บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. โรคติดเชื้อสำคัญในกุ้งกุลาดำ

โดยทั่วไปการเกิดโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำมักจะสัมพันธ์โดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม หรือมลภาวะต่าง ๆ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง และนำไปสู่การเพิ่มการยอมรับเชื้อโรคต่าง ๆ โดยที่โรคติดเชื้อที่สำคัญในกุ้งกุลาดำ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงในระดับอุตสาหกรรมมักจะมีสาเหตุจากแบคทีเรีย และไวรัส โดยเฉพาะโรคไวรัสหัวเหลือง (Yellow head disease) และโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot disease) มีรายงานการตรวจพบการติดเชื้อไวรัสชนิด *Baculovirus penaei* (BP) เป็นครั้งแรกในกุ้งกลุ่ม penaeid ในฟาร์มเลี้ยง (Couch, 1974a,b) แต่ไวรัส BP ที่ตรวจพบไม่ได้มีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งมากนัก ต่อมาในช่วงปี 1980 ซึ่งอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งได้ขยายตัวอย่างรวดเร็ว มีรายงานการพบโรคติดเชื้อ Baculovirus midgut gland necrosis (BMN) ในกุ้ง *Penaeus japonicus* ในญี่ปุ่น (Sano *et al.*, 1981) โรค Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ในกุ้ง *P. stylirostris* ในแถบอเมริกา (Lightner *et al.*, 1983) และ Monodon baculovirus (MBV) ในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ในไต้หวัน (Lin, 1989) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง ต่อมาก็มีรายงานการระบาดของไวรัสที่รุนแรงยิ่งขึ้นในแถบเอเชีย ได้แก่ Yellow head virus (YHV) และ White spot syndrome virus (WSSV) ซึ่งมูลค่าของความเสียหายเป็นหลายพันล้านเหรียญสหรัฐในช่วงตั้งแต่ปี 1993 ถึง 1999 (Flegel and Alday-Sanz, 1998)

1.1 โรค Yellow-Head Virus (YHV)

โรคติดเชื้อไวรัส YHV มีรายงานครั้งแรกในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในประเทศไทย (Limsuwan, 1991) ระหว่างปี 1992 - 1993 การระบาดของโรคไวรัส YHV ได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยเป็นมูลค่ากว่า 40 ล้านเหรียญ (Flegel *et al.*, 1997) การตายของกุ้งที่เกิดจากเชื้อ YHV เริ่มลดลงตั้งแต่ปี 1996 แต่การแพร่ระบาดของไวรัสชนิดนี้ยังคงมีอยู่ และยังคงก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำใน หลายประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ ไต้หวัน จีน อินโดนีเซีย มาเลเซีย และฟิลิปปินส์ (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1997) มีรายงานการติดเชื้อ YHV ในสภาพธรรมชาติในกุ้งกุลาดำ และในสภาพการทดลองของกุ้งชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *P. japonicus*, *P. vannamei*, *P. setiferus*, *P. aztecus*, *P. duorarum* และ *P. stylirostris*

เชื้อ YHV เป็น RNA virus (Wongteerasupaya *et al.*, 1995) ในกลุ่ม Coronavirus มีอนุภาคเป็นรูปแท่ง ความยาวประมาณ 173 ± 13 และกว้างประมาณ 44 ±6 นาโนเมตร (Chantanachookin *et al.*, 1993) เชื้อ YHV มักก่อให้เกิดการติดเชื้อในกุ้งระยะวัยรุ่นจนถึงระยะก่อนโตเต็มวัย (premature)(Boonyaratpalin *et al.*, 1993) ที่มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 5 - 15 กรัม อวัยวะเป้าหมายของ YHV ได้แก่ ต่อมน้ำเหลือง เม็ดเลือด และเหงือก (Chantanachookin *et al.*, 1993) กุ้งที่ติดเชื้อ YHV จะสังเกตเห็นส่วนหัวและอกมีสีเหลืองชัดเจนขึ้น เนื่องจากมีการติดเชื้อบริเวณตับและตับอ่อน (Limsuwan, 1991)

1.2 โรค White Spot Syndrome Virus (WSSV)

มีรายงานโรคติดเชื้อ WSSV ครั้งแรกในกุ้ง *P. japonicus* ที่เลี้ยงในญี่ปุ่นในช่วงปี 1993 ในระยะแรกมีการตั้งชื่อไวรัสชนิดนี้ว่า Penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) หรือ Rod-shaped nuclear virus of *P. japonicus* (RV-PJ) หลังจากนั้นมีการแพร่ระบาดไปทั่วเอเชีย อเมริกา และละตินอเมริกา (Bondad *et al.*, 2001; OIE, 1999; OIE, 2000a,b; Subasinghe *et al.*,2001) ก่อให้เกิดความสูญเสียต่อผลผลิตกุ้งทุกชนิดและในทุกประเทศต่อปีสูงถึงหนึ่งพันล้านเหรียญสหรัฐ WSSV เป็นเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงสูงสุด พบว่ากุ้งในกลุ่ม penaeid ทุกชนิดที่เลี้ยงในฟาร์มสามารถยอมรับเชื้อชนิดนี้ได้ และชนิดที่ติดเชื้อในธรรมชาติ ได้แก่ *P. chinensis*, *P. indicus*, *P. merguiensis*, *P. monodon*, *P. setiferus*, *P. stylirostris* และ *P. vannamei* (Bondad *et al.*, 2001)

เชื้อ WSSV เป็น DNA virus แบบสายคู่ รูปร่างเป็นแท่ง อยู่ในกลุ่ม Baculovirus อนุภาคไวรัสประกอบด้วยนิวคลีโอแคปสิดที่ล้อมรอบด้วย trilaminar envelope อนุภาคไวรัสมีขนาดความยาว 250-280 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 120 นาโนเมตร (Lightner, 1996) กุ้งที่ติดเชื้อ WSSV จะมีอัตราการตายอย่างรวดเร็ว ซึ่งมักจะสัมพันธ์กับความผิดปกติภายนอกของกุ้งใกล้ตาย เช่น ลักษณะของ inclusion body กลม สีขาวหรือจุดขาวบนเปลือก inclusion body ที่เกิดขึ้นบริเวณเปลือกจะมีขนาดตั้งแต่เป็นจุดเล็ก ๆ ไปจนถึงมีเส้นผ่านศูนย์กลางหลายมิลลิเมตร และอาจจะเชื่อมติดกันเป็นแผ่น บางครั้งอาจจะพบสีลำตัวของกุ้งเปลี่ยนเป็นสีแดง (Alday de Graindorge and Flegel, 1999; Lightner, 1996; Wongteerasupaya *et al.*, 1995) อาการของโรคจะพัฒนาไปโดยกุ้งจะไม่กินอาหาร และภายใน 2-3 วัน กุ้งที่ใกล้ตายจะว่ายน้ำขึ้นมาใกล้ขอบบ่อ กุ้งที่ติดเชื้อ WSSV จะแสดงลักษณะของพยาธิสภาพที่ค่อนข้างจำเพาะ พบว่าเนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดจากชั้น ectoderm และ mesoderm ของกุ้งใกล้ตายจะมีเซลล์ที่มีขนาดของนิวเคลียสใหญ่ขึ้น และมี basophilic central inclusion ล้อมรอบด้วย marginated chromatin โดยจะเริ่มต้นด้วยการเกิด eosinophilic Cowdry type-A inclusion แต่จะสิ้นสุดด้วยการเกิด basophilic inclusion บริเวณนิวเคลียส (Chou *et al.*, 1995)

1.3 โรค Vibriosis

โรค vibriosis มีสาเหตุจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น (short rod) มีหลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ ได้แก่ *V. harveyi, V. vulnificus, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. penaeicida* และ *Vibrio* sp. (Vanderzant and Nickelson, 1972; Mohney *et al.*, 1994; Lightner, 1996; Gomez *et al.*, 1998; Roque *et al.*, 1998; Aguirre *et al.*, 2001) มีรายงานการแพร่ระบาดของโรค vibriosis ในกุ้งขาว (*P. vannamei*) ในประเทศเอกัวดอร์ เปรู โคลัมเบีย และอเมริกากลาง (Lightner, 1996; Cuellar *et al.*, 1998) และมีรายงานในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) และ *P. merguiensis* ในไต้หวัน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไทย (Chen *et al.*, 1992; Nash *et al.*, 1992; Johnson, 1994) โดยส่วนใหญ่จะพบการติดเชื้อในกุ้งระยะโพสต์ลาร์วา และระยะวัยรุ่น (Lightner, 1996)

โรค vibriosis เป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยเฉพาะในโรงเพาะฟัก กุ้งที่ติดเชื้อมักจะมีอัตราการตายร้อยเปอร์เซ็นต์ (Brock and Main, 1994; Hu and Tao, 2000) โดยปกติพบว่าเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* จะเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้ง แต่จะพัฒนาเป็นเชื้อก่อโรคและมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม สาเหตุหลักที่ทำให้กุ้งติดเชื้อมาจากภาวะเครียด อันเนื่องจากระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่นสูง และการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมภายในบ่อ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน ความเป็นกรดด่าง และการปนเปื้อนของสารพิษ โดยกุ้งที่อยู่ในภาวะเครียดจะมีความต้านทานโรคลดลง จึงมีโอกาสติดเชื้อได้ง่ายขึ้น (Burrell *et al.*, 1991; Nash *et al.*, 1992; Mohney *et al.*, 1994; Mikulski *et al*, 2000; Labric, 2001) ในระยะแรกของการติดเชื้อจะพบแบคทีเรียอยู่บริเวณผิวเปลือก แล้วจะเข้าสู่ภายในทางบาดแผลหรือทางเดินอาหารของกุ้ง (Brock and Main, 1994; Gomez *et al.*, 1998) บริเวณที่พบการติดเชื้อ *Vibrio* ได้แก่ เหงือก กระเพาะอาหาร ต่อมน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ ผิวใต้เปลือก น้ำเลือด และตับอ่อนของกุ้งทั้งในฟาร์มเพาะเลี้ยงและกุ้งในธรรมชาติ (Chen *et al.*, 1992; Lightner *et al.*, 1992) กุ้งที่เป็นโรค vibriosis จะแสดงอาการผิดปกติ ได้แก่ ลำไส้ว่างเปล่า ตับเหี่ยว และอาจพบตุ่มสีน้ำตาลในตับ บริเวณลำตัวและระยางค์มีรอยแผลสีน้ำตาล (Brock and Main, 1994)

กุ้งที่เป็นโรค vibriosis จะแสดงอาการของโรคทั้งแบบเฉียบพลันโดยกุ้งจะมีการตายอย่างรวดเร็ว และแบบเรื้อรัง ซึ่งกุ้งจะแสดงลักษณะและพฤติกรรมภายนอกที่ผิดปกติ ได้แก่ ไม่กินอาหาร ว่ายน้ำแบบไร้ทิศทาง และมักขึ้นมาอาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำและขอบบ่อ เนื่องจากมีปริมาณออกซิเจนในเลือดต่ำ (hypoxia) (Robertson *et al.*, 1998) พบการอักเสบและรอยแผลสีดำหรือน้ำตาล บริเวณเปลือก ระยางค์และเหงือก กล้ามเนื้อขุ่น ระยางค์ขาด (Takahashi *et al.*, 1985; Sinderman, 1990; Brock and Main, 1994) กรณีที่มีการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหาร ตับและตับอ่อน พบว่าจะมีการตายของเนื้อเยื่อตับ และมี vacuole ภายใน (Lightner,

1993; Robertson *et al.*, 1998) ในตับอ่อนจะมีการสร้างก้อนไขมัน (lipid vacuolation) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำรองน้อยลง (Anderson *et al.*, 1988; Cuellar *et al.*, 1998) นอกจากนี้อาจพบ septic haemocytic nodules ในต่อมน้ำเหลือง หัวใจ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก ตับและตับอ่อน antennal gland ปมประสาท แพนหาง และกล้ามเนื้อ (Anderson *et al.*, 1988, Mohney *et al.*,1991; Jiravanichpaisal and Miyazaki, 1994)

2. การตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Shrimp defense mechanisms)

การตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียประกอบด้วยกลไกต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับเลือด (haemolymph) และเซลล์เม็ดเลือด (haemocytes) เซลล์เม็ดเลือดกุ้งจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาสู่ระบบไหลเวียนของกุ้ง กระบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ ได้แก่ การจับกินสิ่งแปลกปลอมโดยวิธี phagocytosis, การล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) และการเกิดโนดูล (nodule formation) นอกจากนี้เซลล์เม็ดเลือดกุ้งยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสมานแผล (wound healing) โดยที่เซลล์เม็ดเลือดจะมีการเกาะกลุ่มกัน (cellular clumping) และชักนำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด (coagulation) ซึ่งเป็นผลมาจากการปล่อยสารที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพของน้ำเลือด (plasma gelation) เซลล์เม็ดเลือดกุ้งยังเป็นตัวกลางในกระบวนการผลิตเมลานิน (melanin production) ผ่านระบบ prophenoloxidase (proPO) system ระบบ proPO ซึ่งอยู่ภายในเม็ดเลือดจะเป็นกลไกสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งเมลานิน (melanization) และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย โดยที่ proPO จะถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนไปเป็น phenoloxidase (PO) โดยเอนไซม์ serine protease ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของสารยับยั้ง (inhibitors) บางชนิด เช่น alpha-2- macroglobulin

นอกจากนี้เซลล์เม็ดเลือดกุ้งยังเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และปลดปล่อยโมเลกุลของสารสำคัญเข้าสู่ระบบไหลเวียน ได้แก่ alpha-2- macroglobulin, agglitinins และ antibacterial peptides ต่าง ๆ โดยเฉพาะ antibacterial peptides ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงเชื้อราต่าง ๆ จัดเป็นกลไกที่สำคัญในกระบวนการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) เซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง มี 3 ชนิด ประกอบด้วย large granular haemocytes (LGH), small granular haemocytes (SGH) และ agranular haemocytes หรือ hyaline cells (HC) โดยที่เซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดจะมีขนาด รูปร่าง และบทบาทหน้าที่แตกต่างกันไป เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าสามารถใช้การนับปริมาณของเม็ดเลือดทั้งหมด (Total haemocyte count, THC) และปริมาณเม็ดเลือดแต่ละชนิด (Differential haemocyte count, DHC) เป็นดัชนีในการบ่งชี้สุขภาพและการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้งได้ โดยพบว่ากุ้งหลายชนิดจะมีปริมาณ THC ลดลงเนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น การติดเชื้อ สภาพการขาดออกซิเจน (hypoxia situation) และปริมาณ THC ของกุ้งจะเพิ่มสูงขึ้น

ในช่วงของการลอกคราบ (ecdysial period) (Le Moullac and Haffner, 2000; Rodriguez and Le Moullac, 2000)

- **Phagocytosis**

กระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมโดยวิธี phagocytosis เป็นกลไกที่สำคัญของการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันโดยเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง (cellular defense) ระหว่างกระบวนการ phagocytosis เซลล์หรืออนุภาคของสิ่งแปลกปลอม หรือจุลชีพจะถูกกลืน (internalized) เข้าไปอยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือด และกลายเป็น digestive vacuole ที่เรียกว่า phagosome การกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีนี้จะสัมพันธ์กับการปลดปล่อยเอนไซม์ย่อยสลายเข้าไปใน phagosome และการผลิต reactive oxygen intermediates (ROIs) โดยเฉพาะ ROIs จะเป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (respiratory burst) ซึ่งจะมีการปลดปล่อย superoxide anion (O_2^-) รวมถึงผลผลิตอื่น ๆ เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radicals (OH^-) และ singlet oxygen ($^1O_2$) hydrogen peroxide ที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็น hypochlorous acid ($HOCl^-$) โดยระบบ myeloperoxidase (MPO)- H_2O_2 - Cl system เกิดเป็นระบบที่สามารถทำลายเซลล์แบคทีเรีย (antibacterial system) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การศึกษากระบวนการ phagocytosis ในกุ้ง ส่วนใหญ่จะใช้การสังเกตกระบวนการกำจัดเชื้อแบคทีเรียหรือวัสดุที่เป็นอนุภาคเล็ก ๆ (particulate materials) ที่ฉีดเข้าไปในตัวกุ้ง แต่วิธีการนี้มักจะให้ผลที่ไม่ชัดเจนนัก ระยะหลัง ๆ จึงได้มีการพัฒนาวิธีการวัดอัตรา phagocytosis ในกุ้งโดยใช้หลักการวัดอัตราการเกิด oxidative metabolism (respiratory burst) ของเซลล์เม็ดเลือดชนิด hyaline โดยการตรวจวัดปริมาณ O_2^- ภายในเซลล์ ซึ่งใช้เทคนิค Nitro blue tetrazolium (NBT) reduction และตรวจวัดปริมาณของ O_2^- ที่ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์จากการลดลงของ ferricitochrome C หรือการตรวจวัดปริมาณของ H_2O_2 ซึ่งวัดได้จากการเกิด oxidation (horseradish peroxidase (HRP)-dependent oxidation) ของ phenol red อย่างไรก็ตามแม้ว่า respiratory burst จะเป็นกลไกสำคัญในการกำจัดแบคทีเรียของกุ้ง แต่ก็พบว่าเชื้อก่อโรคหลาย ๆ ชนิดในกุ้งสามารถที่จะพัฒนาความสามารถในการต้านทานต่อกลไกนี้ได้ เช่นในกรณีของกุ้งขาว *P. vannamei* ที่พบว่ากุ้งไม่สามารถผลิต O_2^- ตอบสนองต่อการติดเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่มีความรุนแรงสูงได้ แต่ในทางตรงกันข้ามกลไกนี้สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยเชื้อ *V. alginolyticus* หรือ *Escherichia coli*

- **Prophenoloxidase activating (proPO) system**

proPO activating system ของกุ้งจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตเมลานินเอนไซม์ PO จะเป็นผลผลิตจากการกระตุ้นเอนไซม์ proPO มีการศึกษาในกุ้งกลุ่ม penaeid พบว่าระบบ proPO จะสัมพันธ์โดยตรงกับเม็ดเลือดชนิด LGH และ SGH โดยเฉพาะโปรตีนชนิด

peroxinectin ซึ่งเป็นโปรตีนขนาด 76 kDa ที่พบในเม็ดเลือดกุ้ง โปรตีนชนิดนี้จะมีคุณสมบัติในกระบวนการ cell adhesion, degranulation, opsonization และ peroxidase activity เกิดจากการกระตุ้นโดย ปฏิกิริยาของเอนไซม์ PO สามารถตรวจวัดได้จากสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับ L-dihydrophenylalanine (L-DOPA) เกิดเป็น dopachrome ระบบ proPO สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบสุขภาพของกุ้งและสภาพสิ่งแวดล้อมได้โดยตรง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ของระบบ proPO จะสัมพันธ์โดยตรงกับภาวะการติดเชื้อและความแปรผันของสภาพแวดล้อม

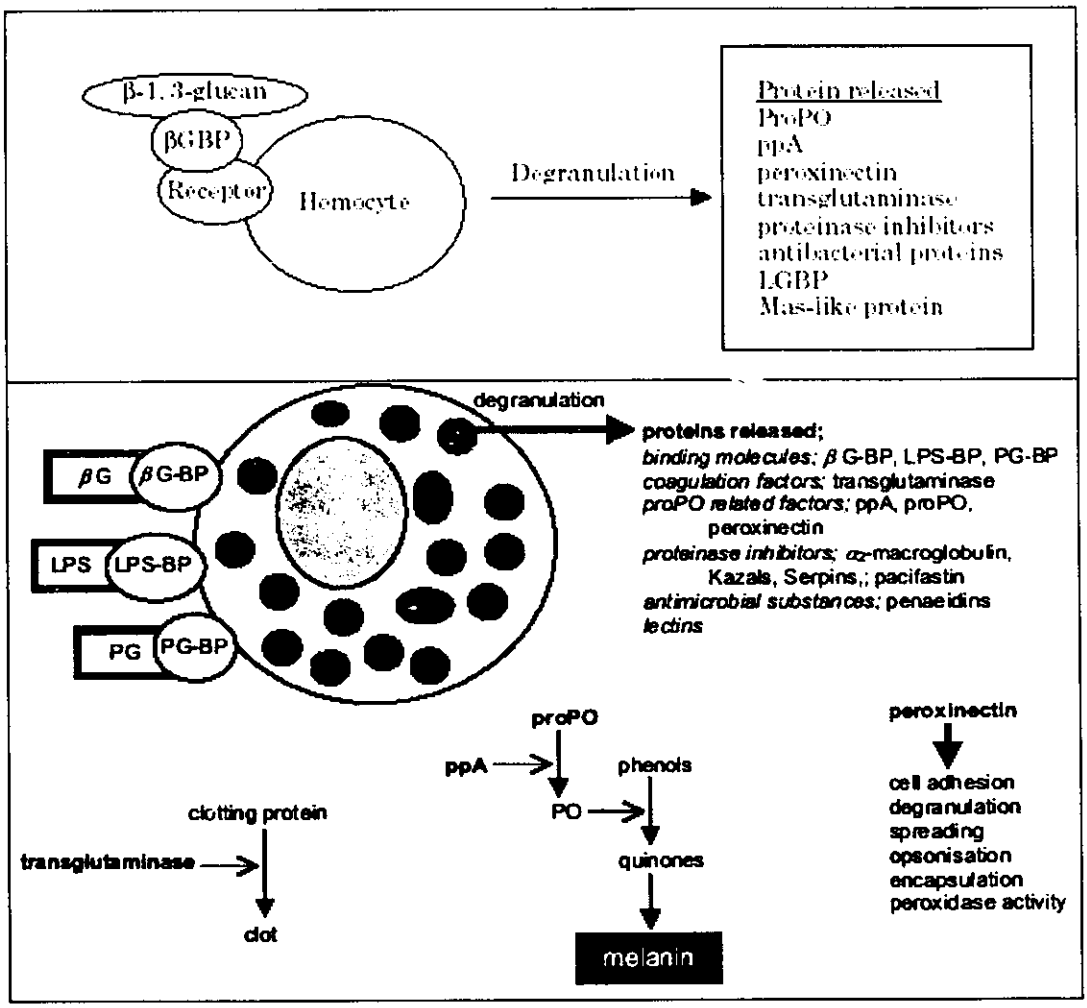
- **Humoral components**

น้ำเลือดของกุ้งจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial activity) ได้ ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำเลือดของกุ้งมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดแบคทีเรีย(antibacterial peptides) หลายชนิด เช่น penaeidins หรือ bactericidins ของกุ้งกลุ่ม penaeid ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ จากการศึกษาพบว่าสามารถใช้ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรีย (bactericidal acitivity) ของสารในน้ำเลือดกุ้งเป็นดัชนีบ่งชี้สภาพแวดล้อมของการเลี้ยงได้ นอกเหนือจากโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแล้ว ในน้ำเลือดกุ้งยังมีโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลไกในการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกัน เช่น respiratory proteins หรือ haemocyanin, clotting proteins ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการแข็งตัวของเลือด รวมถึงสารน้ำอื่น ๆ (humoral components) อีกหลายชนิด ได้แก่ lipopolysaccharide-binding protein (LPS-BP), beta-glucan binding protein (BGBP), peptidoglycan binding protein (PG-BP), alpha-2- macroglobulin และ agglutinin ความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำเลือดกุ้งมักจะสัมพันธ์กับสรีรวิทยาของกุ้งโดยตรง และโปรตีนเหล่านี้มักจะเกี่ยวข้องกับการยอมรับเชื้อ หรือการตอบสนองโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำเลือดกุ้งจะลดลงเมื่ออุณหภูมิของน้ำอยู่ที่ระดับต่ำสุดหรือสูงสุดในรอบปี ระยะหลังการลอกคราบ (postmount stage) ในภาวะที่น้ำมีปริมาณออกซิเจนละลายต่ำ หรือภาวะการติดเชื้อ เป็นต้น (Le Moullac and Haffner, 2000; Rodriguez and Le Moullac, 2000)

โดยสรุป กลไกการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันที่สำคัญที่สุดของกุ้งจะเกี่ยวข้องกับเม็ดเลือด เริ่มต้นจากการที่เม็ดเลือดทำงานร่วมกับโปรตีนในน้ำเลือด (recognition proteins) ซึ่งมีหน้าที่แยกแยะสิ่งแปลกปลอม (recognize) และเกาะติด (bind) ที่ผนังเซลล์ของจุลชีพต่าง ๆ จากนั้นโปรตีนเหล่านี้จะเกาะติดที่ผนังเซลล์เม็ดเลือด และกระตุ้นให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือด (degranulation) ปลดปล่อยโมเลกุลของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ออกมา ได้แก่ pro-enzymes หลายชนิด รวมทั้งสารตั้งต้น (substrate) ต่าง ๆ, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด, prophenoloxidase activating system และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ซึ่งถูก

ปล่อยออกมาจากเซลล์เม็ดเลือด เช่น BG-BP, LPS-BP, PG-BP, phenoloxidase (PO), prophenoloxidase activating enzyme (ppA), prophenoloxidase (proPO), transglutaminase ทำหน้าที่กระตุ้นการแข็งตัวของเลือด และ peroxinectin ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดอื่น ๆ แตกตัว นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นสาร opsonin และ encapsulation promoting factor

การกระตุ้นการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดและกลไกต่าง ๆ ของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เช่น prophenoloxidase system, clotting system จะถูกควบคุมด้วย proteinase inhibitors ที่สำคัญได้แก่ alpha-2-macrogrobulin, Kazals, Serpins และ pacifastin เป็นต้น (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงกลไกการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้ง (ที่มา: van de Braak, 2002)

3. ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมที่สัมพันธ์กับการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้ง

เป็นที่ทราบดีว่าการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม (environmental factors) ได้แก่ คุณภาพน้ำ ฤดูกาล การปนเปื้อนของสารพิษต่าง ๆ จะมีอิทธิพลโดยตรงต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม การเจริญเติบโต การลอกคราบ และโดยเฉพาะระบบภูมิคุ้มกันและความสามารถในการยอมรับเชื้อของกุ้ง แต่การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ กับความสามารถในการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกัน และการยอมรับเชื้อของกุ้งยังมีอยู่อย่างจำกัด เนื่องจากยังคงขาดรูปแบบการทดลอง (experimental model) ที่เป็นมาตรฐาน

- **อุณหภูมิน้ำ (Water temperature)**

จากการศึกษาพบว่าปัจจัยของอุณหภูมิของน้ำเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญที่สุดซึ่งจะส่งผลต่ออัตราเมตาบอลิซึม การใช้ออกซิเจน การเจริญเติบโต การลอกคราบ และอัตราการรอดของกุ้ง นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีอิทธิพลโดยตรงต่อปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ อีกด้วย เช่น ความเค็ม และออกซิเจนละลาย มีรายงานการศึกษาในกุ้งมังกร *Homarus americanus* พบว่าที่อุณหภูมิ 10 และ 15 °C เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งสามารถจับกินเซลล์แปลกปลอมโดยวิธี phagocytosis ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 4°C และบางรายงานพบว่า phagocytosis ของเม็ดเลือดกุ้งที่อุณหภูมิ 20°C จะสูงกว่าที่ 22°C รายงานการศึกษาในกุ้ง brown shrimp (*Penaeus californiensis*) พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิจาก 18°C ไปเป็น 32°C จะมีผลต่อปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้ง 2 ปัจจัย คือปริมาณของ proPO จะลดลงที่ 32°C ในขณะที่โปรตีนในน้ำเลือด (plasma protein) จะเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิ 28°C และ 32°C และการศึกษาในกุ้ง *P. stylirostris* พบว่าอุณหภูมิที่ลดลงจาก 27 °C เป็น 18°C จะมีปริมาณของเม็ดเลือดรวม (THC) ลดลงประมาณ 40% ในขณะที่ PO เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Le Moullac and Haffner, 2000)

- **ออกซิเจนละลาย (Dissolved oxygen)**

ปัจจัยคุณภาพน้ำอีกประการหนึ่ง คือปริมาณออกซิเจนละลาย พบว่าปริมาณของออกซิเจนที่ลดลงจะส่งผลต่ออัตราเมตาบอลิซึมของกุ้งโดยตรง ทำให้อัตราการเจริญเติบโต และความถี่ในการลอกคราบลดลง เป็นสาเหตุการตายของกุ้ง โดยทั่วไปกุ้งที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำจะมีการปรับตัวโดยการลดอัตราเมตาบอลิซึม และปรับความดันออสโมติกในเลือด จากการศึกษาการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้งที่เผชิญกับภาวะออกซิเจนต่ำ (hypoxia) ประมาณ 1 mg/L ประมาณ 24 ชั่วโมง โดยการวัดปริมาณเม็ดเลือดรวม (THC), ปริมาณเม็ดเลือดแต่ละชนิด (DHC), PO activity และ respiratory burst (phagocytosis) พบว่าภาวะออกซิเจนต่ำจะชักนำให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งลดลง เนื่องจากการลดลงของเม็ดเลือดชนิด semi-granular cells และ hyaline cells ในทางกลับกัน PO activity จะเพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์

กับการลดลงของสารยับยั้ง (plasma inhibitors) ที่ควบคุมการทำงานของระบบ proPO นอกจากนี้ยังพบว่ากุ้งยังมีอัตรา phagocytosis ลดลงด้วย Direkbusarakom and Danayadol (1998) ได้รายงานการศึกษาในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่อยู่ในภาวะออกซิเจนต่ำ พบว่ากุ้งจะมี phagocytic activity ลดลง และความสามารถในการกำจัดเชื้อโรคของน้ำเลือด (clearance efficiency) จะลดลงประมาณ 50%

- **ความเค็ม (Salinity)**

เป็นที่ยอมรับว่าการเจริญเติบโตสูงสุดของกุ้งจะเกิดขึ้นเมื่อกุ้งอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็น isoosmotic เนื่องจากเป็นสภาพที่กุ้งจะใช้พลังงานต่ำสุดในระบบการควบคุมสมดุลของของเหลวในร่างกาย (osmotic regulation) อย่างไรก็ตามความเค็มจะมีผลค่อนข้างน้อยต่ออัตราเมตาบอลิซึมของกุ้งที่สามารถทนความเค็มได้ในช่วงกว้าง (euryhaline shrimp) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าพลังงานที่กุ้งกลุ่มนี้ต้องใช้ในกระบวนการ osmotic regulation อาจจะน้อยมาก ในทางกลับกันภายใต้สภาพการติดเชื้อก่อโรค เช่น ไวรัส ของกุ้ง ความเครียดที่เกิดขึ้นจากการที่ความเค็มของน้ำสูงขึ้นอาจจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งช้าลงเนื่องมาจากการติดเชื้อได้ จากการศึกษาในกุ้ง *P. paulensis* พบว่าปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งที่เลี้ยงที่ความเค็ม 34 ppt จะสูงกว่าของกุ้งที่เลี้ยงที่ความเค็ม 22 และ 13 ppt ประมาณ 20% ส่วนผลการศึกษาในกุ้ง *P. californiensis* ที่เลี้ยงที่ระดับความเค็มต่าง ๆ กัน พบว่าความเค็มที่เพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ proPO แต่ความเค็มไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในเลือด

- **แอมโมเนีย (Ammonia)**

แอมโมเนียในน้ำมีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์น้ำและสามารถทำให้เกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ ในระบบการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่น ปัญหาของปริมาณแอมโมเนียในบ่อเลี้ยงสูง เนื่องมาจากการขับถ่ายของสัตว์น้ำ และการเกิด ammonification ของอาหารที่ตกค้างเป็นปัญหาที่พบบ่อยที่สุด ข้อมูลเกี่ยวกับผลของแอมโมเนียต่อสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาในด้านความเป็นพิษของแอมโมเนียที่สัมพันธ์กับกระบวนการเมตาบอลิซึม และ osmoregulation การศึกษาผลต่อระบบภูมิคุ้มกันยังมีอยู่อย่างจำกัด มีการศึกษาในกุ้ง *P. stylirostris* พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณของแอมโมเนีย 1.5 mg/L จะมีปริมาณของเม็ดเลือดลดลง 15% และกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณของแอมโมเนีย 3.0 mg/L จะมีปริมาณของเม็ดเลือดลดลง 50% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการสังเคราะห์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ proPO และ peroxinectin ของกุ้งภายใต้สภาวะเครียดนี้จะลดลงถึง 60 และ 50% ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณเม็ดเลือด และกระบวนการ phagocytosis (Le Moullac and Haffner, 2000)

4. องค์ประกอบเลือดและปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกันที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคในกุ้ง

การเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาหลายประการในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกลุ่ม crustacean สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขภาพของสัตว์ได้ Paterson และคณะ (1987) รายงานว่าปริมาณเม็ดเลือดรวม (THC) ที่ลดลงของ crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) สามารถบ่งชี้ถึงสภาวะการติดเชื้อปรสิต หรือในกุ้ง *P. stylirostris* ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดลดลงในสภาวะที่ปริมาณออกซิเจนต่ำ จะเป็นปัจจัยโน้มนำให้การติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. รุนแรงขึ้น (Le Moullac *et al.*, 1998) จากการศึกษาในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) พบว่าหลังจากการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบกับกุ้งปกติ (กิจการ และคณะ, 2543a) อย่างไรก็ตามแม้ว่าปริมาณเม็ดเลือดจะใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงภาวะการติดเชื้อของกุ้งได้ แต่ปัจจัยอื่น ๆ บางประการที่เกี่ยวข้อง เช่น ระยะของการลอกคราบ ก็อาจมีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดด้วย Yu และคณะ (1993) และ Le Moullac และคณะ (1997) พบว่าปริมาณเม็ดเลือดของกุ้ง *P. japonicus* และ *P. stylirostris* จะสูงสุดในช่วงก่อนการลอกคราบ สอดคล้องกับรายงานของ กิจการ และคณะ (2543b) ซึ่งศึกษาในกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้พบว่าสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงที่แตกต่างกันก็มีผลโดยตรงต่อปริมาณเม็ดเลือด Smith และคณะ (1995) รายงานว่าปริมาณเม็ดเลือดของกุ้ง *P. japonicus* ที่เลี้ยงในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของของเสียจากชุมชนจะลดลง นอกจากนี้อุณหภูมิของน้ำยังมีผลต่อปริมาณเม็ดเลือด กิจการ และคณะ (2543c) พบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำ (25 °C) จะมีปริมาณเม็ดเลือดต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิสูง (30 °C)

Rodriguez และ Le Moullac (2000) พบว่าสามารถใช้องค์ประกอบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ radical oxygen intermediates (ROIs) ซึ่งเกิดจากกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity) ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ปฏิกิริยาของเอนไซม์ Phenoloxidase (PO) ปฏิกิริยาการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) และ plasma protein เป็นดัชนีบ่งชี้สุขภาพและการเกิดโรคของกุ้งในกลุ่ม penaeid ได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Le Moullac และ Haffner (2000) ซึ่งศึกษาผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ THC, antibacterial activity, phagocytic activity และปฏิกิริยาของเอนไซม์ prophenoloxidase (proPO) ใน marine crustacean นอกจากนี้ Pichs และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาในกุ้ง *P. schmitti* โดยการวัดปริมาณการปลดปล่อย superoxide anion (O_2^-) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการจับกินเซลล์สิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* และสรุปว่าปริมาณที่เพิ่มขึ้นของอิออนดังกล่าวสามารถใช้บ่งชี้สภาพการติดเชื้อของกุ้งได้ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Munoz และคณะ (2000) ซึ่งพบว่า white shrimp (*P. vannamei*) ที่ได้รับเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* sp. จะมีปริมาณของ O_2^- เพิ่มสูงขึ้น

Song และคณะ (2003) ได้รายงานการศึกษาผลของการติดเชื้อไวรัส Taura syndrome virus (TSV) ต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อ TSV จะมีปริมาณของเม็ดเลือดรวม (THC), ปริมาณของเม็ดเลือดชนิด hyaline, ปริมาณของเม็ดเลือดชนิด granulocyte และปริมาณโปรตีนรวมในน้ำเลือดลดลง 21%, 24%, 17% และ 56% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งปกติ นอกจากนี้ยังพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อยังมีปริมาณของโปรตีน haemocyanin และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting proteins) ลดลง 67% และ 80% ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งที่ติดเชื้อจะมีปริมาณของ superoxide anion (O_2^-) และ phenoloxidase (PO) เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ plasma bacterial agglutinin ที่ตอบสนองต่อเชื้อ *E. coli* และ *V. harveyi* รวมถึงความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) ในน้ำเลือด

สำหรับองค์ประกอบเลือดอื่น ๆ เช่น ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (total phosphorus) ปริมาณโปรตีน แคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) โปแตสเซี่ยมอิออน (K^+) และแมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากกุ้งกุลาดำติดเชื้อไวรัส white spot baculovirus (WSBV) (Zhang *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณคอปเปอร์อิออน (Cu^{2+}) ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำจะลดลงหลังการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและตัวแดงดวงขาว (กิจการ และคณะ, 2543a) Sung และ Sun (1999) ใช้ปริมาณของ lysozomal enzymes ได้แก่ เอนไซม์ acid phosphatase, alpha-naphthyl acetate esterase และ beta-glucuronidase วัดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำและกุ้งก้ามกรามที่ถูกกระตุ้นโดยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) หรือเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus*