รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินเทคนิคการตรวจหาปรสิต *Perkinsus* sp. ในดินตะกอน หอยลาย (*Paphia undulata*) และหอยนางรม (*Saccostrea* sp.) ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Validation technique for *Perkinsus* sp. detection in sediment undulated clam (*Paphia undulata*) and oyster (*Saccostrea* sp.) by monoclonal antibody

สุพรรณี ลีโทชวลิต
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
นันทิกา คงเจริญพร
อณุมาศ บัวเขียว

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802075
สัญญาเลขที่ 168/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินเทคนิคการตรวจหาปรสิต *Perkinsus* sp. ในดินตะกอน หอยลาย (*Paphia undulata*) และหอยนางรม (*Saccostrea* sp.) ด้วยโมโนโคนอลแอนติบอดี

Validation technique for *Perkinsus* sp. detection in sediment undulated clam (*Paphia undulata*) and oyster (*Saccostrea* sp.) by monoclonal antibody

สุพรรณี ลีโทชวลิต
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
นันทิกา คงเจริญพร
อณุมาศ บัวเขียว

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
กันยายน พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 168/2560

สุพรรณี ลีโทชวลิต
กันยายน 2561

การประเมินเทคนิคการตรวจหาปรสิต *Perkinsus* sp. ในดินตะกอน หอยลาย (*Paphia undulata*) และหอยนางรม (*Saccostrea* sp.) ด้วยมอนอโคลนอลแอนติบอดี

สุพรรณี ลีโทชวลิต[1] จันทร์จรัส วัฒนะโชติ[1] นันทิกา คงเจริญพร[2] และอณุมาศ บัวเขียว[2]

[1] สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี

[2] สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการศึกษาและตรวจหาเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ในหอยลาย ด้วยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา โดยใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตด้วยวิธีไฮบริโดมา แล้วจึงนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีมาทดสอบความสามารถในการทำปฏิกิริยาและความจำเพาะกับปรสิต *Perkinsus olseni* ด้วยวิธี Indirect ELISA และ dot- blotting พบว่า มอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 20 ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด 2.27 ส่วนหมายเลข 12 ไม่ทำปฏิกิริยากับปรสิต *P. olseni* เมื่อตรวจสอบความจำเพาะต่อปรสิตโดยวิธี dot- blotting พบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7 และ 20 สามารถจับกับปรสิต *P. olseni* ระยะฮิปโนสปอร์และโทรโฟซอยด์ได้ และพบว่าแอนติบอดีหมายเลข 20 ทำให้เนื้อเยื่อของระยะฮิปโนสปอร์และโทรโฟซอยด์ บริเวณขอบผนังเซลล์และส่วนที่เป็นนิวเคลียสติดสีน้ำตาลเข้ม

คำสำคัญ: ปรสิต *P. olseni*, มอนอโคลนอลแอนติบอดี, หอยลาย

.

Validation technique for *Perkinsus* sp. detection in ediment undulated clam (*Paphia undulat*a) and oyster (*Saccostrea* sp.) by monoclonal antibody

Supannee Leethochavalit Janjarus Watanachote Nanthika Khongchareonporn and Anumart Beawkeaw

[1] Institute of Marine Science Burapha University Chonburi

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

---

ABSTRACT

This research aims to select monoclonal antibodies for study and detecting parasite *Perkinsus* sp. in undulated surf clam by immunohistochemistry technique. The monoclonal antibodies (MAbs) produced from hybridoma were characterized the specific immunoreactivity to *Perkinsus olseni* by indirect ELISA and dot blotting. In this study, a monoclonal antibody named 20th showed the highest absorbtion at 2.27. The clone named 12 had no cross-reactivity with *P. olseni.* Furthermore, specific blinding of each monoclonal antibody was confirmed by dot blotting. Both antibody named 7 and 20 were reacted with parasite *P. olseni*. In addition, antibody -20 were stained both hypnospore and trophozoite in clams tissue, causing cell wall and nucleus of parasite appeared dark blown colour.

Key words: *P. Olseni,* Monoclonal antibody, Undulated surf clam

สารบัญ

หน้า

บทนำ **1**

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 7

ขอบเขตของโครงการวิจัย 7

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 7

วิธีดำเนินการวิจัย **8**

การเก็บตัวอย่าง 8

การเตรียมเชื้อปรสิตระยะ hypnospore และ zoospore ของปรสิต *Perkinsus* sp. จากหอยลาย 8

การตรวจหาปรสิต *Perkinsus* sp. โดยวิธีการตรวจนับเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 8

การตรวจหาปรสิตในเนื้อเยื่อหอยโดยวิธี Histochemistry 9

การตรวจสอบมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ด้วยวิธี ELISA, dot-blotting 10

การตรวจสอบปรสิตในเนื้อเยื่อหอยโดยวิธี อิมมูโนพยาธิวิทยา 12

ผลการวิจัย **14**

การเก็บตัวอย่าง 14

การเตรียมเชื้อปรสิตระยะ hypnospore และ zoospore ของปรสิต *Perkinsus* sp. จากหอยลาย 15

การตรวจหาปรสิต *Perkinsus* sp. โดยวิธีการตรวจนับเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FTM 16

การตรวจหาปรสิตในเนื้อเยื่อหอยโดยวิธี Histology 18

การตรวจสอบมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ด้วยวิธี ELISA, dot-blotting 18

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง **8**

เอกสารอ้างอิง 27

ภาคผนวก 32

ประวัติคณะผู้วิจัย 40

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ชนิดของปรสิต *Perkinsus* spp. ที่พบในหอยชนิดต่างๆ ทั่วโลก 2
2 ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อหอยก่อน embedded ในพาราฟิน 10
3 ขั้นตอนการ deparaffin ก่อนนำมาย้อมตามวิธีอิมมูโนพยาธิวิทยา 12
4 ขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของหอยลายจากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาครและสมุทรสงคราม . 14
5 ขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของหอยนางรมจากจังหวัดชลบุรี..... 14
6 ปริมาณปรสิต *Perkinsus* sp. ในหอยลายจากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาครและสมุทรสงคราม ระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ.2560 16
7 ค่าการดูดกลืนแสงของมอนอโคลนอลแอนติบอดีแต่ละตัวและคู่โคลน 19

สารบัญภาพ

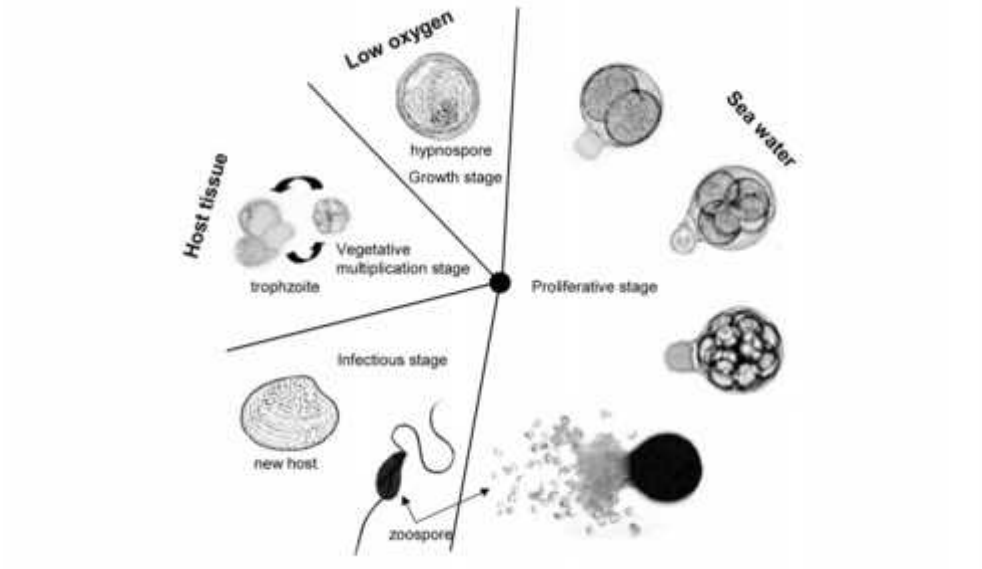
ภาพที่		หน้า
1	วงจรชีวิตของปรสิต *P. olseni*	1
2	ภาพตัดขวางหอยนางรมที่ใช้ทางด้าน histological technique	9
3	ภาพตัดขวางหอยลายที่ใช้ทางด้าน histological technique	9
4	การตัดกระดาษไนโตรเซลลูโลสและการหยดแอนติเจน	11
5	ปรสิต *Perkinsus* sp. ระยะ hypnospore เลี้ยงในน้ำทะเลเทียมปลอดเชื้อ (SM 30)	15
6	ปรสิต *Perkinsus* sp. ขณะเกิดกระบวนการ Zoosporulation จนได้ ปรสิตระยะ Zoospore	15
7	ปรสิต *Perkinsus* sp. ในเนื้อเยื่อส่วนเหงือกของหอยลายที่ย้อมด้วย Lugol's iodine ก่อนนำไปย่อยด้วย NaOH เพื่อนับจำนวน (ลูกศรชี้)	16
8	กราฟแสดงปริมาณปรสิต *Perkinsus* sp. ในหอยลายแต่ละจังหวัดตั้งแต่เดือน มกราคม ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2561 ก. เดือนมกราคม ข. เดือนกุมภาพันธ์ ค. เดือนมีนาคม ง. เดือนเมษายน จ. เดือนมิถุนายน และ ฉ. เดือนกรกฎาคม	17
9	ปรสิต *Perkinsus* sp. ระยะ trophozoites ในเนื้อเยื่อหอยลาย ย้อมด้วยสี H&E	18
10	ปรสิต *Perkinsus* sp. ระยะ trophozoites ในเนื้อเยื่อหอยลาย ย้อมด้วยสี H&E	18
11	ผลการทดสอบความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดเชื้อปรสิตในระยะ hypnospore (A) และ zoospore (B) ที่ความเข้มข้นเซลล์ต่างๆ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด และบ่มในมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้	20
12	ผลการทดสอบความจำเพาะของมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับไดอะตอม ที่ความเข้มข้นโดยประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี dot blotting หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด และบ่มในมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้	21
13	ผลตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี โดยการย้อมเนื้อเยื่อด้วย H&E, ไม่ได้ย้อมด้วย MAb และย้อมด้วย MAb โคลนหมายเลข 7 และ 9 ระยะ trophozoites	22
14	ผลตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี โดยการย้อมเนื้อเยื่อด้วย MAb หมายเลข 12, 15, 17 และ 19 ระยะ trophozoites	23
15	ผลตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี โดยการย้อมเนื้อเยื่อด้วย MAb หมายเลข 20 และ 22 ระยะ trophozoites	24

บทนำ

โรค Perkinsosis เป็นโรคที่เกิดจากโปรโตซัวสกุล *Perkinsus* ที่มีรายงานการแพร่ระบาดมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1946 ในหอยนางรม (Eastern oyster, *Crassostrea virginica*) จากประเทศสหรัฐอเมริกา (Mackin, Owen และ Collier, 1950) ในขณะนั้นปรสิตชนิดนี้ ได้ถูกระบุว่าเป็นเชื้อรา โดยมีชื่อเรียกว่า *Dermocystidium marinum* ต่อมาเมื่อได้ทำการศึกษาลักษณะทางด้านจุลพยาธิวิทยา พบว่ามีอวัยวะที่เรียกว่า Conoid apical complex, Subpellicular membrane, Micropores และมีการเกิดตัวอ่อนที่เรียกว่า zoospore เช่นเดียวกับโปรโตซัวในกลุ่ม apicomplexan อื่น ๆ (Levine, 1978) จึงได้มีการจัดลำดับให้อยู่ใน Order Perkinsida, Class Perkinsea และจัดอยู่ใน Phylum Apicomplexa (Perkin, 1976: Levine, 1978) ต่อมาได้มีการนำเทคโนโลยีการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทาง DNA โดยใช้ส่วน Small subunit ribosomal RNA (SSUrRNA) gene sequence ทำให้ทราบว่าปรสิตกลุ่มนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับกลุ่ม Dinoflagellate จึงได้มีการจัดให้ปรสิตชนิดนี้อยู่ใน phylum Perkinsozoa โดยมีสมาชิกอยู่ 2 สกุล คือ *Perkinsus* และ *Colpodella* (Goggin andBarker, 1993: Noren et al., 1999) ในปัจจุบันมีรายงานการพบ *Perkinsus* หลายชนิดโดยพบในหอยทะเลชนิดต่างๆ จากหลายประเทศ (ตารางที่ 1) โดยในประเทศไทยมีรายงานการพบโปรโตซัวชนิดนี้ในหอยลาย (*Paphiaundulata*) (Leethochavalit et al., 2004) และในหอยนางรม (*Saccrostrea forskali*) (Taveekijakarn et al., 2008)

วงจรชีวิตและกลไกการแพร่ระบาด

วงจรชีวิตของปรสิตในสกุล *Perkinsus* นี้มีอยู่ 3 ระยะ ได้แก่ ระยะ trophozoite ระยะ hypnospore และระยะ zoospore (ภาพที่ 1) ซึ่งสองระยะหลังนี้พบได้จากการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยที่ในธรรมชาติยังไม่มีรายละเอียดมากนัก (Volety and Chu, 1994; Rodríguez et al., 1994; Chu, 1996; Ford et al. 2002)



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของปรสิต *P. olseni* (Choi and Park, 2010)

ตารางที่ 1 ชนิดของปรสิต *Perkinsus* spp. ที่พบในหอยชนิดต่างๆ ทั่วโลก (Villalba et al., 2004)

Perkinsus species	Type host	Other hosts	Areas	Source
Perkinsus marinus	*Crassostrea virginica*	*C. gigas*, *C. arikensis* *C. rhizophorae* *C corteziensis*	USA, Hawaii, Mexico, Brazil	Andrews 1996, Burreson et al. 1994, Calvo et al. 1999, Calvo et al. 2001, Bushek et al. 2002a, Moss et al. 2007 Silva et al. 2013 Cáceres-Martínez et al. 2016
Perkinsus olseni *(=P. atlanticus)*	*Haliotis ruber*	*Clams: Ruditapesdecussatus, R. philippinarum, Anadara trapezia, Austrovenus stutchburyi, Pitar rostrata, Protothaca jedoensis;* *Oysters - C. ariakensis, C. hongkongensis;* *Pearl oysters: Pinctada margaritifera, P. martensii;* *Abalones - Haliotis laevigata, H. scalaris, H. cyclobates*	Australia, New Zealand, Korea, Japan, China, Portugal, Spain, Italy and Uruguay	Azevedo 1989, Goggin and Lester 1995, Hamaguchi et al. 1998, Liang et al. 2001, Casas et al. 2002a, Cremonte et al. 2005, Park et al. 2005, Abollo et al. 2006, Moss et al. 2007, Elandaloussi et al. 2009,
Perkinsus chesapeaki *(P. andrewsi)*	*Mya arenaria*	*Macoma baltica, M. mitchelli, Mercenaria mercenaria, Tagelus plebeius,*	USA, Brazil, Spain	Kotob et al. 1999, Coss et al. 1999, Coss et al. 2001b Dungan et al. 2002

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Perkinsus species	Type host	Other hosts	Areas	Source
		Crassostrea virginica, C. rhizophorae Cerastoderma edule Anadara trapezia		Carrasco , et al, 2014 Neto, et al. 2016
Perkinsus mediterraneus	*Ostrea edulis*		Spain	Casas et al. 2004
Perkinsus qugwadi	*Patinopecten yessoensis*		Canada	Bower et al. 1998
Perkinsus honshuensis	*Ruditapes philippinarum*		Japan	Dungan and Reece 2006,Kang et al. 2016

วงจรชีวิต

วงจรชีวิตของปรสิตในสกุล *Perkinsus* นี้มีอยู่ 3 ระยะ ได้แก่ (ภาพที่ 1)

ระยะโทรโฟซอยท์ (Trophozoite stage)

เป็นระยะที่มีการเพิ่มจำนวนภายเนื้อเยื่อหอยด้วยกระบวนการ Binary division เซลล์ปรสิต มีรูปร่างกลม แวคคิวโอลมีขนาดใหญ่ นิวเคลียสติดอยู่ที่บริเวณขอบด้านใน ขณะที่โทรโฟซอยท์เพิ่มจำนวนให้ได้เซลล์ลูกนั้น เซลล์จะอยู่รวมกันภายในผนังเซลล์แม่จนกระทั่งผนังเซลล์แตกออกจะได้เป็นระยะโทรโฟซอยด์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ จนกว่าจะมีการเพิ่มขนาดและสร้างแวคิวโอล จึงจะเรียกว่าตัวเต็มวัย (Goggin and Lester, 1995; Blackbourn et al., 1998) เซลล์ระยะนี้จะถูกปล่อยออกจากหอยทางเม็ดเลือดและอุจจาระ (Bushek et al. 2002) หรือเมื่อหอยตายลง (Ragone-Calvo et al. 2003)

ระยะฮิปโนสปอร์ (Hypnospore stage or growth stage)

เป็นระยะที่เซลล์โทรโฟซอยท์ มีขนาดใหญ่ขึ้นและสร้างผนังเซลล์หนาขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid glycollate medium ฮิปโนสปอร์นี้เมื่อนำไปเลี้ยงในน้ำทะเลจะเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์ขึ้นภายใน จากรายงานของ Casas และคณะ (2002) กล่าวว่าฮิปโนสปอร์สามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้เป็นเวลานาน ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าระยะนี้เป็นระยะพักตัวของปรสิต

ระยะซูโอสปอร์ (Zoospore stage or proliferative stage)

เป็นระยะตัวอ่อนที่เกิดจากการแบ่งเซลล์โดยกระบวนการbinary fissionของฮิปโนสปอร์จนได้เป็นตัวอ่อนที่ว่ายน้ำได้ เรียกว่าระยะซูโอสปอร์ เมื่อซูโอสปอร์เจริญเต็มวัยจะว่ายน้ำออกมาทางท่อ discharge ซึ่งซูโอสปอร์ ระยะนี้มีนิวเคลียส1 อัน มีแวคคิวโอล จำนวนมาก เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลล่า 2 เส้น ที่อยู่ทางด้านข้างของลำตัว(Azevedo 1989, Casas et al. 2002)

การตรวจวินิจฉัย

การตรวจวินิจฉัยปรสิต *Perkinsus* spp. สามารถแบ่งตามหลักใหญ่ได้ คือ

1. วิธี Ray's fluid thioglycollate medium เป็นวิธีที่นำเนื้อเยื่อหอยมาบ่มในอาหาร Fluid thioglycolate หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อมาย่อยด้วย NaOH ก่อนย้อมด้วย Lugol's iodine solution จะทำให้เห็นเซลล์ *Perkinsus sp*. เป็นสีน้ำเงินดำ (Ray, 1966) หลังจากนั้นวิธีการตรวจวินิจฉัยนี้ได้รับการปรับปรุงมาเป็นลำดับเพื่อให้สามารถใช้ได้อย่างแม่นยำและใช้กับ *Perkinsus* sp. แต่ละชนิด (Choi et al. 1989; Fisher and Oliver 1996; Oliver et al. 1998; Almeida et al. 1999; McLaughlinand Faisal 1999)

2. การตรวจด้วยภาพจากกล้องจุลทรรศน์

การใช้ภาพที่ผ่านกระบวนการทางด้านมิญชวิทยา (histology) แล้วนำไปย้อมด้วยสี H&E จะทำให้เห็นปรสิตระยะโทรโฟซอยท์ ในเนื้อเยื่อหอยที่ติดเชื้อ โดยขนาดจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิด เช่น *P. olseni* มีรายงานว่าขนาดจะแตกต่างกันตั้งแต่ 3-30 μm. (Choi et al. 2002)

3. การตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry และ Molecular Tool

เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยที่เริ่มเข้ามาบทบาทในระยะหลัง และมีความจำเพาะและรวดเร็วมากกว่าวิธีเดิม การตรวจวินิจฉัยแบบนี้เช่น

3.1 วิธี Immunohistochemistry

การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคแบบใหม่นี้ เป็นการพัฒนาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อปรสิต *Perkinsus* sp. โดยในระยะแรกเป็นการพัฒนา polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อปรสิต *P. Marinus* (Choi et al., 1991; Dangan and Robersom, 1993) รวมถึงมีการพัฒนา monoclonal antibody ของ *P. Marinus* ด้วยเช่นกัน (Dangan and Robersom, 1993; Romestand, et al. 2002; Earnhart, et al., 2004)

การแก้ไขข้อจำกัดของเทคนิค RFTM ต่อมาได้มีการนำเอาเทคโนโลยีทางด้าน Molecular มาใช้เนื่องจากมีความจำเพาะมากกว่า เช่น ในปี ค.ศ. 1991 Choi และคณะ ได้ทำการพัฒนาเทคนิค Polyclonal antibody เพื่อใช้ในการวินิจฉัยเซลล์ hypnospore ของปรสิต เช่นเดียวกับ Dungan และ Robertson (1993) ได้พยายามผลิต monoclonal antibodies เพื่อใช้ในการวินิจฉัยเซลล์ hypnospore ของปรสิต *P. marinus* นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคทางด้าน ELISA โดยใช้ polyclonal antibodies เพื่อตรวจหาปรสิต *P. marinus* อีกด้วย (Villalba et al, 2004) ซึ่งการตรวจด้วยเทคนิคนี้จะให้ความถูกต้องแม่นยำกว่าเทคนิค RFTM เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่า

ผลกระทบของการติดเชื้อ *Perkinsus*

หอยที่ติดเชื้อปรสิต *Perkinsus* ในระดับรุนแรงจะส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของหอยทำให้หอยโตช้าลง เกิดเนื้อตายบริเวณที่ติดเชื้อ หรือในรายที่รุนแรงจะทำให้หอยตายได้ (Mackin, 1962; Park et al., 1999; Park and Choi, 2001) ปรสิตชนิดนี้พบโดยทั่วไปที่บริเวณเหงือก ท่อทางเดินอาหาร และแมนเทิล นอกจากนี้ในหอย Manila clam ยังสามารถพบปรสิตนี้ได้บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของระบบสืบพันธุ์ของหอยทั้งตัวผู้และตัวเมีย (Park and Choi, 2001; Choi et al., 2002) ลักษณะอาการที่อาจพบได้ในหอยที่ติดเชื้อ เช่น ตุ่มเนื้อสีขาวที่บริเวณแมนเทิล เท้า และเหงือก ซึ่งเป็นผลมาจากการอักเสบของเนื้อเยื่อ ในกรณีที่หอยติดเชื้ออย่างรุนแรงบริเวณท่อทางเดินอาหาร เหงือก จะแสดงอาการของ hemocytic infiltration เหงือกหอยจะเสื่อมลง

ระบบภูมิคุ้มกันของหอยสองฝา

ระบบภูมิคุ้มกันของหอยสองฝาถูกจัดเป็นแบบ innate และ nonlymphoid system ซึ่งกลไกการป้องกันภายในของหอยสองฝาจะมี 2 ระบบ

1. ระบบ cellular component โดยกระบวนการ phagocytosis หรือ encapsulation ซึ่งจะทำลายเชื้อโรคด้วย enzyme activity และการหลั่งสาร oxygen metabolite ออกมาระบบนี้จะดำเนินการโดยเม็ดเลือด โดยเม็ดเลือดมีคุณสมบัติในการดึงดูด เคลื่อนที่ได้ และสามารถกลืนกินสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กได้ (Hine 1999, Canesi et al., 2002)

2. ระบบ humoral component โดยใช้ปฏิกิริยาที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโมเลกุลแบบต่าง ๆ (Song et al., 2010) เช่น lectins (agglutinins, opsonins), lysosomalenzymes (phosphatase acid, lysozyme and various hydrolytic enzymes), antimicrobial peptides, proteaseinhibitors เป็นต้น (Cheng 1996, Chu 2000)

โมนอโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies)

มอนอโคลนอลแอนติบอดีคือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบี-เซลล์ เซลล์เดียว จึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้ง ในด้านความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายสั้น (Light chain) และสายยาว (Heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของ แอนติบอดีชนิดนั้น เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอิพิโทปจำนวนมากจึงสามารถชักนำกระตุ้นการ ตอบสนองโดยโคลนต่างๆ ของบี-เซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอิพิโทปเป็นผลให้มีการสร้าง แอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจำเพาะต่อแต่ละอิพิโทปรวมอยู่ด้วยกัน ในซีรัมเรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่าง ๆ กันเช่น จับกับแอนติเจนหรือกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวของสิ่งมีชีวิต เองที่สามารถชักนำการตอบสนองในรูปแบบต่างๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรค แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัม ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่ำและอาจไปทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross reaction) กับแอนติเจนอื่นส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีนั้น มีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจาก 1 โคลนของบี-เซลล์ที่มี ความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (หทัยทิพย์ สุขสดใส, 2551)

การผลิต Monoclonal antibody

Monoclonal antibody เป็น Immunoglobulin ที่มีความจำเพาะ ผลิตจากเซลล์ไฮบริโดมาชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยว โดยเป็นอนุพันธ์ของแอนติบอดีที่ประกอบด้วยส่วนแปรผันสายยาวและสายสั้นเชื่อมต่อกันด้วยเปปไทด์สายสั้นปัจจุบันมอนอโคลนอลแอนติบอดีถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ หลายแขนงรวมถึงการตรวจวินิจฉัยโรคและปรสิต (ทวีศักดิ์ จึงวัฒนตระกูล, 2554) วิธีการผลิต monoclonal antibody เริ่มจากการฉีดแอนติเจนที่เหมือนกันในสัตว์ทดลองเพื่อกระตุ้นทำให้ B lymphocytes จำนวนมากสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะตามความต้องการ ส่วนมากแล้วมักใช้หนูเป็นสัตว์ทดลอง สำหรับกระบวนการนำกลุ่มเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีทไปใช้ขึ้นอยู่กับเทคนิคการเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวน สำหรับการผลิต monoclonal antibody จากหนูต้องตรวจกรองหากลุ่มเซลล์สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเพียงเซลล์เดียว (monoclonal) ให้เพียงพอเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นน้ำยาตรวจปรสิต ไม่เพียงแต่ความจำเพาะของ

แอนติบอดีทั้งหมดเท่านั้นแต่ยังรวมถึง IgG class, subclass และชนิดของ light chain ทั้งหมดอีกด้วยต้องเหมือนกัน (อุดม ติ่งต้อย, 2554)

หลังจากฉีดกระตุ้นหนูจนได้แอนติบอดีที่ตอบสนองตามต้องการแล้ว จึงทำการแยกเอาเซลล์ม้าม (spleen cells) มาบดเซลล์ให้ละเอียด เพื่อแยกเอา B lymphocytes ออกมาซึ่งเซลล์เหล่านี้เป็นเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี (plasma cells) ไม่สามารถเลี้ยงขยายได้ เนื่องจากเซลล์สร้างแอนติบอดีมีอายุจำกัดไม่สามารถเลี้ยงให้มีชีวิตยืนยาวได้ ดังนั้นจึงได้มีการเชื่อมเซลล์สร้างแอนติบอดีกับ myeloma cells ของหนูเข้าด้วยกัน (cell fusion) โดยการใช้ sendai virus, lysolecithin, polyethylene glycol(PEG)22 หรือ electrified induction (ใช้กระแสไฟฟ้าเป็นตัวทำให้เกิดการเชื่อมเซลล์ เหมาะสำาหรับเซลล์จำนวนน้อย ๆ) สำหรับในปัจจุบัน hybridomas technique นิยมใช้ PEG เป็นตัวเชื่อมเซลล์มากที่สุด สำาหรับกลไกในการเชื่อมเซลล์เริ่มจากการรวมตัวของเซลล์เมมเบรนเข้าด้วยกันก่อนที่จีโนมของเซลล์จะผ่านเข้าสู่ซัยโตพลาสของอีกเซลล์หนึ่ง เซลล์ที่รวมตัวกันจะเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียส 2 นิวเคลียส หรือมากกว่า เมื่อเซลล์แบ่งตัวนิวเคลียสจึงรวมตัวกันและเกิดเป็นเซลล์ลูกผสมที่เรียกว่า hybrid cells หรือ hybridomacells ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะ ส่วน myeloma cells จะแบ่งตัวเจริญเติบโตไม่ตาย และไม่สามารถควบคุมได้ เซลล์สายพันธุ์มะเร็ง (myeloma cells line) เป็นเซลล์พิเศษสามารถเปลี่ยนแปลงตัวได้ 2 รูปแบบ (two mutations) รูปแบบแรกตัวมันไม่สร้าง immunoglobulin และรูปแบบสองตัวมันขาดเอ็นไซม์ hypoxanthineguanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์จำเป็นสำหรับการสร้าง deoxyribonucleic acid (DNA) ในการจำลองแบบ (replication) ของเซลล์ เมื่อมี HGPRT จะมีการกระตุ้นปฏิกิริยาภายนอกเซลล์ (catalyzes the exogenous) ให้ใช้ hypoxanthine เพื่อผลิต purines ซึ่งเป็นองค์ประกอบพื้นฐานในการขัดขวางการสร้าง DNA แม้ว่าเซลล์จะขาดเอ็นไซม์นี้แต่เซลล์ยังสามารถใช้ hypoxanthine จากภายในเซลล์ (utilizedby an endogenous route) เองได้ ดังนั้นถ้านำ myeloma cells มาทำ fusion กับเซลล์สร้างแอนติบอดีปกติแล้วเพาะเลี้ยงต่อไปพบว่า myeloma cells ที่ยังไม่ fusion จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนปกคลุม hybridoma cells หลังจากนั้นจึงต้องหาวิธีคัดเลือกเฉพาะ hybridoma cells เท่านั้นให้เจริญเติบโตได้ในการเพาะเลี้ยง โดยใช้ selective medium เรียกว่า HAT medium ซึ่งประกอบด้วยสาร aminopterin, hypoxanthine และ thymidine มีคุณสมบัติยอมให้เฉพาะ hybridoma cells เท่านั้นเจริญเติบโตส่วน aminopterin เป็นสาร folic acid analogue มีคุณสมบัติเกาะจับเอ็นไซม์ folic acid reductase เพื่อไปยับยั้ง coenzymes ในการสังเคราะห์ DNA ทาง “de novo” synthesis pathway ทำให้ myeloma cells ตาย ส่วน B lymphocytes ซึ่งเป็นเซลล์ปกติจะตายตามอายุไขประมาณ 7-10 วัน ดังนั้นเซลล์ที่รอดชีวิตใน HAT medium ได้คือ hybridoma cells เพราะมีการสร้าง DNA ผ่านทาง “salvage pathway” ที่อาศัยเอ็นไซม์ที่สำคัญสองตัวคือเอนไซม์ thymidine kinase (TK) และเอ็นไซม์ HGPRT หลังจาก fusion แล้วจึงนำ hybridoma cells มาคำนวณ เพื่อเจือจางและปรับให้มีเซลล์ประมาณ 1-2 เซลล์ต่อหลุม (well) จึงนำไปเลี้ยงใน micro wells ประมาณ 10 วัน ซึ่งเซลล์ในแต่ละหลุมเมื่อเจริญเติบโต จึงนำไปตรวจกรองหาแอนติบอดีจำเพาะ เมื่อได้โคลนที่สร้างแอนติบอดี ที่จำเพาะ แล้วจึงนำโคลนไปเลี้ยงขยายและทำการ reclone เพื่อให้แน่ใจ ในความจำเพาะ และความคงทน เนื่องจาก hybridoma cells เป็นการผสมกันระหว่าง 2 เซลล์ทำให้มี chromosomes มากเกินบางครั้ง อาจจะทำให้เสียหน้าที่ ดังนั้นต้องดูแล chromosomes ที่จำเป็นสำหรับหารผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะให้คงอยู่ตลอดไป (อุดม ติ่งต้อย, 2554)

ในโครงการนี้ทางคณะผู้วิจัยได้มีการร่วมมือกับนักวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยการนำตัวอ่อนระยะซูโอสปอร์และฮิบโนสปอร์ของโปรโตซัว *Perkinsus* sp. ไปใช้ในการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีจนประสบผลสำเร็จได้ส่วนหนึ่ง เพื่อให้การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยสำหรับตรวจเชื้อปรสิตโปรโตซัว

Perkinsus โดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา ประสบผลสำเร็จจึงต้องมีการประเมินผลมอนอโคลนอลแอนติเจน อาศัยเทคนิค immunohistochemistry เปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวินิจฉัยแบบเดิม ก่อนที่จะมีการพัฒนาเพื่อให้สามารถนำมอนอโคลนอลนี้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบทางอิมมูโนวิทยา โดยวิธี ELISA ซึ่งจะช่วยลดเวลาในการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ ในเชิงพาณิชย์ต่อไป โดยมุ่งเน้นการใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตร และอาหารปลอดภัยเป็นหลัก เพื่อส่งเสริมงานวิจัยและพัฒนาด้านการเกษตรและการตรวจวินิจฉัยของประเทศให้มีความก้าวหน้าและมีศักยภาพที่ เข้มแข็งยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อประเมินผลการใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อปรสิตโปรโตซัว *Perkinsus* ในหอยลาย (*Paphia undulate*) หอยนางรม (*Saccrostrea* sp.) และดินตะกอนโดยวิธีการทาง immunohistochemistry และเทคนิค RFTM
2. เพื่อพัฒนาวิธี ELISA ในการตรวจหาปรสิตโปรโตซัว *Perkinsus* ในหอย และในดินตะกอนบริเวณแหล่งเลี้ยงหอย

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ทำการเก็บตัวอย่างหอยลาย (*P. undulata*) บริเวณฝั่งทะเลภาคตะวันออกและจังหวัดชายทะเลภาคกลาง เช่น สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี
2. ทำเก็บตัวอย่างหอยนางรม (*S. forskali*) บริเวณฝั่งทะเลภาคตะวันออก
3. ทำการประเมินผลการใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อปรสิตโปรโตซัว *Perkinsus* ในหอยลาย (*Paphia undulate*) หอยนางรม (*Saccrostrea* sp.)
4. พัฒนาวิธี ELISA ในการตรวจหาปรสิตโปรโตซัว *Perkinsus* แบบ Sandwich ELISA
5. ทดสอบประสิทธิภาพวิธี ELISA ในการตรวจหาปรสิตโปรโตซัว *Perkinsus* ในหอย และในดินตะกอนบริเวณแหล่งเลี้ยงหอย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การจดอนุสิทธิบัตรหรือสิทธิบัตรต้นแบบชุดตรวจสอบ
2. การเผยแพร่ในวารสาร
3. การนำไปผลิตในเชิงพาณิชย์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างหอยลาย (*P. undulata*) จากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาคร และสมุทรสงครามจำนวนจังหวัดละ 30 ตัว ทุกเดือนและตัวอย่างหอยนางรม (*Saccostrea* spp.) จากสถานีวิจัยประมงศรีราชา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์จังหวัดชลบุรี จำนวน 30 ตัวทุกเดือน ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2560

2. การเตรียมเชื้อปรสิตระยะ hypnospore และ zoospore ของปรสิต *Perkinsus* sp. จากหอยลาย

2.1 นำหอยลาย (*P. undulata*) มาแกะเปลือกและตัดเหงือกหอยบ่มในอาหาร Fluid Thioglycollate medium (FTM) ที่มี Streptomycin 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Penicillin 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อหอยมากรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อนำเนื้อเยื่อที่กรองได้มาย่อยด้วย 0.2 % Trypsin ใน SM 30 ปลอดเชื้อ (น้ำทะเลเทียม ความเค็ม 30 พีพีที กรองด้วยกระดาษกรองเมมเบรน 0.2 ไมครอน) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างเนื้อเยื่อด้วย SM 30 ปลอดเชื้อ จำนวน 3 รอบ ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 450 xg เพื่อกำจัด Trypsin ออกให้หมดจนสะอาด นำตัวอย่างปรสิตระยะ hypnospore เลี้ยงด้วย SM 30 ปลอดเชื้อ ในจานเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง

2.2 การเก็บรวบรวม zoospore ของปรสิต *Perkinsus* หลังจากที่ hypnospore ที่เลี้ยงไว้เกิดการแบ่งเซลล์ จนได้ zoospores ว่ายน้ำออกมาจากตัวแม่แล้ว จึงเก็บรวบรวม zoospores ใน PBS นับจำนวนปรสิตเก็บปรสิตระยะ hypnosporeและ zoosporesไว้ใช้ในการทดสอบต่อไป

3. การตรวจหาปรสิต *Perkinsus* sp. โดยวิธีการตรวจนับเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 นำหอยลายจังหวัดละ 30 ตัวและหอยนางรม 30 ตัวที่ตัดเนื้อเยื่อตามภาพที่ 1 และ 2 ออกแล้วจึงนำส่วนด้านหน้าและด้านหลังมาบ่มในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid thioglycolate medium (FTM) พร้อมทั้งใส่ยาปฏิชีวนะคือ Streptomycin 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Penicillin 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

3.2 นำหอยที่ผ่านการบ่มในอาหาร FTM แล้ว มาย่อยด้วย 2 M NaOH ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.3 นำตัวอย่างหอยที่ย่อยแล้วมาปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 x g เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้ง เติม 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 0.15 โมลาร์เกลือ (PBS) 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเท่าเดิม เพื่อล้าง NaOH ออกให้หมด ทำซ้ำจำนวน 3 รอบ

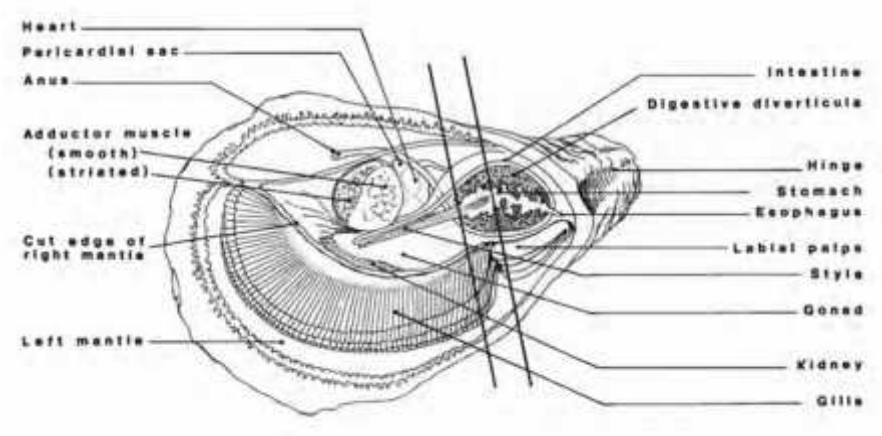
3.4 เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อทำการนับต่อไป

3.5 สุ่มตัวอย่างที่ได้ 500 ไมโครลิตร ย้อมด้วย Lugol's iodine 500 ไมโครลิตร เพื่อนับจำนวน hypnospore ของ *Perkinsus* sp. ด้วยสไลด์นับแพลงก์ตอน (Sedgewick Rafter Counting Chamber) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 3 ครั้ง จดบันทึก แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (Wilson-Ormond et al., 1993; Almeida et al., 1999)

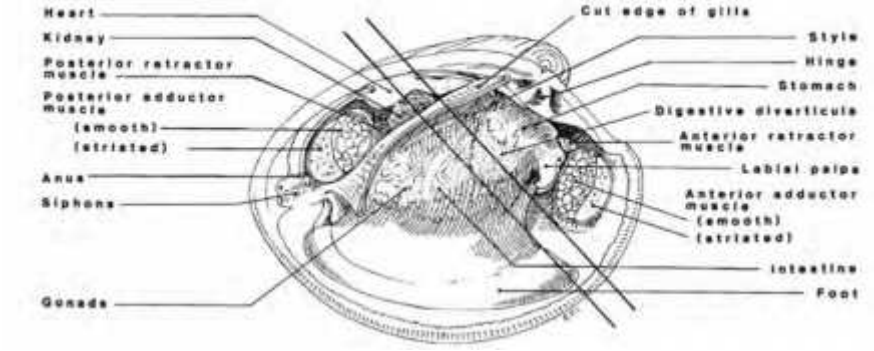
4. การตรวจหาปรสิตในเนื้อเยื่อหอยโดยวิธี Histochemistry

4.1 นำหอยที่เก็บมาตัดตามขวางดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3 แช่ใน Davidson fixative นาน 24 ชั่วโมง

4.2 หลังจากนั้นย้ายมาแช่ใน 70% ethyl alcohol ก่อนนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกด้วยเครื่อง Auto processor (Leica TP 1020) (ตารางที่ 2) และ embed ลงใน block paraffin



ภาพที่ 2 ภาพตัดขวางหอยนางรมที่ใช้ทางด้าน histological technique (Howard and Smith, 1983)



ภาพที่ 3 ภาพตัดขวางหอยลายที่ใช้ทางด้าน histological technique (Howard and Smith, 1983)

ตารางที่ 2 ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อหอยก่อน embedded ในพาราฟิน

สารเคมี	เวลา
1st 70 % ethanol	1 ชั่วโมง
1st 80% ethanol	1 ชั่วโมง
1st 95% ethanol	1 ชั่วโมง
2nd 95% ethanol 1 ชั่วโมง	1 ชั่วโมง
1st 100% ethanol	1 ชั่วโมง
2nd 100% ethanol	1 ชั่วโมง
3rd 100% ethanol	1 ชั่วโมง
½ 100% ethanol ½ Neo clear	1 ชั่วโมง
1st neo clear	1 ชั่วโมง
2 ndneo clear	1 ชั่วโมง
1st paraffin	1 ชั่วโมง
2nd paraffin	1 ชั่วโมง

4.3 นำเนื้อเยื่อหอยที่ผ่านกระบวนการตามตารางที่ 1 เรียบร้อยแล้วไปฝังในพาราฟิน

4.4 ตัดเนื้อเยื่อหอยด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 3-5 ไมโครเมตร เลือกเนื้อเยื่อไปลอยในน้ำอุ่นของเครื่อง water bath เพื่อให้พาราฟินยืดตัว นำสไลด์ที่ทาไข่ขาวแล้วไปช้อนเนื้อเยื่อ และอุ่นสไลด์ที่ได้บนเครื่อง slide warmer ที่ตั้งอุณหภูมิประมาณ 40 $^{\circ}$C

4.5 เก็บสไลด์ที่ได้ ใส่กล่องเพื่อนำมาเข้าวิธีการย้อมด้วยสี H&E

5. การตรวจสอบมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp.ด้วยวิธี ELISA, dot-blotting

5.1 วิธี indirectELISA

1) มอนอโคลนที่นำมาใช้ในการทดสอบ ได้แก่หมายเลข 1, 5, 7, 9, 12, 15, 17, 19, 20, 22, 22 และ 24

2) ตรึง *Polseni* ระยะ hypnospore ความเข้มข้น 8.00x10^5 cells/mL ใส่ในไมโครเพลท ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดฝาไมโครเพลท ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4ºC

3) ล้างด้วย 0.05% Tween 20 ใน PBS (PBST) 3 ครั้ง แล้วเติม 5% skim milk ใน PBST (300 ไมโครลิตรต่อหลุม) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4) ล้างด้วย PBST3 ครั้ง จากนั้นเติมมอนอโคลนอลแอนติบอดี (ความเข้มข้น 1:2 ใน PBS) ลงไปในหลุมไมโครเพลท มอนอโคลนอลทุกหมายเลขจะใส่ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แต่ละหลุม จะใส่ทั้งแบบเดี่ยว (หมายเลขเดียว) และ แบบผสม (สองหมายเลข) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5) ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง แล้วเติม GAM-HRP เจือจางใน PBS (1:10,000) หลุมละ 100 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6) ล้างด้วย PBST เติมสารละลายสับสเตรท Tetramethylbenzidine (TMB) 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

7) เติม 1 M H_2SO_4 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาว 450 nm โดยเทียบค่าการดูดกลืนแสงมอนอโคลนอลแอนติบอดี แบบเดี่ยวกับแบบผสม

5.2 วิธี dot-blotting

เพื่อนำมาใช้ประกอบการตัดสินใจเลือกหมายเลขของ มอนอโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการทดลองและเพื่อเป็นการทดสอบว่าหมายเลขมอนอโคลนอลชนิดนั้นๆยังสามารถจับกับแอนติเจนหรือไม่มอนอโคลนที่นำมาใช้ในการทดสอบ ได้แก่หมายเลข 1, 5, 7, 9, 12, 15, 17, 19, 20, 22, 22 และ 24

ตัวอย่างแอนติเจนที่นำมาทดสอบ ได้แก่

Perkinsus olseni ระยะ zoosporeความเข้มข้น 1.0 $x10^7$ cells/mL

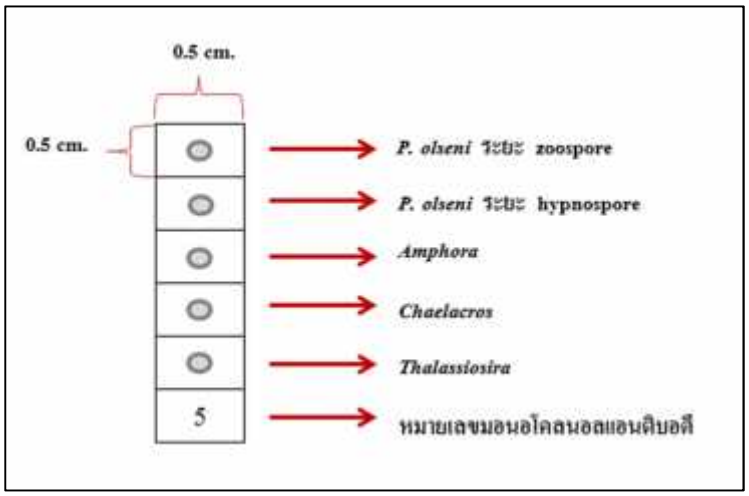
Perkinsus olseni ระยะ hypnosporeความเข้มข้น 8.8 $x10^7$ cells/mL

Amphora (diatom)ความเข้มข้น 2.3 $x10^6$ cells/mL

Chaelacros (diatom) ความเข้มข้น 3.7 $x10^6$ cells/mL

Thalassiosira (diatom) ความเข้มข้น 1.1 $x10^6$ cells/mL

1) หยด เชื้อ *P.* olseni ที่ fixed ด้วย formaldehyde ลงบนกระดาษ ไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อจุด (แบ่งกระดาษเป็นช่องละ 0.5 cm x 0.5 cm) ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การตัดกระดาษไนโตรเซลลูโลสและการหยดแอนติเจน

2) นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปอบที่ 37 ºC 10 นาที หรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง

3) นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปแช่ใน 5% skim milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4) ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง

5) ทำการเจือจาง Monoclonal Antibody 1:5 ใน PBS (โพลีโคลน 1:2,000) และเติมลงในเพลท ช่องละ 1.5 มิลลิลิตร

6) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ ค้างคืน

7) ทำการล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง

8) เติม GAM-HRP เจือจาง 1:3000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือที่ 4°C ข้ามคืน

9) ล้างGAM-HRP ออกด้วย PBST จำนวน 4 ครั้ง

10) จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรท ซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobezidine tetrahydrochoride (DAB), 0.03% hydrogenperoxide (H_2O_2), 1% $CoCl_2$ ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที (DAB 3 มิลลิกรัม , 30% 10 ไมโครลิตร, 1% $CoCl_2$ 25 ไมโครลิตร , PBS 10 ml)

11) ล้างน้ำกลั่นหลายๆครั้ง

12) การอ่านผล บริเวณที่แอนติบอดีจับกับเชื้อ *P.olseni* บนกระดาษจะมีลักษณะเป็นจุดสีดำ

6. การตรวจสอบปรสิตในเนื้อเยื่อหอยโดยวิธี อิมมูโนพยาธิวิทยา (สิริรัตน์ แก้วสลับนิล, 2554)

6.1 นำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้จากขั้นตอน 4 นำมาผ่านขบวนการ deparaffin ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ขั้นตอนการ deparaffin ก่อนนำมาย้อมตามวิธีอิมมูโนพยาธิวิทยา

สารเคมี	**เวลา**
Xylene 1	5 นาที
Xylene 2	5 นาที
Xylene 3	5 นาที
Xylene-Butanol	5 นาที
Butanol	5 นาที
95 % alcohol	5 นาที
90 % alcohol	5 นาที
80 % alcohol	5 นาที
70 % alcohol	5 นาที
DI 1	5 นาที
DI 2	5 นาที
PBS 1	5 นาที
PBS 2	5 นาที
PBS 3	5 นาที
PBS 4	5 นาที

6.2 ขั้นตอนการตรวจหา *Perkinsus* ในเนื้อเยื่อ โดยใช้แอนติบอดี

1) นำสไลด์แช่ที่ผ่านการแช่ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที

2) ดูดสารละลายรอบๆออก โดยไม่ทำให้เนื้อเยื่อแห้ง

3) หยด 10% FBS ให้คลุมบนเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

4) ดูดสารละลาย 10% FBS (โดยไม่ทำให้เนื้อเยื่อแห้ง)

5) หยดแอนติบอดี (Monoclonal antibody) ที่เจือจาง 1:5 ใน 10% FBS ลงบนเนื้อเยื่อ บ่มเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรือ ที่ 4 °C ข้ามคืน

6) จุ่มล้างสไลด์ด้วย PBS 4 ครั้งๆละ 10 นาที

7) หยด GAM-HRP เจือจาง 1:2000 ลงบนเนื้อเยื่อ บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือที่ $4^{\circ}C$ ข้ามคืน

8) จุ่มล้างสไลด์ด้วย PBS 4 ครั้งๆละ 10 นาที

9) จุ่มในสารละลายสับสเตรท ซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobezidine tetrahydrochoride (DAB) และ 0.03% hydrogenperoxide (H_2O_2) ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที (DAB 30 mg, 30% H_2O_2 50 ul, PBS 100 ml)

10) ย้อมสไลด์ด้วย Haematoxylin 5 นาที

11) ดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ 70%, 80%, 90% และ 95% ตามลำดับอย่างละ 5 นาที

12) ย้อมซ้ำด้วย eosin และล้าง eosin ส่วนเกินออกด้วยแอลกอฮอล์ 95%

13) นำสไลด์แช่ในbutanol, xylene –butanol, xylene 1, xylene 2 และ xylene 3 ตามลำดับ อย่างละ 5 นาที

14) ทำเป็นสไลด์ถาวร ด้วย permount ปิดทับด้วย cover glass และดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์บริเวณที่แอนติบอดีจับกับเชื้อ *Perkinsus* บนเนื้อเยื่อจะมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลเข้ม

ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างหอยลาย (*P. undulata*) จากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาครและสมุทรสงคราม จำนวนจังหวัดละ 30 ตัว ทุกเดือนและตัวอย่างหอยนางรม (*Saccostrea* spp.) จากสถานีวิจัยประมงศรีราชา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์จังหวัดชลบุรี จำนวน 30 ตัวทุกเดือน ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2560พบว่าหอยลายจากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาครและสมุทรสงครามมีขนาดและน้ำหนักเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 4 และขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของหอยนางรมจากจังหวัดชลบุรี ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของหอยลายจากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาครและสมุทรสงคราม

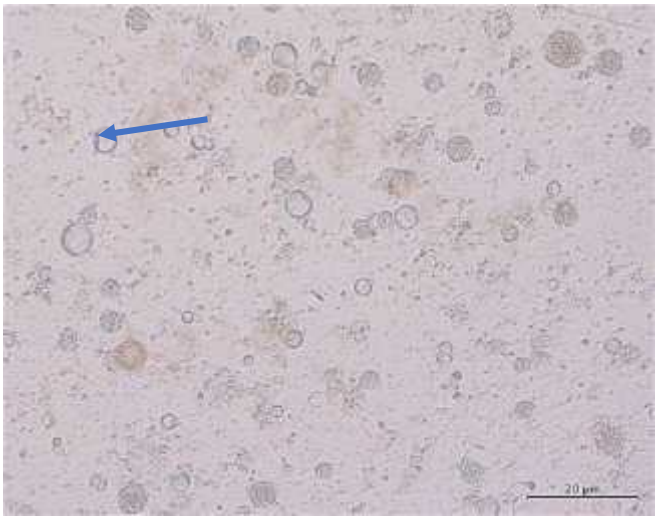
ขนาดและน้ำหนักของหอยลาย						
เดือน	**สถานี**					
	เพชรบุรี (mm.±SD)	**เพชรบุรี (g. ±SD)**	**สมุทรสาคร (mm.±SD)**	**สมุทรสาคร (g. ±SD)**	**สมุทรสงคราม (mm±SD)**	**สมุทรสงคราม (g. ±SD)**
มกราคม	4.15±0.27^{b}	7.56±1.48^{b}	5.14±0.37^{a}	15.37±3.37^{a}	3.92±0.11^{b}	6.57±0.70^{b}
กุมภาพันธ์	4.07±0.20^{b}	6.41±1.28^{b}	4.30±0.23^{a}	8.98±1.69^{a}	4.12±0.19^{b}	6.98±1.10^{b}
มีนาคม	4.06±0.15^{a}	6.11±1.06^{a}	3.87±0.22^{b}	5.08±0.96^{b}	4.09±0.19^{a}	6.35±1.22^{a}
เมษายน	4.49±0.20^{a}	8.32±1.55^{a}	4.38±0.18^{b}	7.36±1.33^{b}	NA	NA
พฤษภาคม	4.62±0.14^{a}	10.02±1.66^{a}	4.65±0.25^{a}	10.21±2.16^{a}	3.87±0.22^{b}	4.88±1.46^{b}
มิถุนายน	4.04±0.16^{a}	6.59±0.89^{a}	3.91±0.24^{b}	5.09±0.85^{b}	3.63±0.20^{c}	4.68±1.05^{b}
กรกฎาคม	1.50±0.20^{a}	6.93±1.09^{a}	1.54±0.15^{a}	6.58±0.92^{a}	1.26±0.25^{b}	5.18±1.04^{b}
สิงหาคม	4.33±0.22^{a}	8.32±1.04^{a}	3.45±0.20^{b}	4.43±1.02^{b}	NA	NA
เฉลี่ย	**3.91±0.95**	**7.53±0.95**	**3.90±1.04**	**7.89±1.04**	**3.48±1.03**	**5.77±1.03**

ตารางที่ 5 ขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของหอยนางรมจากจังหวัดชลบุรี

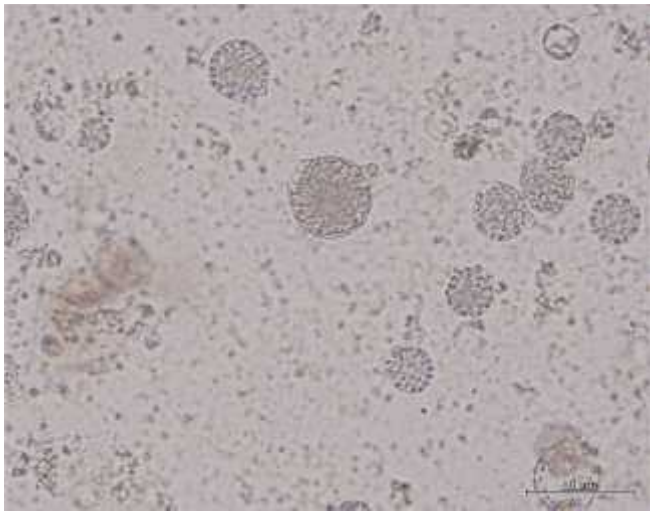
ขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยในหอยนางรม		
เดือน	**ขนาด (mm.±SD)**	**น้ำหนัก (g..±SD)**
มกราคม	4.44±0.69^{c}	30.11±13.78^{a}
กุมภาพันธ์	3.70±0.81^{c}	27.44±12.30^{ab}
มีนาคม	3.41±0.36^{c}	19.87±6.87^{cd}
เมษายน	3.40±0.43^{c}	20.06±6.66^{cd}
พฤษภาคม	3.35±0.49^{c}	25.87±8.48^{ab}
มิถุนายน	35.58±5.80^{a}	24.57±9.09^{bc}
กรกฎาคม	31.14±3.56^{b}	19.27±6.31^{d}
เฉลี่ย	**10.35±12.59**	**24.97±11.06**

2. การเตรียมเชื้อปรสิตระยะ hypnospore และ zoospore ของปรสิต *Perkinsus* sp. จากหอยลาย

เมื่อนำเนื้อเยื่อหอยส่วนเหงือกมาบ่มในอาหาร FTM เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อมาส่องใต้กล้อง เมื่อพบปรสิตจึงนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง ก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ Trypsin 0.2% ในน้ำทะเลเทียมปลอดเชื้อ (SM 30) 3 ช.ม. แล้วจึงนำมาล้างให้สะอาดด้วย SM 30ปลอดเชื้อด้วยการปั่นเหวี่ยง ทำการเก็บ hypnospore บางส่วน ที่เหลือนำไปเลี้ยงใน SM 30 ปลอดเชื้อ ในจานทดลอง เพื่อให้ hypnospore แบ่งเซลล์จนได้ ระยะ zoospore ก่อนทำการเก็บรวบรวมด้วยการปั่นเหวี่ยงต่อไป (ภาพที่ 5-6)



ภาพที่ 5 ปรสิต *Perkinsus* sp. ระยะ hypnospore เลี้ยงในน้ำทะเลเทียมปลอดเชื้อ (SM 30)



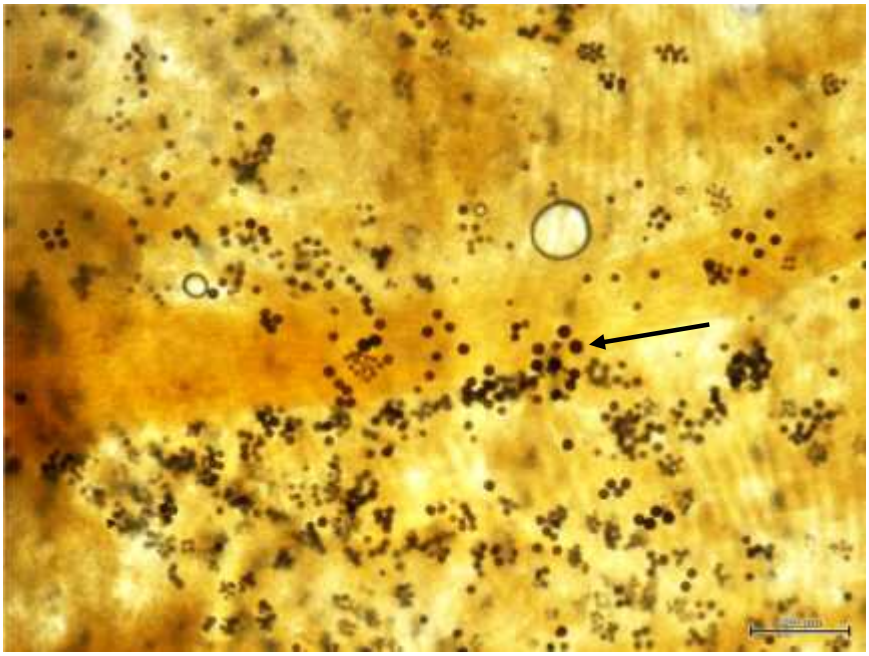
ภาพที่ 6 ปรสิต *Perkinsus* sp. ขณะเกิดกระบวนการ Zoosporulation จนได้ ปรสิตระยะ Zoospore

3. การตรวจหาปรสิต *Perkinsus* sp. โดยวิธีการตรวจนับเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FTM

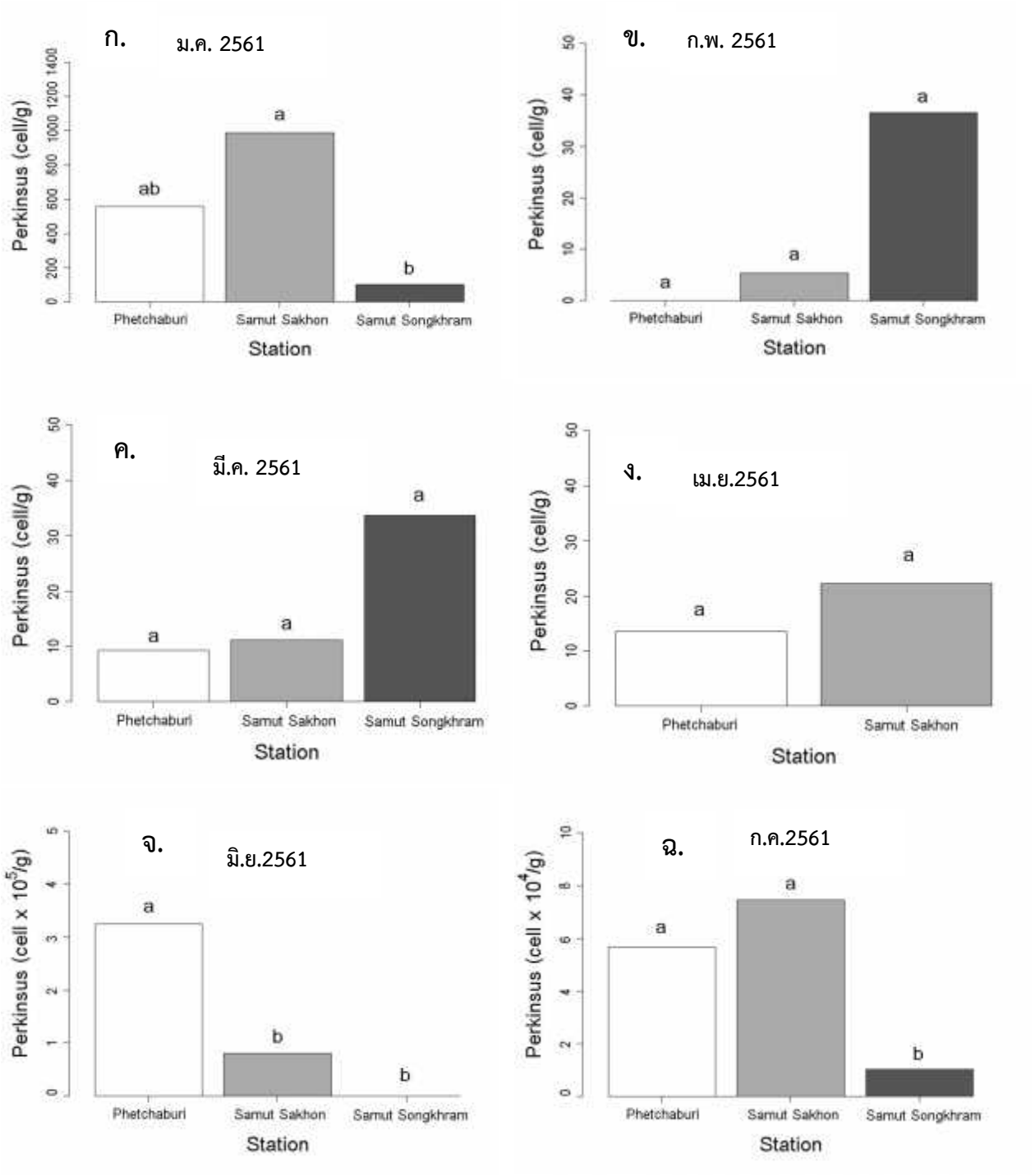
จากการนำเนื้อเยื่อหอยลายและหอยนางรมมาบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ FTM ก่อนนำมาย่อยและล้างให้สะอาด เพื่อนำมานับหาปริมาณปรสิต *Perkinsus* sp. พบปริมาณปรสิตในหอยลายดังแสดงในตารางที่ 6 ภาพที่ 7 และ 8 ส่วนในหอยนางรมที่เก็บจากจังหวัดชลบุรีไม่พบปรสิต *Perkinsus* sp.

ตารางที่ 6 ปริมาณปรสิต *Perkinsus* sp. ในหอยลายจากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาครและสมุทรสงคราม ระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ.2560 ($\bar{X}$±SE)

ปริมาณ *Perkinsus* sp. ในหอยลาย (cell/g)(N=30)			
เดือน	**สถานี**		
	เพชรบุรี	**สมุทรสาคร**	**สมุทรสงคราม**
มกราคม	555.82±324.06^{ab}	985.98±1,660.64^{a}	100.57±46.38^{b}
กุมภาพันธ์	0^{a}	5.30±3.74^{a}	36.53±36.53^{a}
มีนาคม	9.29±5.55^{a}	11.18±8.10^{a}	33.68±21.60^{a}
เมษายน	13.48±13.48^{a}	22.22±22.22^{a}	NA
พฤษภาคม	0	0	0
มิถุนายน	324,923.74,967.41^{a}	80,957.92±36,379.81^{b}	0^{b}
กรกฎาคม	56,708.41±11,663.18^{a}	74,576.99±10,439.64^{a}	10,328.95±5,327.76^{b}



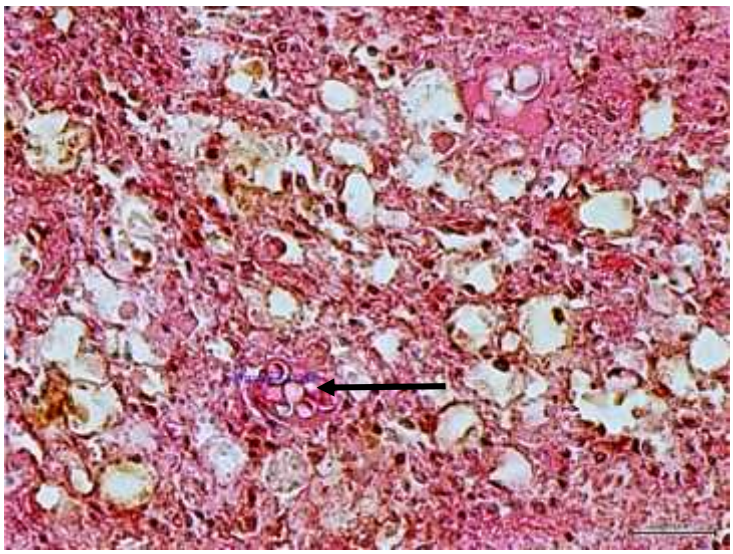
ภาพที่ 7 ปรสิต *Perkinsus* sp. ในเนื้อเยื่อส่วนเหงือกของหอยลายที่ย้อมด้วย Lugol's iodine ก่อนนำไปย่อยด้วย NaOH เพื่อนับจำนวน (ลูกศรชี้)



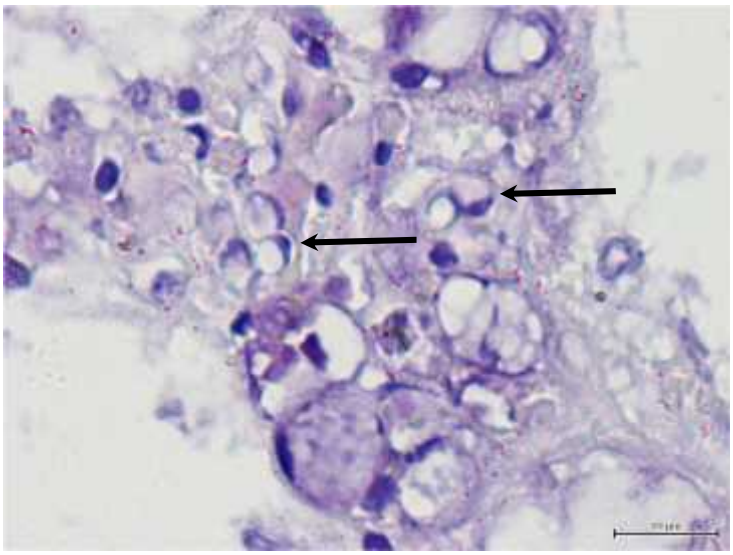
ภาพที่ 8 กราฟแสดงปริมาณปรสิต *Perkinsus* sp. ในหอยลายแต่ละจังหวัดตั้งแต่เดือน มกราคม ถึงเดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561 **ก**. เดือนมกราคม **ข**. เดือนกุมภาพันธ์ **ค**. เดือนมีนาคม **ง**. เดือนเมษายน **จ**. เดือนมิถุนายน และ **ฉ**. เดือนกรกฎาคม

4. การตรวจหาปรสิตในเนื้อเยื่อหอยโดยวิธี Histology

จากการตรวจหาปรสิต *Perkinsus* sp. ในเนื้อเยื่อหอยลายและหอยนางรม ด้วยเทคนิคทางด้าน histology แล้วนำเนื้อเยื่อมาย้อมด้วยสี H&E พบปรสิตระยะโทรโฟซอยด์ในเนื้อเยื่อหอยลายมีขนาดประมาณ 3-6 μm. ดังแสดงในภาพที่ 9 และ 10



ภาพที่ 9 ปรสิต *Perkinsus* sp. ระยะ trophozoites ในเนื้อเยื่อหอยลาย ย้อมด้วยสี H&E (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 10 ปรสิต *Perkinsus* sp. ระยะtrophozoites ในเนื้อเยื่อหอยลาย ย้อมด้วยสี H&E (ลูกศรชี้)

5. การตรวจสอบมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ด้วยวิธี ELISA, dot-blotting

5.1 ผลการทดสอบมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนด้วยเทคนิค indirectELISA

การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาและนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีมอนอโคลนอลแอนติบอดีมาทดสอบว่ายังคงมีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับ0*Perkinsus*0sp.หรือไม่0รวมทั้งการหาอิพิโทปเพื่อที่จะทำการคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในวิธีอิมมูโนพยาธิวิทยา โดยวิธี indirect ELISA จาก

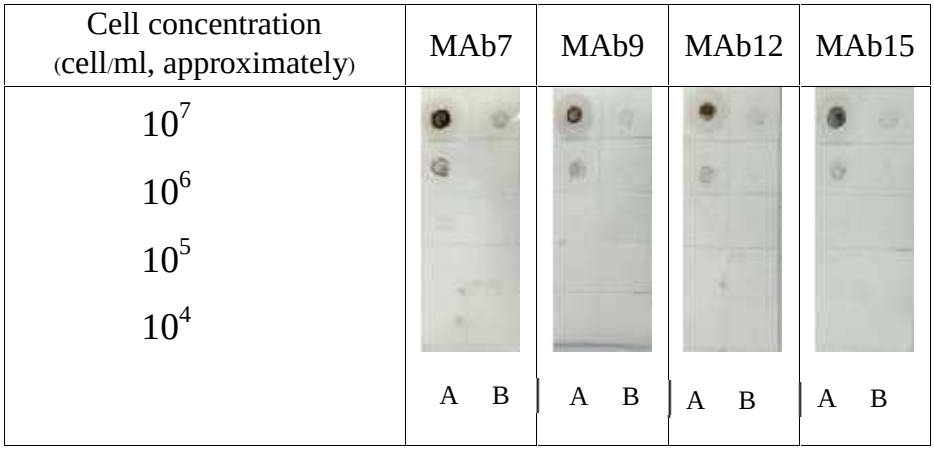
รายงานวิจัยของ สิริรัตน์ แก้วสลับนิล (2554) ที่ได้ทำการทดลองเพื่อผลิตและทดสอบประสิทธิภาพของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยการย้อมเนื้อเยื่อ ผลที่ได้คือ มอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7,12 และ 20 เป็นมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพ ในการจับกับปรสิต *Perkinsus* sp. เมื่อนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7, 12 และ 20 มาทดสอบอีกครั้ง พบว่า มอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 12 ไม่ทำปฏิกิริยากับปรสิต *Perkinsus* sp. โดยวิธีการ indirect ELISA ซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.4 ดังนั้น การทดลองต่อไปจึงใช้เฉพาะมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 070 และ 0200 เท่านั้น

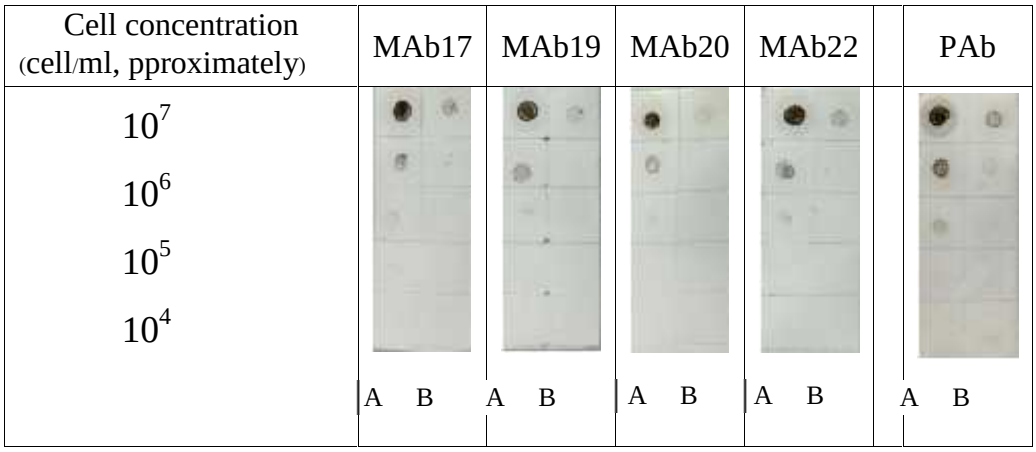
ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงของมอนอโคลนอลแอนติบอดีแต่ละตัวและคู่โคลน

มอนอโคลนอลแอนติบอดี (เจือจาง 1:2)	**ค่าการดูดกลืนแสง (ความยาวคลื่น 450 nm)**
7	1.5752
12	0.1603
20	2.2675

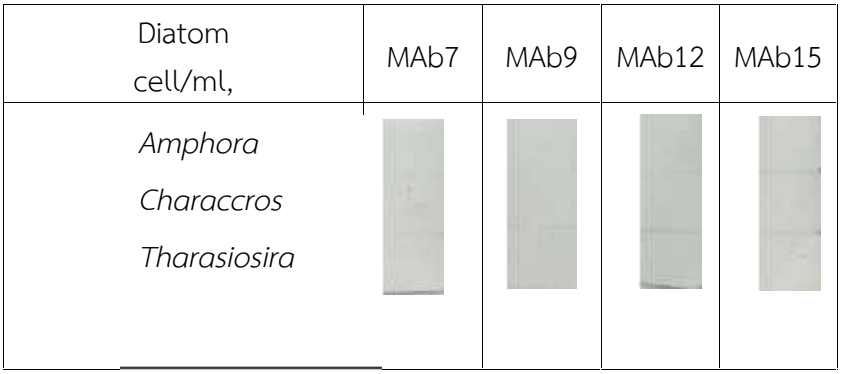
5.2 ผลการทดสอบมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนด้วยเทคนิค dot blotting

เนื่องจากมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อปรสิตที่ได้ทั้งหมด 8 โคลน คือ MAb N0. 7,9,12,15,17,19, 20 และ 22 (สิริรัตน์ แก้วสลับนิล, 2557) ได้มาจากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยปรสิต *P. olseni* ระยะ hypnospore โดยการหาความไวของ MAb พิจารณาจากความเข้มข้นโดยประมาณของเซลล์ที่น้อยที่สุด ที่ยังสามารถเห็นความเข้มสีของจุดเป็นสีเทา ซึ่งเกิดการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน พบว่า MAb ที่ได้จับกับระยะ hypnospore อยู่ในช่วงความไวโดยประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และยังจับกับปรสิตระยะ zoospore อยู่ในช่วงความไวโดยประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclanal antibody; PAb) สามารถจับกับปรสิตระยะ hypnospore และระยะ zoospore อยู่ในช่วงความไวโดยประมาณ 10^5 และ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 10) นอกจากนี้ได้นำ MAb ที่ได้ทดสอบความจำเพาะกับไดอะตอม (*Amphora, Characcros* และ *Tharasiosira)* พบว่า ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับไดอะตอมที่นำมาทดสอบ ยกเว้น MAb19 และ 22 ที่จับกับไดอะตอมอย่างอ่อน ซึ่งปรากฏจุดสีเทาอ่อนบนกระดาษเมมเบรน ในลักษณะเช่นเดียวกับเมื่อบ่มด้วย PAb (ภาพที่ 11) นั่นแสดงว่า MAb ต่อปรสิตที่ได้มีความจำเพาะต่อปรสิตระยะ hypnospore และสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามได้กับระยะ zoospore





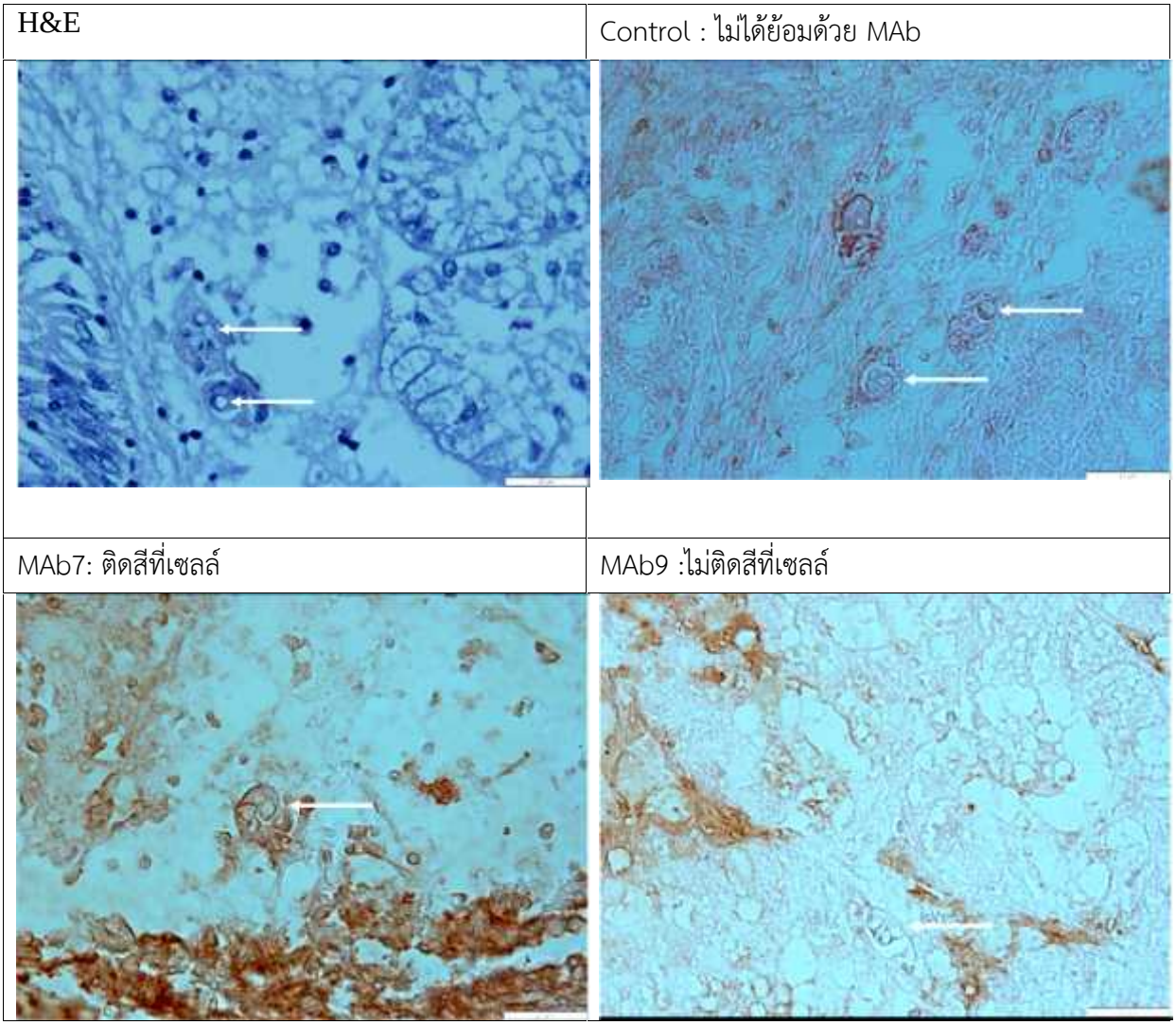
ภาพที่ 11 ผลการทดสอบความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดเชื้อปรสิตในระยะ hypnospore (A) และ zoospore (B) ที่ความเข้มข้นเซลล์ต่างๆ ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด และบ่มในมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้



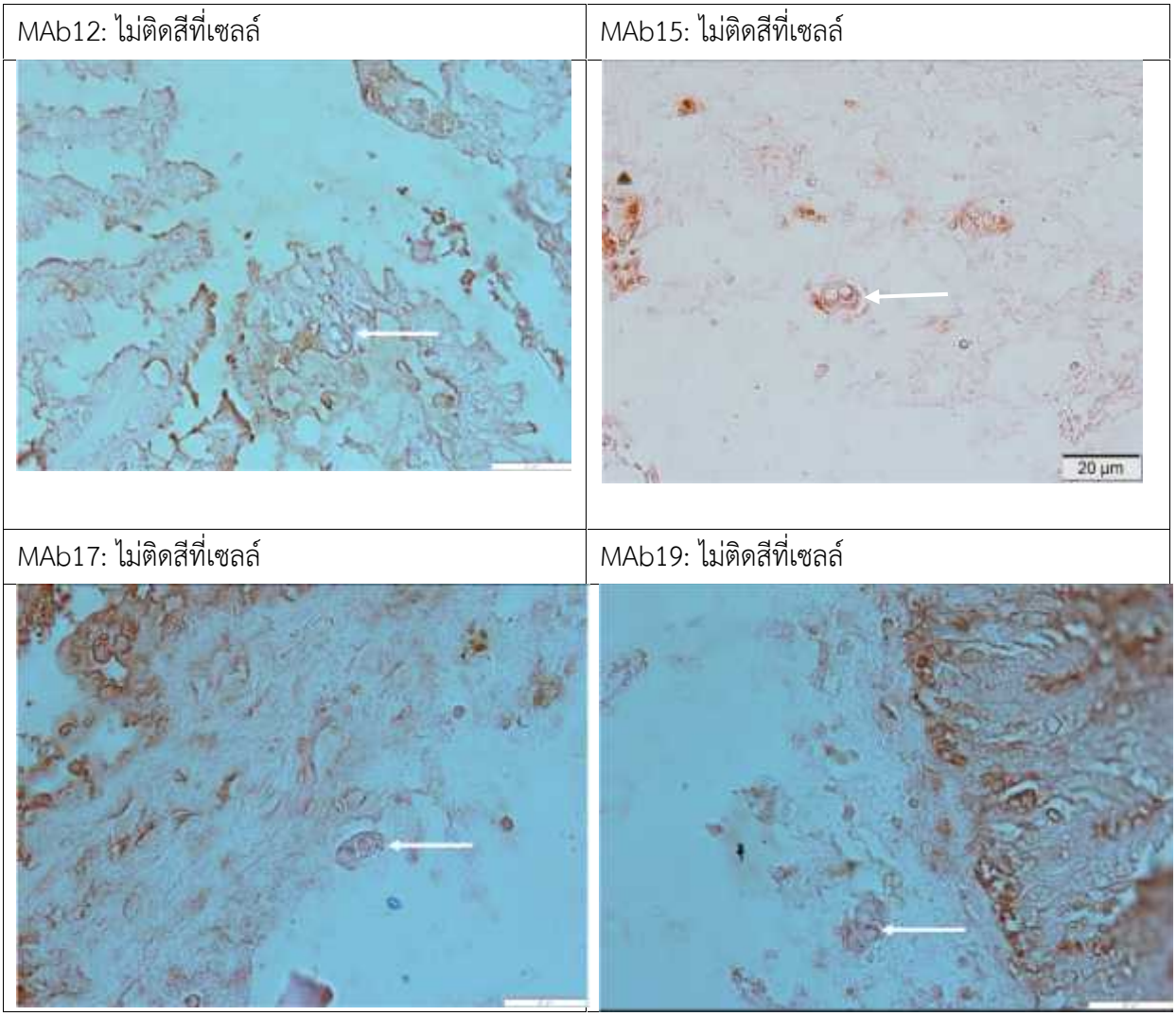
ภาพที่ 12 ผลการทดสอบความจำเพาะของมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับไดอะตอม ที่ความเข้มข้นโดยประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี dot blotting หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 1 ไมโครลิตรต่อจุด และบ่มในมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

5.3 **ผลการตรวจสอบปรสิตในเนื้อเยื่อหอยโดยวิธี อิมมูโนพยาธิวิทยา**

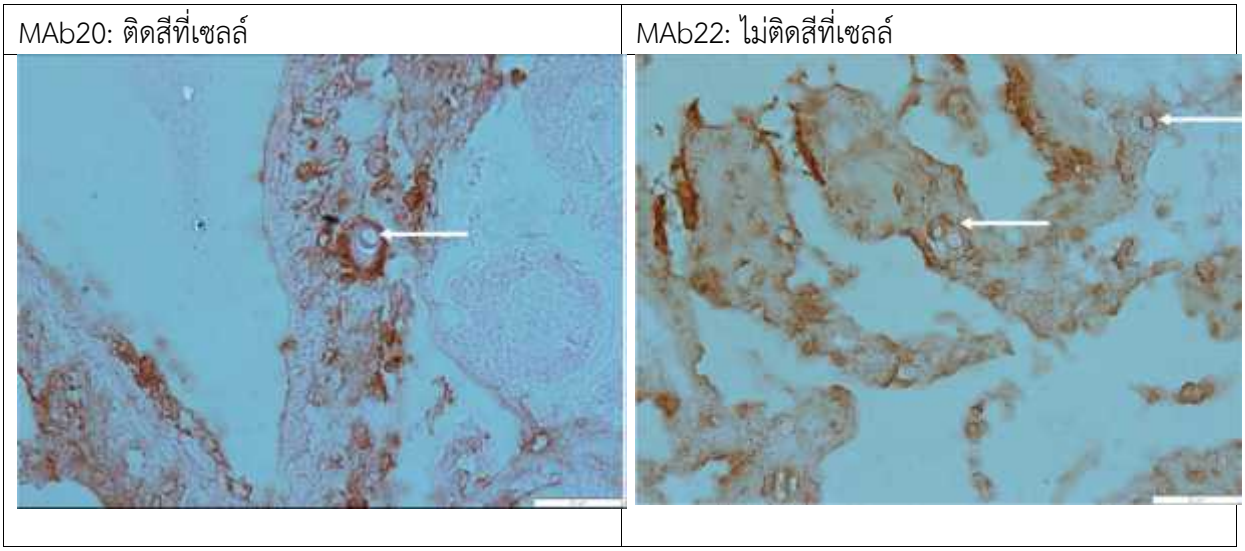
เพื่อการคัดเลือกว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โคลนใด ที่มีความสามารถในการจับกับปรสิตเนื้อเยื่อได้หรือไม่ จึงได้ทำการตรวจหาปรสิตในหอยลายโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี ในเบื้องต้นจากเนื้อเยื่อหอยลายจำนวน 10 ตัว ที่ได้พิสูจน์แล้วว่ามีการติดเชื้อปรสิต โดยพิจารณาการติดสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการจับกันระหว่างมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับเซลล์ปรสิต โดยในการทดลองได้เปรียบเทียบการย้อมเนื้อเยื่อด้วย H&E, ไม่ได้ย้อมด้วย MAb และย้อมด้วย MAb แต่ละโคลน และนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าเมื่อใช้ MAb 7 และ 20 มีการย้อมติดสีน้ำตาล ที่ปรสิตระยะ trophozoites บริเวณขอบผนังเซลล์ แสดงว่า MAb 7 และ 20 มีความสามารถในการจับกับปริสิตในเนื้อเยื่อหอยลายได้ ในขณะที่ MAb22 มีการย้อมติดสีน้ำตาลเช่นกัน แต่มีความเข้มของสีพื้นหลังสูง ซึ่งจะทำให้ยากต่อการแปลผล ส่วน Mab9, 12, 15, 17 และ 19 ไม่มีการย้อมติดสีน้ำตาลที่ปรสิตในเนื้อเยื่อหอยลาย (ภาพที่ 13-15) ดังนั้นจึงคัดเลือก MAb7 และ 20 เป็นมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มีความสามารถในการตรวจหาปรสิตโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี เพื่อใช้ต่อไป



ภาพที่ 13 ผลตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี โดยการย้อมเนื้อเยื่อด้วย H&E, ไม่ได้ย้อมด้วย MAb และย้อมด้วย MAb โคลนหมายเลข 7 และ 9 ระยะ trophozoites (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 14 ผลตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี โดยการย้อมเนื้อเยื่อด้วย MAb หมายเลข 12, 15, 17 และ 19 ระยะ trophozoites (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 15 ผลตรวจหาเชื้อปรสิต *P. olseni* ด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี โดยการย้อมเนื้อเยื่อด้วย MAb หมายเลข 20 และ 22 ระยะ trophozoites (ลูกศรชี้)

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

โรค Perkinsosis เป็นโรคที่เกิดจากโปรโตซัวสกุล *Perkinsus* ที่มีรายงานการแพร่ระบาดมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 ในหอยนางรม (eastern oyster, *Crassostrea virginica*) ในประเทศสหรัฐอเมริกาจากนั้นมีรายงานการพบปรสิต *Perkinsus* ในหอยชนิดต่างๆ จาก 20 ประเทศทั่วโลก ซึ่งปรสิต *Perkinsus* นี้จะส่งผลกระทบทำให้อัตรารอดของหอยที่เลี้ยงลดลงหรืออาจทำให้หอยตายได้ จากการศึกษาของ Waki และคณะ (2018) พบว่าหอย Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) จากธรรมชาติ บริเวณอ่าวอริเกะ ประเทศญี่ปุ่นมีจำนวนลดลงจากการติดเชื้อ *P. olseni* สำหรับในประเทศไทยนั้นมีรายงานการพบปรสิต *Perkinsus olseni* ในหอยลาย (Leethochavalit et al., 2004) และหอยนางรม (Taveekijakarn et al., 2008) การตรวจวินิจฉัยปรสิตชนิดนี้เริ่มแรกใช้วิธีนำเนื้อหอยที่คาดว่าจะติดเชื้อไปบ่มในอาหาร Fluid thioglycollate mediumเพื่อให้ปรสิตระยะ trophozoite มีขนาดใหญ่ขึ้นและผนังหนาขึ้น (Ray, 1966) เกิดเป็นระยะใหม่ที่เรียกว่า hypnospore ซึ่งการวินิจฉัยด้วยวิธีนี้สามารถใช้ได้กับปรสิต*Perkinsus* ทุกชนิดยกเว้น *P. Qugwadi* (Blackbourn et al. 1998) การวินิจฉัยด้วยวิธี RFTM นี้เหมาะสำหรับการเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดซึ่งวิธีนี้ได้มีการพัฒนามาเป็นระยะเพื่อให้สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยปรสิต *Perkinsus* ชนิดต่างๆ (Choi et al. 1989; McLaughlin and Faisal 1999; Oliveret al. 1998) แต่อย่างไรก็ตาม Novoa et al. (2002) ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีน SSU rRNA จาก hypnospores ที่ได้จากการบ่มเพาะของเหงือกหอยนางรมในอาหาร FTM และพบว่า วิธี RFTM นี้จะไม่มีความจำเพาะต่อสมาชิกของปรสิต *Perkinsus* และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่เหมือน *Perkinsus* (*Pseudoperkinsus tapetis, Mesomycetozoa*) เนื่องจากอาหารนี้สามารถทำให้ hypnospores ขยายใหญ่ขึ้นได้ เมื่อนำไปบ่มใน FTM จากผลการตรวจหาปรสิต *Perkinsus* sp. จากงานวิจัยนี้ทั้งในดินตะกอน หอยลาย (*P.undulata*) และหอยนางรม (*Saccostrea* sp.) ด้วยวิธี RFTM พบปรสิตในหอยลายจากจังหวัดเพชรบุรี ในเดือนมิถุนายนมากที่สุด ทั้งนี้จากรายงานของ Leethochavalit และคณะ (2004) พบปรสิต *Perkinsus*ในหอยลายเดือนตุลาคมมากที่สุด แต่จากการทดลองนี้ไม่พบปรสิตในหอยนางรมที่เก็บในระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือนกรกฎาคม 2560 ซึ่งขัดแย้งกับผลของTaveekijakarn และคณะ (2008) ที่รายงานการพบปรสิต *Perkinsus* sp. ในหอยนางรม (*Saccostrea forskali*) จากการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี ในเดือนพฤศจิกายน 2004

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาเมื่อเทคโนโลยีทันสมัยขึ้น ได้มีการพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยทางด้านภูมิคุ้มกันและทางด้านโมเลกุลขึ้นเพื่อใช้เป็นทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากการทดสอบด้วยวิธี RFTM เช่น Choi และคณะ (1991) พัฒนา polyclonal antibody ต่อ hypnospores ของ *P. marinus* ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับระยะปรสิตอื่น ๆ ซึ่งชี้ให้เห็นการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของแอนติเจนของเมมเบรนปรสิตในช่วงที่ผนังเซลล์ของhypnospore เจริญเต็มที่ เช่นเดียวกับ Dungan และ Robertson (1993) ได้ผลคล้ายกันกับ Choi และคณะ แต่เป็นผลจากmonoclonal antibodiesในทางตรงข้าม Bushek และคณะ (2002) ได้พัฒนา polyclonal antibody ที่สามารถยึดจับกับเซลล์ของปรสิต *P. Marinus* ได้ทุกระยะ อีกทั้งยังสามารถจำแนกชนิดของอนุภาคในเนื้อเยื่อของหอยที่ถูกล้อมรอบด้วย focal lesion อีกด้วย นอกจากนี้ แอนติบอดีเหล่านี้ยังตรวจสอบ *P. olseni / P atlanticus* และ *Perkinsus* sp อื่นๆ ได้หลายชนิด แต่ไม่สามารถใช้ได้กับ *Dermocystidium* บางสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามแอนติบอดีเหล่านี้มีการแสดงให้เห็นว่ามีปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์กับ dinoflagellate หลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งปรสิตที่เป็น dinoflagellates หลายชนิด นอกจากนี้ Montes และคณะ (2002) ได้ใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วย ELISA โดยใช้ polyclonal antibody ต่อ extracellular

products ของ *P. marinus* ที่ผลิตขึ้นในหลอดทดลองและพบว่าวิธีนี้ให้ผลที่ไวกว่าวิธี RFTM ทั้งนี้จากการทดลองการประเมินเทคนิคการตรวจวินิจฉัยปรสิต *Perkinsus* sp. ในหอยลาย (*P. undulata*) และหอยนางรม (*Saccostrea* sp.) ด้วยมอนอโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งผลิตจากการนำ hypnospores และ zoospores ไปฉีดในหนูและนำมาทำการผสม จนได้เป็นแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ จำนวน 8 clone นำมาทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อปรสิตและไดอะตอมชนิดต่างๆ ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม แต่จะเกิดปฏิกิริยาต่อปรสิตระยะฮิปโนสปอร์และซูโอสปอร์ ซึ่งเชื้อปรสิต *Perkinsus* spp. ที่แพร่ระบาดในหอย มีหลายระยะทั้งที่เป็นระยะโทรโฟซอยด์ พบในเนื้อหอย ระยะที่เป็น ฮิปโนสปอร์ ซึ่งเป็นระยะเต็มวัย ก่อนแบ่งเซลล์ได้เป็นซูโอสปอร์ (Choi et al., 1991) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ คณะผู้วิจัยได้ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. olseni* มาแล้ว (สิริรัตน์ แก้วสลับนิล, 2557) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้นำแอนติบอดีที่ได้มาเพื่อนำมาทดสอบโดยเทคนิค indirect ELISA และ เทคนิค dot blotting หาโคลนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด จนพบว่า โคลน 7 และ 20 ให้ประสิทธิภาพดีที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Romestand และคณะ (2001) ที่ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีจาก *P. marinus* และมีความจำเพาะต่อโทรโฟซอยด์ ฮิปโนสปอร์ และ ซูโอสปอร์ จำนวน 2 โคลน เมื่อได้โคลนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดแล้วจึงนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีมาทดสอบกับเนื้อเยื่อหอยที่ได้จากกระบวนการมิญชวิทยาและทดสอบกับปรสิตตัวเต็มวัย ที่แยกออกมาจากเนื้อเยื่อ ทำให้บริเวณผิวของเซลล์ปรสิตระยะโทรโฟซอยด์และ ฮิปโนสปอร์ เป็นสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากการจับของ MAbs กับผนังเซลล์ปรสิต แต่จากรายงานของ Dungan และ Roberson (1993) พบว่ามอนอโคลนอลที่ผลิตได้จะจับกับอิพิโทปของอิปโนสปอร์ของปรสิต *P. marinus* เท่านั้น จากรายงานของ Maenoและคณะ (1999) พบว่าการตรวจวิเคราะห์ทางด้านimmunohistochemical โดยใช้ antiserum กับปรสิต *P. marinus* แอนติบอดีนั้นจะมีปฏิกิริยากับ trophozoites ของปรสิตที่พบเป็นเซลล์เดี่ยวและที่อยู่กันเป็นกลุ่ม ผลการทดลองสรุปได้ว่าปรสิตเหล่านี้อยู่ในสกุล *Perkinsus* แม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ trophozoites และ prezoosporangia จะแตกต่างออกไปจากรายงานที่พบในอดีต เช่นเดียวกับรายงานของ Park และคณะ (2010) ที่พบว่า antibody จาก rabbit anti-*P. olseni* IgG จะมีความจำเพาะต่อปรสิตทุกระยะทั้ง prezoosporangium trophozoite และ zoospore

ปี ค.ศ. 2003 Calvo และคณะ ได้ใช้เทคนิค antibody-label ในการนับเซลล์ *P. Marinus* ในหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) จากรายงานของ Earnhart และคณะ (2005) พบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากปรสิต *P. marinus* จะจับกับผนังเซลล์ของโทรโฟซอยด์และโทมอนท์ นอกจากนี้ยังกล่าวว่าแอนติบอดียังสามารถใช้ในการสำรวจการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผนังเซลล์ปรสิตระหว่างการเลี้ยงในอาหาร FTM และยังระบุว่าแอนติบอดีสามารถใช้ตรวจหาลักษณะเฉพาะเจาะจงของปรสิต *P. marinus* ในเนื้อเยื่อหอยที่แช่ในน้ำยาดองได้ จากงานวิจัยนี้พบว่าเทคนิคการตรวจหาปรสิตด้วยมอนอโคลนอลแอนติบอดีนี้สามารถตรวจพบปรสิต *P. olseni* ระยะโทรโฟซอยด์ และฮิปโนสปอร์ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Romestand และคณะ (2001) ได้รายงานว่า วิธีการใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีตรวจหาปรสิต *P. marinus* มีความไวและจำเพาะพอที่จะตรวจพบปรสิตระยะโทรโฟซอยด์ได้ และจากการรายงานของ Wang และคณะ (2009) รายงานการใช้ Antibody-functionalized, Au-gated AlGaN/GaN high electron mobility transistors (HEMTs) ในการตรวจหาปรสิต *Perkinsus*ในน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงหอยมือเสือ (*Tridacna crocea*) และสรุปว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่เร็วสำหรับการตรวจหาปรสิต *P. marinus* ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงเพียงผลการทดสอบของแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. olseni* ที่ผลิตได้หลายโคลนเพื่อหาประสิทธิภาพของโคลนเหล่านั้น ซึ่งจะนำไปสู่การนำโคลนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการตรวจวินิจฉัยปรสิตไปทำบริสุทธิ์เพื่อหาแนวทางการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ทวีศักดิ์ จึงวัฒนตระกูล. (2554). การประยุกต์ใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีและชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยวในงานเภสัชเวท. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน, 7*, 1-13.

สิริรัตน์ แก้วสลับนิล. (2557). การผลิตและลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Perkinsus olseni* ในหอยลาย *Paphia undulata*. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

หทัยทิพย์ สุขสดใส. (2551). การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ Aeromonas caviae. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ.

อุดม ติ่งต้อย. (2554). Monoclonal antisera for blood group serology. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต, 21*, 103-112.

Almeida, M., Berthe, F., Thébault, A., & Dinis, M. T. (1999). Whole clamculture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture, 177*, 325-332.

Azevedo, C. (1989). Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *Journal of Parasitology, 75*, 627-635.

Blackbourn, J., Bower, S. M., & Meyer, G. R. (1998). *Perkinsus qugwadi* sp.nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanesescallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *CanadianJournal of Zoology, 76*, 942-953.

Booth, B. C. (1993). Estimating cell concentration and biomass of autotrophic plankton using microscopy. In: Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Kemp, P.F., Sherr,B.F., Sherr,E.B. and Cole, J.J. (eds.), Lewis Publish, Boca Raton. pp. 199-205.

Bushek, D., Dungan, C. F., & Lewitus, A. J. (2002). Serological affinitiesof the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) withsome dinoflagellates (Dinophyceae). *Journal of EukaryoticMicrobiology, 49*, 11-16.

Cáceres-Martínez, J., Madero-López, L. H., Padilla-Lardizábal, G., & Vásquez-Yeomans, R. (2016). Epizootiology of Perkinsus marinus, parasite of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis*, in the Pacific coast of Mexico. *Journal of Invertebrate Pathology, 139*, 12–18.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., & Pruzzo, C. (2002). Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis inmarine bivalves. *Microscopy Research and Technique, 57*, 469-476.

Carrasco, N., Rojas, M., Aceituno, P., Andree, K. B., Lacuesta, B., & Furones, M. D. (2014). *Perkinsus chesapeaki* observed in a new host, the European common edible cockle *Cerastoderma edule*, in the Spanish Mediterranean coast. *Journal of Invertebrate Pathology, 117*, 56–60.

Casas, S. M., Villalba, A., & Reece, K. S. (2002). Study of perkinsosis inthe carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I.Identification of the aetiological agent and in vitro modulation ofzoosporulation by temperature and salinity. *Diseases of AquaticOrganisms, 50*, 51-65.

Calvo, L. M. R., Dungan, C. F., Roberson, B. S., & Burreson, E. M. (2003). Systematic evaluation of factors controlling Perkinsus marinus transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms, 56*, 75-86.

Cheng, T. C. (1996). Hemocytes: Forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Eds.), The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, College Park, MD, USA, pp. 299-333.

Chitari, R. R., & Anil, A. C. (2017). Estimation of diatom and dinoflagellate cell volumes from surface waters of the Northern Indian Ocean. *Oceanologia, 59*, 389-395.

Choi, K. S., Wilson, E. A., Lewis, D. H., Powell, E. N., & Ray, S. M. (1989). The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. *Journal of Shellfish Research, 8*, 125-131.

Choi, K. S., Lewis, D. H., Powell, E. N., Frelier, P. F., & Ray, S. M. (1991). A polyclonal antibody developed from *Perkinsus marinus* hypnospores fails to cross react with other life stages of *P. marinus*in oyster (*Crassostrea virginica*) tissues. Journal of Shellfish Research. 10: 411-415.

Choi, K. S., Park, K. I., Lee, K. W., & Matsuoka, K. (2002). Infection intensity, prevalence and histopathology of *Perkinsus* sp. in theManila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Isahaya Bay, Japan. *Journal ofShellfish Research, 21*, 119-125.

Chu, F. L. E. (1996). Laboratory investigations of susceptibility, infectivity and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *Journal ofShellfish Research, 15*, 57-66.

Chu, F. L. E. (2000). Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R.(Eds.), Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and Pathology. Sciencepublishers, Inc., Enfield (NH), USA; Plymouth, UK, pp. 1-42.

Dungan, C. F., & Robertson, B. S. (1993). Binding specificities of monoand polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen*Perkinsus marinus*. Diseases of Aquatic Organisms, 15, 9-22.

Earnhart, C. G., Gauthier, D. T., Vogelbein, W. K., & Kaattari, S. L. (2005). Monoclonal antibody analysis of Perkinsus marinus extracellular products. *International journal for parasitology, 35*, 171-184.

Earnhart, C. G., Vogelbein, M. A., Brown, G. D., Reece, K. S., & Kaattari, S. L. (2004). Supplementation of Perkinsus marinus cultures with host plasmaor tissue homogenate enhances their infectivity. *Applied and Environmental Microbiology, 70*, 421–431

Elandaloussi, L. M. (2009). First record of *Perkinsus olseni*, a protozoan parasite infecting the commercial clam *Ruditapes decussatus* in Spanish Mediterranean waters. *Journal of Invertebrate Pathology, 100*, 50–53.

Fisher, W. S., & Oliver, L. M. (1996). A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycolate culture medium. *Journal ofShellfish Research, 15*, 109-117.

Ford, S. E., Chintala, M. M., & Bushek, D. (2002). Comparison of in vitrocultured and wild-type *Perkinsus marinus*. I. Pathogen virulence.Diseases ofAquaticOrganisms, 51, 187-201.

Goggin, C. L., & Barker, S. C. (1993). Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomalRNA. *Molecular* and *Biochemical Parasitology*, 60, 65-70.

Goggin, C. L., & Lester, R. J. G. (1995). *Perkinsus*, a protistan parasite ofabalone in Australia: a review. Marine and Freshwater Research.46: 639-646.

Hine, P. M. (1999). The inter-relationships of bivalve haemocytes. Fish and Shellfish Immunology. 9: 367-385.

Howard, A. W., & Smith, C. S. (1983). Histological techniques for marine bivalve mollusks. NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25, Woods Hole. 97 p.

Kang, H. S., Yang, H. S., Reece, K. S., Hong, H. K., Park, K. I., & Choi, K. S. (2016). First report of *Perkinsus honshuensis* in the variegated carpet shell clam Ruditapes variegatus in Korea. Diseases of Aquatic Organisms. 122: 35-41.

Leethochavalit, S., Chalermwat, K., Upatham, E. S., Choi, K. S., Sawangwong, P., & Kruatrachue, M. (2004). Occurrence of Perkinsus sp. in undulated surf clams *Paphia undulata* from the Gulf of Thailand. Diseases of Aquatic Organisms. 60: 165-171.

Levine, N. D. (1978). *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. Journal ofParasitology. 64: 549.

Mackin, J. G., Owen, H. M., & Collier, A. (1950). Preliminary note on theocurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum*n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). Science, 111: 328-329.

Maeno, Y., Yoshinaga, T., & Nakajima, K. (1999). Occurrence of *Perkinsus* Species (Protozoa, Apicomplexa) from Manila Clam *Tapes philippinarum* in Japan. Fish Pathology. 24: 127-131.

McLaughlin, S. M., & Faisal, M. (1999). A comparison of diagnostic assays for detection of *Perkinsus* spp. in the softshell clam *Myaarenaria*. Aquaculture, 172, 197-204.

Menden-Deuer, S., Lessard, E. J., & Satterberg, J. (2001). Effect of preservation on dinoflagellate and diatom cell volume and consequences for carbon biomass predictions. Diseases of AquaticOrganisms, 222, 41-50.

Montagnes, D. J. S., Berges, D. A., Harrison, P. A., & Taylor, F. J. R. (1994). Estimating C, nitrogen, protein and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton. Limnology and Oceanography. 39: 1044–1060.

Montes, J. F., Durfort, M., Lladó, A., & García-Valero, J. (2002). Characterization and immunolocalization of a main proteinaceous component of the cell wall of the protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. Parasitology. 124: 477-484.

Neto, M. P. D. (2016). First record of *Perkinsus chesapeaki* infecting *Crassostrea rhizophorae* in South America. *Journal of Invertebrate Pathology, 141*, 53–56.

Nóren, F., Möestrup, O., & Rehnstam-Holm, A. S. (1999). *Parvilucifera infectans* Nóren et Möestrup gen. et sp. nov. (Perkinsozoa phylumnov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. *European Journal of Protistology, 35*, 233-254.

Novoa, B., Ordás, M. C., & Figueras, A. (2002). Hypnospores detectedby RFTM in clam (Ruditapesdecussatus*)* tissues belong totwo different protozoan organisms, Perkinsus Atlanticusand a Perkinsus-like organism. Aquaculture, 209, 11–18.

Oliver, L. M., Fisher, W. S., Ford, S. E., Ragone Calvo, L. M., Burreson, E. M., Sutton, E. B., & Gandy, J. (1998). *Perkinsus marinus* tissue distribution and seasonal variation in oysters *Crassostrea virginica*from Florida, Virginia and New York. Diseases of AquaticOrganisms, 34, 51-61.

Park, K. I. Yang, H.-S., Kang, H.-S., Cho, M., Park, K.-J., & Cho, K.-S. (2010). Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. *Journal of Invertebrate pathology, 105*, 261-269.

Perkins, F. O. (1976). Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*. I. Fine structure of the conoidand other sporozoan–like organelles. *Journal ofParasitology, 62*, 959–974.

Ragone Calvo, L. M., Dungan, C. F., Roberson, B. S., & Burreson, E. M. (2003). Systematic evaluation of factors controlling *Perkinsusmarinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. Diseases of AquaticOrganisms, 56, 75-86.

Ray, S. M. (1966). A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. Proceeding of the National Shellfisheries Association, 54, 55-69.

Rodríguez, F., Godoy, T., Navas, J. I. (1994). Cross-infection with*Perkinsus atlanticus* in *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum* and *Venerupis pullastra*. *Bulletinof the European Association of the Fish Pathologists, 14*, 24-27.

Romestand, B., Corbier, F., & Roch, P. (2002). Protease inhibitors andhaemagglutinins associated with resistance to the protozoan parasite, *Perkinsus marinus*, in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Parasitology, 125*, 323-329.

Romestand, B., Torreilles, J., & Roch, P. (2001). Production of monoclonal antibodies against the Protozoa, Perkinsus marinus: estimation of parasite multification in vitro. *Aquatic Living Resources, 14*, 351–357.

da Silva, P. M., Vianna, R. T., Guertler, C., Ferreira, L. P., Santana, L. N., Fernández-Boo, S., Ramilo, A., Cao, A., & Villalba, A. (2013). First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River(NE, Brazil). *Journal of Invertebrate Pathology, 113*, 96–103.

Song, L., Wang, L., Qiu, L., & Zhang, H. (2010). Bivalve Immunity. In: Söderhäll K. (eds) Invertebrate Immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology, 708*. Springer, Boston, MA.

Taveekijakarn, P., Somsiri, T., Puttinaowarat, S., Tundavanitj, S., Chinabut. and Nash, G. (2008). Parasitic fauna of rock oyster (*Saccostrea forskali*) cultured in Thailand, pp. 335-342. In Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 505 pp.

Villalba, A., Reece, K. S., Ordás, M. C., Casas, S. M., & Figueras, A. (2004). Perkinososis in molluscs: a review. *AquaticLiving Resources, 17*, 411–432.

Volety, A. K., & Chu, F. L. E. (1994). Comparison of infectivity andpathogenicity of two life stages, meront (trophozoite) and prezoosporangia stages of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* inEastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin 1971). J. ShellfishRes. 13: 521-527.

Waki, T., Takahashi, M., Eki, T., Hiasa, M, Umeda, K., Karakawa, N., & Yoshinaga, T. (2018). Impact of *Perkinsus olseni* infection on a wild population of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Ariake Bay, Japan. Journal of Invertebrate Pathology. 153: 134-144.

Wang, Y.-L., Chu, B. H. Chen, K. H., & Chang, C.-Y. (2009). Fast Detection of *Perkinsus Marinus*, a Prevalent Pathogen of Oysters and Clams from Sea Waters. MRS Online Proceedings Library. 1202: 109-110.

Wilson-Ormond, E. A., Powell, E. N., Choi, K-S., & Song, J. (1993). *Perkinsus marinus* assay In: Lauenstein GG and Cantillo AY (eds), Comprehensive descriptions of complementary measurements. Sampling and analytical methods of the national status and trends program national benthic surveillance and mussel watch projects vol II. NOAA technical memorandum NOS ORCA 71 p II.79 - II.84.

ภาคผนวก

แก่นเกษตร 46 ฉบับพิเศษ 1 : (2561). KHON KAEN AGR. J. 46 SUPPL. 1 : (2018).

การคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการศึกษาปรสิต *Perkinsus olseni* ในหอยลาย (*Paphia undulata*)

Selection of MAb for investigation of parasitic *Perkinsus olseni* in undulated surf clam (*Paphia undulata*)

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

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

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการศึกษาและตรวจหาเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ในหอยลาย ด้วยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา โดยใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตด้วยวิธีไฮบริโดมา แล้วจึงนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีมาทดสอบความสามารถในการทำปฏิกิริยาและความจำเพาะกับปรสิต *Perkinsus olseni* ด้วยวิธี indirect ELISA และ dot- blotting พบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 20 ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด คือ 2.27 ส่วนหมายเลข 12 ไม่ทำปฏิกิริยากับปรสิต *P. olseni* เมื่อตรวจสอบความจำเพาะต่อปรสิตโดยวิธี dot- blotting พบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7 และ 20 สามารถจับกับปรสิต *P. olseni* ระยะฮิปโนสปอร์และโทรโฟซอยด์ได้ นอกจากนี้จะพบว่าแอนติบอดีหมายเลข 20 ทำให้เนื้อเยื่อของระยะฮิปโนสปอร์และโทรโฟซอยด์ บริเวณขอบผนังเซลล์ และส่วนที่เป็นนิวเคลียสติดสีน้ำตาลเข้ม

คำสำคัญ: ปรสิต *P. olseni*, มอนอโคลนอลแอนติบอดี, หอยลาย

ABSTRACT: This research aims to select monoclonal antibodies for study and detecting parasite *Perkinsus* sp. in undulated surf clam by immunohistochemistry technique. The monoclonal antibodies (MAbs) produced from hybridoma were characterized the specific immunoreactivity to *Perkinsus olseni* by indirect ELISA and dot blotting. In this study, a monoclonal antibody named 20th showed the highest absorbtion at 2.27. The clone named 12 had no cross-reactivity with *P. olseni*. Furthermore, specific blinding of each monoclonal antibody was confirmed by dot blotting. Both antibody named 7 and 20 were reacted with parasite *P. olseni*. In addition, antibody -20 were stained both hypnospore and trophozoite in clams tissue, causing cell wall and nucleus of parasite appeared dark blown colour.
Keywords: *P. Olseni*, Monoclonal antibody, Undulated surf clam

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

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

* Corresponding author: supannee@buu.ac.th

บทนำ

โรค Perkinsosis เป็นโรคที่เกิดจากโปรโตซัวสกุล *Perkinsus* ที่มีรายงานการพบการแพร่ระบาดมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1950 ในหอยนางรม (eastern oyster, *Crassostrea virginica*) ในประเทศสหรัฐอเมริกา และต่อมามีรายงานการพบ *Perkinsus* ชนิดอื่นๆ ในหอยทะเลหลายชนิด ซึ่งปัจจุบันมีการรายงานการพบถึง 20 ประเทศทั่วโลก สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการพบโปรโตซัวสกุลนี้ในหอยลาย (*P. undulata*) (Leethochavalit et al., 2004) และหอยนางรม (*Saccrostrea forskali*) (Taveekijakarn et al., 2008) การตรวจวินิจฉัยปรสิต *Perkinsus* spp. ในหอย เริ่มแรกใช้วิธี Ray's fluid thioglycollate assay (RFTM) (Ray, 1966) โดยการเลี้ยงปรสิตในอาหาร Fluid thioglycollate medium ซึ่งเนื้อเยื่อหอยจะถูกบ่มใน FTM ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 -14 วัน ก่อนนำเนื้อเยื่อมาย่อยและล้างให้สะอาด แล้วจึงนำตะกอนที่เหลือมาย้อมด้วย Lugol' s iodine solution ภายใต้กล้องจุลทรรศน์วิธีนี้จะใช้เวลาหลายวัน และขาดความจำเพาะต่อปรสิต *Perkinsus* ต่อมาได้มีการนำเทคโนโลยีทางด้านต่างๆ มาใช้เนื่องจากมีความจำเพาะมากกว่า เช่น ในปี 1991 Choi และคณะ ได้ทำการพัฒนาเทคนิคพอลีโคลนอลแอนติบอดี เพื่อใช้วินิจฉัยเซลล์ระยะฮิปโนสปอร์ของปรสิต เช่นเดียวกับ Dungan และ Robertson (1993) ได้พยายามผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี เพื่อใช้ในการวินิจฉัยเซลล์ ระยะฮิปโนสปอร์ของปรสิต *P. marinus* รวมทั้งการใช้เทคนิคทางด้าน ELISA เพื่อตรวจหาปรสิต *P. marinus* อีกด้วย (Villalba et al., 2004) ซึ่งการตรวจด้วยเทคนิคนี้จะให้ความถูกต้องแม่นยำกว่าเทคนิค RFTM เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่า งานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองเพื่อคัดเลือก มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ให้ความจำเพาะสูงต่อปรสิต *Perkinsus* sp. ที่พบในประเทศไทยเพื่อใช้ในการพัฒนาเทคนิคตรวจหาปรสิตให้มีความจำเพาะและเร็วขึ้น

วิธีการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างหอยลาย (*P. undulata*) จากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาคร และสมุทรสงครามจำนวนจังหวัดละ 30 ตัว ตั้งแต่เดือนมกราคม-มีนาคม พ.ศ. 2560

2. การเตรียมปรสิตระยะซูโอสปอร์ (Zoospore) ของปรสิต *P. olseni* จากหอยลาย

ตัดเหงือกหอยลายบ่มในอาหาร FTM ที่มี Streptomycin 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Penicillin G Potassium 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อหอยมากรองผ่านผ้าขาวบาง แล้วจึงนำเนื้อเยื่อที่กรองได้มาย่อยด้วย 0.25 % Trypsin ในน้ำทะเลเทียม ความเค็ม 30 พีพีที (SM 30) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างเนื้อเยื่อด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 450 x g ที่เวลา 8 นาที เก็บปรสิตระยะพรีซูโอสปอร์แรนเจีย (prezoosporangia) เลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อด้วย SM 30 ตั้งในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง ให้แบ่งเซลล์จนได้ตัวอ่อนระยะซูโอสปอร์ ว่ายน้ำออกมาจากตัวแม่ แล้วทำการเก็บรวบรวม ซูโอสปอร์ด้วยการปั่นเหวี่ยงเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป (Leethochavalit et al., 2004)

3. การตรวจและเตรียมปรสิต *P. olseni* ระยะฮิปโนสปอร์ (Hypnospore)

นำเนื้อเยื่อหอยลายมาบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid thioglycolate medium (FTM) ที่เติม Streptomycin 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Penicillin G Potassium salt 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำมาย่อยด้วย 2 M NaOH ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแยกตะกอนออกโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 x g เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 0.15 โมลาร์เกลือ (PBS) 30 มิลลิลิตร ทำซ้ำจำนวน 3

รอบ เก็บตัวอย่างใน PBS จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร ย้อมด้วย Lugol's iodine 500 ไมโครลิตร เพื่อนับจำนวน ฮิปโนสปอร์ ของ *P. olseni* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 3 ครั้งต่อตัวอย่าง จดบันทึกแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ส่วนปรสิตที่เหลือนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บรวบรวมไว้ใช้ต่อไป (Leethochavalit et al., 2004)

4. การเตรียมเนื้อเยื่อหอยทางด้านมิญชวิทยา

นำเนื้อหอยที่แกะแล้วมาตัดผ่านอวัยวะต่างๆ แช่ใน Davidson fixative นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเนื้อหอยไปผ่านกระบวนการทาง Histological technique (Howard และ Smith, 1983) หลังจากนั้นนำมาตัดด้วยเครื่องไมโครโตม ที่ความหนา 3-5 ไมโครเมตร แล้วนำไปย้อมด้วยเทคนิค H&E และมอนอโคลนอลแอนติบอดี จำนวน 5 สไลด์/หอย 1 ตัว

5. การตรวจสอบมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olseni*

5.1 การเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ทำการละลายเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olseni* หมายเลข 7, 12 และ 20 ที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 20% fetal bovine serum ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 5% และอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาจนอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนใสที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีมอนอโคลนอลแอนติบอดีเชื้อปรสิต *P. olseni* ไว้ สำหรับการทดลองต่อไป (สิริรัตน์, 2557)

5.2 วิธี dot-blotting

ตรึงปรสิต ระยะ zoospore และ hypnospore ความเข้มข้น 5.0 x10^7 cell/mL ไดอะตอมที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *Amphora Chaelacros Thalassiosira* ความเข้มข้น 2.3-3.7 x10^6 cell/mL หยด1 ไมโครลิตร ต่อจุดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นแช่ใน 5% สารละลายนมพร่องมันเนย ล้างด้วย PBS บ่มต่อใน MAbs หมายเลข 7, 12 และ 20 เจือจาง 1:5 ใน PBS ล้างด้วย PBS บ่มต่อใน GAM-HRP เจือจาง 1:3000 ล้างด้วย PBS แช่ในสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobezidine tetrahydrochoride (DAB), 0.03% hydrogenperoxide (H_2O_2), 1% $CoCl_2$ ใน PBS การอ่านผลบริเวณที่แอนติบอดีจับกับเชื้อ *P. olseni* บนกระดาษจะมีลักษณะเป็นจุดสีเทาดำ (สิริรัตน์, 2557)

5.3 วิธี indirect ELISA

นำ *P. olseni* ระยะ hypnospore ความเข้มข้น 8.00x10^5 cell/mL ใส่ในไมโครเพลทปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดฝาไมโครเพลท ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°C ล้างด้วย PBS เติม MAb หมายเลข 7, 12 และ 20 เจือจาง 1:2 ใน PBS ล้างด้วย PBS บ่มต่อใน GAM-HRP เจือจาง 1:10,000 ล้างด้วย PBS เติมสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วย Tetramethylbenzidine (TMB) และ hydrogenperoxide หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M H_2SO_4 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm (สิริรัตน์, 2557)

5.3 วิธี อิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry)

นำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้จากข้อ 4 ผ่านกระบวนการนำพาราฟินออก (deparaffinX และนำน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (rehydration) แล้วย้อมสไลด์โดยใช้ MAbs ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:5 GAM-HRP เจือจาง 1:2000 สารละลายสับสเตรทที่ใช้ประกอบด้วย 0.03% diaminobezidine tetrahydrochoride (DAB), 0.03% hydrogenperoxide (H_2O_2), 1% $CoCl_2$ ใน PBS หลังจากนั้นย้อมสไลด์ด้วย Haematoxylin 5 นาที แล้วย้อมซ้ำด้วย eosin ทำเป็นสไลด์ถาวร ด้วย permount ปิดทับด้วย cover glass ตรวจดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์และถ่ายภาพ บริเวณที่มอนอโคลนอลแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับเชื้อปรสิตจะปรากฏเป็นสีน้ำตาล (สิริรัตน์, 2557)

ผลการศึกษา

การสำรวจปรสิต *P. olseni* โดยวิธีการตรวจนับเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FTM

ผลการสำรวจ *P. olseni* ในหอยลายที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาคร และสมุทรสงคราม ระหว่างเดือน มกราคมถึงเดือนมีนาคม 2560 ด้วยวิธี RFTM พบว่าเดือนมกราคม มีปริมาณปรสิตมากที่สุด ในหอยลายจังหวัดสมุทรสาคร รองลงมาคือจังหวัดสมุทรสงคราม และเพชรบุรี ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 1 และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำหนักเนื้อหอยสดกับปริมาณปรสิต พบว่าปริมาณปรสิตมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักเนื้อหอย เมื่อน้ำหนักเนื้อหอยมากขึ้นมีแนวโน้มที่จะตรวจพบจำนวนปรสิตมากขึ้น ดังแสดงใน Figure 2

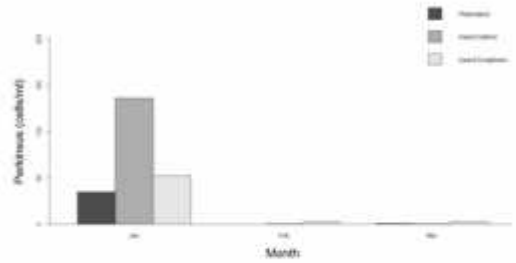


Figure 1 Quantitative of *Perkinsus* sp. in *P. undulata* from Samut Sakhon, Samut Songkhram and Petchaburi province during January to March, 2017

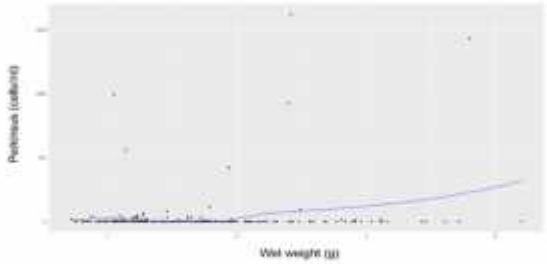


Figure 2 Relationship of tissue weight and quantity of parasites

การตรวจสอบมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olseni*

หลังจากที่นำเซลล์ไฮบริดาที่ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olseni* หมายเลข 7, 12 และ 20 ที่เก็บเซลล์ไว้ที่ไนโตรเจนเหลว (Kaewsalabnil et.al, 2015) ออกมาเลี้ยงใหม่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา และนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต *P. olseni* นั้นมาตรวจสอบว่าเซลล์ไฮบริโดมานั้นยังสร้างมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อที่จำเพาะเชื้อปรสิต *P. olseni* หรือไม่ โดยวิธี dot-blotting และวิธี indirect ELISA พบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดี หมายเลข 12 ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อปรสิตทั้งระยะ hypnospore และระยะ zoospore ไม่ปรากฏจุดสีบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยวิธี dot-blotting และมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำมาก โดยวิธี indirect ELISA ซึ่งชี้ให้เห็นว่าหลังจากที่นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 12 กลับมาเลี้ยงใหม่ เซลล์ไฮบริโดมาสูญเสียความสามารถในการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี (Figure 3, Table 1)

สำหรับวิธี dot-blotting มอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7 และ 20 ยังสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อปรสิตทั้งระยะฮิปโนสปอร์และระยะซูโอสปอร์ ซึ่งจะเห็นเป็นจุดที่เทาดำบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ความเข้มของจุดสีเทาและดำ แสดงให้เห็นว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดี หมายเลข 7 และ 20 ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อปรสิตระยะฮิปโนสปอร์ (สีดำ) ได้ดีกว่าระยะซูโอสปอร์ (สีเทา) และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับไดอะตอมที่นำมาทดสอบ (ไม่ปรากฏจุดสี) แสดงว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะสูงต่อเชื้อปรสิต ส่วนวิธี indirect ELISA พบว่าเมื่อใช้ มอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 20 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่าการใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 7 แสดงให้เห็นว่า มอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 20 มีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาเชื้อปรสิตระยะฮิปโนสปอร์ ที่ตรึงไว้ที่หลุม ELISA ได้ดีกว่า ดังTable 1 จึงเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดี หมายเลข 20 ไปใช้ในการตรวจหาปรสิตบอเนื้อเยื่อหอยลาย โดยวิธีอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry) ต่อไป

Figure 3 Dot blotting of *Perkinsus olseni* and diatoms

Note:

A	B	C	D	E	Monoclonal antibody

A: Zoospore, B: hypnospore, C: *Amphora* D: *Characros* E: *Tharasiosira* No.: Monoclonal antibody

Table 1 Monoclonal antibodies of *Perkinsus olseni* absorbance

Monoclonal antibody	Absorbance (Wavelength 450 nm)
7	1.5752
12	0.1603
20	2.2675

ผลการตรวจหาปรสิตด้วยวิธีอิมมูโนพยาธิวิทยา

จากการนำมอนอโคลนอลแอนติบอดี หมายเลข 20 มาใช้เพื่อตรวจหาตรวจหาปรสิต *P. olseni* บนเนื้อเยื่อหอยลาย โดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา พบมีการติดสีน้ำตาลที่ระยะฮิปโนสปอร์และโทรโฟซอยด์ของเชื้อปรสิต บริเวณขอบผนังเซลล์และส่วนที่เป็นนิวเคลียส ดังแสดงใน **Figure 4, 6** แสดงว่า การใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีนี้มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อปรสิตในเนื้อเยื่อหอยลายได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการย้อมด้วย Lugol's iodine **Figure 5, 7**

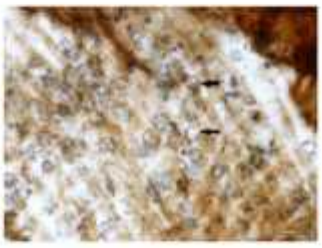


Figure 4 Hypnospores of *Perkinsus* sp. from *P. undulata* stained with MAb

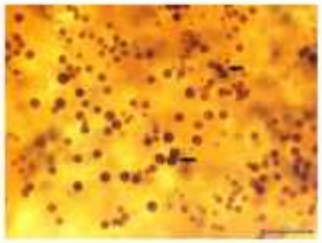


Figure 5 Hypnospores of *Perkinsus* sp. from *P. undulata* stained with Lugol's iodine.

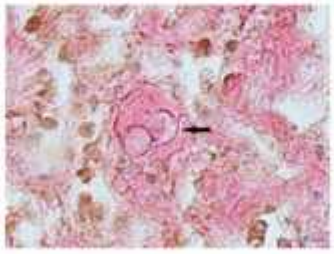


Figure 6 Trophozoites of *Perkinsus* sp. in *P. undulata* stained with MAbs และ H&E

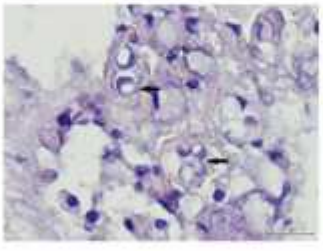


Figure 7 Trophozoites of *Perkinsus* sp. in *P. undulata* stained with H&E

วิจารณ์

ปัจจุบันมีการนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคและการศึกษาทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Coll และ Dominguez-Juncal, 1995) ซึ่งมอนอโคลนอลแอนติบอดีบางชนิดที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคปลา สามารถผลิตได้ในเชิงพาณิชย์แล้ว (Kim et al., 2017) ในการศึกษาการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยปรสิต *P. olseni* ในหอยลาย (*P. undulata*) ด้วยมอนอโคลนอลแอนติบอดี ผลการศึกษาที่ได้ในการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อปรสิตและไดอะตอมชนิดต่างๆ ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม แต่จะเกิดปฏิกิริยาต่อปรสิตระยะฮิปโนสปอร์และซูโอสปอร์ ซึ่งเชื้อปรสิต *Perkinsus* spp. ที่แพร่ระบาดในหอย มีหลายระยะทั้งที่เป็นระยะโทรโฟซอยด์ พบในเนื้อหอย ระยะที่เป็น ฮิปโนสปอร์ ซึ่งเป็นระยะเต็มวัย ก่อนแบ่งเซลล์ได้เป็นซูโอสปอร์ (Choi et al., 1991) ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้ คณะผู้วิจัยได้ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. olseni* มาแล้ว (สิริรัตน์, 2557) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้นำแอนติบอดีที่ได้มาเพื่อนำมาทดสอบโดยเทคนิค indirect ELISA และ เทคนิค dot blotting หาโคลนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด จนพบว่าโคลน 7 และ 20 ให้ประสิทธิภาพดีที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Romestand, Torreilles และ Roch (2001) ที่ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีจาก *P. marinus* และมีความจำเพาะต่อโทรโฟซอยด์ ฮิปโนสปอร์ และ ซูโอสปอร์ จำนวน 2 โคลน เมื่อได้โคลนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดแล้วจึงนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีมาทดสอบกับเนื้อเยื่อหอยที่ได้จากกระบวนการมิญชวิทยาและทดสอบกับปรสิตตัวเต็มวัย ที่แยกออกมาจากเนื้อเยื่อ ทำให้บริเวณผิวของเซลล์ปรสิตระยะโทรโฟซอยด์และ ฮิปโนสปอร์ เป็นสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากการจับของ MAbs กับผนังเซลล์ปรสิต แต่จากรายงานของ Dungan และ Roberson (1993) พบว่า มอนอโคลนอลที่ผลิตได้จะจับกับอิพิโทปของฮิปโนสปอร์ของปรสิต *P. marinus* เท่านั้น จากรายงานของ Earnhart et al. (2005) พบว่า มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากปรสิต *P. marinus* จะจับกับผนังเซลล์ของโทรโฟซอยด์และโทมอนท์ นอกจากนี้ยังกล่าวว่า แอนติบอดียังสามารถใช้ในการสำรวจการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผนังเซลล์ปรสิตระหว่างการเลี้ยงในอาหาร FTM และยังระบุว่าแอนติบอดีสามารถใช้ตรวจหาลักษณะเฉพาะเจาะจงของปรสิต *P. marinus* ในเนื้อเยื่อหอยที่แช่ในน้ำยาดองได้ จากงานวิจัยนี้พบว่าเทคนิคการตรวจหาปรสิตด้วยมอนอโคลนอลแอนติบอดีนี้สามารถตรวจพบปรสิต *P. olseni* ระยะโทรโฟซอยด์ และฮิปโนสปอร์ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Romestand et al. (2001) ได้รายงานว่า วิธีการใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีตรวจหาปรสิต *P. marinus* มีความไวและจำเพาะพอที่จะตรวจพบปรสิตระยะโทรโฟซอยด์ได้ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงเพียงผลการทดสอบของแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. olseni* ที่ผลิตได้หลายโคลนเพื่อหาประสิทธิภาพของโคลนเหล่านั้น ซึ่งจะนำไปสู่การนำโคลนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการตรวจวินิจฉัยปรสิตไปทำบริสุทธิ์เพื่อหาแนวทางการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

สรุป

ผลการสำรวจ *P. olseni* ในหอยลายที่เก็บจากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาคร และสมุทรสงคราม ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม 2560 ด้วยเทคนิค RFTM พบว่าเดือนมกราคม มีปริมาณปรสิตมากที่สุดในหอยลายจังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดสมุทรสงคราม และเพชรบุรี ตามลำดับ เมื่อทำการคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดี เพื่อหามอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในวิธีอิมมูโนพยาธิวิทยา ด้วยวิธี indirect ELISA และ dot blotting พบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีหมายเลข 20 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการจับกับปรสิต *P. olseni* และสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาปรสิตบนเนื้อเยื่อหอยลายได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผ่านงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2560 สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา และทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2557

เอกสารอ้างอิง

สิริรัตน์ แก้วสลับนิล. 2557. การผลิตและลักษณะคุณสมบัติสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Perkinsus olseni* ในหอยลาย *Paphia undulata*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

Choi, K.S., D. H. Lewis, E. N. Powell, P. F. Frelier, and S. M. Ray. 1991. A polyclonal antibody developed from *Perkinsus marinus* hypnospores fails to cross react with other life stages of *P. marinus* in oyster (*Crassostrea virginica*) tissues. J. Shellfish Res. 10: 411-415.

Coll, J. M. and J. Dominguez-Juncal. 1995. Applications of monoclonal-antibodies in aquaculture. Biotech Adv. 13: 45-73.

Dungan C. F., and B. S. Roberson. 1993. Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. Dis. Aquat Org. 15: 9-22.

Earnhart, C. G., D. T. Gauthier, W. K. Vogelbein, and S. T. Kaattari. 2005. Monoclonal antibody analysis of *Perkinsus marinus* extracellular products. Int J. Parasitol. 35: 171-184.

Howard, D. W., and C. S. Smith. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. Wood Hole, Massachusetts.

Kim, A., T. L. Nguyen, and D.-H. Kim. 2017. Modern methods of diagnosis. P. 109-145. In: B. Austin and A. Newaj-Fyzul In Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish. Wiley, CRO.

Leethochavalit, S. K. Chalermwat, E. S. Upatham, K.-S. Choi, P. Sawangwong, and M. Kruatrachue. 2004. Occurrence of *Perkinsus* sp. in undulated surf clams *Paphia undulata* from the Gulf of Thailand. Dis Aquat Org. 60: 165-171.

Ray, S. M. 1966. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested Modifications and precautions. Proc Natl Shellfish Assoc. 54: 55-69.

Romestand, B., J. Torreilles, and P. Roch. 2001. Production of monoclonal antibodies against the Protozoa, *Perkinsus marinus*: estimation of parasite multiplication in vitro. Aquat Living Resour.14: 351-357.

Kaewsalabnil, S., S. Leethochavalit, J. Watanachote, K. Komolpis, and N. Khongchareonporn. 2015. Production and characterization of monoclonal antibody against *Perkinsus olseni* in undulated surf clams *Paphia undulata*. Food Appl Bios J. 3: 231-238.

Taveekijakarn, P., T. Somsiri, S. Puttinaowarat, S. Tundavanitj, Chinabut G. Nash. 2008. Parasitic fauna of rock oyster (*Saccostrea forskali*) cultured in Thailand. pp. 335-342. In: M. G. Bondad-Reantaso, C. V. Mohan, M. Crumlish, and R. P. Subasinghe. Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

Villalba, A. , K. S. Reece, M. C. Ordás, S. M. Casas, and A. Figueras. 2004. Perkinsosis in molluscs: A review Aquat Living Resour. 17: 411-432.