บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ประเทศไทยมีภูมิประเทศที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลจัดเป็นกิจกรรมทางเกษตรที่มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาประเทศอย่างยิ่ง เพราะกุ้งทะเลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีมูลค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ วงจรของธุรกิจกุ้งกุลาดำในประเทศไทยแต่ละปีมีมูลค่านับแสนล้านบาท เกี่ยวข้องกับการจ้างงานไม่ต่ำกว่าสามแสนคน สามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศจากการส่งออกสินค้าดังกล่าวปีละไม่ต่ำกว่า 8 หมื่นล้านบาท ปัจจุบันระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ มีการเลี้ยงแบบหนาแน่นถึงหนาแน่นมาก (48-62 ตัว/ตารางเมตร) โดยใช้ระบบกึ่งปิด หรือระบบปิด (Musig, 2002) ซึ่งทำให้สัตว์น้ำมีความเครียดสูง อ่อนแอและติดเชื้อโรคต่างๆได้ง่าย ทั้งโรคติดเชื้อโปรโตซัว แบคทีเรีย รา และไวรัส ทั้งชนิดที่ไม่รุนแรงและมีความรุนแรงสูงก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก

โรคติดเชื้อไวรัสโดยเฉพาะไวรัสหัวเหลือง (YHV) และตัวแดงดวงขาว (WSSV) เป็นโรคติดเชื้อที่ระบาดรุนแรงมีอัตราการตายสูง โรค YHV มีการระบาดครั้งแรกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2530 ขณะที่โรค WSSV มีการระบาดเป็นบริเวณกว้างในปี พ.ศ. 2535 ในปัจจุบันไวรัสทั้ง 2 ชนิดยังคงระบาดอยู่ทั่วประเทศ การแพร่ระบาดของโรคในพื้นที่ใกล้เคียงมักเกิดจากการใช้น้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส และกระจายไปโดยพาหะนำเชื้อในธรรมชาติ ทั้งกุ้ง ปู และครัสเตเชียอื่นในพื้นที่ห่างไกลกัน เช่น ในประเทศแถบเอเชียการระบาดของโรคมักเกิดขึ้นโดยการเคลื่อนย้ายพ่อแม่พันธุ์ หรือลูกกุ้งที่มีการปนเปื้อนเชื้อ (Takahashi, *et al*., 1994) การระบาดของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ทำให้ประเทศไทยสูญเสียรายได้ไปมากกว่า 150 ล้านบาทต่อปี รวมทั้งส่งผลให้ผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งที่ส่งออกต้องผ่านขั้นตอนการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าวมากขึ้น ถึงแม้ว่าโรคติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดจะมีความรุนแรงและสร้างความเสียหายอย่างมากจนถึงปัจจุบัน แต่มาตรการควบคุมและป้องกันโรคมีเพียงการเตรียมบ่อเลี้ยงที่ปลอดเชื้อ การนำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลซึ่งมีความไวสูงมาใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์และลูกกุ้งก่อนปล่อย รวมทั้งตรวจสอบภาวะการติดเชื้อในช่วงการเลี้ยง เพื่อแยกและทำลายกุ้งที่ติดเชื้อได้ทัน หรือนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ตรวจหาพาหะนำเชื้อและป้องกันไม่ให้ปะปนในบ่อเลี้ยงเป็นต้น ซึ่งวิธีต่างๆ เหล่านี้ก็ไม่สามารถจำกัดพื้นที่ระบาดของโรคได้

ดังนั้นแนวทางอื่นๆ ที่น่าจะนำมาใช้ในการป้องกันและควบคุมการติดเชื้อไวรัสได้คือการใช้วัคซีน สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สารเสริมในอาหารเพื่อลดการติดเชื้อ หรือการใช้สัตว์น้ำที่ทนต่อโรคติดเชื้อ และวิธีการดังกล่าวจะนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อ ผู้ใช้ต้องมีความรู้ความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งอย่างชัดเจน ในปัจจุบันการศึกษาต่างๆเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสของกุ้งทะเลส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาการตอบสนองของกุ้งในขณะที่ติดเชื้อ และจากข้อสังเกตที่เกิดขึ้นในกรณีเกิดการระบาดของโรคไวรัสอย่างรุนแรงมักจะพบว่ากุ้งกุลาดำส่วนหนึ่งหรือกุ้งชนิดอื่นที่ยอมรับเชื้อยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาทดลองเพื่อยืนยันว่ากุ้งรอดตายเหล่านั้นสามารถต้านทานต่อโรคได้มากขึ้น หรือรอดตายเพราะไม่เคยติดเชื้อมาก่อน มีเพียงข้อสันนิษฐานของ Flegel และคณะ (1997) ที่ว่ากุ้งที่เลี้ยงในบ่อที่มีประวัติการระบาดของโรคมาก่อน มีความต้านทานต่อโรคได้มากขึ้น จึงเป็นไปได้ว่ากุ้งสามารถพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันต่อโรคเดิมได้ และรายงานของ Pasharapipas และคณะ (1997) พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในบ่อที่มีโรค YHV ระบาดอย่างรุนแรงในอดีตมีการเจริญเติบโต และมีผลผลิตดีขึ้น แม้ว่าตรวจพบเชื้อ YHV อยู่บ้างในกุ้งบางตัว รวมทั้งมีการตั้งข้อสังเกตว่าการระบาดของโรคในระยะหลังๆ มีความรุนแรงลดลง ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาข้อมูลสนับสนุนข้อสังเกตข้างต้นในเชิงวิทยาศาสตร์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

การวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาเกี่ยวกับความสามารถของกุ้งกุลาดำที่รอดตายจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อไวรัสว่ามีการตอบสนองต่อเชื้อ YHV และ WSSV หรือไม่ มีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องอย่างไรในระดับห้องปฏิบัติการ ถ้าทราบรายละเอียดเบื้องต้นเหล่านี้ ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาวิธีกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และสามารถใช้เป็นข้อมูลศึกษารายละเอียดในระดับยีน และการวิจัยอื่นๆ ให้ครอบคลุมยิ่งขึ้น เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสในกุ้งต่อไปในอนาคต

ตรวจเอกสาร

1. กุ้งทะเล (Marine shrimp)

กุ้งทะเลเป็นสิ่งมีชีวิตไม่มีกระดูกสันหลังที่จำแนกอยู่ใน

ไฟลัมอาร์โทรโปดา (Arthropoda)

คลาสครัสเตเชียน (Class Crustacean)

ซับคลาสมาลาคอสตราคา (Subclass Malacostraca)

ซุบเปอร์ออเดอร์ยูคาริดา (Superorder Eucarida)

ออเดอร์เดคะโปดา (Order Decapoda)

ซับออเดอร์นาแทนเทีย (Suborder Natantia)

เซคชันปีนัยเดีย (Section Penaeidea)

ลักษณะที่สำคัญของสัตว์กลุ่มนี้คือลำตัวแบ่งเป็นข้อปล้องแยกได้เป็น 3 ส่วน คือส่วนหัว (head) ส่วนอก (thorax) และส่วนลำตัว (abdomen) แต่พบว่าส่วนหัวและอกมีการรวมเข้าด้วยกัน จำนวน 14 ปล้อง เรียกว่า Cephalothorax และส่วนลำตัวมี 6 ปล้อง มีระยางค์ยื่นออกมาปล้องละ 1 คู่ มีเปลือกหุ้มลำตัวเป็นโครงสร้างภายนอก (enveloping exoskeleton) เปลือกประกอบด้วยไคตินและโปรตีน โดยชั้นเอพิเดอมิสมีแคลเซียมอยู่มาก ส่วนของเปลือกแต่ละข้อปล้องเชื่อมติดกันด้วยเนื้อเยื่อบางๆ (articular membrane) มีการลอกคราบเป็นระยะๆ เพื่อการเจริญเติบโต

กุ้งทะเลที่ทำการเพาะเลี้ยงกันในหลายๆ ภูมิภาคของโลกมีหลายชนิด เช่นกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งแชบ๊วย (*P. merguiensis*) กุ้งขาว (*P. vannamei*) และกุ้งคุรุมา (*P. japonicus*) เป็นต้น ชนิดที่มีการเลี้ยงกันในประเทศไทยมานานกว่า 40 ปี คือกุ้งกุลาดำ โดยในช่วงแรกๆ การเลี้ยงจะเลียนแบบธรรมชาติ ทำการเปิดเอาลูกพันธุ์กุ้งจากทะเลเข้ามากักไว้ในบ่อเลี้ยงช่วงที่น้ำขึ้นสูงสุด อย่างไรก็ตามเมื่อมีการศึกษาวิจัยและสามารถเพาะพันธุ์ลูกกุ้งกุลาดำได้สำเร็จในโรงเพาะฟัก ทำให้มีการพัฒนาและขยายการเลี้ยงออกไปเป็นบริเวณกว้าง จนปัจจุบันมีการดำเนินการเพาะเลี้ยงประมาณ 550,000 ไร่ ทั่วประเทศ มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ มีการเลี้ยงแบบหนาแน่นมาก (48-62 ตัว/ตารางเมตร) ทำให้ทั่วประเทศสามารถผลิตกุ้งเพื่อเป็นสินค้าส่งออกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 จนถึงปัจจุบันปีละประมาณ 234,000 ตัน (Musig, 2002) โดยมีส่วนแบ่งตลาดกุ้งส่งออกประมาณ 33-34 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลผลิตกุ้งกุลาดำเลี้ยงในประเทศไทย

Table 1 Black tiger shrimp production in Thailand

Year	Culture area (Rai)	Production (ton)
1991	468,750	162,069
1992	456,250	184,884
1993	450,000	225,514
1994	456,250	263,446
1995	450,000	259,541
1996	468,750	230,708
1997	450,000	211,955
1998	443,750	241983
1999	443,750	240,529
2000	500,000	249,633
2001	550,000	255,568
2002	550,000	212,091
2003*	450,000	73,737

*: Production from January – May

ที่มา: Musig (2002); Shrimp News (2003)

2. โรคติดเชื้อในกุ้งทะเล

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกชนิด โดยเฉพาะสัตว์น้ำที่มีคุณค่าสูงทางเศรษฐกิจ มักจะทำในรูปแบบการเลี้ยงที่หนาแน่นถึงหนาแน่นมาก เนื่องจากมีข้อจำกัดหลายๆ ปัจจัยไม่ว่าเป็นขอบเขตของพื้นที่ที่มีอย่างจำกัด ปริมาณน้ำ และคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยง การลำเลียงขนส่งเป็นต้น ทำให้สัตว์น้ำที่อยู่ในสภาพเหล่านี้ เกิดความเครียดและตามมาด้วยโรคติดเชื้อชนิดต่างๆ ในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลก็ประสบปัญหาการระบาดของโรคติดเชื้อหลายชนิดใน 4 กลุ่มหลัก คือโรคติดเชื้อโปรโตซัว รา แบคทีเรีย และไวรัส (ตารางที่ 2) แม้ว่าโรคติดเชื้อโปรโตซัว รา และแบคทีเรีย จะทำให้เกิดโรคได้รุนแรง แต่ในช่วงการเลี้ยงถ้ามีการจัดการที่ดี ก็สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ หรือเมื่อเกิดโรคก็สามารถใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะที่จำเป็นรักษาได้ รวมทั้งในปัจจุบันก็มีการศึกษาวิจัยร่วมจากหลายองค์กรในการผลิตวัคซีน โปรไบโอติก (probiotic) และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ จึงสามารถป้องกันและลดความรุนแรงของโรคเหล่านี้ลงได้

ตารางที่ 2 โรคติดเชื้อในกุ้งทะเล

Table 2 Infectious diseases in marine shrimp

Protozoan and fungi	Bacteria	Virus
Ciliates protozoan	Black gill disease	BMNV, BP, BPSV,
Suctorians protozoan	Epicommensals	GAV, HPV, IHHNV,
Gregarine	Gill brown disease	LPV, LOVV, LOV,
Larval metazoan	Necrotizing hepatopancreatitis	MBV, REO, RPS, SMV,
Microsporidian	Mycobacteriosis	TSV, WSSV, YHV
Haplosporidian	Rickettsial like organism	
Larvae mycosis	Vibriosis	
Fusariosis		

ที่มา: Modified from Brock and Main (1994); Spann *et al*., (1995,1997); Vogt (1996); Lightner *et al*., (1997)

3. โรคติดเชื้อไวรัส

โรคติดเชื้อไวรัสในกุ้งทะเล นับเป็นปัญหาต่อการเลี้ยงและส่งผลกระทบทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรง ทั้งการสูญเสียในระหว่างการผลิตเนื่องจากอัตราการตายสูง การเจริญเติบโตช้า และการสูญเสียทางเศรษฐกิจปีละหลายร้อยล้านบาท เนื่องจากข้อจำกัดในการส่งออกสินค้าที่ต้องผ่านขั้นตอนมากขึ้น โรคติดเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดปัญหาในกุ้งทะเลชนิดต่างๆ มีหลายกลุ่มมีทั้งชนิดที่มีความรุนแรงสูงและต่ำ มีทั้งที่ทำให้เกิดโรคในช่วงระยะใดระยะหนึ่ง หรือทุกระยะของการเจริญเติบโต ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 โรคติดเชื้อไวรัสในกุ้งทะเล

Table 3 Viral diseases in marine shrimp.

Diseases	Nucleic acid	Group	Species	Stages	Distribution areas	References
Monodon baculovirus (MBV)	DNA	Baculovirus	*Penaeus monodon* *P. keratrus* *P. merguiensis* *P. semisulcatus*	Larvae-Adult	Asia Mediterranean Italy, Kenya Tahiti, Hawaii	Lightner and Redman (1981)
Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)	DNA	Parvovirus	*P. monodon* *P. vannamei* *P. stylirostris* *P. japonicus* *P. aztecus* *P. duorarum* *P. merguiensis*	Juvenile-Adult	Hawaii,Tahiti, Florida, Texas, Cayman Islands, Guam, France, Israel, Costa Rica, Belize, Ecuador, Brazil, Panama, Jamaica, Honduras, Singapore, Philippines	Vega-Villasante and Puente (1993); Lightner (1996)
Lymphoid organ parvo-like virus (LPV)	RNA	Parvovirus	*P. monodon*	Juvenile	Australia	Owens, *et al*. (1991)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3 (Continued)

Diseases	Nucleic acid	Group	Species	Stages	Distribution areas	References
Rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)	RNA	Rhabdovirus	*P. vannamei* *P. stylirostris*	Postlarvae -Adult	USA, Ecuador	Lu, *et al*. (1991)
Lymphoid organ vacuolization virus (LOVV)	RNA	Togavirus	*P. vannamei* *P. monodon* *P. chiensis*	Juvenile	USA	Bonami, *et al*. (1992)
Baculovirus mid-gut gland necrosis virus (BMNV)	DNA	Baculovirus	*P. japonicus*	Larvae-Postlarvae	Japan	Lightner (1996)
Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV)	DNA	Parvovirus or Piconavirus	*P. chiensis* *P. vannamei* *P. merguiensis* *P. semisulcatus* *P. monodon*	Postlarvae-adult	Asia, Italy, Mediterranean, Kenya, Tahiti, Hawaii	Lightner and Redman, 1985; Vega-Villasante and Puente (1993)
Reo-like virus (REO)	RNA	Reovirus	*P. monodon* *P. japonicus* *P. vannamei* *Decapod crustacean*	Juvenile	Japan	Vega-Villasante and Puente (1993)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3 (Continued)

Diseases	Nucleic acid	Group	Species	Stages	Distribution areas	References
Baculovirus penaei (BP)	DNA	Baculovirus	*P. setiferus* *P. vannamei* *P. stylirostris* *P. merguiensis* *P. aztecus* *P. duorarum*	Larvae Larvae-Postlarvae Larvae-Postlarvae Juvenile Larvae-Adult Larvae-Adult	USA, Ecuador	Vega-Villasante and Puente (1993); Bruce, *et al.* (1994)
Yellow head virus (YHV)	RNA	Rhabdovirus/ Coronavirus	*P. monodon* *P. vannamei*	Juvenile-Adult	Thailand	Wongteerasupaya, *et al.* (1995 b)
Lymphoid organ virus (LOV)	RNA	Rhabdovirus	*P. monodon*	Juvenile-Adult	Australia	Spann, *et al.* (1995)
Tuara syndrome virus (TSV)	RNA	Piconavirus	*P. vannamei* *P. stylirostris*	Juvenile-Adult	USA, Mexico, Hawaii, Ecuador, Columbia, Peru, Honduras	Jimenez (1992 cited by Hasson, *et al.* 1999); Bonami, *et al.* (1997)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3 (Continued)

Diseases	Nucleic acid	Group	Species	Stages	Distribution areas	References
Bay of Pyran shrimp virus (BPSV)	RNA	Piconavirus/ Parvovirus	*Palaemon elegans*	Juvenile-Adult	Mediterranean Sea	Vogt (1996)
White spot syndrome virus (WSSV)	DNA	Baculovirus	*P. monodon* *P. japonicus* *P. vannamei*	Postlarvae-Adult	Worldwide	Lightner (1996)
Spawner isolated mortality virus (SMV)	DNA	Parvovirus	*P. monodon* *P. japonicus* *P. esculentus* *P. merguiensis*	Adult	Australia, Queensland	Fraser and Owens (1996); Owens, *et al*. (1998)
Gill associate virus (GAV)	RNA	Rhabdovirus	*P. monodon*	Juvenile-Adult	Australia, Queensland	Nadala, *et al.* (1997) Spann, *et al*. (1997)

4. โรคติดเชื้อ WSSV YHV และ MBV/HPV ในกุ้งทะเล

4.1 โรคติดเชื้อ WSSV

โรค WSSV เป็นโรคติดเชื้อที่มีความรุนแรงมากอีกชนิดหนึ่ง แม้ว่าอัตราการตายจะช้าและรุนแรงน้อยกว่าโรค YHV แต่การระบาดของโรคมีการแพร่กระจายออกไปเป็นบริเวณกว้างกว่าโรคติดเชื้อ YHV ลักษณะอาการภายนอกของกุ้งที่เป็นโรคคือสีตัวจะซีดในช่วงแรกๆ แล้วเปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือแดงเรื่อๆ พบจุดขาวบริเวณด้านล่างของเปลือกทั้งส่วนหัวและลำตัว กุ้งจะกินอาหารลดลง และจะทยอยตายเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อาจตายมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3-10 วัน รายงานโรคไวรัสชนิดครั้งแรกในกุ้งคุรุมาที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่นโดยพบว่าเกิดขึ้นในฟาร์มที่นำลูกกุ้งมาจากประเทศจีนเท่านั้น (Nakano, *et al.*, 1994; Takahashi, *et al.,* 1994) หลังจากนั้นก็มีรายงานการระบาดของโรคดังกล่าวอีกหลายภูมิภาค โดยมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไป เช่น RV-PJ (rod shaped nuclear virus of *P. japonicus*) ในญี่ปุ่น ต่อมาเปลี่ยนเป็น PRDV (penaeid rod shape disease virus) และ PAV (penaeid acute viremia) ในปัจจุบัน (Inouye, *et al.*, 1994; 1996) WSDV (white spot disease virus) เป็นชนิดที่มีการระบาดในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในไต้หวัน (Chen, 1995) และ SEMBV (systemic ectodermal and mesodermal baculovirus) เป็นชนิดที่พบและระบาดในกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วยที่เลี้ยงในประเทศไทยเมื่อปลายปี พ.ศ. 2537 (Wongteerasupaya, *et al.,* 1995a) ส่วน WSD (white spot disease) พบในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในอินเดีย (Mohan, *et al.,* 1998) อย่างไรก็ตามชื่อสามัญที่ใช้เรียกกันโดยทั่วไปคือ WSSV (white spot syndrome virus) ตามรายงานของ Lightner (1996) และมีรายงานการระบาดในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในทุกประเทศของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน

นอกจากกุ้งทะเล 3 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว รายงานพบว่า PAV ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้กุ้ง greasyback (*Metapenaeus ensis*) เกิดโรคและตายอย่างรุนแรงเช่นเดียวกับที่ระบาดในกุ้งคุรุมา (Momoyama, *et al*., 1997) และพบว่าครัสเตเชียหลายชนิดติดเชื้อไวรัสนี้ ทั้งในธรรมชาติ บ่อเลี้ยง และห้องปฏิบัติการ แต่ระดับความรุนแรงอาจไม่สูงมาก และนอกจากประเทศในแถบเอเชียแล้ว การระบาดของโรคดังกล่าวยังพบได้ในบางประเทศของทวีปอเมริกาใต้ เช่นปานามา เอควาดอร์ ชิลี และล่าสุดมีรายงานในกุ้งทะเลที่เลี้ยงในทวีปอเมริกาเหนือ (Pantoja and Lightner, 2003) และกุ้งขาวที่นำเข้ามาเลี้ยงในภาคใต้ของประเทศไทย (ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์, 2546)

การศึกษาวิจัยทางชีวโมเลกุลและเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าเชื้อ WSSV เป็นไวรัสชนิดดีเอ็นเอ (DNA) ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Baculovirus อวัยวะเป้าหมายของเชื้อคือเนื้อเยื่อใต้เปลือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อเยื่อบุผิว

เหงือก กระเพาะอาหาร ต่อมน้ำเหลือง แอ่งเลือด และหัวใจ (Takahashi, *et al.,* 1994; Inouye, *et al.,* 1994; Momoyama, *et al.,* 1995; Wongteerasupaya, *et al.,* 1995a; Mohan, *et al*., 1998; Wang, *et al*., 1999; Pantoja and Lightner, 2003)

4.2 โรคติดเชื้อ YHV

โรค YHV มีการระบาดอย่างรุนแรงในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในหลายประเทศในเอเชีย รัฐควีน-สแลนด์ และออสเตรเลีย ในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคชนิดดังกล่าวจึงค่อนข้างมีความหลากหลาย รวมทั้งชื่อของโรคชนิดเดียวกันก็มีความแตกต่างกันตามแหล่งที่รายงานการระบาดระยะแรกๆ เช่น yellow head disease baculovirus (YHDBV) (Limsuwan, 1991) yellow head baculovirus (YBV) (Boonyaratpalin, *et al.*, 1993) yellow head disease หรือ yellow head virus (YHV) (Lightner, 1996) อย่างไรก็ตามเมื่อได้ทำการศึกษาในรายละเอียดต่างๆ มากขึ้นด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพบว่าเป็นโรคชนิดเดียวกันและมีการเรียกชื่อสามัญของโรคเป็น yellow head virus (YHV) ตามรายงานของ Lightner (1996)

ในประเทศไทยโรคติดเชื้อ YHV มีรายงานการระบาดครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2533 บริเวณชายฝั่งของภาคกลาง โดยกุ้งที่แสดงอาการของโรคมีเหงือก ตับและตับอ่อนสีเหลือง ตับบวมโตกว่ากุ้งปกติ ว่ายน้ำช้า และเกยขอบบ่อ ภายในระยะเวลา 2-3 วันของอาการดังกล่าวกุ้งในบ่อจะไม่กินอาหาร และอาจตาย 90-100 เปอร์เซ็นต์ (Limsuwan, 1991) ในปี พ.ศ. 2535 พบการระบาดของโรคดังกล่าวในบริเวณภาคใต้ของประเทศที่มีพื้นที่การเลี้ยงมากว่า 55 เปอร์เซ็นต์ (Flegel, *et al.*, 1992) ทำให้ผู้ที่เกี่ยวข้องมีความตื่นตัวกันมากขึ้นในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับรายละเอียดของโรค และพบว่าอาการดังกล่าวมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส (Boonyaratpalin, *et al.,* 1993; Chantanachookin, *et al.*, 1993) ในปี ค.ศ. 1994 ที่ประเทศควีนสแลนด์และออสเตรเลีย พบกุ้งกุลาดำในธรรมชาติและบ่อเลี้ยงติดเชื้อไวรัสเหมือนกับเชื้อ YHV ที่พบในประเทศไทย (Spann, *et al.,* 1995) หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1995-1996 พบการระบาดของโรคดังกล่าวอย่างรุนแรงในกุ้งกุลาดำเลี้ยงในประเทศ ควีนสแลนด์ (Spann, *et al.,* 1997) และพบว่าเป็นไวรัสชนิดที่มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ YHV ที่พบในประเทศไทย (Cowley, *et al*., 1999) นอกจากกุ้งกุลาดำแล้วยังพบการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกุ้งคุรุมาในประเทศไต้หวัน (Wang, *et al.,* 1996) ปัจจุบันแม้ยังไม่มีการยืนยันที่ชัดเจนแต่มีรายงานว่าพบการติดเชื้อในกุ้งทะเลของทวีปอเมริกาเหนือ (Pantoja and Lightner, 2003) ซึ่งอาจจะแพร่กระจายเข้าไปโดยการนำเข้ากุ้งสดและกุ้งแช่แข็ง (Lightner, *et al*., 1997; Nunan, *et al*., 1998)

การศึกษาทางชีวโมเลกุลเชื้อ YHV เป็นไวรัสอาร์เอ็นเอ (RNA) ที่น่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม Rhabdovirus หรือ Coronavirus และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบว่าอวัยวะเป้าหมายของเชื้อคือต่อมน้ำเหลือง หัวใจ เม็ดเลือด แอ่งเลือด ตับ เยื่อบุกระเพาะอาหาร และเหงือก (Boonyaratpalin, *et al.,* 1993; Wongteerasupaya, *et al*., 1995b; Spann, *et al.,* 1997; Cowley, *et al*., 1999)

4.3 โรคติดเชื้อ Monodon baculovirus และ Hepatopancreatic parvo-like virus (MBV/HPV)

โรค MBV และ HPV แม้ว่าจะเป็นโรคระบาดที่ไม่รุนแรงเมื่อเทียบกับโรค 2 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้น อย่างไรก็ตามไวรัสดังกล่าวก็ส่งผลกระทบอย่างมากในกุ้งกุลาดำระยะอนุบาล ซึ่งผู้ ประกอบการจะต้องผลิตลูกกุ้งให้ปลอดไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ เพราะการติดเชื้อในลูกกุ้งมักส่งผลถึงผลิตผลที่ต่ำกว่าปกติ เมื่อเลี้ยงในบ่อดิน MBV มีรายงานครั้งแรกในลูกกุ้งกุลาดำโดย Lightner และคณะ (1983)กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคจะว่ายน้ำช้าลง ลำตัวมีสีคล้ำ และมีขนาดที่แตกต่างกัน มักพบการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ร่วมกับปรสิต เช่น *Zoothamnium* spp. และแบคทีเรียภายนอกในกลุ่ม filamentous bacteria เช่นเดียวกับกุ้งที่ติดไวรัส HPV แต่พบการเจริญเติบโตของกุ้งที่เป็นโรคนี้ช้ากว่ากุ้งที่ติดเชื้อ MBV อย่างชัดเจน (Vega-Villasante and Puente, 1993) ในระบบการเลี้ยงที่ดีไวรัสทั้ง MBV และ HPV จะไม่ทำให้กุ้งเป็นโรคที่รุนแรง แต่ในสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างในรอบวันช่วงกว้างๆ หรือสภาพพื้นบ่อที่สกปรก และมีกุ้งหนาแน่นความรุนแรงของโรคจะเกิดขึ้นอย่างชัดเจน (Chang and Chen, 1994; Hao, *et al*., 1999)

MBV เป็นไวรัสชนิดดีเอ็นเออยู่ในกลุ่ม Baculovirus ในขณะที่ HPV จัดเป็นชนิดดีเอ็นเอ ซึ่งยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดระหว่างกลุ่ม Piconavirus/Parvovirus ไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีอวัยวะเป้าหมายคือบริเวณตับและตับอ่อน และกุ้งสามารถกำจัดเชื้อบางส่วนออกได้ทางระบบทางเดินอาหาร จึงมักจะพบก้อนโปรตีนของเชื้อไวรัสในลำไส้หรือมูล (Lightner*, et al*., 1983, Vogt, 1992; Vega-Villasante and Puente, 1993) จึงเป็นสาเหตุของการแพร่เชื้อภายในบ่อเพาะและอนุบาลได้ง่าย ทั้งจากแม่กุ้งสู่ลูกกุ้ง และจากลูกกุ้งที่ติดเชื้อสู่กุ้งตัวอื่นๆ ที่อยู่ภายในบ่อเดียวกัน และเนื่องจากไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีอวัยวะเป้าหมายคือตับและตับอ่อนซึ่งมีบทบาทมากในระบบที่เกี่ยวข้องกับการย่อย ดูดซึม และจัดเก็บอาหาร การติดเชื้อไวรัสดังกล่าวถึงแม้ไม่ส่งผลต่อการตายที่รุนแรงในกุ้งบ่อดิน แต่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งอย่างชัดเจน (Chang and Chen, 1994) ยิ่งไปกว่านั้นการเพาะเลี้ยงกุ้งในปัจจุบันพบกับปัญหาการเลี้ยงกุ้งไม่โต หรือโตช้า การติดเชื้อดังกล่าวจึงกลายเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งในการคัดเลือกลูกกุ้งก่อนปล่อย

5. กลไกการป้องกันตัวเองของครัสเตเชียและกุ้งทะเล

กุ้งเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำที่ล้อมรอบด้วยปัจจัยของสิ่งแวดล้อมที่สามารถเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอด รวมทั้งรอบๆ ตัวยังต้องสัมผัสกับสิ่งแปลกปลอมทั้งที่เป็นเชื้อโรคและไม่ใช่เชื้อโรค ถึงแม้ว่ากุ้งหรือสิ่งมีชีวิตในกลุ่มครัสเตเชียจะมีเปลือกแข็งหุ้มอยู่ภายนอก แต่โอกาสที่สิ่งแปลกปลอมเข้าไปในตัวก็เป็นไปอย่างง่าย ไม่ว่าจะเป็นการกินเข้าไป หรือช่วงระยะเวลาที่มีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมอย่างรุนแรง หรือช่วงลอกคราบสัตว์กลุ่มนี้จะมีความอ่อนแอมาก จากการศึกษาพบว่าสัตว์น้ำในกลุ่มอาร์โทรปอดมีการป้องกันตัวเองโดยการดำเนินกิจกรรมของ 2 ระบบหลักๆ คือ

5.1 กลไกการป้องกันตัวเองโดยเซลล์ (Cellular immunity)

การป้องกันตัวโดยเซลล์เป็นกลไกที่มีการแสดงออกในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด แต่วิวัฒนาการที่ต่างกันทำให้กลไกของรายละเอียดในแต่ละชนิดแตกต่างกันสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียการป้องกันตัวดยเซลล์เกิดจากกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือด (hemocytes)เซลล์ฮีมาโตปอยติก (haemotopoietic cells) และเซลล์จับกินอยู่กับที่ (fixed phagocytes) ซึ่งกระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ และทำให้เกิดการแสดงออกในระบบภูมิคุ้มกันทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยเซลล์ต่างชนิดกันมีกระบวนการในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหลายกระบวนการดังนี้

5.1.1 ฟาโกซัยโทซีส (phagocytosis)

กระบวนการฟาโกซัยโทซีสเป็นกลไกที่เกิดโดยเซลล์ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกผ่านเข้ามาในร่างกาย และพบว่าเป็นกลไกพื้นฐานที่มีอยู่ในสัตว์ทั่วไป กระบวนการฟาโกซัยโทซีสเกิดจากการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและโปรตีนเปอร์ออกซิเนคติน (peroxinectin) ในน้ำเลือดช่วยทำให้เกิดการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอม (Soderhall and Cerenius, 1992; Holmblad and Soderhall, 1999) ในครัสเตเชียพบว่าค่าฟาโกซัยโทซีสของเซลล์เม็ดเลือดรวมมีค่าตั้งแต่ 1-28 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำเลือด และปัจจัยแวดล้อมภายนอก (Paterson and Stewart, 1974; Paterson, *et al.*, 1976; Smith and Soderhall, 1983; Soderhall and Cerenius, 1992) ในกุ้งกุลาดำที่ทดลองเลี้ยงในห้องปฏิบัติการพบค่าดังกล่าวอยู่ในช่วง 20-24 เปอร์เซ็นต์ และมีค่ามากกว่า 36 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในบ่อดิน (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543 ก) เซลล์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการฟาโกซัยโทซีสโดยมากเป็นไฮยาลินเซลล์ อย่างไรก็ตามในครัสเตเชียบางชนิด เช่นกุ้งคุรุมาและกุ้งมังกร

(*Sicyonia ingentis*) พบเซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินไม่ทำหน้าที่ในกระบวนการดังกล่าว (Tsing, *et al.,* 1989)

5.1.2 เอนแคปซูลเลชั่นและโนดูลฟอร์เมชั่น (Encapsulation and Nodule formation)

เอนแคปซูลเลชั่นเป็นกระบวนที่เกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมในกลุ่มปรสิตจำนวนมากบุกรุกเข้ามาเกินกว่าที่ร่างกายจะกำจัดได้หมดโดยฟาโกซัยโทซีส กระบวนการเกิดจากเซลล์เม็ดเลือดโดยเฉพาะเซมิแกรนูลาร์ฮีโมไซต์ เข้ามาล้อมจับสิ่งแปลกปลอมในระบบไหลเวียนให้รวมกันด้วยเม็ดเลือดหลายๆชั้น แล้วทำการกำจัดออกนอกร่างกายต่อไป ส่วนโนดูลฟอร์เมชั่นเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีจุลินทรีย์จำนวนมากเข้ามาจนร่างกายไม่สามารถกำจัดได้หมดกระบวน การเริ่มจากเซลล์จับกินกับที่จำนวนไม่มากเกาะติดจุลินทรีย์ไว้และหลั่งสารบางชนิดออกมาหุ้มสิ่งแปลกปลอมไว้เป็นก้อนเล็กๆ บริเวณที่มีการแสดงออกมากของกระบวนการทั้ง 2 ในครัสเตเชียคือในเหงือก แอ่งเลือด ตับและตับอ่อน Smith และ Ratcliffe (1980) พบว่าปูทะเล (*Carcinus maenas*) สามารถกำจัดเซลล์แบคทีเรียออกไปจากระบบไหลเวียนของเลือดอย่างรวดเร็วโดยพบกลุ่มของเม็ดเลือดห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียจำนวนมากในท่อตับและเหงือก ส่วนในกุ้งกุลาดำกระบวนการโนดูลฟอร์เมชั่นมักจะเกิดขึ้นในบริเวณที่เซลล์เม็ดเลือดเข้าไปได้น้อยเช่นบริเวณเหงือก เนื้อเยื่อตับ ต่อมน้ำเหลือง และหัวใจ สำหรับเอนแคปซูลเลชั่นพบได้อย่างชัดเจนในแอ่งเลือด (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543 ค)

5.1.3 โปรฟีนอลออกซิเดสเอกติเวติ้งซิสเต็ม (proPO activating system)

ระบบโปรพีโอมีการศึกษาในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียหลายชนิด การเกิดจุดสีดำหลังการบาดเจ็บและเป็นแผลเป็นแนวทางในการศึกษาค้นคว้าอย่างจริงจังจนพบว่าสารสีดำดังกล่าวเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase; PO: E.C. 1.14.18) ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดในรูปโปรเอนไซม์ที่ไม่แอคทีฟ เรียกว่าโปรพีโอ (proPO; prophenoloxidase) การเปลี่ยนเอนไซม์โปรพีโอให้อยู่ในรูปของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ดำเนินกิจกรรมหลายๆ ขั้นตอนในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมรู้จักกันในระบบที่เรียกว่าโปรฟีนอลออกซิเดสเอกติเวติ้งซิสเต็ม การศึกษากลไกการแสดงออกระบบโปรพีโอใน crayfish น้ำจืด (*Pacifastacus leniusculus*) (Soderhall, *et al.*, 1996; Soderhall and Cerenius, 1998) พบว่าเกิดโดยสารพอลิแซคคาร์ไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ จุลินทรีย์เข้ามาในระบบไหลเวียนและจับกับโปรตีนในพลาสมา เพื่อเข้าจับที่ผนังเซลล์เม็ดเลือดให้เกิดการดีแกรนูเลท (degranulated) แล้วปล่อยเอนไซม์โปรพีโอออกมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ เซอรีนโปรตีเอส (serine protease) ชื่อพีพีเอ (prophenoloxidase activating enzyme, ppA) (Aspan, *et al.*, 1990) ให้เป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งทำหน้าที่ในกระบวนการเมลาไนเซชั่น (melaniza-tion) ต่อไปโดยเอนไซม์ฟีนอล

ออกซิเดสจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนฟีนอล (phenol) ให้เป็น ควิโนน (quinone) ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อโรคและเป็นสารตัวกลางในการฟอร์มเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือเมลานิน (melanin) ซึ่งมีสีดำบนเปลือกและเหงือก รวมทั้งรอบๆ บริเวณที่เกิดฟาโกซัยโทซิส โนดูลฟอร์เมชั่น และเอนแคปซูลเลชั่น หลังจากที่มีปรสิตและแบคทีเรียบุกรุก (Soderhall, 1982; Soderhall and Ajexson, 1982; Cerenius, *et al.*, 1991; Soderhall and Cerenius, 1992; Gote, 1986 อ้างโดย Sung, *et al.*, 1998)

5.1.4 ระบบการแข็งตัวของเลือด (Clotting system)

การลอกคราบ การถูกโจมตีจากศัตรูหรือเชื้อโรค อาจทำให้สัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียเกิดบาดแผล ดังนั้นเพื่อป้องกันการเสียเลือดสัตว์กลุ่มนี้จะต้องมีกลไกที่มีประสิทธิภาพมากพอ การแข็งตัวของเลือดพบว่าเป็นบทบาทที่มีความสำคัญมากในการป้องกันการเสียเลือดของแมงดาทะเล*Tachypleus tridentatus* (Kawabata, *et al.*, 1996) เป็นกระบวนการที่เกิดจากกิจกรรมของโปรตีนที่เกี่ยวข้องจากเซลล์เม็ดเลือดที่เรียกว่า haemocytes derived clotting cascade และกลไกที่ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนส (transglutaminase; TGase) (Kopacek, *et al.*, 1993; Hall, *et al.*, 1999)

เนื่องจากปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโปรตีนทั้งหมดอยู่ในเซลล์เม็ดเลือด เมื่อเกิดบาดแผลโปรตีนต่างๆ ในกลุ่มเซอรีนโปรตีเอสไซโมเจน (serine protease zymogen) ที่มีโครงสร้างและหน้าที่ที่แตกต่างกัน (Muta, *et al.,* 1991, 1993, 1995; Seki, *et al.*, 1994) จะถูกขับออกมาจากแกรนูลของลาร์จแกรนูลาร์ฮีโมไซต์สู่น้ำเลือดอย่างรวดเร็วในรูปเอนไซม์ที่ไม่แอคทีฟ (Kawabata, *et al.*, 1996) เมื่อได้รับการกระตุ้นจากองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลินทรีย์เช่นจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ติดเข้ามาด้วย โปรตีนต่างๆจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่แอคทีฟขึ้นเพื่อไปกระตุ้น proclotting enzyme ซึ่งเป็นเซอรีนโปรตีเอสไซโมเจนเช่นกันให้เป็น clotting enzyme ที่สามารถไปคาตาเลสเพื่อเปลี่ยนโปรตีน coagulogen ที่ละลายน้ำได้อยู่ในรูป coagulin ที่ไม่ละลายน้ำคล้ายเจล (Iwanaga, 1993; Kawabata, *et al.*, 1996) โดยกลไกนี้ในครัสเตเชียปกติจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 นาที และกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นนอกจากป้องกันการสูญเสียเลือดแล้วยังเอาสิ่งแปลกปลอม และเซลล์เม็ดเลือดติดมาด้วย ดังนั้นเชื้อโรคที่ปะปนเข้ามาจึงถูกทำลายโดยกลไกต่างๆ เช่นจากสารในระบบโปรพีโอ หรือโดยสารแอนติไมโครเบียลคอมปาวด์ (antimicrobial compound) ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดและน้ำเลือดเป็นต้น (Kawabata, *et al.*, 1996)

อีกกลไกหนึ่งที่พบในครัสเตเชียหลายชนิด เป็นกระบวนการเกี่ยวข้องกับ clotable proteins (CP) ที่เป็นโอโมไดเมอริคไกลโคโปรตีน (homodimeric glycoprotein) ขนาด 380-400 kDa ซึ่งหลั่งจากเซลล์เม็ดเลือด ใน crayfish น้ำจืด CP ที่แยกได้คือ VHDL (very high density lipoprotein) ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยขนาด 210 kDa (Kopacek, *et al.,* 1993; Hall *et al.*, 1995) แต่ละหน่วยจะมีกรดอะมิ

โนชนิดไลซีนและกลูตามีนเป็นอิสระเมื่อสัตว์น้ำเกิดบาดแผลหน่วยของโปรตีนเหล่านี้เกิดการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนท์ระหว่างไลซีนกับกลูตามีนเรียกว่าพันธะกลูตามีน- ไลซีน (glutamine-lysine bond) โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาจากเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนส และมี Ca^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ (Kopacek, *et al.*, 1993) กระบวนการดังกล่าวนี้สามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่จำเป็นต้องมีการกระตุ้นจากเชื้อโรคเหมือนกับระบบแรก ดังนั้นในกรณีที่เกิดบาดแผลครัสเตเชีย สามารถป้องกันการเสียเลือดโดยใช้กลไกดังกล่าว

5.2 ระบบภูมิคุ้มกันโดยสารน้ำ (Humoral Immune System)

กลไกการป้องกันตัวเองโดยสารน้ำในสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียเป็นที่เข้าใจกันโดยทั่วไปว่าเกิดจากการแสดงออกของสารในซีรัมหรือพลาสมาที่สามารถต้านต่อสิ่งแปลกปลอม (foreign cells or abiotic materials) และจุลินทรีย์ (microorganisms) ได้ ซึ่งคุณสมบัติของสารน้ำที่มีผลในการต้านต่อสิ่งที่บุกรุกเข้ามาในร่างกายอาจมีการแสดงออกในหลายๆ ระบบดังนี้

5.2.1 ระบบที่เกี่ยวข้องกับเลคตินหรือแอคกลูตินิน (Lectin or Agglutinin)

เลคตินหรือแอคกลูตินินเป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน ที่โดยปกติจะไม่มีคุณสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเหมือนกับเอนไซม์อื่นๆ และไม่มีคุณสมบัติที่แสดงออกแบบจำเพาะเจาะจงแบบแอนติบอดี้ แต่คุณสมบัติเด่นของเลคตินคือโปรตีนเกิดการเชื่อมต่อกับโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรท (carbohydrate binding proteins) หลายชนิดที่อยู่บนผนังเซลล์ของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม จึงทำให้เกิดปฏิกิริยารวมกลุ่ม (agglutination activity) ของสิ่งแปลกปลอมได้ จึงกำจัดออกนอกร่างกายได้มากขึ้น การจำแนกเลคตินสามารถแยกได้จากหน่วยโปรตีนที่ใช้จดจำคาร์โบไฮเดรท (carbohydrate recognition domain; CRD) เช่นซีรีแอคทีฟโปรตีน (C-reactive protein) และกลุ่มพอลิแซคคาร์ไรด์บายดิงโปรตีน (polysaccharide binding protein) เป็นต้น

ปัจจุบันนักวิจัยได้หันมาสนใจศึกษากันมากเกี่ยวกับโครงสร้างและหน้าที่ของเลคตินในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ และพบว่าเลคตินในกลุ่มสิ่งมีชีวิตดังกล่าวจัดอยู่ในครอบครัวแพนตาซิน (pantaxins) และเลคตินกลุ่ม C-type ในเดคคาปอดได้ทำการศึกษาและแยกเลคตินออกมาหลายชนิด โดยแต่ละชนิดมีโครงสร้างที่สามารถจดจำคาร์โบไฮเดรท ไกลโคโปรตีน และลิโปพอลิแซคคาร์ไรด์คล้ายๆกัน กลไกการแสดงออกของเลคตินที่พบในครัสเตเชียนอกจากมีบทบาททำให้เกิดการรวมกลุ่มของเชื้อโรคเพื่อให้ร่างกายทำการกำจัดสิ่งแปลกปลอมด้วยกลไกต่างๆ ได้ในปริมาณมากแล้วยังพบว่าเป็นตัวที่ช่วยให้เกิดการเชื่อมต่อของเซลล์สิ่งแปลกปลอมและเซลล์เม็ดเลือดในลักษณะของการทำหน้าที่เป็นออพโซนิน (opsonin role) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับกระบวนการฟาโกซัยโท

ซิสของร่างกาย (Paterson, *et al.*, 1976; Wilson, *et al.*, 1999) และเป็นไปได้ว่าอาจเป็นสารที่ชักนำให้เจ้าบ้านเกิดการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมด้วยระบบอื่นๆ ด้วย การแสดงออกของเลคตินโดยส่วนมากต้องการ divalent cation โดยเฉพาะ Ca^{2+} และ Mg^{2+} คงสภาพที่อุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างได้ในช่วงกว้าง และมีความไวต่อสารที่เป็น chealating agent เช่น EDTA EGTA (Ratanapo and Chulavatnaton, 1990; Nalini, *et al.*, 1994; Sritanyalucksana, 1995; Maheswari, *et al.*, 1997 ; Marques and Barracco, 2000)

5.2.2 ระบบที่เกี่ยวข้องกับแอนติไมโครเบียลคอมปาวด์ (antimicrobial compound)

แอนติไมโครเบียลคอมปาวด์เป็นสารประกอบโปรตีนที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย จึงจัดเป็นสารน้ำอีกประเภทหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในระบบการป้องกันตัวเองของสัตว์ชนิดต่างๆ จัดเป็นสารประกอบที่เป็นภูมิคุ้มกันพื้นฐานของร่างกาย (innate immunity) กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกับครัสเตเชียมากที่สุดคือแมลงก็พบสารประเภทนี้มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการต่อต้านและทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยเฉพาะพวกจุลินทรีย์ที่เข้าสู่ร่างกาย สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ มีสารแอนติไมโครเบียลคอมปาวด์ได้หลายชนิด โดยแต่ละชนิดเป็นโปรตีนที่มีขนาดโครงสร้างและหน้าที่ คล้ายกันและแตกต่างกันไปบางส่วน อย่างไรก็ตามสารประเภทนี้ที่พบในครัสเตเชียสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

5.2.2.1 แอนติแบคทีเรียลคอมปาวด์ (antibacterial compound)

แอนติแบคทีเรียลคอมปาวด์เป็นโปรตีนตรวจพบในเลือดของครัสเตเชียหลายชนิดโครงสร้างที่ชัดเจนของสารประกอบชนิดนี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่พบว่าเป็นสารที่สามารถยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ได้หลายประเภททั้ง แบคทีเรีย ปรสิต และรา รวมทั้งพบว่าบางชนิดสามารถที่จะย่อยทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ แอนติแบคทีเรียลคอมปาวด์ที่มีบทบาทและรู้จักกันดีคือ bactericidins หรือ bactericidal (Smith and Chisholm, 1992; Sritanyalucksana, 1995; Noga, *et al.,* 1996 a, b; Sritanyalucksana, *et al.*, 1999) anti-LPS factor (Tanaka, *et al.*, 1982; Noga, *et al.*, 1996 b) และ quinone ที่เป็นสารตัวกลางในระบบโปรพีโอ และ melanin ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายในระบบดังกล่าวก็จัดว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อราที่เข้าสู่ร่างกายโดยเฉพาะในกรณีที่สัตว์น้ำเกิดการบาดเจ็บบริเวณผิวหนัง (Soderhall and Ajexson, 1982)

สำหรับกลไกการทำงานของแอนติแบคทีเรียลคอมปาวด์ยังไม่เป็นที่ชัดเจนนัก แต่ Noga และคณะ (1996b) พบว่ากลุ่มสารดังกล่าวที่แยกจากปูสีน้ำเงิน (*Callinectes sapidus*) ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารที่มีอยู่นั้นสามารถทำลายเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียในลักษณะที่เรียกว่า membrane active agent เนื่องจากผลการทดสอบพบสารดัง

กล่าวมีการออกฤทธิ์คล้ายกับยาต้านจุลชีพกลุ่มที่เป็น membrane active antibiotic สามารถยับยั้งและทำลายแบคทีเรีย *E. coli* ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน (Boman, 1995) ส่วน กลไกที่ค่อนข้างชัดเจนของสาร anti LPS factor พบสารดังกล่าวมีโครงสร้างบางส่วนที่สามารถเชื่อมต่อบริเวณไลปิดเอ (lipid A) ของลิโปพอลิแซคคาร์ไรด์ที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียชนิดนั้นๆ ไม่สามารถเจริญและผลิตสารที่เป็นพิษต่อเจ้าบ้านได้ (Kawabata, *et al.*, 1996)

5.2.2.2 แอนติไมโครเบียลเปปไทด์ (antimicrobial peptide)

เปปไทด์เป็นสารน้ำที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรคในแมลงและครัสเตเชีย เปปไทด์เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างแบบที่หนึ่ง และแบบที่สอง ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กและมีคุณสมบัติเป็นประจุบวก ขนาดที่แยกได้ในสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียก็แตกต่างกัน ชนิดที่พบมักเป็นกลุ่มที่ 2 3 และ 4 ตามการจำแนกของ Hetru และคณะ (1998) ซึ่งมีโครงสร้างในแต่ละกลุ่มแตกต่างกันแต่มีลักษณะที่เป็น proline-rich เหมือนๆกัน ในสัตว์น้ำชนิดหนึ่งๆ สามารถที่จะแยกเปปไทด์ที่มีกลไกยับยั้งและทำลายเชื้อโรคได้มากกว่า 1 ชนิด เช่นในแมงดาทะเล (*T. tridentatus*) พบสารน้ำดังกล่าวมีโครงสร้างแตกต่างกันถึง 4 ชนิดคือ tachyplesin big defensin S_2 และ Factor D ซึ่งมีโครงสร้าง ขนาดและการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน เช่นมีผลให้การผ่านเข้าของ K^+ สูงขึ้น หรือส่งผลให้เส้นใย (hyphae) มีรูปร่างที่ผิดปกติเป็นต้น (Lehrer, *et al.*, 1991; Gabay and Almeida, 1993; Katsu, *et al.*, 1993; Ganz and Lehrer, 1994 ; Saito, *et al.,* 1995) ในกุ้งขาวพบเปปไทด์ชื่อ penaeidin และการศึกษาการแสดงออกในระดับยีนของเปปไทด์ชนิดนี้พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแกรมลบและไม่มีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอซึ่งเป็นชนิดก่อโรคในกุ้ง (Destoumieux, *et al.*, 1999) ส่วน Bachere และคณะ (2000) พบว่าสาร penaeidin ปริมาณ 5 ไมโครโมล สามารถยับยั้งรา *Fusarium oxysoprum* โดยทำให้เส้นใยมีรูปร่างที่ผิดปกติ ในขณะที่ความเข้มข้นสูงขึ้น 10 ไมโครโมล สามารถออกฤทธิ์ฆ่าสปอร์ของ *Fusarium* sp. ที่ก่อโรคในกุ้งได้ ปัจจุบันนักวิจัยได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับบทบาทของ penaeidin ในระบบป้องกันตัวเองของสัตว์กลุ่มอาร์โทรปอดมากขึ้น (Destoumieux, *et al.*, 1997)

5.3 Reactive Oxygen Intermediates (ROIs)

ในการดำรงของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดเกี่ยวข้องกับออกซิเจนเสมอ เพราะจำเป็นต้องใช้ในกระบวนการหายใจ และดำเนินกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ สารอนุมูลอิสระที่เกิดจากเมตาบอไลต์ของออกซิเจนในขั้นตอนต่างๆ มีอยู่หลายชนิดเรียกว่า Reactive oxygen intermediates (ROIs) เช่น อนุมูลของซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O^-_2) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อนุมูลของไฮดรอกซิลไอออน (OH^-) และ

singlet oxygen (O_2^1) ซึ่งดูเหมือนว่าสารดังกล่าวที่เกิดขึ้นจะเป็นสาร ประกอบที่เป็นพิษกับเซลล์ อย่างไรก็ตามถ้าสารดังกล่าวเกิดขึ้นในเป้าหมายและเวลาที่เหมาะสมก็จะเป็นตัวที่สามารถใช้ในการยับยั้งป้องกันเชื้อโรคได้ เช่นในกุ้งกุลาดำพบว่าปริมาณ O_2^- จะเกิดสูงขึ้นเมื่อเซลล์เม็ดเลือดล้อมจับจุลินทรีย์และสิ่งแปลกปลอมต่างๆไว้ โดยเฉพาะจากกระบวนการ ฟาโกซัยโทซิส แล้วปล่อย O_2^- ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ออกมาด้วย (Song and Hsieh, 1994) สัมพันธ์กับรายงานของ Holmblad และ Soderhall (1999) ที่ว่าระดับ ROIs ในปริมาณที่เข้มข้นมากพอจะยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคและทำลายโครงสร้างเซลล์ของสิ่งแปลกปลอมได้ นอกจากนั้น ROIs น่าจะมีประโยชน์ในเชิงการป้องกันการฉวยโอกาสของเชื้อโรคในกรณีที่สัตว์น้ำได้รับบาดเจ็บด้วย เพราะ Munoz และคณะ (2000) พบว่าเซลล์ของกุ้งขาวมีการผลิต O_2^- อย่างต่อเนื่องในระดับที่สูงขึ้นเมื่อมีการปนเปื้อนของสารฆ่าเชื้อรา (propiconazone) และสารที่มีความเป็นด่างสูง (Dulbecco's PBS) ซึ่งอาจเป็นกลไกที่ไปลดความเจ็บปวดหรือ เป็นการปรับตัวที่บ่งชี้ถึงสภาพความเครียดที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บ ซึ่งถ้ามีเชื้อโรคเข้ามาทางบาดแผล O_2^- ก็สามารถยับยั้งเชื้อโรคได้ จากการทดลองในสัตว์ไม่มีกระดูกสันบางชนิด เช่นหอยสองฝาพบว่าปริมาณของ ROIs ที่ปล่อยจากเม็ดเลือดจะสัมพันธ์กับความเครียด การเกิดบาดแผล และการติดเชื้อซึ่งเป็นกลไกที่ป้องกันการฉวยโอกาสและลดการติดเชื้อโรค (Adema, *et al.*, 1991)

5.4 คิลลิ่งแฟกเตอร์ (Killing factors)

นอกจากระบบที่เกี่ยวข้องกับเลคติน แอนติไมโครเบียลคอมปาวด์ และROIs แล้วในครัสเตเชียยังพบกลไกการป้องกันตัวในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ อีกดังนี้

5.4.1 ไลซิน (Lysin)

ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชีย ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารชนิดนี้น้อยมากซึ่งการศึกษาที่มีจะมุ่งเน้นเกี่ยวกับสารฮีโมไลซิน (haemolysin) ที่มีกลไกการทำงานเช่นเดียวกับระบบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ผลการศึกษาคุณสมบัติของไลซินในกุ้ง *P. californiensis* พบว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์เซอรีนโปรตีเอส (Guzman, *et al.,* 1993) ซึ่งผลการยับยั้งดังกล่าวทำให้เม็ดเลือดแตก และการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี้ (monoclonal antibody) ที่มีความจำเพาะกับสารดังกล่าว (41B12) ตรวจสอบในกุ้งคุรุมาพบโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้ายกับ α_2-immunoglobulin อยู่บน เมมเบรนของเซลล์เม็ดเลือด โดยเฉพาะในไฮยาลินเซลล์ และเซมิแกรนูลาร์ฮีโมไซต์ เมื่อทำการแยกชนิดของโปรตีนพบว่าประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ขนาด 180 kDa มีคุณสมบัติสลายเม็ดเลือดแดงได้ (Rodriguez, *et al.*, 1995) นอกจากนั้น Sottrup-Jonsen (1989) พบโปรตีนขนาด 150 kDa ใน crayfish น้ำจืด (*Pacifastacus leniusculus*) ที่

คาดน่าจะเป็นสารในกลุ่มไลซินเนื่องจากโปรตีนดังกล่าวมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน

5.4.2 Precipitin

เช่นเดียวกับไลซินสารที่มีคุณสมบัติในการตกตะกอนสิ่งแปลกปลอม (precipitin) ในครัสเตเชียมีรายงานค่อนข้างน้อย แต่ Osawa และ Yambuui (1963 อ้างโดย Smith and Chisholm, 1992) พบสารบางชนิดใน crayfish (*Procambarus clarki*) มีปฏิกิริยาทำให้เม็ดเลือดแดงแกะตกตะกอนได้เล็กน้อย ส่วน Stewart และ Foley (1969 อ้างโดย Sritanyalucksana, 1995) พบว่าสารบางชนิดในเลือด American lobster (*H. americanus*) ทำให้วัสดุที่เคลือบด้วยโบวีนซีรัมอัลบูมิน ตกตะกอน อย่างไรก็ตามกลไกการตกตะกอนที่เกิดขึ้นยังไม่มีรายงานการศึกษาที่ชัดเจน แต่ในเบื้องต้นพบว่ามีกลไกที่แตกต่างจากเลคตินที่เกิดจากการใช้โครงสร้างที่สามารถจับกับสิ่งแปลกปลอมและทำให้เกิดปฏิกิริยาการรวมกลุ่ม ในขณะที่ precipitin ทั้ง 2 ชนิดที่รายงานข้างต้น ไม่มีโครงสร้างดังกล่าวในการเชื่อมต่อกับสิ่งแปลกปลอม

5.4.3 Cytotoxicity and Neutralizing Factors

ในครัสเตเชียมีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของสาร cytotoxic อยู่ค่อนข้างน้อย ใน Australian crayfish บางชนิดพบสารที่มีคุณสมบัติทำให้เซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบตาย เช่นเดียว กับที่พบว่าสารบางชนิดในน้ำเลือด European crayfish (*Astacus astacus*) สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ แต่รายละเอียดในการแสดงออกของสารดังกล่าวยังไม่มีรายงาน ส่วนบทบาทของสารที่สามารถลบล้างฤทธิ์ (neutralization activity) ยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสนั้นก็มีการศึกษาไม่มากนัก ในกลุ่ม ครัสเตเชียได้มีการทดลองแยกพลาสมากุ้งคุรุมาที่รอดจากการติดเชื้อ PAV มาทดสอบปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์พบว่าสารในพลาสมาสามารถทำลายเชื้อไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Venegas, *et al.*, 2000) เช่นเดียวกับการศึกษาในกุ้งขาวต่อการต้านเชื้อ TSV (Hasson, *et al.,* 1999) อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังขาดการศึกษาถึงโครงสร้างและคุณลักษณะทางชีวเคมีของสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าว เนื่องจากมีข้อจำกัดเรื่องเซลล์เพาะเลี้ยงและการเตรียมเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์และมีปริมาณมากพอสำหรับการทดสอบ เพื่อหลีกเลี่ยงผลที่เกิดจากปัจจัยอื่นที่ปนเปื้อนมาทั้งในส่วนของพลาสมาและส่วนของเชื้อที่นำมาใช้

6. ระบบภูมิคุ้มกันกึ่งจำเพาะ (Quasi Immune System)

จากการสังเกตและตั้งข้อสันนิษฐานที่เกิดขึ้นในระยะไม่นานมานี้คาดว่ากุ้งอาจจะมีระบบป้องกันตัวเองแบบจำเพาะเจาะจง เนื่องจากพบว่าการระบาดของโรคติดเชื้อ WSSV หรือ YHV ในกุ้งกุลาดำช่วงแรกๆ มีความรุนแรงสูง แต่ลดลงในปีหลังๆ จึงคาดว่ากุ้งน่าจะมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันตัวเองเพื่อต้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดนั้นๆได้มากขึ้น (Flegel, *et al.,* 1997; Pasharawipas, *et al*., 1997; Flegel and Pasharawipas, 1998) การศึกษาของ Venegas และคณะ (2000) ที่ทำการฉีดเชื้อ PAV ให้กุ้งคุรุมาที่รอดตายจากการติดเชื้อไวรัสชนิดเดียวกัน พบกุ้งรอดตายมีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อเดิมสูงมาก (RPS 64-77 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสมาก่อน Hasson และคณะ (1999) รายงานว่ากุ้งขาวที่ติดโรค TSV มีการสร้าง spheroid ในต่อมน้ำเหลืองมากขึ้น เช่นเดียวกับ Anggraeni และ Owens (2000) ที่พบ spheroid ในต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ WSSV ในระหว่างการเลี้ยง แต่ไม่พบหรือพบได้น้อยในกุ้งขนาดเดียวกันที่ไม่ติดเชื้อ จากข้อมูลดังกล่าวจึงตั้งข้อสันนิษฐานว่า spheroid ที่สร้างขึ้นน่าจะเกี่ยวข้องกับระบบต่อต้านเชื้อไวรัส นอกจากนั้น พจนพร (2544) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ WSSV มีการพัฒนากลุ่มยีนแตกต่างจากกุ้งปกติ เช่นตรวจพบยีนกลุ่มที่เหมือนกับ chromosome 21 (interferon/ interleukin) ซึ่งยีนดังกล่าวในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทำหน้าที่ควบคุมการสร้างสารในกลุ่มไซโตไคน์ ที่มีฤทธิ์ขัดขวางการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส และเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบต่างๆ (Cooper *et al*., 1996; Bogdan, 2000 อ้างโดย พจนพร, 2544) เช่นเดียวกับ Rojtinnakorn และคณะ (2002) พบยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นในกุ้งคุรุมาที่ติดเชื้อ PAV และ Bangrak (2003) พบว่าเมื่อติดเชื้อ WSSV กุ้งจะสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการติดต่อระหว่างเซลล์มากขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลรายงานเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองเมื่อเกิดการติดเชื้อต่างกัน หรือเมื่อได้รับสิ่งแปลกปลอมอื่น เช่นยีสต์ว่าเหมือนหรือต่างกันอย่างไรเมื่อเกิดการติดเชื้อ WSSV และในกรณีที่ติดเชื้อแล้วรอดตายการตอบสนองของยีนและระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเดิมหรือเชื้ออื่นๆจะมีแนวโน้มเป็นอย่างไร ซึ่งข้อมูลเหล่านี้น่าจะทำการศึกษาต่อให้ชัดเจนมากขึ้นในอนาคต

7. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในครัสเตเชียและกุ้งทะเล

กลไกการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรคในครัสเตเชียและกุ้งทะเลมีหลายๆ รูปแบบทั้งโดยเซลล์และโดยสารน้ำ ซึ่งมีกลไกการทำงานร่วมกัน เช่นการกำจัดเชื้อโรคโดยเซลล์เม็ดเลือดในกระบวนการเอนแคปซูลเลชั่นจะต้องได้รับการกระตุ้นจากสารน้ำจึงจะมีประสิทธิภาพดี และกระบวนการในระบบโปรพีโอเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นจากสิ่งภายนอกเช่นเซลล์แบคทีเรีย ยีสต์ และราเป็นต้น ดังนั้นการที่จะประยุกต์เอาสารกระตุ้นต่างๆ มาใช้เพื่อกระตุ้นการทำงานของกระบวนการ

ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันของครัสเตเชียและกุ้งทะเลก็น่าจะเป็นอีกแนวทางในการป้องกันจัดการโรคติดเชื้อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น จากรายงานต่างๆ พบว่าแหล่งของสารกระตุ้นที่นำมาใช้ในครัสเตเชียและกุ้งทะเลมีดังนี้

7.1 สารกระตุ้นจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์หรือสารสกัดที่แยกจากผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (microorganism) เช่น รา ยีสต์ และแบคทีเรีย ทำให้กุ้งมีความสามารถในการต้านทานโรคมากขึ้น ซึ่งการกระตุ้นมีหลายรูปแบบ ทั้งวิธีการแช่ การฉีด และการผสมอาหารให้กิน และใช้ทั้งชนิดเซลล์เป็น เซลล์ตาย สารที่ผลิตออกมานอกเซลล์ และสารประกอบภายในเซลล์ เป็นต้น โดยแต่ละชนิดและแต่ละวิธีที่ให้ก็ให้ผลที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามพบว่าการศึกษาเกี่ยวกับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเลและในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียจากจุลินทรีย์มักจะเน้นภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งพอจะประมวลได้ว่าการใช้วัคซีนและสารกระตุ้นจะช่วยป้องกันการเกิดโรคติดเชื้อได้ดีขึ้นในขณะที่ได้รับวัคซีน หรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำเท่าที่มีการศึกษากันเป็นแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune response) ที่ทำการตอบสนองขณะที่มีสิ่งแปลกเข้าสู่ร่างกาย หรืออาจเป็นเพราะเชื้อหรือสารที่นำมาใช้มีประสิทธิภาพไม่ดีพอ จึงทำให้ระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อเชื้อโรคไม่ชัดเจน

ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้จุลินทรีย์ต่อเชื้อไวรัสยังมีข้อมูลไม่มากนัก เช่นกิจการ ศุภมาตย์ และสิทธิ บุณยรัตผลิน (2538) ทดลองให้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Vibrio* sp. แก่กุ้งกุลาดำโดยวิธีการแช่ พบว่าหลังแช่วัคซีนเป็นเวลา 10 วัน ค่าความว่องไวของเม็ดเลือดกุ้งในการจับกินสิ่งแปลกปลอมมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่กุ้งที่ทดลองไม่มีความต้านทานต่อเชื้อ YHV อย่างไรก็ตามเมื่อทดลองผสมเปปทิโดกลัยแคนในอาหารให้กิน 8 สัปดาห์ พบว่านอกจากกุ้งเจริญ เติบโตดี มีอัตรารอดสูงกว่าชุดควบคุมแล้วกุ้งยังสามารถทนต่อโรคติดเชื้อ YHV เพิ่มขึ้นด้วย (Boonyaratpalin, *et al*., 1995) ส่วน Hennig และคณะ (1998) พบว่ากุ้งคุรุมาที่ได้รับอาหารผสม เปปทิโดกลัยแคนมีความสามารถในการต้านต่อเชื้อ PR-DV ได้ดีขึ้น เช่นเดียวกับ Chang และคณะ (1999) ที่พบว่าลูกกุ้งและกุ้งกุลาดำวัยรุ่นที่ได้รับการกระตุ้นด้วยอาหารที่ผสมบีตา-1,3-กลูแคน (β-1, 3 glucan) มีความสามารถในการต้านต่อเชื้อไวรัส WSSV ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน Huang และ Song (1999) พบว่ากุ้ง

กุลาดำที่ได้รับบีตา-1,3-กลูแคนที่ได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยการฉีดสามารถป้องกันการติดเชื้อ WSSV ได้ในระดับหนึ่ง เป็นต้น

7.2 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากพืช

นอกจากจุลินทรีย์การศึกษาเกี่ยวกับสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากแหล่งอื่นๆ พบว่าสามารถทำให้กุ้งทะเลมีความต้านทานต่อโรคติดเชื้อไวรัสได้มากขึ้นเช่น Takahashi และคณะ (1998) ทดลองใช้ fucoidan ที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Cladosiphon okamuranus* พบว่ากุ้งคุรุมาที่ได้รับอาหารผสม fucoidan มีความต้านทานต่อเชื้อ PAV ได้ดีกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับผลการศึกษาของสุประภา ทองประภา (2545) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสม fucoidan จากสาหร่ายทะเลและแพลงก์ตอนพืชมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อเชื้อ WSSV เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าความต้านทานต่อโรคที่เกิดขึ้นนั้น มาจากปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสโดยความเข้มข้นของสาร fucoidan ที่อยู่ในร่างกายกุ้งเอง หรือสารบางชนิดในfuciodan มีคุณสมบัติกระตุ้นให้กุ้งสร้างระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อเชื้อไวรัสได้ ข้อมูลที่จะสามารถนำมาอธิบายได้ จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อในอนาคต

7.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้เชื้อไวรัส

นอกจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถกระตุ้นให้กุ้งมีระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นแล้ว พบว่ากุ้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสก็มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อเดิมได้ เช่น Venegas และคณะ (2000) และ Wu และคณะ (2002) รายงานว่ากุ้งคุรุมาที่รอดตายจากการติดเชื้อ PAV ครั้งแรกมีการต้านต่อเชื้อชนิดเดิมได้สูงขึ้น หรือข้อมูลจากการสังเกตพบว่ากุ้งกุลาดำที่นำมาเลี้ยงในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคติดเชื้อ YHV อย่างรุนแรงมาก่อนจะมีความต้านทานต่อโรคเดิมที่ระบาดได้มากขึ้น โดยพบว่าแม้ในกุ้งเหล่านั้นจะมีเชื้อ YHV อยู่ก็สามารถเจริญเติบโตและให้มีผลผลิตที่สูงขึ้นได้ จึงคาดว่าสภาวะดังกล่าว น่าจะโน้มนำให้กุ้งมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อเชื้อไวรัสชนิดเดิมได้ (Flegel, *et al.,* 1997; Pasharawipas, *et al.*, 1997; Flegel and Pasharawipas, 1998) อย่างไรก็ตามข้อมูลการทดลองที่ใช้สนับสนุนสมมุติฐานหรือยืนยันข้อสังเกตเบื้องต้นในกุ้งกุลาดำ ก็ยังไม่มีรายงานเช่นเดียวกัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อเชื้อ WSSV และ YHV ของกุ้งกุลาดำที่ผ่านการติดเชื้อจาก 3 สภาวะคือกุ้งที่ถูกเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV และ YHV ในห้องปฏิบัติการและกุ้งติดเชื้อ MBV/HPV จากบ่อเลี้ยง

2. เพื่อศึกษาระยะเวลาของการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV และYHV ต่อการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส 2 ชนิดคือ WSSV และYHV ที่ทำการเหนี่ยวนำให้ติดซ้ำ

3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV และ YHV ในระยะเวลาต่างๆ และศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ผ่านการติดเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิด