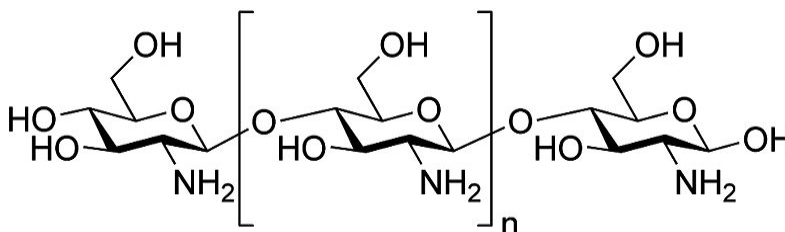


บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ข้อมูลเกี่ยวกับไคโตแซนและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา

ไคโตแซน (Chitosan) เป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติ (linear polysaccharide) ซึ่งประกอบด้วย β -(1-4)-linked D-glucosamine (deacetylated unit) และ N-acetyl-D-glucosamine (acetylated unit) ไคโตแซนเป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการ deacetylation ของไคติน (Chitin) โดยไคตินเป็นสารประกอบที่พบได้ทั่วไปในเปลือกกุ้ง กระดองปู เปลือกแมลง และเชื้อรา ไคโตแซนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการผลิตเพื่อการค้าและมีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างหลากหลาย ทั้งในทางการแพทย์ เกษตรกรรม และอุตสาหกรรม อาทิ การผลิตไวน์ การผลิตสี และเป็นสารช่วยในการนำส่งยาผ่านผิวหนัง เป็นต้น นอกจากนี้พบว่าไคโตแซนยังเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อราและแบคทีเรีย (fungicidal and bactericidal action) ซึ่งคุณสมบัตินี้เกี่ยวข้องกับ electrostatic force ระหว่างโปรตอน (proton) ของอะมิโนกรุป (NH_2) ของไคโตแซน และ negative residue บริเวณผิวเซลล์ (Young *et al.*, 1982; Tsai and Su, 1999) โครงสร้างทางเคมีของ chitosan แสดงไว้ในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ chitosan (ที่มา: <http://en.wikipedia.org>)

มีการนำ chitosan มาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการใช้ chitosan เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) ในปลาหลายชนิด มีการทดลองฉีดและแช่สารละลาย chitosan ในปลา brook trout พบว่าปลาทดลองจะมีภูมิคุ้มกันสูงขึ้นภายใน 3 วัน แต่ภูมิคุ้มกันจะลดลงหลังจากวันที่ 14 (Anderson and Siwicki, 1994) และการทดลองในปลา rainbow trout พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 0.25% เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะมีค่าองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือด และ serum glucose และความต้านทานต่อปัจจัยความเครียด อาทิ ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ และความเค็มของน้ำ เพิ่มขึ้น (Meshkini *et al.*, 2012) สอดคล้องกับการทดลองฉีดสารละลาย chitosan ในปลาสีกเทห์ (*Labeo rohita*) พบว่าปลาทดลองจะมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนรวมในน้ำเลือด อัลบูมิน โกลบูลิน และปริมาณเม็ดเลือดอัดแน่น (packed cell volume) (Sahoo and Mukherjee, 1999)

นอกจากนี้ยังพบว่าปลาในกลุ่ม salmonid และปลาไนที่ได้รับ chitosan จะมีความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรียด้วย (Anderson and Siwicki, 1994; Siwicki *et al.*, 1994)

จากการทดลองในปลาไน (*Cyprinus carpio*) พบว่า chitosan ที่ผสมในอาหารที่ระดับ 1% เป็นเวลา 90 วัน มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ค่าปัจจัยด้านภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะ lysozyme activity และ NBT reduction และอัตราการรอดจากการชักนำให้ติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (Gopalakannan and Arul, 2006) สอดคล้องกับรายงานของ Maqsood และคณะ (2010) ซึ่งพบว่าปลาไนที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 2% เป็นเวลา 70 วัน จะให้ผลดีที่สุดในการกระตุ้นการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ phagocytic activity และ serum bactericidal activity รวมถึงอัตราการรอดจากการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* นอกจากนี้ยังพบว่าปลาไน (*Cyprinus carpio koi*) ที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีแนวโน้มการเพิ่มสูงขึ้นของค่าปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกัน และความต้านทานต่อการติดเชื้อ *Aeromonas veronii* อย่างไรก็ตามผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าการให้อาหารผสม chitosan ต่อเนื่องเป็นเวลานานถึง 8 สัปดาห์ จะส่งผลต่อการเกิดภาวะไม่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunity fatigue) ของปลาไนได้ (Lin *et al.*, 2011)

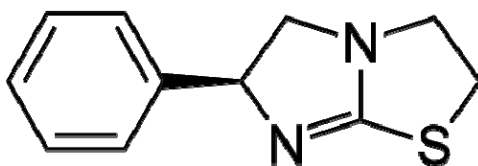
Luo และคณะ (2009) รายงานว่าปลา rainbow trout ที่ได้รับอาหารผสม chitosan-oligosaccharides (COS) จะมีค่า phagocytic activity และ respiratory burst activity เพิ่มขึ้น และมีระดับของ cortisol ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสม COS ยังมีอัตราการรอดจากการชักนำให้ติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เพิ่มขึ้นด้วย สอดคล้องกับการทดลองในปลา ovate pompano ซึ่งพบว่าปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม COS ที่ระดับ 4.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 56 วัน จะมีอัตราการเจริญเติบโต ค่าปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดขาว, respiratory burst activity, lysozyme activity และ superoxide dismutase (SOD) activity และความต้านทานต่อการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* เพิ่มขึ้น (Lin *et al.*, 2012) และจากการทดลองในปลากะรัง (kelp grouper) พบว่า chitosan ที่ผสมในอาหาร ที่ระดับ 1% - 2% มีผลในการกระตุ้นค่าองค์ประกอบเลือด ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และอัตราการรอดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* และโปรโตซัว *Philasterides dicentrarchi* ในปลาทดลองอย่างมีนัยสำคัญ (Harikrishnan *et al.*, 2012a,b)

จากการทดลองในปลา olive flounder โดยให้อาหารเม็ดที่เคลือบสารละลายไคโตแซน (chitosan-coated moist pellet) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า chitosan ไม่มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโต แต่ปลาทดลองจะมีค่าปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะ myeloperoxidase (MPO), neutrophil respiratory burst และ skin mucus lysozyme activity เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Cha *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่วมกันสองชนิดในระดับที่เหมาะสม จะให้ผลในการเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลา พบว่าปลา cobia ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (*Bacillus subtilis*) ที่ระดับ 1.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ร่วมกับ chitosan ที่ระดับ 6.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะมีอัตราการเจริญเติบโต ปัจจัยด้านภูมิคุ้มกันแบบไม่

จำเพาะ โดยเฉพาะ phagocytic activity และ respiratory burst activity และอัตราการรอดจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus subtilis* หรือ chitosan อย่างใดอย่างหนึ่ง (Geng *et al.*, 2011)

2. ข้อมูลเกี่ยวกับเลวามิโซลและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา

เลวามิโซล (Levamisole) เป็นสารสังเคราะห์ชนิด Phenylimidazolthiazole ((S)-6-Phenyl-2,3,5,6-tetrahydroimidazo[2,1-b][1,3]thiazole) ภายใต้ชื่อทางการค้า Ergamisol (R12564) มีฤทธิ์ในการทำลายหนอนพยาธิตัวกลม (antihelminthic agent) ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นยาถ่ายพยาธิในกระเพาะอาหารลำไส้ และปอดอย่างกว้างขวางทั้งในคนและในวงการสัตวแพทย์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1965 (Janssen, 1976; Renoux, 1980) โดยมีฤทธิ์ในการขัดขวางการทำงานของสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ของพยาธิ levamisole เป็นยาที่ได้รับการรับรองจาก European Community และ United States' Food and Drug Administration (FDA) (Cuesta *et al.*, 2002) โครงสร้างทางเคมีของ levamisole แสดงไว้ในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ levamisole (ที่มา: <http://en.wikipedia.org>)

มีรายงานพบ levamisole เป็นยาชนิดแรกที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการตอบสนองของ เซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) และ T-lymphocyte ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งในสภาวะปกติ (Renoux, 1980) และในภาวะที่ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่ำ (immunocompromised) (Amery, 1978; Morimoto *et al.*, 1979; Ogunbiyi *et al.*, 1988) จึงมีการนำ levamisole มาประยุกต์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะในปลา ซึ่งพบว่า levamisole มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) ในปลา โดยเฉพาะการกระตุ้นการทำงานของ T-lymphocyte และกระบวนการ phagocytosis แต่จำเป็นจะต้องมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณที่ใช้ และระยะเวลาที่เหมาะสมในปลาแต่ละชนิดด้วย เนื่องจากปริมาณ levamisole ที่สูงเกินไปอาจส่งผลในการกดภูมิคุ้มกันของปลาได้ หรือกรณีที่ปริมาณน้อยเกินไปอาจไม่มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Anderson *et al.*, 1989; Siwicki *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2004) มีรายงานว่า levamisole มีผลในการกระตุ้นการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันในปลาหลายชนิด อาทิ กระตุ้น leukocyte cytotoxic activity (Cuesta *et al.*, 2002), phagocytosis, respiratory burst, macrophage activating factor (Mulero *et al.*, 1998) และการสร้าง antibody (Cuesta *et al.*, 2004) ในปลา gilthead seabream นอกจากนี้ยังพบว่า levamisole ยังมีผลในการกระตุ้น

ความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคในปลาหลายชนิด อาทิ เชื้อ *Vibrio anguillarum* (Kajita *et al.*, 1990) และเชื้อ *Aeromonas salmonicida* (Siwicki *et al.*, 1994) ในปลา rainbow trout เชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลาไน (*Cyprinus carpio*) (Baba *et al.*, 1993) เชื้อ *Edwardsiella tarda* ในปลาอีสกเทศ (*Labeo rohita*) (Sahoo and Mukherjee, 2002) และเชื้อ *Photobacterium damsela* ในปลา cobia (Leano *et al.*, 2004) และโปรโตซัวในกลุ่มมีบา (*Paramoeba* sp.) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเหงือกในปลา Atlantic salmon (Findlay and Munday, 2000; Munday and Zilberg, 2003)

จากรายงานการศึกษาการใช้ยาและสารเคมีหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการกำจัดปลิงในกลุ่ม *Gyrodactylus* ในปลา rainbow trout รวมถึง levamisole พบว่าการแช่ปลาด้วยสารละลาย levamisole hydrochloride ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/L เป็นเวลา 60 นาที สามารถกำจัดปลิงกลุ่ม *Gyrodactylus* ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อปลาทดลอง (Santamarina *et al.*, 1991) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของผู้ผลิต ซึ่งรายงานว่า levamisole hydrochloride มีความเป็นพิษต่อสัตว์บก โดยมีค่า Median lethal dose (LD50) ในหนูที่ระดับ 200 – 500 mg/kg แต่ไม่เป็นพิษต่อปลา หรือผึ้ง และ levamisole hydrochloride ไม่ตกค้างในสิ่งมีชีวิต มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) ในดินตั้งแต่ 5 ถึง 75 วัน ขึ้นอยู่กับแสงแดดและสภาพอากาศ และสามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในดิน (Novartis Animal Health Australia, 2009)

จากการทดลองฉีดสารละลาย levamisole ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าบริเวณช่องท้องของปลา rainbow trout ที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 50 กรัม พบว่าปลาทดลองมีค่า phagocytic activity, chemiluminescence responses, natural killer cell activity, alternative complement pathway (ACH₅₀) และอัตราการรอดจากการติดเชื้อ *Vibrio anguillarum* เพิ่มขึ้น (Kajita *et al.*, 1990) สอดคล้องกับการจากการทดลองฉีดสารละลาย levamisole ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าบริเวณช่องท้องของปลา rainbow trout ที่มีน้ำหนักตัวระหว่าง 99.4 – 216 กรัม แล้วเก็บเลือดที่เวลา 3, 7, 10 และ 14 วัน ซึ่งพบว่าปลาทดลองมีค่าปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ NBT reduction activity, phagocytic activity, potential killing activity ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และ monocyte, myeloperoxidase production (MPO), lysozyme activity และ ceruloplasmin (Cp) activity เพิ่มขึ้น ยกเว้นค่า hematocrit, leukocrit และ immunoglobulin เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Ispir and Dörücü, 2005) นอกจากนี้จากการทดลองแช่ปลา rainbow trout ที่มีน้ำหนักตัวระหว่าง 42 – 87.3 กรัม ในสารละลาย levamisole ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลาอย่างน้อย 14 วัน พบว่าปลาทดลองจะมีค่า oxidative radical production, phagocytic activity ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และการผลิต superoxide anion ตอบสนองต่อเชื้อ *Yersinia ruckeri* ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และ monocyte เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Yonar and Ispir, 2007)

จากการทดลองในปลาอุกด้าน (Asian catfish; *Clarias batrachus*) ที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 49.52 กรัม พบว่าปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม levamisole ที่ระดับ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 10 วัน จะมีค่าปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะ respiratory burst activity (NBT reduction) และ myeloperoxidase activity เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม ทั้งในกลุ่มปกติและกลุ่มที่ได้รับการฉีดสารกดภูมิคุ้มกันชนิด cyclophosphamide (CYP) (Kumari and Sahoo, 2006a) นอกจากนี้ Kumari และคณะ (2006b) ยังพบว่าปลาอุกด้านน้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 52.4 กรัม ซึ่งได้รับอาหารผสม levamisole ที่ระดับ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลาอย่างน้อย 10 วัน จะมีค่าปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะทั้งในส่วนของ humoral และ cellular immune response เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะค่า oxidative radical production, serum myeloperoxidase (MPO) และอัตราการรอดจากการชักนำให้ติดเชื้อ ในปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในขณะที่พบว่าปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม levamisole ที่ระดับ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร กลับมีค่า superoxide production และ complement activity ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับการทดลองใน Hong Kong catfish (*Clarias fuscus*) ซึ่งพบว่าอาหารผสม levamisole ในอาหารที่ระดับ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร จะให้ผลดีที่สุดในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และอัตราการรอดของปลาทดลองจากการชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter lwoffii* ในขณะที่ levamisole ที่ระดับ 75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ไม่มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และ levamisole ที่ระดับ 600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร กลับส่งผลในการกดภูมิคุ้มกันของปลา Hong Kong catfish (Li et al., 2006a)

จากการทดลองในปลาไน (*Cyprinus carpio*) พบว่าปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม levamisole ที่ระดับ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 70 วัน จะมีค่าองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต โปรตีนในน้ำเลือด ปริมาณอัลบูมิน และโกลบูลิน ปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ NBT reduction, lysozyme activity และอัตราการรอดจากการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และดัชนีการเจริญเติบโต ได้แก่ specific growth rate (SGR) และอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio; FCR) ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ levamisole ที่ระดับ 0, 125 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Maqsood et al, 2009) สอดคล้องกับการทดลองในปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) พบว่าปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม levamisole ทุกระดับ (125, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) เป็นเวลา 56 วัน จะมีค่าองค์ประกอบเลือดและปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดขาว (WBC count), phagocytic ratio, lymphokine production index, lysozyme activity และ serum bactericidal activity เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ levamisole ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของปลาทดลองจากการชักนำให้ติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Edwardsiella tarda* (Misra et al., 2008) ในขณะที่ Yuji Sado และคณะ (2010) รายงานว่า levamisole ที่ผสมในอาหารปริมาณตั้งแต่ 50 – 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 30 วัน ไม่มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโต แต่มีผลในการกระตุ้นค่าโลหิตวิทยา อาทิ ปริมาณฮีโมโกลบิน ปริมาณกลูโคส และปริมาณเม็ด

เลือดขาวของปลา pacu (*Piaractus mesopotamicus*) ที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 55.94 กรัม และยังพบว่า levamisole จะเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อ lymphopoietic tissues ของปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม levamisole ตั้งแต่ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร นานกว่า 15 วัน

การทดลองในปลา striped bass ลูกผสม (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) พบว่า ปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม levamisole ที่ระดับ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จะมีอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการแลกเนื้อดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม levamisole ที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร จะมีอัตราการเจริญเติบโต, feed intake และ feed efficiency ลดลง และปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม levamisole ที่ระดับ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร จะมีค่าองค์ประกอบเลือดและปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ hematocrit, extracellular superoxide anion production ของเซลล์แมคโครฟาจาบริเวณไตส่วนหน้า, serum lysozyme และ peroxidase สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ levamisole ที่ระดับ 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Li *et al.*, 2006b) สอดคล้องกับการทดลองในปลา gilthead sea bream ซึ่งพบว่าการให้อาหารผสม levamisole ที่ระดับ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 10 วัน มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ในขณะที่ levamisole ในระดับที่สูงขึ้น (250 หรือ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) จะมีผลในการกระตุ้นการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของปลาทดลอง (Mulero *et al.*, 1998)

Novoa และคณะ (1996) รายงานว่าสารชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ macrophage-activating factor (MAF), lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor α (TNF α) และ β -glucans จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีผลต่อการกระตุ้น respiratory burst activity ของเซลล์ macrophage ของไตส่วนหน้าของปลา rainbow trout และพบว่าการกระตุ้น respiratory burst activity จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้สารสองชนิดร่วมกัน เช่น จับคู่ระหว่าง MAF กับ LPS, MAF กับ TNF, MAF กับ Glucan, Glucan กับ TNF และ Glucan กับ LPS