บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ WSSV และ YHV

การทดสอบเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) และเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ในกุ้งกุลาดำขนาดเดียวกัน และเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเหมือนกัน พบว่าเชื้อ YHV เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงและส่งผลให้กุ้งกุลาดำตายเร็วกว่าเชื้อ WSSV เนื่องจากพบปริมาณเชื้อดังกล่าวทำให้กุ้งกุลาดำปกติขนาด 4-6 กรัม ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 15 วัน มีความเจือจางกว่าเชื้อ WSSV ประมาณ 1,000 เท่า ชี้ให้เห็นว่าการทดสอบการเกิดโรคในห้องปฏิบัติการมีความสอดคล้องกับการระบาดของโรคในสภาพแวดล้อมจริงๆ ที่พบว่าการระบาดของโรคติดเชื้อ YHV ทำให้กุ้งกุลาดำมีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3-5 วัน (Chantanachookin, *et al.,* 1993) ขณะที่การระบาดของโรค WSSV อาจกินเวลา 5-10 วัน หลังจากกุ้งเริ่มแสดงอาการ (จิราพร เกษรจันทร์ และคณะ, 2538; Chou, *et al.,* 1995) เมื่อพิจารณาถึงอวัยวะเป้าหมายของเชื้อทั้ง 2 ชนิดแล้ว ความรุนแรงของเชื้อ YHV น่าจะเกี่ยวข้องกับการที่เชื้อ YHV สามารถเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดและเพิ่มปริมาณเชื้อในอวัยวะดังกล่าวได้ดีกว่าเชื้อ WSSV (van de Braak, *et al*., 2002a) ซึ่งทราบกันดีอยู่แล้วว่าเซลล์เม็ดเลือดเป็นเซลล์หลักที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชีย (Soderhall and Cerenius, 1992) นอกจากนั้นการที่เชื้อเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายและเพิ่มจำนวนได้มากในระบบเลือดยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อแพร่กระจายไปสู่ส่วนต่างๆ ของร่างกายได้อย่างรวดเร็ว โอกาสการเกิดโรคและอัตราการตายจึงสูงขึ้นด้วยเช่นเดียวกัน

สำหรับผลการศึกษาโรคที่เกิดจากเชื้อ WSSV พบว่ากุ้งที่เกิดโรคชนิดนี้และมีอัตราการตายสูงนั้น กุ้งจะต้องได้รับเชื้อครั้งแรกในปริมาณมาก หรือได้รับเชื้ออย่างต่อเนื่อง เพราะเมื่อฉีดกุ้งด้วยเชื้อไวรัสที่ความเจือจางต่ำกว่าค่า LD_{50} 200 เท่า กุ้งบางส่วนเริ่มไม่กินอาหารและแสดงอาการเป็นโรคภายในวันที่ 2-3 หลังจากนั้นกุ้งทยอยตายเรื่อยๆ จนตายทั้งหมดภายใน 18 วัน ซึ่งสาเหตุการตายในช่วงแรก น่าจะเกิดจากเมื่อกุ้งได้รับเชื้อแล้วร่างกายไม่สามารถกำจัดเชื้อออกจากร่างกายได้ เซลล์เป้าหมายต่างๆ จึงถูกทำลาย แต่กุ้งที่ทยอยตายในวันหลังๆ อาจจะกำจัดเชื้อหรือลดปริมาณเชื้อที่เข้าสู่ร่างกายได้ อย่างไรก็ตามจากการสังเกตพบว่าเมื่อมีกุ้งตายในช่วงเวลาที่ไม่สามารถเก็บออกจากถังเลี้ยงได้ (เว้นระยะเวลาในการเก็บทุกๆ 5-6 ชั่วโมง) จะถูกกุ้งตัวอื่นๆ กินขาว่ายน้ำ เหงือก ตับและตับอ่อนจนหมด ดังนั้นจึงทำให้กุ้งกุลาดำซึ่งสามารถกำจัดเชื้อออกได้ในครั้งแรกมีโอกาสรับเชื้อซ้ำอีก เหตุการณ์ดังกล่าวสอดคล้องกับ

การระบาดของโรคในบ่อดิน ที่มักพบกุ้งที่ติดเชื้อและตายในยอถูกกุ้งตัวอื่นๆ กินอวัยวะต่างๆ และในเวลาต่อมากุ้งที่มีขนาดใหญ่เริ่มแสดงอาการติดเชื้อและตาย ดังนั้นการแพร่เชื้อจากตัวกุ้งสู่ตัวกุ้งจึงน่าจะเป็นสาเหตุหลักของการระบาดและการตายที่เกิดขึ้นเกือบทั้งหมดภายใน 5-10 วัน

หลังพบกุ้งติดเชื้อจำนวนไม่มากนักในวันแรกๆ โดยกุ้งตัวใหญ่มีโอกาสรับเชื้อจากการกินได้สูงกว่ากุ้งขนาดเล็ก

4.2 ความสามารถในการต้านทานโรคไวรัสและการคงอยู่ของเชื้อไวรัสในตัวกุ้งที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV และ YHV

จากการทดลองให้กุ้งได้รับเชื้อครั้งแรกในปริมาณที่ต่ำลงและพยายามป้องกันการติดเชื้อซ้ำโดยการแยกกุ้งที่กำลังจะตายออกจากถังเลี้ยงทั้งหมด พบว่ากุ้งจากชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับเชื้อ WSSV และกุ้งที่ติดเชื้อ YHV 26 และ 32 วัน ที่ยังคงมีเชื้อไวรัสเดิมอยู่ในร่างกาย แต่พบว่าปริมาณของเชื้อไม่ส่งผลให้กุ้งแสดงอาการของโรค เนื่องจากกุ้งรอดตายชุดเดียวกันที่ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนการฉีดเชื้อซ้ำมีอัตรารอดตายสูง 90-100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามระดับของเชื้อที่มีอยู่ ถ้าได้รับเชื้อไวรัสเดิมหรือชนิดอื่นๆ เพิ่มก็จะแสดงออกถึงการติดเชื้อ และมีอัตราการตายสูงกว่ากุ้งที่ไม่มีเชื้ออยู่ก่อน นอกจากนั้นผลการทดลองพบว่าถ้ากุ้งได้รับเชื้อซ้ำครั้งที่ 2 แตกต่างจากชนิดที่ได้รับครั้งแรก การเกิดโรคและการตายเกิดขึ้นเร็วกว่าการได้รับเชื้อเดิมซ้ำ แสดงว่าการติดเชื้อไวรัสร่วมทำให้กุ้งเกิดโรคที่รุนแรงยิ่งขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Mohan และคณะ (1998) ที่ว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อร่วมระหว่าง WSSV และ YHV มีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 2-3 วัน เร็วกว่ากุ้งที่ติดเชื้อ YHV หรือ WSSV ชนิดใดชนิดหนึ่ง ที่ทำให้กุ้งชนิดเดียวกันตายทั้งหมดประมาณ 3-5 วัน และ 5-10 วัน ตามลำดับ (จิราพร เกษรจันทร์ และคณะ, 2538; Chantanachookin, *et al.,* 1993; Pratanpipat, *et al.,* 1996) อวัยวะเป้าหมายของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดที่ต่างกันหลายส่วนอาจอธิบายถึงความรุนแรงของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อร่วมได้ เนื้อเยื่อตับของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV มีความผิดปกติเพียงเล็กน้อย แต่พบการเปลี่ยนแปลงโดยมีเซลล์ตายจำนวนมากในกุ้งที่ติดเชื้อ YHV หรือการพบลักษณะเซลล์บวมจำนวนมากของเนื้อเยื่อใต้เปลือกเมื่อติดเชื้อ WSSV ในขณะที่เซลล์บริเวณดังกล่าวของกุ้งที่ติดเชื้อ YHV ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน รวมทั้งการรายงานว่าเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนไม่ใช่เป็นเซลล์เป้าหมายในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ WSSV แต่ในทางกลับกันพบว่าเม็ดเลือดเป็นแหล่งเพิ่มจำนวนของเชื้อ YHV (กิจการ ศุภมาตย์ และ สิทธิ บุณยรัตผลิน, 2539; Wongteerasupaya, *et al.,* 1995a; Lo, *et al.,* 1996, 1997; Tsai, *et al.,* 1999; van de Braak, *et al*., 2002a) ซึ่งการมีเชื้อ 2 ชนิดหรือมากกว่าเข้าสู่ตัวกุ้งโดยมี

เซลล์เป้าหมายที่ต่างกันจะทำให้เนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกายติดเชื้อและถูกทำลายพร้อมๆ กันจึงทำให้การตายเกิดขึ้นเร็วกว่าอย่างเห็นได้ชัด

ส่วนผลการศึกษาจากชุดการทดลองที่ 3 พบว่ากุ้งที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสสูงขึ้น โดยเฉพาะกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ 43 วัน สามารถต้านทานต่อเชื้อเดิมได้อย่างมีประสิทธิภาพ (RPS 67 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่กุ้งรอดตายที่ระยะเวลาเดียวกันต้านทานต่อเชื้อ YHV ได้ต่ำกว่า (RPS 37.5 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV มีการสร้างระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสได้สูงขึ้น แต่ทั้งนี้กุ้งจะต้องสามารถ

กำจัดเชื้อที่ได้รับในครั้งแรกได้หมด โดยระบบที่สร้างขึ้นเป็นลักษณะกึ่งจำเพาะกับเชื้อไวรัสชนิดเดิมได้เป็นอย่างดี สอดคล้องกับผลการศึกษาในกุ้งคุรุมาที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (PAV) หลังรอดตายกุ้งจะต้านทานต่อเชื้อเดิมได้มากขึ้นอย่างชัดเจน (RPS 64-77 เปอร์เซ็นต์) (Venegas, *et al.,* 2000; Wu, *et al.,* 2002) อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวไม่ได้ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ YHV หรือเชื้อโรคอื่น นอกจากนั้นประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อ WSSV ได้ดีกว่า YHV ยังคงพบในกุ้งที่รอดตายจากติดเชื้อ YHV อีกด้วย (RPS 37.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับเชื้อ WSSV และ 12.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสชนิดเดิม) แสดงว่าระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ YHV มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ และเป็นการตอบสนองแบบไม่จำเพาะเนื่องจากกุ้งสามารถต้านต่อเชื้อต่างกลุ่มได้ดีกว่าเชื้อเดิมที่เหนี่ยวนำให้ติดซ้ำ ซึ่งแตกต่างจากข้อสันนิษฐานของ Flegel และ Pasharawipas (1998) ที่ว่าการเลี้ยงกุ้งในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองจะทำให้กุ้งมีความสามารถทนต่อเชื้อเดิมได้มากขึ้นได้อย่างชัดเจน อีกทั้งผลที่ได้จากการทดลองยังแตกต่างจากข้อสังเกตของ Pasharawipas และคณะ (1997) ที่ว่าผู้เลี้ยงกุ้งมีผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเลี้ยงกุ้งในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค YHV มาก่อน ซึ่งการที่กุ้งกุลาดำสามารถทนต่อโรคระบาดได้ตามข้อสังเกตเบื้องต้นอาจไม่ได้มีผลจากการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ YHV โดยตรงแต่อาจมาจากปัจจัยอื่นๆ ที่อาจเกี่ยวข้องด้วยหลายประการ เช่น ข้อสังเกตดังกล่าวเกิดในสภาพการเลี้ยงจริงซึ่งมีปัจจัยแวดล้อมต่างกับห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะปัจจัยทางด้านโภชนาการของระบบการเลี้ยงบ่อดินมีความอุดมสมบูรณ์ของอาหารมีชีวิต ทั้งพืช แพลงก์ตอน สัตว์หน้าดิน รวมทั้งจุลินทรีย์หลายชนิด สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งสูงขึ้น (สาวิตรี ศิลาเกษ และกิจการ ศุภมาตย์, 2543; Haryanti and Tsumura, 1998; Gomez-Gil, *et al.,* 2000; Rengpipat, *et al.,* 2000) ในขณะที่ระบบในห้องทดลองขาดปัจจัยสนับสนุนข้างต้น หรืออาจจะเป็นไปได้ว่าการระบาดของโรคไม่ได้เกิดขึ้นในระยะเวลาที่สังเกตผล รวมทั้งพื้นที่เลี้ยงกุ้งที่เคยมีประวัติการ

ระบาดของโรครุนแรงมาก่อน ผู้เลี้ยงมักจะมีการเตรียมบ่อและมีการจัดการดูแลอย่างดีทำให้มีผลผลิตดีขึ้นด้วย

อย่างไรก็ตามการที่กุ้งกุลาดำรอดตายจากการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ YHV มีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อไวรัส 2 ชนิดได้ต่ำกว่าการกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV ในการทดลองเดียวกัน และต่ำกว่าการกระตุ้นด้วยเปปติโดกลัยแคนซึ่งมีรายงานว่ากุ้งมีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อโรค YHV สูงถึง 55.6 เปอร์เซ็นต์ (RPS 55.6 เปอร์เซ็นต์) (Boonyaratpalin, *et al*., 1995) อาจจะมีผลมาจากลักษณะโครงสร้างของเชื้อ YHV ที่มีเปลือกหุ้ม (envelope) ค่อนข้างหนา แต่ส่วนที่มีผลเหนี่ยวนำให้กุ้งสร้างระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อเชื้อไม่ใช่เป็นส่วนที่อยู่บนเปลือกหุ้ม เช่นเดียวกับที่พบว่าการใช้ยีสต์ทั้งเซลล์จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้ต่ำและช้ากว่าเมื่อใช้เฉพาะส่วนของ กลูแคน (มลฤดี สิทธิพันธ์ และคณะ, 2543) อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษานี้ก็พบว่าการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสดังกล่าวทำให้กุ้งสามารถต้านทานต่อเชื้อ YHV ได้ดีกว่าการใช้เซลล์แบคทีเรีย *Vibrio* sp. (กิจการ ศุภมาตย์ และสิทธิ บุณยรัตผลิน, 2538)

4.3 ความสามารถในการต้านทานต่อโรคไวรัสของกุ้งที่ติดเชื้อ MBV/HPV

สำหรับกุ้งที่ติดเชื้อ MBV/HPV ทั้งกุ้งที่สุ่มจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคไวรัสมาก่อน (สงขลา) และกุ้งที่เลี้ยงในพื้นที่ที่ไม่เคยมีการระบาดของโรค (สตูล) พบว่ากุ้งไม่มีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อเชื้อ WSSV และYHV เพราะหลังจากกุ้งได้รับเชื้อที่มีความรุนแรงสูงซ้ำ จะมีการติดเชื้อและทยอยตายอย่างต่อเนื่องและเร็วกว่าชุดควบคุม การที่เชื้อไวรัสดังกล่าวมีตับและตับอ่อน (hepatopancreas) เป็นเซลล์เป้าหมาย (ระบิล และคณะ, 2535; Chang and Chen, 1994) แต่ตับและตับอ่อนเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสร้างน้ำย่อยต่างๆ รวมทั้งการดูดซึม และเก็บสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโต และสะสมพลังงานเพื่อกิจกรรมต่างๆ ของร่างกาย ดังนั้นเมื่อการติดเชื้อทำให้ท่อตับบางส่วนถูกทำลายไป ซึ่งแน่นอนว่าจะต้องส่งผลให้การดำเนินกิจกรรมต่างๆ ของร่างกาย และระบบภูมิคุ้มกันลดลงด้วย เมื่อกุ้งได้รับเชื้อโรคโอกาสในการติดเชื้อจึงเกิดได้มากกว่า และมีอัตราการตายสูงและเร็วกว่ากุ้งปกติ ยิ่งไปกว่านั้นจากการทดลองพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อ MBV/HPV แม้ไม่ได้รับเชื้อไวรัสอื่นเพิ่มขึ้น กุ้งก็มีอัตรารอดตายต่ำกว่ากุ้งที่ไม่ติดเชื้อเช่นกัน ทั้งที่การศึกษานี้ได้เลี้ยงกุ้งทดลองในระบบที่สามารถควบคุมได้เป็นระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้น ในระบบการเลี้ยงจริงที่สภาพแวดล้อมในบางช่วงไม่สามารถจะควบคุม เช่น Hao และคณะ (1999) พบว่าการแปรผันของอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างๆ ในรอบวันมีค่าสูง กุ้งกุลาดำจะติดเชื้อ MBV สูงและรุนแรงขึ้น สอดคล้องกับ Chang และ Chen (1994) ที่พบว่าสภาพบ่อเลี้ยงที่มีพื้นบ่อสกปรกและปล่อยกุ้งหนาแน่น ทำให้กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ MBV แสดงอาการของโรคได้รุน

แรงและมีอัตรารอดตายต่ำ จากผลการทดลองและข้อมูลต่างๆ ข้างต้นจึงน่าจะบ่งชี้ได้ว่าการนำลูกกุ้งที่ติดเชื้อ MBV/HPV สำหรับปล่อยในบ่อดินนอกจากไม่ทำให้กุ้งมีความต้านทานต่อโรคติดเชื้อเพิ่มขึ้นแล้ว ในกรณีที่เกิดการระบาดของโรคต่างๆ กลับทำให้โอกาสติดเชื้อโรค และเกิดโรคแทรกซ้อนเกิดได้ง่ายและรุนแรงกว่ากุ้งที่ไม่มีเชื้ออยู่ในร่างกาย และแม้ว่าไม่เกิดการระบาดของโรคการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวยังส่งผลให้ผลผลิตเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงลดลง

4.4 ความสัมพันธ์ของระยะเวลากับความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสของกุ้งกุลาดำ

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันกับความสามารถในการต้านทานต่อโรคไวรัส พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ WSSV สามารถสร้างระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต้านทานต่อเชื้อ YHV เพิ่มขึ้นหลังได้รับเชื้อครั้งแรก นาน 29 วัน และคงอยู่ได้ถึง 43 วัน ขณะที่ใช้เวลาสร้างภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อเชื้อเดิมถึง 43 วัน ซึ่งช้ากว่าการสร้างระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต้านทานต่อเชื้อไวรัสเดิมของกุ้งคุรุมาที่เพิ่มขึ้นหลังการติดเชื้อ PAV เพียง 21 วัน (Wu, *et al.,* 2002) และช้ากว่าการกระตุ้นด้วยบีตา-1, 3 กลูแคน เพราะกุ้งกุลาดำมีการสร้างระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ WSSV หลังได้รับอาหารผสมบีตา-1, 3 กลูแคน เพียง 20 วัน (Chang, *et al.,* 1999) ส่วนการกระตุ้นด้วยเชื้อ YHV ทำให้กุ้งกุลาดำเริ่มสร้างระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ WSSV หลังได้รับเชื้อครั้งแรกนาน 32 วัน และคงอยู่ถึง 46 วัน ขณะที่ใช้เวลาในการสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อต้านทานต่อเชื้อเดิมนานถึง 46 และยังคงมีอยู่จนถึง 73 วัน

จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำค่อนข้างใช้ระยะเวลานานในการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต้านทานต่อเชื้อไวรัสที่เข้ามาในร่างกาย อีกทั้งระบบดังกล่าวคงตัวอยู่ได้เพียงระยะเวลาสั้นๆ เช่นเดียวกับกุ้งคุรุมาที่ระดับของภูมิต้านทานต่อเชื้อไวรัสเพิ่มขึ้นหลังได้รับเชื้อ 21 วัน และคงอยู่ได้เพียง 60 วัน (Wu, *et al.,* 2002) แต่ต่างกับครัสเตเชียกลุ่มอื่น เช่น American lobster (*H. americanus*) สามารถสร้างระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อโรค gaffkemia หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมจาก *Aerococcus viridans* var. *homari* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเพียง 6 วัน และระบบดังกล่าวคงอยู่ถึง 93 วัน (Keith, *et al.,* 1992) ข้อมูลดังกล่าวจึงมีความสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าเมื่อเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายพร้อมกันในปริมาณสูงๆ การเกิดโรคและอัตราการตายจึงเกิดได้รวดเร็วและน่าจะง่ายกว่าเมื่อติดเชื้ออื่นๆ

อย่างไรก็ตามแม้แต่กลุ่มเดียวกันก็อาจให้ผลที่แตกต่างกันได้ เช่นพบว่าหลังจากกุ้งกุลาดำได้รับวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *V. harveyi* โดยการผสมอาหารให้กินเพียง 10 วัน กุ้งก็สามารถต้านทานต่อเชื้อเดิมได้สูงขึ้น และมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ถ้าให้กินติดต่อกัน และเมื่อให้วัคซีนโดยการแช่พบว่ากุ้งสามารถต้านทานเชื้อเดียวกันหลังได้รับวัคซีนเพียง 6 วัน แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปอีก 10 วัน ความสามารถดัง

กล่าวกลับลดลง (สาวิตรี ศิลาเกษ และกิจการ ศุภมาตย์, 2543) ส่วน Chang และคณะ (1999) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมบีตา-1, 3 กลูแคนนาน 10 วัน ไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อ WSSV ได้ ในขณะที่กุ้งชุดที่ได้รับอาหารนาน 20 วัน มีความสามารถในการต้านทานโรคดังกล่าวได้สูงขึ้น นอกจากระยะเวลาหรือชนิดของสารกระตุ้นที่ต่างกันจะมีผลต่อการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อเชื้อโรคของกุ้งกุลาดำได้ต่างกันแล้ว น่าจะมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบดังกล่าวด้วย เช่นอาจจะเป็นไปได้ว่ากุ้งที่มีอายุมากขึ้นมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อเชื้อโรคลดลง เนื่องจากในการศึกษานี้พบว่ากุ้งที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV 57 วัน หรือกระตุ้นด้วย YHV 73 วัน รวมทั้งกุ้งอายุเท่ากันในชุดควบคุมมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดได้ต่ำกว่าชุดการทดลองเดียวกันแต่อายุกุ้งน้อยกว่า ทั้งที่ใช้ความเข้มข้นเชื้อเท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Song และคณะ (1997, อ้างโดย Chang, *et al.,* 1999) ที่ว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมกลูแคนสลับกับอาหารปกติตลอด 4.5 เดือน เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ WSSV โดยการแช่พบว่ากุ้งอายุ 60 วัน มีความสามารถในการต้านต่อเชื้อ WSSV สูงกว่ากุ้งอายุ 113 วัน

นอกจากนั้นปัจจัยการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีปริมาตรน้ำน้อย การถ่ายเทอากาศไม่ดี จึงเอื้อให้เกิดการผันแปรของอุณหภูมิในรอบวันสูง (27-28 องศาเซลเซียส) อาจทำให้กุ้งเกิดความเครียดส่งผลต่อการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อเชื้อโรคลดลงได้ จากรายงาน Chou และคณะ (1995) พบว่าความสามารถในการยอมรับเชื้อไวรัสและแบคทีเรียของกุ้งกุลาดำจะสูงขึ้นถ้าอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ส่งเสริมความเครียด เช่นการเคลื่อนย้าย สภาพแวดล้อมของการเลี้ยง เช่นการผันแปรของอุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรดด่างของน้ำในรอบวันมากๆ เช่นเดียวกับกิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543ก, ข) พบว่าปัจจัยแวดล้อมบางประการเช่นอุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (0.9-1.2 มิลลิกรัม/ลิตร) ความเป็นกรดด่างของน้ำต่ำ (pH 6.0) รวมทั้ง ระบบการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการทำให้ระบบภูมิคุ้มกันและความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของกุ้งกุลาดำลดลงต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงในบ่อดิน นอกจากนั้นเป็นไปว่าความสมดุลของอาหารที่กุ้งได้รับอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้การพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อเชื้อโรคของกุ้งกุลาดำเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ เนื่องจากกุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลานานกว่า ทั้งชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัส และกุ้งชุดควบคุมมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อทั้ง 2 ชนิดต่ำลง จากรายงานของ Douillet และ Langdon (1994) พบว่าลูกหอยสองฝาที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายผสมเซลล์แบคทีเรียมีอัตราการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย และความต้านทานต่อโรคสูงกว่าลูกหอยที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายอย่างเดียว ซึ่งเป็นเพราะสารอาหารที่จำเป็นบางชนิดที่ได้รับจากเซลล์แบคทีเรียช่วยส่งเสริมความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยอาหารได้ดีขึ้น เช่นเดียวกับกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย Bacillus S11 มีการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย ระบบภูมิคุ้มกัน และความ

ต้านทานโรคสูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับเซลล์แบคทีเรียอย่างชัดเจน (Rengpipat, *et al*., 2000) จากข้อมูลดังกล่าวจึงสอดคล้องกับรายงานของ Gomez-Gil และคณะ (2000) ที่ว่าสัตว์น้ำน่าจะได้รับสารบางชนิดที่ไม่รู้โครงสร้างและคุณสมบัติและไม่สามารถเสริมลงในอาหารสำเร็จรูปจากอาหารธรรมชาติ เช่น แพลงก์ตอนพืช สัตว์หน้าดิน และจุลินทรีย์ต่างๆ ในการศึกษาครั้งนี้แม้จะพบว่ากุ้งได้รับอาหารสำเร็จรูปอย่างเพียงพอ แต่เมื่อพิจารณาสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงพบว่าในห้องปฏิบัติการขาดปัจจัยเสริมของอาหารธรรมชาติดังที่กล่าวมา จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กุ้งมีความต้านทานต่อโรคติดเชื้อลดลง ซึ่งข้อสังเกตนี้อาจสนับสนุนโดยการศึกษาของ กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543 ข) ที่พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในระบบของห้องปฏิบัติการมีระบบภูมิคุ้มกันและความสามารถของน้ำเลือดในการลดเชื้อแบคทีเรียต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงในบ่อดิน และจากรายงานของ Pratanpipat และคณะ (1996) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อและเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจะแสดงอาการติดเชื้อภายใน 4-7 วัน ในขณะที่การเลี้ยงในบ่อดินกุ้งเริ่มแสดงอาการของโรคหลังการติดเชื้อ 40-45 วัน (Withayachumnarnkul, 1999) ส่วน Tsai และคณะ (1999) ก็รายงานว่าลูกกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ในระยะแรกถ้าเลี้ยงในบ่อที่มีสภาพแวดล้อมดี การระบาดของโรคจะไม่เกิดขึ้น ในขณะที่ Sanchez และคณะ (2001) รายงานว่ากุ้ง *Litopenaeus setiferus* เต็มวัยเพศผู้ที่ถูกนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ 7 วัน มีอัตราเมตาโบลิซึมของสารอาหารต่างๆ ต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงในสภาพธรรมชาติ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคและประสิทธิภาพของน้ำเชื้อต่ำลง จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำเพื่อตอบสนองต่อโรคติดเชื้อและสภาพความเครียดต่างๆ ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นชนิดและขนาดของสัตว์น้ำ ชนิดและปริมาณของสารกระตุ้น ชนิดและความรุนแรงของเชื้อโรค สภาพแวดล้อมที่อาศัย รวมทั้งวิธีการให้สารกระตุ้น เป็นต้น

4.5 ปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ

การตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจากการทดลองนอกจากพิจารณาจากอัตรารอดตายของกุ้งหลังทำการติดเชื้อซ้ำแล้ว ผลการทดสอบปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสพบว่าน้ำเลือดกุ้งจากชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งยังคงมีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสอยู่ทำให้กุ้งมีอัตราการตายในช่วงแรกช้ากว่าชุดที่ได้รับเชื้อซึ่งบ่มกับน้ำเลือดของกุ้งปกติในชุดควบคุม และเมื่อใช้น้ำเลือดกุ้งรอดตายจากการติดเชื้อ WSSV 43 วัน มาบ่มรวมกับเชื้อไวรัส และฉีดให้กุ้งปกติ ผลการทดสอบแสดงให้เห็นได้ชัดเจนว่าน้ำเลือดกุ้งมีประสิทธิภาพลบล้างฤทธิ์ของเชื้อ WSSV ได้ดีกว่า YHV ซึ่งผลดังกล่าวสัมพันธ์กับความสามารถต้านทานต่อเชื้อเดิมได้ดีกว่าเมื่อฉีดเชื้อซ้ำ และเหมือนกับกุ้งคุรุมาที่พบสารน้ำในเลือดที่ผลิตขึ้นหลังได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ PAV สามารถลดการติดเชื้อเดิมอย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวไม่ได้ทดสอบการลบล้างเชื้อ YHV หรือเชื้ออื่นๆ (Venegas, *et al*., 2000; Wu, *et al*., 2002) van Hulten

และคณะ (2001) พบว่าสารน้ำ (VP28-antiserum) ที่แยกจากกระต่ายซึ่งกระตุ้นด้วยโปรตีนขนาด 28 kDa ที่เป็นโครงสร้างของเปลือกหุ้มเชื้อ WSSV (VP28) สามารถลดปริมาณของเชื้อ WSSV ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน ในขณะที่ Alday-Sanz และคณะ (1998) พบว่าหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วย IgY-WSSV นาน 15-30 นาที กุ้งกุลาดำมีการผลิต anti-WSSV IgY ออกมาในกระแสเลือด จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าความสามารถในการต้านทานต่อโรคไวรัสของกุ้งกุลาดำส่วนหนึ่งน่าจะมีผลจากสารน้ำบางชนิดที่กุ้งผลิตขึ้นหลังการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัส ซึ่งสารน้ำดังกล่าวอาจเป็นโปรตีนที่มีลักษณะกึ่งจำเพาะต่อเชื้อ WSSV ที่อาศัยกลไกในการจับ (binding) เชื้อไวรัสโดยตรง van Hulten และคณะ (2001) คาดว่ากลไกของ VP 28-antiserum ในการลดเชื้อ WSSV ที่เป็นสาเหตุของโรคกุ้งกุลาดำเกิดจากสารบางชนิดที่มีอยู่ในซีรัมจับกับโปรตีนขนาด 28 kDa บนเปลือกหุ้มเชื้อ ซึ่งโปรตีนดังกล่าวน่าจะเป็นส่วนของ spikes ซึ่งทำหน้าที่โน้มนำให้เกิดการติดเชื้อ ซึ่งผลของการจับทำให้ไวรัสสูญเสียความสามารถในการเข้าเกาะติดและหลอมรวมส่วนของเปลือกหุ้มกับเซลล์เป้าหมาย เช่นเดียวกับ Song และคณะ (2003) You และคณะ (2002) ที่คาดว่ากุ้งขาวน่าจะจดจำส่วนของโปรตีนเปลือกหุ้มเชื้อ TSV ไว้แล้วสร้างสารน้ำบางอย่างขึ้นมาเพื่อต่อต้านเชื้อ จึงทำให้กุ้งที่ได้รับเชื้อในครั้งแรกมีระบบภูมิคุ้มกันที่ต้านทานต่อเชื้อดังกล่าวเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม Burton และคณะ (2000) กล่าวว่ากลไกการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงอาจเกิดขึ้นในส่วนของไซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน (host) โดยในขณะที่ไวรัสปลดสิ่งห่อหุ้ม (uncoating) แอนติบอดี้จะถูกผลิตออกมาเคลือบส่วนของแคปซิดไว้ จนเชื้อไม่สามารถจับกับนิวเคลียร์เมมเบรนของเซลล์เจ้าบ้านได้ จึงเป็นการขัดขวางการปล่อยดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ในขณะที่ Ramsey และคณะ (1998) กล่าวว่าการยับยั้งไวรัสบางชนิดเกิดโดยเซลล์เจ้าบ้านผลิตสารโมเลกุลเล็กหลายๆ โมเลกุลเพื่อใช้จับโปรตีนโครงสร้างที่ทำหน้าที่จับกับ epitopes หรือ spikes ของไวรัส ให้เกิดการเปลี่ยนรูปแบบไป (conformational change) ไวรัสจึงไม่สามารถเข้าสู่เซลล์และก่อโรคได้

ส่วนผลจากการทดสอบการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของน้ำเลือด และจากการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสที่มีประสิทธิภาพไม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นเพราะสารน้ำบางอย่างที่กุ้งผลิตขึ้นจากการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสเพียงครั้งเดียวมีปริมาณไม่มากพอที่จะลบล้างเชื้อไวรัสได้ทั้งหมด รายงานการศึกษาพบว่า VP 28-antiserum สามารถลบล้างเชื้อไวรัส WSSV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เมื่อสารดังกล่าวถูกเจือจางลงประสิทธิภาพในการลดเชื้อก็ลดลงด้วย (van Hulten , *et al.*, 2001) ซึ่ง Burton และคณะ (2000) พบว่าความเข้มข้นของแอนติบอดี้ของสัตว์ชั้นสูงมีผลโดยตรงกับปริมาณเชื้อไวรัสที่ถูกลบล้างฤทธิ์ เพราะถ้ากลไกการยับยั้งเกิดจากแอนติบอดี้ไปจับกับส่วนของ spikes/epitopes บนเปลือกหุ้ม ปริมาณของแอนติบอดี้สูงขึ้นโอกาสที่ spikes/ epitopes ทั้งหมดถูกจับไว้

ก็มีสูงด้วย ส่วนผลที่น้ำเลือดของกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 กลุ่ม ลบล้างฤทธิ์ของเชื้อ YHV ได้น้อยมาก อาจเป็นเพราะสารน้ำที่สร้างขึ้นเพื่อยับยั้งเชื้อดังกล่าวมีปริมาณน้อยจนเห็นผลได้ไม่ชัดเจน และอาจเป็นไปได้ว่ากุ้งไม่มีการสร้างสารใดๆ ที่จำเพาะสำหรับการยับยั้งเชื้อ YHV เนื่องจากวิถี (pathway) ที่ตอบสนองต่อเชื้อ YHV ไม่ถูกกระตุ้น

4.6 องค์ประกอบเลือดและความสามารถในการต้านทานโรคไวรัสของกุ้งกุลาดำ

เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบเลือดบางประการของกุ้งกุลาดำที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อในระยะเวลาต่างกัน คาดว่าระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นนอกจากสารน้ำดังที่กล่าวมาข้างต้นแล้วน่าจะเกี่ยวข้องกับการแสดงออกที่ไม่จำเพาะเจาะจงที่ดำเนินการโดยเซลล์ด้วย เพราะแม้ว่าน้ำเลือดกุ้งรอดตายสามารถลบล้างฤทธิ์ของเชื้อ YHV ได้ไม่แตกต่างกับน้ำเลือดกุ้งปกติ แต่กุ้งที่ผ่านการติดเชื้อดังกล่าวมีอัตรารอดตายหลังการติดเชื้อ YHV ซ้ำสูงกว่ากุ้งปกติในชุดควบคุม โดยเฉพาะความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสได้สูงสุดที่ 46-60 วัน นั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือดที่เพิ่มขึ้นสูงสุดด้วยเช่นเดียวกัน ในขณะที่กุ้งชุดที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV และมีความต้านทานต่อโรคจากการทดสอบเชื้อซ้ำสูงสุด (43 วัน) ไม่พบความแตกต่างของเม็ดเลือดรวมเมื่อเทียบกับกุ้งทดลองจากชุดอื่น จากผลดังกล่าวจึงเป็นไปได้ว่าความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ YHV ของกุ้งกุลาดำเกิดจากระบบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์มากกว่าสารน้ำต่างๆ แต่ระบบที่ถูกกระตุ้นให้สามารถต้านทานต่อเชื้อ WSSV เกิดจากทั้งระบบที่ดำเนินการโดยเซลล์และสารน้ำ ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์ที่เกี่ยวข้องอย่างชัดเจนจากการศึกษานี้น่าจะเป็นกระบวนการในระบบโปรพีโอ เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ตรวจวัดได้จากกุ้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีค่าสูงขึ้น สอดคล้องกับความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อได้ดีขึ้น จากรายงานของ Soderhall และ Ajexson (1982) และ Cerenius และคณะ (1991) พบว่าควิโนนที่สร้างขึ้นในระบบโปรพีโอของ crayfish สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อปรสิตได้ เช่นเดียวกับ Song และคณะ (2003) พบว่าปริมาณสารพิษที่เกิดขึ้นในกระบวนการโปรพีโอ (toxic intermediate of phenol) ซึ่งแปรผันตรงกับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่วัดได้ น่าจะมีผลยับยั้งเชื้อ TSV ที่เข้าสู่เซลล์เป้าหมายกุ้งขาวได้ จึงเป็นไปได้ว่าความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสที่เพิ่มขึ้นของกุ้งกุลาดำที่รอดตายจากการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสจากการทดลองครั้งนี้มีผลมาจากกระบวนการในระบบโปรพีโอที่ผลิตสารตัวกลาง เช่นควิโนนมากพอที่จะยับยั้งเชื้อไวรัสได้

ยิ่งไปกว่านั้นการดีแกรนูเลทของเซลล์เม็ดเลือดจากกระบวนการในระบบโปรพีโอนอกจากทำให้เกิดสารที่เป็นพิษต่อเชื้อโรคแล้ว กระบวนการดังกล่าวยังช่วยกระตุ้นให้เกิดการเกาะติดของเซลล์กับสิ่งแปลกปลอมต่างๆ (opsonic activity) (Thornqvist, *et al*., 1994) ซึ่งแน่นอนว่าจะต้องช่วยให้ระบบ

ภูมิคุ้มกันโดยเซลล์อื่นๆ คือฟาโกซัยโทซิส เอนแคปซูลเลชั่น โนดูลฟอร์เมชั่น มีประสิทธิภาพมากขึ้น และในกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ก็จะผลิตและปล่อยอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่เรียกว่า reactive oxygen intermediates (ROIs) เช่น O^-_2 OH^- และ H_2O_2 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสาร antimicrobial ที่มีประสิทธิภาพออกมา (Song and Hsieh, 1994; Holmblad and Soderhall, 1999) สอดคล้องกับรายงานของ Itami และคณะ (1998) ที่พบว่าเม็ดเลือดของกุ้งคุรุมาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเปปติโดกลัยแคนเกิดฟาโกซัยโทซิสได้มากขึ้น ส่งผลให้กุ้งชุดดังกล่าวทนต่อโรคได้มากขึ้น Supamattaya และคณะ (2003) พบว่าปริมาณของ O^-_2 ในเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำสูงขึ้นสอดคล้องกับกิจกรรมฟาโกซัยโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดและความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดที่เพิ่มขึ้นด้วย ในขณะที่ Nappi และคณะ (1995) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดของแมลงหวี่ที่เกิดเอนแคปซูลเลชั่นต่อเชื้อปรสิตมีการผลิต O^-_2 ออกมารอบบริเวณดังกล่าวมากขึ้น เช่นเดียวกับสาวิตรี ศิลาเกษ และกิจการ ศุภมาตย์ (2543) พบว่าเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับวัคซีนจากเชื้อ *Vibrio harveyi* มีการผลิต O^-_2 ได้เพิ่มขึ้น ส่งผลให้กุ้งมีความสามารถต้านทานต่อโรคติดเชื้อได้ดีขึ้น นอกจากนั้นเป็นไปได้ว่ากระบวนการในระบบโปรพีโอออาจมีความสัมพันธ์กับการผลิตแอนติไมโครเบียลเปปไทด์ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ เนื่องจาก Soderhall และ Cerenius (1998) พบว่านอกจากเอนไซม์เซอรีนโปรตีเอสจะทำหน้าที่เปลี่ยนโปรพีโอให้เป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกระบวนการโปรพีโอในครัสเตเชียแล้ว ในแมลงหวี่โปรตีนดังกล่าวช่วยส่งสัญญาณกระตุ้นวิถี Toll ให้ผลิต แอนติไมโครเบียลเปปไทด์ด้วยในการศึกษานี้แม้ว่าไม่ได้วัดค่าฟาโกซัยโตซิส O^-_2 และ แอนติไมโครเบียลคอมปาวด์ ชนิดต่างๆ แต่ถ้าพิจารณาจากปริมาณเม็ดเลือด กิจกรรมของเอนไซม์ ฟีนอลออกซิเดส ปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของน้ำเลือดซึ่งเพิ่มขึ้น จึงคาดว่าน่าจะมีความสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของสารเหล่านั้น จนทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการก่อโรคของเชื้อไวรัสลดลงได้ในระดับหนึ่ง กุ้งกุลาดำที่รอดตายจึงทนต่อการติดเชื้อซ้ำได้มากขึ้น

สำหรับองค์ประกอบเลือดอื่นๆ คือโปรตีน และทองแดงในซีรัมของกุ้งที่รอดตายจากการติดเชื้อ WSSV พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันระหว่างกุ้งรอดตายและชุดควบคุมที่เก็บตัวอย่างพร้อมกัน Song และคณะ (2003) รายงานว่าโปรตีนในเลือดเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้บ่งชี้ถึงภาวะโภชนาการของสัตว์น้ำ และการศึกษาในกุ้งขาว กุ้งคุรุมา และกุ้งกุลาดำพบว่าปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในอาหาร ซึ่งถ้ากุ้งได้รับอาหารที่มีโปรตีนสูงๆ ปริมาณโปรตีนในเลือดจะสูงขึ้น (Chen and Cheng, 1993, 1995; Rosas, *et al*., 2000) เช่นเดียวกับปริมาณทองแดงในเลือดของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียพบว่าเป็นพารามิเตอร์ที่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงแคบๆ เว้นแต่ในภาวะขาดอาหารหรือติดเชื้อ โดยกุ้งจะได้รับทองแดงจากอาหารเป็นแหล่งหลักโดยปริมาณทองแดงในน้ำเลือดสูงขึ้นถ้ากุ้งได้รับอาหารที่มีทองแดงสูงๆ ในภาวะที่ขาดอาหารแต่อาศัยในน้ำที่มีความเค็มสูงกุ้งกุลาดำสามารถดูดซึม

ทองแดงบางส่วนได้จากน้ำ และพบว่ากุ้งจะเกิดภาวะเลือดจางถ้าเลี้ยงในน้ำกร่อยหรือน้ำจืดโดยไม่มีการเสริมทองแดงในอาหารให้เพียงพอ เช่นเดียวกับเมื่อติดเชื้อปริมาณทองแดงในเลือดกุ้งกุลาดำลดลง 31-41 เปอร์เซ็นต์ (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543 ง; Depledge and Bjerregaard, 1989; Lee and Shiau, 2002)

สำหรับปริมาณกลูโคสก็ไม่พบความแตกต่างระหว่างกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ และกุ้งปกติชุดควบคุม แต่พบว่าปริมาณกลูโคส ในเลือดของกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV นาน 43 วัน นั้นมีปริมาณสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุม แต่ระดับที่สูงขึ้นนี้ไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้ที่ทำให้กุ้งเกิดความเครียดและติดเชื้อได้ง่ายขึ้น เพราะที่ระยะเวลาเดียวกันนั้นกลับพบว่ากุ้งรอดตายมีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไวรัสทั้ง 2 ชนิดได้สูงสุด จึงอาจเป็นไปได้ว่าผลของระดับกลูโคสสูงๆ ทำให้กุ้งมีแหล่งของพลังงานมากเกินพอที่จะส่งเสริมให้กระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพราะเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่ติดเชื้ออย่างรุนแรง (ชุดการทดลองที่ 1) องค์ประกอบเลือดต่างๆ คือเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ ฟีนอลออกซิเดส กลูโคสในเลือด และโปรตีนในซีรัม มีค่าต่ำกว่ากุ้งปกติ เนื่องจากการทดลองพบว่ากุ้งชุดดังกล่าวกินอาหารน้อยลงหลังจากติดเชื้อ 1-2 วัน และไม่กินอาหารเลยติดต่อกันหลายวัน จึงทำให้องค์ประกอบเลือดจากตัวอย่างดังกล่าวมีปริมาณโปรตีน และกลูโคส ซึ่งกุ้งจะต้องได้รับจากอาหารมีค่าลดลง เหมือนกับกุ้งคุรุมาที่ติดเชื้อ PRDV ปริมาณโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดและพลาสมามีค่าลดลง (Hennig, *et al*., 1998) และกุ้งขาวที่ติดเชื้อ TSV มีจำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ปริมาณกลูโคสในเลือด โปรตีนรวม และทองแดงในพลาสมาลดลงเช่นกัน ในชุดการทดลองดังกล่าวนี้แม้ไม่ได้วัดปริมาณทองแดงแต่คาดว่าน่าจะต่ำมาก เนื่องจากรายงานของกิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543ง) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ WSSV YHV และแบคทีเรีย นาน 5 วัน ปริมาณทองแดงในเลือดลดต่ำกว่ากุ้งปกติ 37-41 เปอร์เซ็นต์ และเนื่องจากกุ้งจะใช้ทองแดงในเลือดเป็นแกนหลัก (metal nucleus) ของโปรตีนฮีโมซัยยานินที่ทำหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนไปสู่เซลล์ต่างๆ ทางกระแสเลือด (Lee and Shiau, 2002) ดังนั้นถ้าปริมาณทองแดงในเลือดต่ำก็มีผลให้การขนส่งออกซิเจนไปยังเซลล์ต่างๆ ลดลง ทำให้กิจกรรมต่างๆ ของร่างกายทุกระบบลดลงด้วย ถ้าเซลล์เม็ดเลือดผลิตออกมาในระบบไหลเวียนลดลง ก็จะส่งผลต่อเนื่องให้กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดมีปริมาณลดลงเช่นกัน (Sung, *et al*., 1998; Perrazzolo and Barracco, 1997; Srituyaluksana, *et al*., 1999) ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อสภาวะขาดอาหารทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่ำลง การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไปสู่เซลล์เป้าหมายต่างๆ จึงเกิดได้อย่างรวดเร็ว และอาจรวมถึงเชื้อโรคอื่นๆ ที่สามารถแทรกซ้อนได้ง่ายขึ้น เมื่อเชื้อเพิ่มมากขึ้นเซลล์ต่างๆ จึงถูกทำลายหรือยับยั้งจนไม่สามารถทำหน้าได้ กุ้งจึงตายในที่สุด

สำหรับกุ้งที่รอดตายจากการติดเชื้อ YHV พบว่าปริมาณกลูโคสในเลือดโปรตีนและทองแดงในซีรัมไม่แตกต่างกับชุดควบคุมที่เก็บตัวอย่างพร้อมกัน แสดงว่าภาวะโภชนาการและอัตราเมตาบอลิซึมของกลูโคสยังอยู่ในระดับปกติ ส่วนระดับของโปรตีนที่ไม่แตกต่างกันอาจบ่งชี้ว่ากุ้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ YHV ไม่มีการสร้างโปรตีนอื่นนอกเหนือจากโปรตีนที่จำเป็นในการเจริญเติบโต สืบพันธุ์ และซ่อมแซมส่วนสึกหรอ สอดคล้องกับผลการทดสอบปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์เชื้อ ไวรัสที่น้ำเลือดมีประสิทธิภาพในการลดเชื้อได้น้อยมาก จึงอาจอธิบายได้ว่าการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ทำให้กุ้งชุดดังกล่าวต้านทานต่อเชื้อไวรัสได้เกิดจากกระบวนการของเซลล์เป็นหลัก

4.7 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและความสามารถในการต้านทานโรคไวรัสของกุ้งกุลาดำ

สำหรับการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง WSSV และ YHV และสามารถกำจัดเชื้อได้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่อมน้ำเหลืองโดยพบเซลล์ที่มีลักษณะเป็น spheroid มากขึ้น เช่นเดียวกับรายงานก่อนหน้าที่พบว่าต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ ไวรัส YHV และกุ้งทะเลที่ติดเชื้อไวรัสหลายชนิด เกิดการเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลืองเป็นแบบ spheroid อย่างชัดเจน ในขณะที่ไม่พบหรือพบลักษณะดังกล่าวได้น้อยเมื่อติดเชื้อชนิดอื่น อย่างไรก็ตามรายงานผลเหล่านั้นสรุปว่าพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นเป็นการเปลี่ยนแปลงเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสซึ่งมีอวัยวะเป้าหมายคือต่อมน้ำเหลืองเพื่อการเพิ่มจำนวน (Chen and Kou, 1989; Bonami, *et al*., 1992; Flegel, *et al*., 1992; Nadala *et al*., 1992; Owens, *et al*., 1992; Boonyaratpalin, *et al*., 1993; Hasson, *et al*., 1995; Spann, *et al*., 1995; Fraser and Owens, 1996; Wang *et al*., 1996) แต่เมื่อมีการศึกษาวิจัยมากขึ้นพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อและรอดตายก็ยังคงมีเซลล์รูปแบบดังกล่าวปรากฏอยู่ในต่อมน้ำเหลืองด้วย Hasson และคณะ (1999) พบลักษณะ spheroid ในต่อมน้ำเหลืองของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ TSV แบบเฉียบพลันจนถึงเรื้อรัง โดยเมื่อติดเชื้อ TSV แบบเฉียบพลันพบเซลล์ดังกล่าวถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ต่อมน้ำเหลืองทั้งหมด แต่กุ้งที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังจำนวนของเซลล์ดังกล่าวลดลงเหลือประมาณ 25-50 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับที่พบกุ้งกุลาดำที่รอดตายจากโรค sprawner-isolated mortality virus (SMV) และกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ WSSV มี พยาธิภาพของต่อมน้ำเหลืองแบบ spheroid จำนวนมาก (Hameed, *et al*., 2000; Anggraeni and Owens, 2000) แต่ไม่พบลักษณะดังกล่าว หรือพบได้น้อยในกุ้งปกติขนาดเท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ที่แทบจะไม่พบลักษณะของท่อน้ำเหลืองปกติเลยในกุ้งที่ติดเชื้อ 4-7 สัปดาห์ แต่เมื่อกุ้งรอดตายจากการติดเชื้อ WSSV และ YHV นาน 8-10 สัปดาห์ ก็สามารถพบรูปแบบของท่อน้ำเหลืองปกติได้มากขึ้น นอกจากนั้นในต่อมน้ำเหลืองของแม่กุ้งกุลาดำที่เคยติดเชื้อ YHV และกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio anguillarum* ก็สามารถพบ spheroid ภายในต่อมน้ำเหลืองได้เช่นเดียวกัน

(Flegel, *et al*., 1997; van de Braak, *et al*., 2002b) ต่างจากข้อสังเกตของ Anggraeni และ Owens (2000) ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลืองเป็นแบบ spheroid ในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้ออื่นๆ นอกจากเชื้อไวรัส

ผลการทดลองนี้และจากข้อมูลต่างๆ ข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเมื่อกุ้งติดเชื้อพยาธิสภาพของต่อมน้ำเหลืองจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็น spheroid และการใช้ TSV probe และ WSH-8 probe ตรวจหาตำแหน่งของเชื้อไวรัส TSV และเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio anguillarum* ในต่อมน้ำเหลืองของกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดอยู่ในบริเวณที่เป็น spheroid เท่านั้น (Hasson, *et al*., 1999; van de Braak, *et al*., 2002b) แสดงว่า spheroid เป็นกลไกในการกำจัดทั้งเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย และอาจรวมถึงเชื้อและสิ่งแปลกปลอมอื่นๆ ที่เข้าสู่ตัวกุ้งทะเล เพราะ van de Braak และคณะ (2002b) พบ spheroid ในต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ สอดคล้องกับผลการศึกษานี้ที่พบ spheroid ได้ในต่อมน้ำเหลืองกุ้งที่ติดเชื้อ MBV/HPV และกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ อย่างไรก็ตามรูปแบบของ spheroid ส่วนใหญ่มีลักษณะเหมือนกับการฟอร์มตัวในระยะแรกๆ และมีจำนวนค่อนข้างน้อยกว่ากุ้งที่ติดเชื้อไวรัส รวมทั้งไม่ค่อยพบเซลล์ที่ย้อมไม่ติดสีแทรกใน spheroid ดังกล่าว นอกจากนั้นจากการสังเกตของผู้วิจัยเองพบว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* อย่างรุนแรงก็มีการเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลืองเป็น spheroid ด้วยแต่ไม่เด่นชัดทั้งปริมาณและรูปแบบเมื่อเทียบกับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเมื่อติดเชื้อไวรัส ซึ่งขัดแย้งกับข้อสันนิษฐานของ Anggraeni และ Owens (2000) และ Flegel และคณะ (1997) ที่ว่าลักษณะ spheroid ที่เกิดขึ้นในต่อมน้ำเหลืองน่าจะเป็นกลไกที่จำเพาะเจาะจงในการกำจัดเชื้อไวรัสของกุ้งตระกูลพีเนียส จากข้อสันนิษฐานดังกล่าวอาจเป็นเพราะต่อมน้ำเหลืองเป็นอวัยวะเป้าหมายในการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลายชนิด ดังนั้นปริมาณของ spheroid ที่เกิดขึ้นจึงสังเกตได้ชัดกว่ากุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และ MBV/HPV ซึ่งมีอวัยวะเป้าหมายคือตับและตับอ่อน และการที่ spheroid ในต่อมน้ำเหลืองซึ่งเกิดจากเม็ดเลือดจำนวนมากจากระบบไหลเวียนเข้ามาทางท่อเลือดเพื่อทำการล้อมจับเชื้อโรคที่เข้ามาสู่เซลล์เป้าหมายทางเดียวกัน จนกลายเป็นลักษณะ spheroid ที่ประกอบด้วยเซลล์ต่างๆ รวมกันอยู่ค่อนข้างหนาแน่น (Anggraeni and Owens, 2000) ดังนั้นกลไกในการกำจัดเชื้อของ spheroid ในต่อมน้ำเหลืองจึงน่าเกิดจากกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือด เช่น ฟาโกซัยโทซิส หรือเอนแคปซูลเลชั่น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ van de Braak และคณะ (2002 b) ที่พบลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดใน spheroid ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อแบคทีเรียเป็นเซลล์ลักษณะแบนยาว (endothelia)โอบล้อมรอบบริเวณที่พบเซลล์แบคทีเรียไว้ สำหรับการที่ภายใน spheroid มีเซลล์ที่ย้อมติดสีจางๆ หรือย้อมไม่ติดสีแทรกอยู่ด้วยนั้น อาจจะเกิดจากเซลล์เม็ดเลือดในบริเวณดังกล่าวมีการดีแกรนูเลทเพื่อกระตุ้นให้กระบวนการในระบบโปรพีโอทำงานตอบสนองต่อเชื้อไวรัสที่เข้ามา สอดคล้องกับ

การศึกษาของ Anggraeni และ Owens (2000) ที่พบปฏิกิริยาของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสได้ชัดเจนบริเวณที่เป็น spheroid แต่พบได้น้อยในบริเวณต่อมน้ำเหลืองปกติ

และเนื่องจากภายใน spheroid เป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรคและเม็ดเลือดที่เข้ามาทำลายเชื้อจำนวนมาก ดังนั้นเมื่อกุ้งสามารถกำจัดเชื้อโดยอาศัยกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นแล้ว กระบวนการต่อมาน่าจะเป็นการกำจัดเศษเซลล์ต่างๆ รวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดที่ตายออกจากต่อมน้ำเหลืองเพื่อให้กลับเข้าสู่รูปแบบปกติต่อไป ซึ่งกุ้งอาจจะต้องใช้เวลานาน หรือเป็นไปได้ว่าไม่สามารถกำจัดออกได้ทั้งหมด เนื่องจากเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมอาจจะเข้ามาได้ตลอดเวลามากน้อยแล้วแต่โอกาส ซึ่งสัมพันธ์กับผลการศึกษาที่ยังคงพบ spheroid ในต่อมน้ำเหลือง แม้ว่าไม่มีเชื้อเหลืออยู่เลยในตัวกุ้งอย่างไรก็ตามพบว่าในกุ้งที่รอดตายนานขึ้นปริมาณของ spheroid ก็มีจำนวนลดลง เช่นเดียวกับ Hasson และคณะ (1999) รายงานว่ากุ้งขาวที่ติดเชื้อ TSV แบบเรื้อรังมีปริมาณ spheroid ในต่อมน้ำเหลืองน้อยกว่ากุ้งที่ติดเชื้อรุนแรง 45-70 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามรายละเอียดเกี่ยวกับ spheroid ในต่อมน้ำเหลืองกุ้งกุลาดำที่เกิดขึ้นหลังจากติดเชื้อชนิดต่างๆ ทั้งรูปแบบและปริมาณที่เกิดหลังจากกำจัดเชื้อออกไปได้ในระยะเวลาต่างๆ มีความสัมพันธ์กันอย่างไรนั้นยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจน จึงน่าจะทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

ส่วนลักษณะของเซลล์อื่นๆ ของกุ้งรอดตายที่กระตุ้นด้วย WSSV และ YHV จากการย้อมด้วยสีฮีมาท็อกไซลิน และอีโอซิน จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน แต่สำหรับกุ้งที่ติดเชื้อ MBV/HPV มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนอย่างชัดเจน โดยเซลล์ตับที่มีเชื้อไวรัสแทรกอยู่ มีลักษณะลีบเล็ก พบจำนวนของ R-cell และแวคคิวโอลเซลล์อยู่ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับกุ้งปกติ และเนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการสร้างน้ำย่อย ดูดซึมและเป็นแหล่งเก็บสะสมสารอาหาร แต่จากพยาธิสภาพที่พบแสดงให้เห็นว่ากุ้งที่ติดเชื้อจะมีความสามารถในการย่อย ดูดซึม และมีการสะสมอาหารได้น้อยมาก สอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อมีการเจริญเติบโตช้ากว่ากุ้งปกติมาก นอกจากนั้นปริมาณของ แวคคิวโอลเซลล์ และ R-cell ในตับและตับอ่อน ยังสามารถบ่งชี้ถึงปริมาณของเนื้อเยื่อไขมัน (fat body) ที่มีอยู่ในร่างกายด้วย ในแมลงพบว่านอกจากเซลล์เม็ดเลือดและเนื้อเยื่ออื่นๆ แล้ว ส่วนของเนื้อเยื่อไขมันยังเป็นแหล่งสังเคราะห์แอนติไมโครเบียลเปปไทด์ที่สำคัญอีกด้วย (Boman, 1995; Hoffmann, 1995) จากการศึกษาในกุ้ง *P. indicus* พบว่าปริมาณของไขมัน (lipid) ในเลือดมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยกุ้งที่มีไลปิดสูงจะติดเชื้อช้า (Avarre, *et al*., 2003) และ Chim และคณะ (2001) พบว่ากุ้งพีเนียสที่ได้รับอาหารที่มีไขมันไม่อิ่มตัวสูง จะมีไขมันในเลือดและซากสูงขึ้น ทำให้กุ้งสามารถทนต่อความเครียดได้มากขึ้น รวมทั้งส่งผลให้ปฏิกิริยาแอคกลูติเนชั่นของพลาสมามีค่าสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารปกติอย่างชัดเจน ในทางกลับกัน Floreto และคณะ (2000) พบว่า American lobster (*H. americanus*) ที่เป็นโรค shell disease มี

ปริมาณไขมันในตับน้อยกว่าสัตว์ปกติประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดในเลือดลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกุ้งปกติ จากข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ นอกจะใช้ศึกษาเพื่อบ่งชี้ถึงการติดเชื้อหรือการเกิดโรคแล้ว น่าจะสามารถใช้บ่งชี้ถึงภาวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งได้ด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษาซึ่งให้ได้ข้อมูลในรายละเอียดมากขึ้นนั้น จำเป็นต้องมีการประยุกต์ใช้เทคนิคอื่นๆ เช่น Immunohistochemistry *in situ* hybridization มาประกอบการศึกษาวิจัยด้วย