

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา

ชนกันต์ จิตมนัส

Abstract

Chitmanat, C.

Fish immunostimulants

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 739-747

Fish immunostimulants are important substances useful to control infectious fish diseases and are substantially beneficial to the aquaculture business and environment.

This literature review covers the results of using fish immune modulators, including bacteria and bacterial derivatives, adjuvants, chitin, glucan, vitamin, and other synthetic materials. These immunostimulants enhance the activities of phagocytotic cells, stimulate the immunological cells to create more lysozymes and more antibodies, enhance the complement efficiency in fish and eventually increase the abilities to prevent bacterial infection. These responses are able to prevent fish from succumbing to various infectious diseases.

Key words : fish immunostimulant, fish immunity, fish diseases

Department of Fisheries Technology, Faculty of Agricultural Product, Maejo University, Sansai, Chiang Mai 50290 Thailand.

M.S. (Fisheries) และ M.S. (Medical Microbiology) ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

Corresponding e-mail : chanagun@hotmail.com

รับต้นฉบับ 26 มีนาคม 2545 รับลงพิมพ์ 29 กรกฎาคม 2545

บทคัดย่อ

ชนกันต์ จิตมนัส

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(4) : 739-747

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) มีความสำคัญในการควบคุมป้องกันโรคปลา เป็นประโยชน์ต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อม บทความนี้จะเป็นการรวบรวมผลของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียและส่วนประกอบของเซลล์แบคทีเรีย แอดจูแวนท์ โคติน กลูแคน วิตามินและสารสังเคราะห์ต่าง ๆ โดยสารกระตุ้นเหล่านี้ส่วนใหญ่จะช่วยเพิ่มการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic cell) ช่วยกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทำให้มีการเพิ่มการผลิตไลโซไซม์ (lysozyme) และปริมาณของแอนติบอดี (antibody) รวมทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (complement) และเพิ่มการยับยั้งการเกิดโรคจากการติดเชื้อแบคทีเรียในปลา ปรากฏการณ์เหล่านี้จะมีผลช่วยให้ปลาเพิ่มความต้านทานโรคติดเชื้อต่าง ๆ

อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอุตสาหกรรมทางการเกษตรที่มีความสำคัญและมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นทุก ๆ ปี เกษตรกรได้พัฒนาการเลี้ยงแบบหนาแน่นเพื่อให้ได้ผลผลิตต่อพื้นที่สูงขึ้น ซึ่งในสภาพดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำเป็นโรคร้ายขึ้น การจัดการที่ดีในส่วนของอาหาร การควบคุมคุณภาพของน้ำและการคัดเลือกสายพันธุ์เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ธุรกิจนี้ดำเนินการไปได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน แม้ว่า การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการป้องกันและรักษาโรค เป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีในปริมาณที่ไม่เหมาะสมติดต่อกันนาน แบคทีเรียจะมีการพัฒนาสายพันธุ์ที่ดื้อยา ทำให้การป้องกันและรักษาโรคปลาในครั้งต่อไปไม่ได้ผล นอกจากนี้ Kruse and Sorum (1994) รายงานว่า ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเหล่านี้อาจส่งผ่านไปยังแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในผู้บริโภคได้ ทำให้การใช้ยาในมนุษย์ใช้ไม่ได้ผลในอนาคต รวมทั้งปัญหาสารตกค้างจากการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ และสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาสำคัญที่มีผลกระทบทางเศรษฐกิจของชาติอยู่ในขณะนี้ จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้นำไปสู่การคิดค้นแนวทางในการลดการใช้ผลิตภัณฑ์น้ำเข้าพวกสารเคมีและยาปฏิชีวนะ การให้วัคซีนน่าจะเป็นวิธีการ

หนึ่งในการลดปัญหาดังกล่าว แม้จะมีการยอมรับว่าวัคซีนที่ป้องกันโรคในปลาแชลมอนใช้ได้ผลดีในต่างประเทศ แต่สำหรับการใช้วัคซีนสำหรับปลาในประเทศไทยยังไม่แพร่หลาย อาจเนื่องมาจากความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียที่พัฒนาปรับตัวเพื่อหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ เป็นผลให้วัคซีนมีประสิทธิภาพต่ำในการป้องกันโรครวมทั้งต้นทุนในการผลิตวัคซีนสำหรับปลาน้ำจืดค่อนข้างสูง ในขณะที่ราคาต่อตัวของปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยยังมีราคาต่ำเมื่อเทียบกับปลาแชลมอน ซึ่งแม้ว่า กุ้งจะนำรายได้เข้าสู่ประเทศปริมาณมาก แต่กุ้งไม่มีภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ การผลิตวัคซีนสำหรับกุ้งไม่น่าจะเป็นไปได้ จึงไม่ได้มีแรงดึงดูดให้นักวิชาการไทยได้คิดค้นวัคซีนปลาอย่างจริงจัง ประกอบกับมีข้อจำกัดด้านความรู้เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ

การหาแนวทางในการเพิ่มความต้านทานโรค โดยเฉพาะการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (nonspecific immunity) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ จะเห็นได้ว่าการพัฒนาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลายตัวมาใช้ในเชิงพาณิชย์แล้ว จุดประสงค์ของการเขียนบทความนี้เพื่อรวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลาและเป็นองค์ความรู้พื้นฐานให้ผู้สนใจได้ค้นคว้าวิจัยเพิ่มเติมต่อไป

ระบบภูมิคุ้มกันของปลา

เพื่อให้เข้าใจผลของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา ควรทราบถึงความรู้พื้นฐานของระบบภูมิคุ้มกันปลา ก่อน ภูมิคุ้มกันของปลามีลักษณะทั่วไปคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Sakai *et al.* 1999 และ Vadstein 1997) Vadstein (1997) กล่าวว่า ภูมิคุ้มกันปลามีการพัฒนาที่ไม่ดี ส่วนใหญ่สุขภาพของปลาจะขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (nonspecific immunity) ซึ่งภูมิคุ้มกันชนิดนี้ไม่จำเป็นต้องได้รับแอนติเจนหรือเชื้อโรคก่อนที่จะเกิดการตอบสนอง ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะถือเป็นด่านแรกในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคต่างๆ และมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคหลากหลายชนิด นักวิทยาศาสตร์ท่านนี้ยังได้ตั้งข้อสังเกตว่า ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะอาจจะเป็นภูมิคุ้มกันหลักในการป้องกันการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในปลาว่ายอ่อน แม้ว่าภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) มีการพัฒนาช้ากว่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในการป้องกันการติดเชื้อในครั้งแรก แต่จะมีความจำ (immunological memory) ทำให้ปลาสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นอย่างรวดเร็วและประสิทธิภาพสูงมาก หากได้สัมผัสกับแอนติเจนหรือเชื้อโรคเดียวกันในครั้งต่อไป อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถแยกภูมิคุ้มกันทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันอย่างสิ้นเชิงเพราะภูมิคุ้มกันทั้งสองระบบมีการทำงานที่ร่วมกัน

ภูมิคุ้มกันทั้งสองชนิดยังแบ่งได้ตามลักษณะการทำงาน ได้ 2 ชนิด คือ ภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวกับเซลล์ (cell-mediated immunity) และภูมิคุ้มกันสารน้ำ (humoral immunity) ภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ จะประกอบด้วยเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytotic cell) ได้แก่ มาโครฟาจ (macrophage) และนิวโทรฟิล (neutrophil) Evans and Jaso-Friedmann (1992) กล่าวว่า ปลาสามารถผลิตเซลล์ที่เรียกว่า nonspecific cytotoxic cell (NCC) ซึ่งทำหน้าที่คล้ายกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีความสามารถในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสหรือเซลล์มะเร็ง [natural killer (NK) cell] นอกจากนี้ปลายังผลิตเซลล์เม็ดเลือดขาวจำพวก T และ B lymphocytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนสำหรับภูมิคุ้มกันที่เป็นของเหลวในน้ำเลือดหรือภูมิคุ้มกัน

สารน้ำ (humoral immunity) มีหลายชนิด เช่น (1) คอมพลีเมนต์ (complement) ทำหน้าที่ช่วยในการทำให้เชื้อแบคทีเรียและไวรัสสลายต่อการถูกทำลายโดยจะช่วยเสริมการทำงานการกลืนกินของเซลล์ (phagocytosis) ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า opsonization คอมพลีเมนต์ยังทำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียอีกด้วย (2) ไลโซไซม์ (lysozyme; N-acetylmuramide glycanhydrolase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย (Dalmo *et al.* 1997) (3) สารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จำพวก transferrin และโปรตีน C-reactive (CRP) ที่อยู่ในซีรัมทำหน้าที่ร่วมกับคอมพลีเมนต์ในการช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (4) ไซโตไคน์ (cytokine) เป็นกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณในการกระตุ้นและยับยั้งการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ

ดังนั้น ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา น่าจะใช้ตัวบ่งชี้ความสำเร็จดังต่อไปนี้

1. การศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์กลืนกิน (phagocytic cell) ซึ่งตรวจสอบได้จากความสามารถในการทำลายสิ่งแปลกปลอมและการผลิตสารเคมีต่างๆ ออกมา ทำให้มีผลต่อการทำลายและการบุกรุกของเชื้อโรค
2. การเพิ่มความสามารถในการฆ่าเชื้อโรคของเซลล์มาโครฟาจและนิวโทรฟิล วิธีการทำลายเชื้อโรคมักได้หลายวิธีซึ่งอาจจะขึ้นอยู่กับออกซิเจนหรือไม่ก็ได้ การทำลายเชื้อโดยอาศัยออกซิเจน ได้แก่ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสามารถตรวจสอบโดยวิธีการเรืองแสงทางเคมี (chemiluminescence) และการย้อมสี (nitroblue tetrazolium; NBT)
3. การเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte proliferation) และเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงในเลือด
4. การเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ที่สูงขึ้น
5. ระดับและการทำงานของไลโซไซม์
6. การกระตุ้นการทำงานของเซลล์ NCC โดยพิจารณาจากความสามารถของเซลล์ดังกล่าวในการทำลายเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (killer cell activity)
7. หากต้องการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อเสริม

ประสิทธิภาพของวัคซีนให้สูงขึ้น อาจใช้ผลผลิตของแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้นเป็นตัววัดความสำเร็จ รวมถึงความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคและการตายจากการติดเชื้อ (challenge test)

การทดลองใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา

นักวิทยาศาสตร์หลายท่านให้ความสนใจในการใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์จากแหล่งต่างๆ เพื่อช่วยกระตุ้นการ

ทำงานของระบบภูมิคุ้มกันซึ่งเป็นประโยชน์ในการป้องกันโรคปลา (Table 1) อันได้แก่

1) การใช้แบคทีเรียและส่วนประกอบของแบคทีเรีย (bacterial derivative)

โดยปกติภูมิคุ้มกันจะถูกกระตุ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอม โดยเฉพาะพวกเชื้อโรคต่างๆ เข้าสู่ร่างกาย แต่การกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้อ่อนกำลังลง (attenuation) ซึ่งทำได้โดยการใช้ความร้อนหรือการใช้

Table 1. Fish immunostimulant

Fish immunostimulant	Fish species	Administration	Results	References
Bacteria and derivative products	Rainbow trout	immersion	Increase resistance to <i>Streptococcus</i> sp.	Sakai (1999)
	Channel catfish	immersion	stimulate B lymphocyte proliferation	Clem <i>et al.</i> (1985)
	Coho salmon	injection	Increase resistance to <i>A. salmonicida</i>	Oliver <i>et al.</i> (1985)
Adjuvants	Turbot	injection	Increase antibody	Estevez <i>et al.</i> (1994)
	Trout	injection	Increase resistance to <i>V. anguillarum</i>	Kijita <i>et al.</i> (1992)
Chitin	Rainbow trout	injection	Enhance macrophage activities and increase resistance to <i>V. anguillarum</i>	Sakai <i>et al.</i> (1992)
	Yellowtail	injection	Increase resistance to <i>P. piscicida</i>	Kawakami <i>et al.</i> (1998)
Glucan	Channel catfish	injection	Increase resistance to <i>E. ictaluri</i>	Chen and Ainsworth (1992)
	Atlantic salmon	mixed feed	Increase resistance to <i>V. anguillarum</i>	Jenney and Anderson (1993)
Vitamin C	Channel catfish	mixed feed	Increase resistance to <i>E. tarda</i>	Li and Lovell (1985)
Vitamin E	Atlantic salmon	mixed feed	Increase resistance to <i>A. salmonicida</i>	Hardie <i>et al.</i> (1990)
<i>Spirulina</i> sp.	Channel catfish	mixed feed	Increase in phagocytotic cells	Duncan and Klesius (1996b)
<i>Psidium guajava</i> <i>Momordica charantina</i>	<i>In vitro</i> test		Inhibit <i>A. hydrophila</i> growth <i>in vitro</i>	Direkbusarakom (1998)
Growth hormone	Rainbow trout	injection	Increase resistance to <i>V. anguillarum</i>	Sakai (1997)
Levamisole	Rainbow trout	injection	Increase resistance to <i>V. anguillarum</i>	Kajita <i>et al.</i> (1990)

ฟอร์มาลินเพื่อพัฒนาวัคซีน โดยยังคงให้แบคทีเรียมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันนั้นอาจส่งผลเสียต่อปลาเนื่องจากเชื้อดังกล่าวอาจจะเปลี่ยนสภาพเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงและก่อให้เกิดโรคได้ รวมทั้งปลาที่ให้วัคซีนอาจเป็นพาหะนำเชื้อโรคไปยังปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่ไม่มีประวัติการระบาดของเชื้อโรคนั้นๆ อย่างไรก็ตาม มีรายงานความสำเร็จของการใช้วัคซีนสำหรับปลาในต่างประเทศเป็นต้นว่า Sakai (1999) กล่าวว่า วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio anguillarum* (*Vibrio bacterin*) เป็นวัคซีนที่ได้ผลดีมากที่สุดสำหรับปลาแซลมอน ไม่ว่าจะเป็นการให้โดยการฉีด การให้ทางปากและการจุ่ม เขาได้รายงานต่อไปว่า ปลาแรนโบว์เทรทท์ (*Oncorhynchus mykiss*) ที่จุ่มในวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *V. anguillarum* ยังสามารถเพิ่มความต้านทานต่อการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. จากเหตุการณ์นี้แสดงให้เห็นว่า วัคซีนนอกจากจะกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะแล้วยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะด้วยการกระตุ้นดังกล่าวอาจเกิดจากส่วนของผนังเซลล์แบคทีเรียที่ใช้ส่วนประกอบเพียงบางส่วนของแบคทีเรียเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันนี้จะช่วยลดปัญหาการแปรสภาพของแบคทีเรียที่อ่อนกำลังไปเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงได้ ตัวอย่าง เช่น Clem และคณะ (1985) กล่าวว่า LPS (lipopolysaccharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ B lymphocyte อันเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดี และ LPS ยังกระตุ้นการเพิ่มผลผลิตของโปรตีนที่มีลักษณะคล้าย interleukin 1 จากเซลล์โมโนไซท์ (monocyte) ของปลาคอดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) Sakai (1999) รายงานว่า Muramyl dipeptide (MDP; N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) จากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Mycobacterium* สามารถกระตุ้นมาโครฟาจเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี (B lymphocyte) และ alternative pathway ของคอมพลีเมนต์ในหนู Oliver *et al.* (1985) รายงานว่า ปลาโคโฮแซลมอน (*Oncorhynchus kisutch*) ที่ได้รับการส่นผสมของ MDP ใน Freund's incomplete adjuvant มีการเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *A. salmonicida* ถึง 47 เท่า

2) สารเสริมปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหรือแอดจูแวนท์ (adjuvant)

Anderson (1996) กล่าวว่า แอนจูแวนท์ทำหน้าที่เป็นที่เก็บแอนติเจน (antigen reservoir) โดยแอดจูแวนท์จะไปจับกับแอนติเจนให้มีอนุภาคใหญ่ขึ้น ทำให้แอนติเจนอยู่ในร่างกายได้นานขึ้น แล้วค่อยๆ ปล่อยออกมากระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ ดังนั้นจึงนิยมใช้แอดจูแวนท์เป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพวัคซีน ตัวอย่างของแอดจูแวนท์ ได้แก่ alum (aluminium hydroxide), Freund's complete adjuvant (FCA; เชื้อตายของ *Mycobacterium* ใน water-in-oil emulsion) Estévez และคณะ (1994) รายงานว่า ปลาข้างเดียว (turbot; *Scophthalmus maximus*) ที่ฉีดด้วยวัคซีนที่เตรียมจาก *V. anguillarum* ผสมกับ FCA จะช่วยเพิ่มปริมาณแอนติบอดีของปลาดังกล่าว โดยที่ไม่จำเป็นต้องมีการฉีดวัคซีนซ้ำ (boost) อย่างไรก็ตาม Kawakmai *et al.* (1998) กล่าวว่า ปลา yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) ที่ฉีดด้วย FCA อย่างเดียว ไม่ได้เพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ *Pasteurella piscicida* แม้ว่า FCA จะช่วยเสริมประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันแบคทีเรียในปลาดังกล่าว

3) ไคตินและไคโตซาน (chitin and chitosan)

ไคตินเป็น polysaccharide ที่เป็นส่วนประกอบพื้นฐานในเปลือกกุ้งและแมลง รวมทั้งเป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ของสาหร่ายบางชนิด Sakai และคณะ (1992) รายงานว่า ปลาแรนโบว์เทรทท์ที่ฉีดไคติน 100 มก/น้ำหนักปลา 1 กก มีการกระตุ้นเซลล์ macrophage และเพิ่มความต้านทานในการติดเชื้อ *V. anguillarum* นอกจากนี้ยังพบว่า ปลาหางเหลือง (yellowtail; *Seriola quinqueradiata*) ที่ฉีดด้วยไคตินสามารถเพิ่มความต้านทานโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *P. piscicida* หลังจากได้รับเชื้อในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 45 วัน (Kawakami *et al.* 1998)

ไคโตซาน (de-N-acetylated chitin) มีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเช่นกัน ดังที่พบตัวอย่างในงานวิจัยของ Anderson และคณะ (1995) ซึ่งรายงานว่าการฉีดหรือจุ่มในไคโตซานมีการเพิ่มขึ้นของระบบภูมิคุ้มกันโรค โดยสังเกตได้จาก ความสามารถในการ

การฆ่าของเซลล์ (potential killing activity) และปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินรวม (total Ig concentration)

4) กลูแคน (glucan)

ผลของการใช้กลูแคนที่ได้จากผนังเซลล์ยีสต์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลาย Chen และ Ainsworth (1992) รายงานว่า ปลาตกตออเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) ที่ฉีดด้วยกลูแคนจากยีสต์มีปริมาณของแอนติบอดีโตเตอร์สูงขึ้นและเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Edwardsiella ictaluri* Jenney และ Anderson (1993) ให้กลูแคนผสมอาหารแก่ปลา Atlantic salmon ในอัตราส่วน 1 กรัม/อาหาร 1 กก เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ปลาดังกล่าวมีความสามารถในการต้านทานการตายจากการติดเชื้อ *V. anguillarum* และ *V. salmonicida* แต่เมื่อ Duncan and Klesius (1996a) ได้ทดลองให้ยีสต์กลูแคนแก่ปลาดังกล่าว โดยการผสมอาหารในอัตรา 2.7% เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ พบว่าไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว แสดงว่า วิธีการในการให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีผลต่อการตอบสนองของปลา วิธีการให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เป็นไปได้ในทางปฏิบัติสำหรับสัตว์น้ำ คือการให้โดยการผสมอาหาร การจุ่มหรือการแช่ วิธีดังกล่าวช่วยลดความเครียดของปลา และสามารถปฏิบัติได้กับปลาปริมาณมาก อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองการใช้กลูแคนยังคงให้ผลไม่คงที่ กล่าวคือ Thompson และคณะ (1995) ได้ใช้ยีสต์กลูแคนฉีดให้ปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่า ปลาดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มความต้านทานในการติดเชื้อ *Vibrio anguillarum* ในขณะที่ Sung และคณะ (1994) กล่าวว่า กุ้งกุลาดำที่จุ่มในยีสต์กลูแคน (0.5 และ 1.0 มก/ลิตร) สามารถเพิ่มความต้านทานต่อการเกิดโรคจาก *V. vulnificus* อย่างไรก็ตาม เนื่องจากกุ้งไม่มีภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากการใช้สารดังกล่าวในกุ้งจึงน่าจะเป็นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ยีสต์กลูแคนยังมีความสามารถในการเสริมภูมิคุ้มกัน (adjuvant effect) Aakre *et al.* (1994) กล่าวว่า การใช้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *A. salmonicida* ควบคู่ไปกับการใช้ยีสต์กลูแคนในปลาแอตแลนติกแซลมอน มีการเพิ่มการตอบสนองของแอนติบอดี Jeney และ Anderson (1993) รายงานว่า ปลาเทราท์ (ขนาด 20-30 กรัม) ที่ฉีด

100 ไมโครกรัมของกลูแคนเข้าช่องท้องหรือแช่ด้วยกลูแคน 100 ไมโครกรัม/มล เป็นเวลา 30 นาทีร่วมกับวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Yersinia* เพิ่มความต้านทานโรคแบบไม่จำเพาะ โดยพบว่าจำนวนของเม็ดเลือดขาวมีปริมาณสูงขึ้นและความสามารถในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมสูงขึ้น

5) วิตามินและพีชชนิดต่าง ๆ

มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในการใช้วิตามินซีในการผสมอาหารเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและป้องกันโรคในสัตว์น้ำ Li and Lovell (1985) รายงานว่า ปลาตกตออเมริกันที่ให้อาหารที่มีระดับของวิตามินซี 3,000 มก/มล เป็นเวลา 13 สัปดาห์ มีอัตราการตายจากโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Edwardsiella tarda* น้อยลง ในขณะที่ Hardie และคณะ (1991) กล่าวว่า การให้อาหารปลาที่มีวิตามินซีสูง (มากกว่า 1,000 มก/มล) สามารถเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ โดยพบว่า ปลามีการทำงานของคอมพลีเมนต์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น วิตามินอีเป็นสารสำคัญอีกตัวหนึ่งที่มีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา Hardie และคณะ (1990) รายงานว่า ปลาแอตแลนติกแซลมอนที่ให้อาหารที่ไม่มีวิตามินอีเพียงพอ มีอัตราการตายเนื่องจากติดเชื้อ *A. salmonicida* มากกว่าอาหารสำเร็จรูปปกติ Wise และคณะ (1993) กล่าวว่า ปลาตกตออเมริกันที่ได้รับวิตามินอีในปริมาณสูงจะเพิ่มประสิทธิภาพในการ phagocytosis ของเม็ดเลือดขาว ต่อมา Wahli *et al.* (1998) ทดลองให้อาหารผสมวิตามินซีและอี ในอัตราส่วน 2000:800 ppm แก่ปลาเทราท์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าจำนวนของเม็ดเลือดขาวของปลาเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากมีการกระตุ้นด้วย Concanavalin A และปลาไม่อัตราการตายลดลงหลังจากมีการทดลองให้ปลาติดเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค VHS (viral hemorrhagic septicemia)

Duncan and Klesius (1996b) ได้ทดลองใช้สาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina sp.*) 2.7% ผสมอาหารให้ปลาตกตออเมริกันนาน 7 วัน พบว่าปลามีการตอบสนองในส่วนของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่สูงขึ้น โดยสังเกตจากความสามารถในการจับสิ่งแปลกปลอมของเซลล์สูงขึ้น แต่ปริมาณแอนติบอดีไม่แตกต่างกับปลาในชุดควบคุมหลังจากให้วัคซีนเชื้อตายของ *Edwardsiella ictaluri*

Direkbusarakom และคณะ (1998) รายงาน

ว่า สารสกัดจากไบโพรังและมะระขี้นก มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดจากไบโพรัง คือ 0.625 มก/มล ในขณะที่ค่า MIC ของสารสกัดจากมะระขี้นก คือ 1.25 มก/มล

6) ฮอริโมนเร่งการเจริญเติบโต (growth hormone)

Kajita *et al.* (1992) รายงานว่า ฮอริโมนเร่งการเจริญเติบโตมีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา โดยเฉพาะการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ NCC Sakai (1997) ทดลองฉีดฮอริโมนเร่งการเจริญเติบโตให้กับปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่า ปลามีความสามารถในการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. anguillarum* สูงขึ้น

7) สารสังเคราะห์ทางเคมี (synthetic chemicals)

Levamisole เป็นยากำจัดพยาธิในสัตว์บกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ยานี้จะเพิ่มความสามารถในการจับสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีการกลืนกินของเซลล์ (phagocytosis) ของเซลล์นิวโตรฟิล และเพิ่มจำนวนของเซลล์กลืนกิน (phagocyte) จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวและระดับของ lysozyme ในเลือด รวมทั้งมีผลต่อภูมิคุ้มกันโรคมะเร็งปลาโคโฮแซลมอนที่ฉีดด้วย levamisole 0.1-0.5 มก/กก ผสมกับแอดจูแวนท์ (Freund's complete adjuvant) จะเพิ่มความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. salmonicida* (Olivier และคณะ 1985) Kajita และคณะ (1990) รายงานว่า ปลาเรนโบว์เทราท์ที่ฉีด levamisole จะเพิ่มการป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio anguillarum* โดยสารดังกล่าวจะไปเพิ่มการสร้างภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ Baba และคณะ (1993) รายงานว่า ปลาคาร์พที่จุ่มใน levamisole 10 ไมโครกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และเพิ่มความสามารถในการ phagocytosis ผลการใช้ levamisole ในการกระตุ้นปลาอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ แต่ยังคงขาดการตรวจสอบถึงความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Sakai 1999)

Jorgensen *et al.* (2001) รายงานว่า ส่วนของดีเอ็นเอที่สร้างขึ้น (synthetic oligodeoxynucleotides) ซึ่งมีลำดับเบสไซโตซีนตามด้วยกัวนีน (CpG) สามารถกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลา Atlantic salmon ให้

สร้างไซโตคายน์ที่มีความสามารถในการทำลายเชื้อไวรัส

สรุปและวิจารณ์

ปัจจุบันมีรายงานการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลามากขึ้น โดยปลาที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสามารถป้องกันตนเองจากโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย อันได้แก่ *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *A. salmonicida* และ *Streptococcus* sp. รวมถึงโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส เช่น Infectious hematopoietic necrosis (IHN) แต่สารเหล่านี้ไม่สามารถป้องกันปลาจากการติดเชื้อทุกชนิดได้ (Sakai 1999) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียจำพวก *Renibacterium salmonarum* และ *E. ictaluri* ที่มีความสามารถที่จะหลบหลีกจากการจับกินของเซลล์กลืนกินสิ่งแปลกปลอม

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเหล่านี้ยังมีผลดีต่อสัตว์น้ำอย่างอื่นด้วย เช่น Sung และคณะ (1994) กล่าวว่า กุ้งกุลาดำจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น เมื่อจุ่มในกลูแคน ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 มก/มล เมื่อปลามีความแข็งแรงแล้วจะเห็นได้ว่า ปลาที่มีความสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่แปรปรวนเพิ่มขึ้น ดังรายงานของ Boonyaratpalin และคณะ (1995) ที่ใช้ peptidoglycan ผสมอาหารให้กุ้งกุลาดำ แล้วพบว่า กุ้งกุลาดำสามารถทนต่อการปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่ลดลง ความเค็มและความเครียดได้มากขึ้น

ระยะเวลาที่ควรจะใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และระยะเวลาในการป้องกันสัตว์น้ำจากการติดเชื้อหลังสิ้นสุดการให้สารกระตุ้น เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน กล่าวคือ การให้สารกระตุ้นเหล่านี้ควรกระทำก่อนการเกิดระบาดของเชื้อโรค Matsuo และ Miyazano (1993) รายงานว่า ปลาเรนโบว์เทราท์ที่ให้กิน peptidoglycan เป็นเวลา 56 วันไม่สามารถป้องกันการตายจากการติดเชื้อ แม้ว่าปลาที่ให้ peptidoglycan จำนวน 28 วัน จะสามารถเพิ่มความสามารถในการป้องกันโรคก็ตาม จากปรากฏการณ์ดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ว่า สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจะมีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเป็นหลัก ทำให้ไม่มีระบบความจำ นอกจากนี้ Sakai และคณะ (1999) กล่าวว่า การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเหล่านี้ในปริมาณที่มากเกินไป (overdose) และ

ยาวนานเกินไปจะมีประสิทธิภาพดังกล่าวลดลง โดยอาจมีผลทำให้เกิดภาวะการไม่ตอบสนองต่อแอนติเจนนั้นๆ ในภายหลัง (immunological tolerance)

แม้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีมีส่วนสำคัญอย่างมากในการควบคุมการเกิดโรคสัตว์น้ำ การให้วัคซีน การใช้โพรไบโอติก (probiotics) และการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน น่าจะปลอดภัยกว่า ควบคุมโรคโดยใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่วมกับการใช้วัคซีนเพื่อทำให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคของวัคซีนสูงขึ้นเป็นสิ่งจำเป็นในการพัฒนาวัคซีนปลา การพัฒนาความรู้ด้านภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ ช่วยสร้างความกระจ่างในข้อจำกัดและกลไกการทำงานของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่างๆ ที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ความรู้เหล่านี้จะนำไปสู่เครื่องมือที่สำคัญในการควบคุมโรคสัตว์น้ำ หวังว่า งานเขียนชิ้นนี้จะช่วยจุดประกายให้นักวิจัยได้ร่วมมือกันในการหาแนวทางในการศึกษาวิจัยเรื่องนี้อย่างจริงจัง เพื่อให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้คงอยู่ยั่งยืน โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

- Aakre, R., Wergeland, H.I., Aasjord, P.M., and Endersen, C. 1994. Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing β -1, 3-M-glucan as adjuvant. *Fish and Shellfish Immunology* 4: 47-61.
- Anderson, D.P. 1996. Environmental factors in fish health: immunological aspects. The fish immune system: organism, pathogen, and environment. Academic Press, INC.: 289-310
- Anderson, D.P., Siwicki, A.K., and Rumsey, G.L. 1995. Injection or immersion delivery of selected immunostimulants to trout demonstrate enhancement of nonspecific defense mechanisms and protective immunity. **In:** Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), Diseases in Asian Aquaculture Vol 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Phillipines, pp. 413-426.
- Baba, T., Watase, Y., and Yoshinaga, Y. 1993. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 301-307.
- Boonyaratpalin, S., Boonyaratpalin, M., Supamttaya, K., and Toride, Y. 1995. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune responses, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **In:** Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), Diseases in Asian Aquaculture Vol 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Phillipines, pp. 469-477.
- Chen, D. and Ainsworth, A.J. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. *J. of Fish Diseases* 15: 295-304.
- Clem, L.W., Sizemore, R.C., Ellsaesser, C.F., and Miller, N.W. 1985. Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Developmental and Comparative Immunology* 9: 803-809.
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K. and Bogwald, J. 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J. of Fish Diseases* 20: 241-273.
- Direkbusarakom, S., Ezura, Y., Yoshimizu, M., and Herunsalee, A. 1998. Efficacy of Thai traditional herb extracts against fish and shrimp pathogenic bacteria. *Fish Pathology* 33: 437-441
- Duncan, P.L. and Klesius, P.H. 1996a. Dietary immunostimulants nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. *J. of Aquatic Animal Health*. 8: 241-248.
- Duncan, P.L. and Klesius, P.H. 1996b. Effects of feeding *Spirulina* on specific and nonspecific immune responses of channel catfish. *J. of Aquatic Animal Health* 8: 308-313.
- Estevez, J., Leiro, J., Toranzo, A.E., Barja, J.L. and Ubeira, F.M. 1994. Kinetics of antibody production against *Vibrio anguillarum* antigens in turbot. *Aquaculture* 123: 191-196.
- Evans, D.L. and Jaso-Friedmann, L. 1992. Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 109-121.

- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., and Secombes, C.J. 1990. The effect of dietary Vitamin E on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 87: 1-13.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., and Secombes, C.J. 1991. The effect of dietary Vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 95: 201-214.
- Jeney, G. and Anderson, D.P. 1993. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 116: 315-329.
- Jorgensen, J.B., Johansen, A., Stenersen, B., and Sommer, A.I. 2001. CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 313-321.
- Kajita, Y., Sakai, M., and Kobayashi, M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathology* 25: 93-98.
- Kajita, Y., Sakai, M., Kobayashi, M., and Kawauchi, H. 1992. Enhancement of nonspecific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, injected with growth hormone. *Fish and Shellfish Immunology* 2: 155-157.
- Kawakami, H., Hiratsuka, M., and Dosako, S. 1998. The nonspecific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin or Freund's complete adjuvant in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* to *Pasteurella piscicida* infection. *Fish Pathology* 33: 287-292.
- Kruse, H. and Sorum, H. 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied Environmental Microbiology* 60: 4015-4021.
- Li, Y. and Lovell, R.T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. of Nutrition* 115: 123-131.
- Matsuo, K. and Miyazano, I. 1993. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 1377-1379.
- Oliver, G., Evelyn, T.P.T, and Lallier, R. 1985. Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. *Developmental and Comparative Immunology* 9: 419-432.
- Sakai, M., Kamiya, H., Ishii, S., Atsuta, S., and Kobayashi, M. 1992. The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). In: Shariff, M., Subasighe, R.P. Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Phillippines*, pp. 413-417.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172: 63-92.
- Secombes, C.J., Hardie, L.J., and Daniels, G. 1996. Cytokines in fish: an update. *Fish and Shellfish Immunology* 6: 291-304.
- Sung, H.H., Kou, G.H., and Song, Y.L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* 29: 11-17.
- Thompson, K.D., Cachos, A., and Inglis, V. 1995. Immunomodulating effects of glucans and oxytetracycline in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) on serum lysozyme and protection. In: Shariff, M., Subasighe, R.P. Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines*, pp. 433-439.
- Vadstein. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture* 155: 401-417.
- Wahli, T., Verlhac, V., Gabaudan, J., Schuep, W., and Meier, W. 1998. Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. of Fish Diseases* 21: 127-137.
- Wise, D.J., Tomasso, J.R., Schwedler, T.E., Blazer, V.S., and Gatlin, D.M. III. 1993. Effect of vitamin E on the immune responses of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. *J. of Aquatic Animal Health* 5: 183-188.

