P. marinus* เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c พบว่าได้มอนอโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 5 โคลน โดยพบว่าสามารถจับกับทั้งระยะ trophozoite และ hypnospore แต่ไม่จับกับ

ระยะ zoospore [34] สำหรับการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับระยะอื่น ๆ นั้นเกิดขึ้นได้เนื่องจากระยะ hypnospore เป็นระยะที่พัฒนามาจากระยะ trophozoite เมื่อบ่มเนื้อเยื่อหอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ fluid thioglycollate medium (FTM) trophozoite จะมีขนาดใหญ่และผนังเซลล์หนาขึ้น กลายเป็นระยะ hypnospore เมื่อแยกเซลล์จากอาหารและถ่ายเซลล์ลงในน้ำทะเล จะเกิดกระบวนการ zoosporulation และมีการแบ่งนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม ทำให้มี zoospore เกิดขึ้นอยู่ภายในผนังเซลล์ของ hypnospore และถูกปล่อยออกมาภายนอกผ่าน discharge tube โดยถือได้ว่า hypnospore เป็น precursor ของ zoospore [18] ดังนั้นโอกาสที่จะมีอิทธิพลร่วมกันระหว่างทั้งสามระยะของ *P. olseni* จึงมีความเป็นไปได้ โดยในงานวิจัยนี้ต้องการมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับได้ทั้งระยะ zoospore และ hypnospore เพื่อนำไปใช้ตรวจหาเชื้อปรสิตในเนื้อเยื่อหอยด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

สำหรับผลการทดสอบความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *P. olseni* ด้วยวิธี dot blotting โดยแบ่งออกเป็นช่วงความไวต่อระยะ zoospore อยู่ระหว่าง  $10^7$ - $10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และช่วงความไวต่อระยะ hypnospore อยู่ระหว่าง  $10^5$ - $10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับมอนอโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 3 หมายเลข 7, 17 และ 22 มีความไวและความแรงในการจับ (affinity) สูงที่สุด โดยในงานวิจัยที่ทำการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อ *P. marinus* ระยะ trophozoite พบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีค่าความไวอยู่ที่  $2 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรจากการคัดเลือกด้วยเทคนิค ELISA [9] โดยเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความไวในการตรวจวัดสูงกว่าเทคนิค dot blotting จึงทำให้ค่าความไวที่ได้สูงขึ้นเช่นกัน สำหรับมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 1 ที่จับได้เฉพาะระยะ zoospore เท่านั้น มีค่าความไวและความแรงในการจับต่ำ ในขณะที่มอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 12 ที่จับได้เฉพาะระยะ hypnospore มีความไวและความแรงในการจับสูง

จากผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงจากมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร พบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีมีไอโซไทป์เป็นชนิด IgG<sub>1</sub> 6 โคลน ได้แก่ หมายเลข 1, 9, 15, 17, 19 และ 22 ชนิด IgG<sub>2b</sub> 3 โคลน ได้แก่ หมายเลข 7, 12 และ 24 และเป็นชนิด IgM 2 โคลน ได้แก่ 5 และ 24

โดยในงานวิจัยของ Earnhart และคณะ (2005) มอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อ *P. marinus* ที่ผลิตได้ 2 โคลน มีไอโซไทป์เป็น IgG<sub>1</sub> ทั้งหมด [34]

สำหรับการนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ในเนื้อเยื่อหอย จากการศึกษาลักษณะสมบัติทั้งความสามารถในการจับ ความไว และชนิดของไอโซไทป์ ทำให้ได้โคลนที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาปรสิตด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีทั้งหมด 7 โคลน ได้แก่ หมายเลข 7, 9, 12, 17, 19, 20 และ 22 ซึ่งทุกโคลนมีไอโซไทป์เป็นชนิด IgG ทั้งหมด เนื่องจากไอโซไทป์ IgM จะจับกับกลุ่มของแอนติเจนได้ในช่วงกว้างที่ค่า affinity ต่ำ ในขณะที่ไอโซไทป์ IgG จับกับกลุ่มของแอนติเจนในช่วงที่แคบกว่าที่ค่า affinity สูง ซึ่งการทดลองที่มีอิทธิพลมาเกี่ยวข้องส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่ไอโซไทป์ชนิด IgG [35] สำหรับปฏิกิริยาข้ามจะมีทั้งที่จับได้เฉพาะระยะ hypnospore และจับได้ทั้งสองระยะ ส่วนมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 1 และ 15 ที่ไม่ถูกเลือก เนื่องจากหมายเลข 1 ที่จับได้เฉพาะระยะ zoospore นั้นมีความไวและความแรงในการจับกับแอนติเจนต่ำ เช่นเดียวกับหมายเลข 15 การคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่จับเชื้อปรสิต *P. olseni* ได้ทั้งสองระยะเป็นส่วนใหญ่ เหมาะสมในการทำงานมากกว่า เนื่องจากเนื้อเยื่อหอยลายที่นำมาทดสอบเป็นการสุ่มตัวอย่างจากธรรมชาติ ดังนั้นจึงไม่สามารถควบคุมวงจรชีวิตของเชื้อปรสิตที่อยู่ภายในหอยลายได้เหมือนการเพาะเลี้ยง โดยตัวอย่างสไลด์เนื้อเยื่อหอยที่ได้ส่วนใหญ่ได้รับมาจากรายงานการวิจัยก่อนหน้าเป็นการศึกษาโรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของไทย [3] ซึ่งจากการศึกษานำหอยลายที่ไม่ติดเชื้อมาเลี้ยงร่วมกับเชื้อปรสิต *P. olseni* เพื่อป้องกันการติดเชื้อในหอย พบว่าใช้เนื้อเยื่อหอยลายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการทดลองไม่ได้ เนื่องจากหอยตายหลังจากติดเชื้อ งานวิจัยที่ผ่านมา มีการสุ่มตัวอย่างหอยลายจากธรรมชาติมาใช้ในการทดลองตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* เช่นกัน โดยสุ่มตัวอย่างบริเวณชายฝั่งตะวันตกของเกาหลี ซึ่งพบการแพร่ระบาด 90-100% [16]

มอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, 12, 17, 19 และ 20 พบว่าสามารถใช้ตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ในเนื้อเยื่อหอยลายที่มีรายงานการติดเชื้อโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีได้ (ตารางที่ 4.5) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Earnhart และคณะ (2004) ซึ่งได้นำเอามอนอโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ extracellular product (ECP) ของ *P. marinus* มาใช้ตรวจหาการติดเชื้อ *P. marinus* ในกระเพาะ (digestive gland) และเหงือก (gill) ของหอยนางรม *Crassostrea virginica* และ *P. atlanticus* ในหอยลาย *Ruditapes decussatus* [29] โดยมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข



12 และ 20 มีความสามารถในการตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olsenii* ในสภาพธรรมชาติมากที่สุดจากเนื้อเยื่อหอยลายทั้งหมด 10 ตัว และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อของหอยชนิดอื่น ได้แก่ หอยนางรม หอยแมลงภู่ และหอยแครง โดยเฉพาะในหอยนางรมที่มีรายงานพบการติดเชื้อ *Perkinsus* sp. เช่นเดียวกับในหอยลาย แต่เมื่อตรวจด้วยมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้กลับไม่พบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อหอยนางรม ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการติดเชื้อ *P. marinus* ในหอยนางรมเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ *P. olsenii* ถูกพบในหอยลาย [1] โดยในการศึกษาก่อนหน้าไม่สามารถใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ในสปีชีส์ที่ต่างกันได้ ตัวอย่างเช่น มอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อ *P. marinus* ในหอยนางรม พบว่าไม่สามารถใช้ตรวจเนื้อเยื่อหอยลายที่ติดเชื้อ *P. atlanticus* ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีได้ [29] สำหรับ *P. atlanticus* ถือได้ว่าเป็นสปีชีส์เดียวกับ *P. olsenii* มีลำดับดีเอ็นเอในบริเวณ NTS และ ITS เหมือนกัน [33]

จากผลการทดลองที่ได้พบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 12 และ 20 มีความสามารถในการตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olsenii* ในสภาพธรรมชาติได้ดีที่สุด และเมื่อพิจารณามอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, 17 และ 19 จากผล dot blotting และอิมมูโนฮิสโตเคมีพบว่า มีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน จึงทำการคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีมาหนึ่งโคลน นั่นก็คือหมายเลข 7 เพื่อทำการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยมอนอโคลนอลแอนติบอดี พบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีทั้งสามจับที่อิพิโทปต่างกันบนแอนติเจน และเมื่อนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, 12 และ 20 ผสมกัน พบว่าสามารถเพิ่ม affinity ในการจับกับอิพิโทปบนแอนติเจนที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olsenii* ในเนื้อเยื่อหอยลายในสภาพธรรมชาติได้ (รูปที่ 4.9) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีแบบเดี่ยว ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมาที่ยังไม่มีการใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีแบบผสมในการตรวจหาเชื้อปรสิต *Perkinsus* โดยจะเห็นว่าทั้งมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 12 และ 20 มีความสามารถในการจับที่สูงอยู่แล้วจากผลการทดลองก่อนหน้า เมื่อศึกษาและพบว่าจับอิพิโทปที่ต่างกันบนเชื้อปรสิต *P. olsenii* จึงทำให้ affinity ที่ได้จากการผสมทั้งสามโคลนเพิ่มขึ้น ทำให้เห็นผลการทดลองที่ชัดเจนขึ้นผ่านกล้องจุลทรรศน์ไม่แตกต่างจากการใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดี

ดังนั้นจากผลการศึกษาทั้งหมด แสดงว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีแบบผสม ซึ่งจับอิพิโทปบนแอนติเจนที่แตกต่างกัน ให้ประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olsenii* ในหอยลายได้ดีกว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีแบบเดี่ยวด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ซึ่งสะดวกกว่าการย้อมด้วยวิธีเดิมคือการ

ย้อมด้วยลูกลอไอโอดีน และมีความจำเพาะต่อ *P. olseni* โดยมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ สามารถนำไปใช้ตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* เพื่อรวบรวมเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับโรคระบาดเพอร์-คินซิสในหอยลายต่อไปได้



## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยเชื้อปรสิต *P. olseni* ระยะ zoospore และ hypnospore พบว่าได้มอโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 11 โคลน โดยหนูทดลองกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วย zoospore ได้ทั้งหมด 3 โคลน และกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วย hypnospore ได้ทั้งหมด 8 โคลน มอโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ส่วนใหญ่จับกับ *P. olseni* ได้ทั้ง 2 ระยะ โดยจับกับระยะ zoospore อยู่ในช่วงความไว  $2.64 \times 10^7$  ถึง  $3.30 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และจับกับระยะ hypnospore อยู่ในช่วงความไว  $1.60 \times 10^5$  ถึง  $2.00 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มอโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์เป็นชนิด IgG<sub>1</sub> 6 โคลน, ชนิด IgG<sub>2b</sub> 3 โคลน และชนิด IgM 2 โคลน จากการตรวจหาเชื้อปรสิตในเนื้อเยื่อหอยลายโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่ามอโนโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, 12, 17, 19 และ 20 สามารถตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ในเนื้อเยื่อหอยลายสภาพธรรมชาติที่พบรายงานการติดเชื้อได้ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อหอยลายที่ไม่พบรายงานการติดเชื้อและเนื้อเยื่อหอยชนิดอื่น และมอโนโคลนอลแอนติบอดีแบบผสมของหมายเลข 7, 12 และ 20 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกับเชื้อปรสิต *P. olseni* เนื่องจากมอโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสามโคลนจับอีพิโทปที่ต่างกันบนเชื้อปรสิต

#### ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากมอโนโคลนอลแอนติบอดีแบบผสมที่ได้เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ในเนื้อเยื่อหอยลายด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการใช้แบบเดี่ยว ดังนั้นในการศึกษาต่อไป ควรที่จะต้องเพิ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อหอยที่นำมาทดสอบ เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของการใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นเครื่องมือในการตรวจหาเชื้อปรสิตในสภาพธรรมชาติ และนำผลการทดสอบที่ได้เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้อยู่ในปัจจุบันคือการย้อมด้วยลูกบอลไอโอดีน เพื่อให้เกิดความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

## รายการอ้างอิง

1. Petty D. *Perkinsus* Infections of Bivalve Molluscs. UF/IFAS Extension. Fisheries and Aquatic Sciences Department, [cited 2014 November 2<sup>nd</sup>]. Available from: <http://edis.ifas.ufl.edu/fa178>
2. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. หน่วยงานรับผิดชอบของไทย. 2545 [cited 2014 November 5<sup>th</sup>]; Available from: <http://www.acfs.go.th/foodsafety/fisheries.php>
3. สุพรรณณี ลีโทชลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, นันทิกา คงเจริญพร, และนารีรัตน์ ฤทธิธุดมภ์. รายงานการวิจัยโรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา, 2555.
4. Soudant P. R., Leite F. L., Chu E., Villalba A., Cancela L. Bivalves – *Perkinsus* spp. Interactions. Proceeding of the workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European shellfish industry: Fundacion CETMAR, Vigo, Spain 2008; 2008. p. 78-109.
5. Mackin J. G. Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier. Bulletin of Marine Science 1951;1(1):72-87.
6. Ford S. E., Schotthoefer A., Spruck C. In vivo dynamics of the microparasite *Perkinsus marinus* during progression and regression of infections in eastern oysters. The Journal of Parasitology 1999;273-282.
7. Marsh A. G., Gauthier J. D., Vasta G. R. A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Journal of Parasitology 1995;81(4):577-583; Robledo J. A., Gauthier J. D., Coss C. A., Wright A. C., Vasta G. R. Species-specificity and sensitivity of a PCR-based assay for *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with the fluid thioglycollate assay. Journal of Parasitology 1998;84(6):1237-1244.
8. Choi K. S., Lewis D. H., Powell E. N., Frelier P. S., Ray S. M. A polyclonal antibody developed from *Perkinsus marinus* hypnospores fails to react with

- other life stages of *P. marinus* in oyster (*Crassostrea virginica*) tissues. Journal of Shellfish Research 1991;10:411-415.
9. Romestand B., Torreilles J., Roch P. Production of monoclonal antibodies against the Protozoa, *Perkinsus marinus*: estimation of parasite multiplication in vitro. Aquatic Living Resources 2001;14(6):351-357.
  10. Dungan C. F., Roberson B. S. Binding specificities of mono-and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. Disease of Aquatic Organisms 1993;15:9-22.
  11. Sanguansin J. Short-necked clam fishery in Thailand. 2006 [cited 2014 November 16<sup>th</sup>]; Available from: <http://www.fisheries.go.th>
  12. Chanrachkij I. Undulated Surf Clam (*Paphia* spp.) Dredge Fishing of Thailand 1. Southeast Asian Fisheries Development Center, 2013.
  13. ศเชนทร เฉลิมวัฒน์. การเพาะเลี้ยงหอย. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ริ้วเขียว; 2544, 35-36.
  14. Leethochavalit S. Epizootiology of *Perkinsus olseni* in undulated surf clam (*Paphia undulata*) from Thailand Doctor degree of philosophy, Biological Science Burapha University. 2004.
  15. Azevedo C., Cachola R. Fine structure of the apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve molluscs. Diseases of Aquatic Organisms 1992;14:69–73.
  16. Choi K. S., Park K. I. Review on the Protozoan Parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) Infection in Asian Water. In: Ishimatsu A, Lie H-J, editors. Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea; 2010. p. 269-281.
  17. White M. E., Powell E., Ray S., Wilson E. Host-to-host transmission of *Perkinsus marinus* in oyster (*Crassostrea virginica*) populations by the ectoparasitic snail *Boonea impressa* (Pyramidellidae). Journal of Shellfish Research 1987;6(1):1-5.
  18. Villalba A., Reece K. S., Camino O. M., Casas S. M., Figueras A. Perkinsosis in molluscs: a review. Aquatic Living Resources 2004;17(04):411-432.

19. Ottinger C. A., Lewis T. D., Shapiro D. A., Faisal M., Kaattari S. L. Detection of *Perkinsus marinus* Extracellular Proteins in Tissues of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*: Potential Use in Diagnostic Assays. *Journal of Aquatic Animal Health* 2001;13(2):133-141.
20. Casas S. M., Villalba A., Reece K. S. Study of Perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Diseases of Aquatic Organisms* 2002;50(1):51-65.
21. สุวิน ว่องวัจนะ. แอนติเจน (Antigen). [cited 2014 October 20<sup>th</sup>]; Available from: <http://oc.md.kku.ac.th>
22. Wiley. Antibody Structure and Function. 2002 [cited 2014 November 11<sup>th</sup>]; Available from: <http://www.wiley.com>
23. สุวิน ว่องวัจนะ. แอนติบอดี (Antibody). [cited 2014 October 20<sup>th</sup>]; Available from: <http://oc.md.kku.ac.th>
24. กัญญนันท์ กฤษศิริวัฒนันท์. พื้นฐานวิทยาภูมิคุ้มกัน และหลักการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน: หก. โรงพิมพ์วัชรินทร์ พี.พี; 2555, 66-76.
25. Luttmann W., Bratke K., Kupper M., Myrtek D. *Immunology*: Elsevier Inc.; 2006, 15-17.
26. Abbas A. K. *Cellular and molecular immunology* Philadelphia: Saunders; 1991.
27. Bio-Siva. Monoclonal antibody production. 2010 [cited 2014 November 2<sup>nd</sup>]; Available from: <http://biosiva.50webs.org/mab.htm>
28. Leethochavalit S., Chalermwat K., Upatham E. S., Choi K. S., Sawangwong P., Kruatrachue M. Occurrence of *Perkinsus* sp. in undulated surf clams *Paphia undulata* from the Gulf of Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms* 2004;60(2):165-171.
29. Earnhart C. G., Vogelbein M. A., Brown G. D., Reece K. S., Kaattari S. L. Supplementation of *Perkinsus marinus* cultures with host plasma or tissue homogenate enhances their infectivity. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70(1):421-431.

30. Kim J. Y., Adhya M., Cho S. K., Choi K. S., Cho M. Characterization, tissue expression, and immunohistochemical localization of MCL3, a C-type lectin produced by *Perkinsus olseni*-infected Manila clams (*Ruditapes philippinarum*). *Fish & Shellfish Immunology* 2008;25(5):598-603.
31. Park K. I., Yang H. S., Kang H. S., Cho M. J., Park K. J., Choi K. S. Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. *Journal of Invertebrate Pathology* 2010;105(3):261-269.
32. หทัยทิพย์ สุขสดใส. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Aeromonas caviae*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 2551.
33. Park K. I., Park J. K., Lee J., Choi K. S. Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manila clams *Ruditapes philippinarum*. *Diseases of Aquatic Organisms* 2005;66(3):255-263.
34. Earnhart C. G., Gauthier D. T., Vogelbein W. K., Kaattari S. L. Monoclonal antibody analysis of *Perkinsus marinus* extracellular products. *International Journal for Parasitology* 2005;35(2):171-184.
35. Wedemayer G. J., Patten P. A., Wang L. H., Schultz P. G., Stevens R. C. Structural insights into the evolution of an antibody combining site. *Science* 1997;276(5319):1665-1669.

## ภาคผนวก ก.

### อาหารเลี้ยงเซลล์ และสารเคมีสำหรับผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

#### 1. Stock 100x HT

Hypoxanthine	0.1360 g ในน้ำกลั่น 20 ml
Thymidine	0.0388 g ในน้ำกลั่น 20 ml

ละลายสารและปรับปริมาตรเป็น 100 ml ในน้ำกลั่น แบ่งใส่ขวดและเก็บที่ -20 °C ก่อนใช้

#### 2. Stock 100x HAT

Hypoxanthine	0.1360 g ในน้ำกลั่น 20 ml
Aminopterin	0.0018 g ในน้ำกลั่น 20 ml
Thymidine	0.0388 g ในน้ำกลั่น 20 ml

ละลายสารและปรับปริมาตรเป็น 100 ml ในน้ำกลั่น แบ่งใส่ขวดและเก็บที่ -20 °C ก่อนใช้

#### 3. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	10.43 g
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
L-glutamine	0.1 g
Glucose	2 g
Sodium pyruvate	0.11 g
น้ำกลั่น	1000 ml



เติมสารละลาย Penicillin G และ Streptomycin ลงไปให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 หน่วย และ 100 mg/l ตามลำดับ กรองอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ Millipore membrane (ขนาดรู 0.22  $\mu\text{m}$ ) เก็บที่ 4 °C

#### 4. อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1000 ml
100x HT	10 ml

ผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองให้เข้ากันดีและกรองด้วย Millipore membrane (ขนาดรู 0.22  $\mu\text{m}$ ) เก็บที่ 4 °C

#### 5. อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1000 ml
100x HAT	100 ml

ผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองให้เข้ากันดีและกรองด้วย Millipore membrane (ขนาดรู 0.22  $\mu\text{m}$ ) เก็บที่ 4 °C

#### 6. 50% (w/v) polyethylene glycol (PEG)

ละลาย PEG ในอ่างน้ำร้อน 60 °C โดยสารละลายเตรียมจากละลาย PEG 2 g ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 แบ่งสารละลาย PEG หลอดละ 1 ml และเก็บที่ 4 °C ก่อนใช้นำสารละลาย PEG ที่แบ่งใส่หลอดไว้มาวางในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 °C

#### 7. อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับแช่แข็งเซลล์ (10% DMSO)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	90 ml
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10 ml

## ภาคผนวก ข

## บัฟเฟอร์ และสารเคมีสำหรับ immunoassay

## 1. 0.15 M Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

NaCl	8	g
KCl	0.2	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub>	0.2	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15	g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1000	ml
ปรับ pH เป็น 7.4		

## 2. 0.05% Tween 20 ใน PBS (PBST)

Tween 20	500	μl
PBS	1000	ml

## 3. 5% skim milk

Skim milk	5	g
PBS	100	ml

4. 1% CoCl<sub>2</sub>

CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	1.83	g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	100	ml

### 5. 0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.5	g
Citric acid	7.3	g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1000	ml
ปรับ pH เป็น 5.0 และเก็บที่ 4 °C ในที่มืดก่อนนำมาใช้		

### 6. สารละลายซึบสเตรต TMB

Tetramethylbenzidine (TMB)	3	mg
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	0.3	ml
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.0034	ml
0.15 M Phosphate Citrate buffer	9.9	ml

### 7. สารละลายซึบสเตรต DAB

3,3' Diaminobensidine tetrahydrochloride	15	mg
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.05	ml
1% CoCl <sub>2</sub>	0.125	ml
PBS	50	ml

### 8. 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (สารละลายหยุดปฏิกิริยา)

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96%)	55.53	ml
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1000	ml

## ภาคผนวก ค

## สารเคมีสำหรับเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

## 1. 0.15 M Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

NaCl	8	g
KCl	0.2	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub>	0.2	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15	g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1000	ml
ปรับ pH เป็น 7.4		

## 2. 1% BSA ใน PBS (blocking solution)

BSA	0.2	g
PBS	20	ml

## 3. สี 0.2% Eosin Y ใน 95% ethanol

สี Eosin Y	0.2	g
95% ethanol	100	ml

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสิริรัตน์ แก้วสลัสนิล เกิดเมื่อวันที่ 16 ธันวาคม พ.ศ. 2531 ที่จังหวัดสงขลา สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 โดยเสนอผลงานเรื่องการผลิตและลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Perkinsus olseni* ในหอยลาย *Paphia undulata* ในการประชุมเสนอผลงานวิจัย Food and Applied Bioscience (FAB) ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 6-7 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557 ที่โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่

