บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กุ้งกุลาดำจัดเป็นสินค้าส่งออกทางการเกษตรที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย แต่เกษตรกรยังประสบกับปัญหาจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำอีกมากโดยเฉพาะปัญหาโรคกุ้งที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่น Vibriosis และไวรัส เช่น White Spot Syndrome ซึ่งส่งผลกระทบในการเลี้ยงกุ้งทั่วทั้งภูมิภาคเอเชียและยังแพร่กระจายสู่อเมริกา (Lightner, 1996; Jory and Dixon, 1999) การแก้ปัญหาโดยใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะก่อให้เกิดปัญหาเรื่องสารตกค้างในธรรมชาติและในตัวกุ้ง ทำให้กุ้งมีความเสี่ยงต่อการต้านทานยาเพิ่มขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงมีการหาแนวทางที่ปลอดภัยเพื่อที่จะเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันในตัวของกุ้งซึ่งพบว่าการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ควรจะนำมาประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันการสูญเสียกุ้งจากการระบาดของโรคกุ้งต่างๆ เนื่องจากกุ้งมีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune system) โดยได้มีการค้นพบ Prophenoloxidase (proPO) activating system (Mcvey, 1993; Sung *et al*., 1996) ซึ่งระบบนี้สามารถถูกกระตุ้นได้โดย immunostimulants เช่น Fucoidan และ beta-1,3-glucan ได้มีการทดลองใช้สาร Fucoidan ซึ่งสกัดจาก *Sargassum polycystum* พบว่าช่วยเพิ่มการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (Chotigeat *et al*., 2003) และยังยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* (สุประภา, 2545) และพบว่าการแช่กุ้งในสารละลายที่มี β-1,3-glucan ทำให้เพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *V. vulnificus* (Sung *et al*., 1994) นอกจากนี้ยังพบการต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus) เมื่อใช้ β-1,3-glucan ร่วมกับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ถูกทำให้อ่อนกำลังใน kuruma shrimp ทั้งนี้เนื่องจาก quasi-immune response ถูกชักนำเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสหรือการฉีดไวรัสที่อ่อนกำลังหรือโดยโปรตีนลูกผสมของไวรัส (Namikoshi *et al*., 2003) และจากการค้นพบโคลน pCR 154 (เอื้อมนัส, 2545) ในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งมีความเหมือนกับยีน ribosomal protein L26 (RPL26) ที่ได้จากการสกัดแยก cDNA ของ *P. japonicus* (Watanabe, 1993) คิดเป็น 98.6% และความเหมือนระหว่างโคลน pCR154 กับยีน RPL26 ของ Mus musculus คิดเป็น 63.1% โดยโปรตีน RPL26 มีการแสดงออกเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของ macrophage (macrophage activator) (Segade *et al*., 1995) ดังนั้นหากสามารถหาวิธีและระยะเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้น macrophage activating factor ที่สามารถป้องกันโรคได้ ก็จะเป็นอีกวิธีหนึ่งในการป้องกันโรคกุ้ง

บทตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

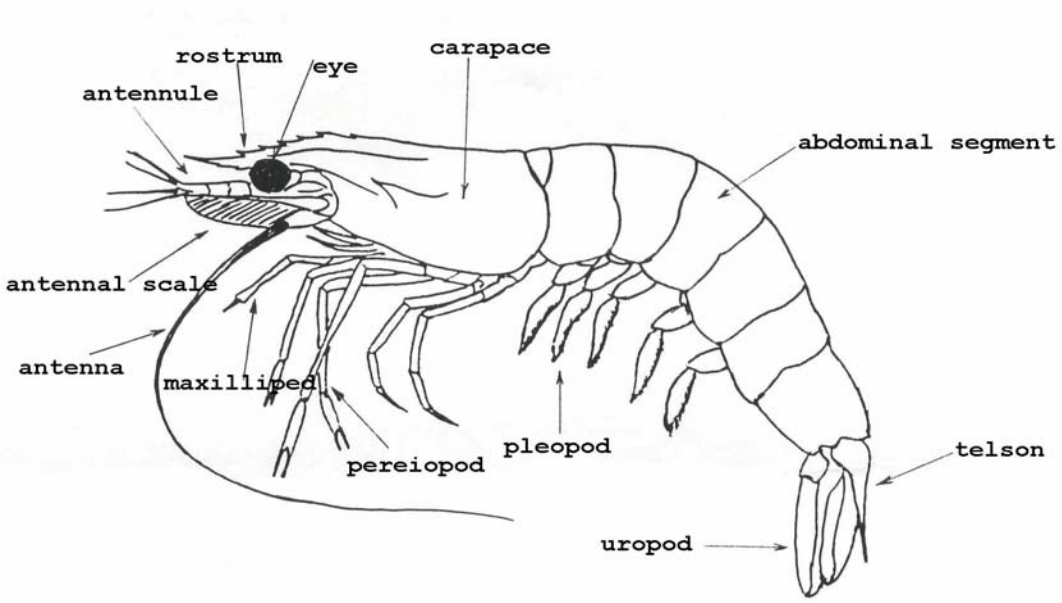
กุ้งกุลาดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์แตกต่างกันหลายชื่อตามนักวิทยาศาสตร์ที่ค้นพบ แต่ที่เป็นที่ยอมรับกันสากลคือ *Penaeus monodon* Frabricius และมีชื่อสามัญที่องค์การอาหารและเกษตรแห่ง สหประชาชาติ (FAO) ใช้กันอยู่คือ Giant tiger prawn (พรรณิภา, 2531) โดยกุ้งกุลาดำมีการจัดทางอนุกรมวิธานดังนี้ Phylum Athropoda, Class Crustacea, Subclass Malacostraca, Superorder Eucarida, Order Decapoda, Suborder Natantia, Family Penaeidea, Genus Penaeus (ประจวบ, 2532; Roch, 1999) จัดเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในตระกูล Penaeidae มีเปลือกหัวเกลี้ยงไม่มีขน ฟันกรีด้านบนมี 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ ช่วงข้างกรีทั้งสองด้านแคบ และยาวไม่ถึงฟันกรีสุดท้าย ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีเอกโซโพไดท์ (exopodite) เป็นกุ้งทะเลที่มีสีน้ำตาลเข้มและแถบสีเข้มกับจางพาดขวางลำตัว (กลุ่มบัณฑิตเกษตรอาสา, 2539) ขนาดโตเต็มที่มีความยาว 270 มิลลิเมตร และมีน้ำหนักถึง 260 กรัม (Motoh, 1981 อ้างโดย วรวิทย์และคณะ, 2534) สามารถเลี้ยงได้ในบ่อทุกประเภทเพราะอดทนสูง ทนต่อความเค็มที่ระดับ 0.2-70 ส่วนในพัน ชอบหากินตามพื้นบ่อ หากินตามหน้าดิน และกินอาหารได้ทุกเวลา พบตามธรรมชาติ แถบชายฝั่งไทย ฮ่องกง ออสเตรเลีย และชายฝั่งอินโดแปซิฟิก (สุภาพร, 2538) แหล่งกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในแถบอินโดแปซิฟิกตะวันตก แอฟริกาตะวันออก และตะวันตกเฉียงใต้และคาบสมุทรอินเดีย (พรรณิภา, 2531) นิยมเลี้ยงกันมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย (ประจวบ, 2531) กุ้งกุลาดำมีอายุไขประมาณ 18-24 เดือน วางไข่ในทะเลที่ระดับความลึกประมาณ 30-40 เมตร ใกล้กับพื้นดิน ไข่กุ้งในตระกูล Penaeus โดยทั่วไปจะหนักมากกว่าน้ำทะเลเล็กน้อยจึงมักจม ไข่ที่ผสมแล้วที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส จะเจริญและฟักออกเป็นตัวภายในเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นลูกกุ้งจะวิวัฒนาการและเปลี่ยนรูปร่างไปตามขั้นตอนดังนี้คือ

ลุกกุ้งวัยอ่อนระยะที่หนึ่ง (Nauplius) เป็นลูกกุ้งที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ ขนาดเล็กมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น รูปร่างค่อนข้างกลมมีระยางค์สามคู่ ระยะนี้ลูกกุ้งยังไม่กินอาหารแต่จะได้อาหารส่วนใหญ่จากถุงอาหาร (yolk sac) ที่ติดตัวมา ลูกกุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 45-50 ชั่วโมง ลอกคราบ 6 ครั้ง และมีชีวิตอยู่ตามหน้าดิน

ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สอง (Zoea) ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวโตเห็นได้ชัดค่อยๆ ลอยตัวสู่ผิวน้ำ เริ่มกินอาหารพวกแพลงค์ตอน เริ่มเดินทางเข้าหาฝั่ง และอยู่ในระยะนี้ประมาณ 4 วัน ลอกคราบ 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งรูปร่างจะเปลี่ยนไปจากเดิม

ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สาม (Mysis) มีลักษณะคล้ายพ่อแม่มากขึ้นสามารถมองเห็นส่วนหัวและส่วนท้องชัดเจนส่วนอกยังรวมอยู่กับส่วนหัวมีเปลือกคลุม กรีเห็นได้ชัด ลูกกุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 7 วัน ลอกคราบ 3 ครั้งและเจริญต่อไป

ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สี่ (Postlarva) มีตัวยาวประมาณ 5.56 มิลลิเมตร เปลือกคลุมส่วนหัวยาวประมาณ 1.57 มิลลิเมตร เริ่มมีระยางค์ครบเหมือนกุ้งเต็มวัย หางจะแคบเข้าจนแหลม ขาสำหรับเดินคู่แรกมีลักษณะเป็นก้ามมองเห็นชัดเจน และจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 30 วัน ลูกกุ้งจะเลี้ยงตัวอยู่บริเวณป่าไม้ ชายเลน หรือในแหล่งน้ำกร่อยประมาณ 3-4 เดือน และจะวิวัฒนาการไปเป็นกุ้งวัยรุ่น (Juvenile) เมื่ออายุประมาณ 6 เดือน ก็จะเดินทางออกสู่ทะเล เพื่อผสมพันธุ์ต่อไป (บรรจง, 2530)



รูปที่ 1 ลักษณะทางชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

Figure 1 Morphology of Black Tiger Shrimp (*P. monodon*)

ที่มา : Motoh (1981)

2. โรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ

โรคที่พบในกุ้งกุลาดำเกิดมาจากหลายสาเหตุด้วยกัน โดยอาจเกิดจากแบคทีเรีย ไวรัส โปรโตซัว เชื้อรา และอื่นๆ ดังตารางที่ 1 อันเนื่องมาจากการเลี้ยงในระบบเปิดประกอบกับการเลี้ยงแบบหนาแน่นทำให้ยากต่อการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมได้ เมื่อมีการระบาดของโรคจึงสร้างความเสียหายให้แก่ผู้เลี้ยงอย่างมหาศาล

ตารางที่ 1 โรคติดเชื้อกลุ่มต่างๆ ในกุ้งทะเล

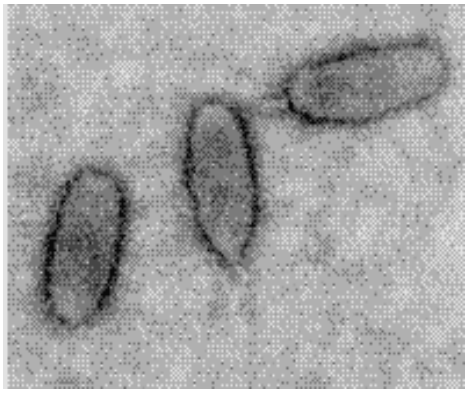
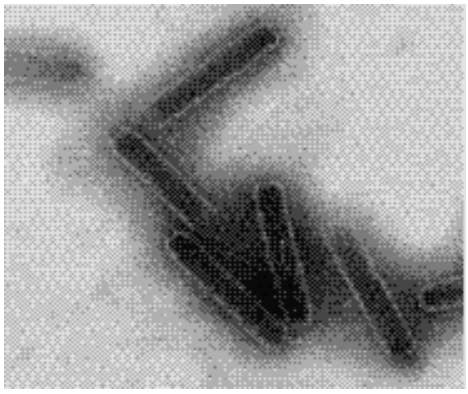
Table 1 Infectious diseases in marine shrimp

Protozoa and Fungi	Bacteria	Virus
Ciliates protozoan, Suctorians, Gregarine, Larval metazoan, Microsporidian, Haplosporidian Larvae mycosis	Black gill disease, Epicommensal, Gill brown disease, Necrotizing, Mycobacteriosis, Vibriosis, Rickettsial like organism	BMNV, BP, BPSV, GAV, HPV, IHHNV, LOV, LOW, LPV, MBV, RPS, SMV TSV, WSSV, YHV

ที่มา: ดัดแปลงจาก Lightner และคณะ (1997) อ้างโดย คูณชัย (2547)

3. โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV: White Spot Syndrome virus)

โรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำพบระบาดในประเทศจีนและญี่ปุ่นตั้งแต่ปี 2536 ส่วนในประเทศไทยพบระบาดปลายปี 2537 สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) ชนิดดีเอ็นเอรูปร่างแท่ง (Baculovirus) ขนาด 250-290 นาโนเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 110-120 นาโนเมตร (จิราพร และคณะ, 2538) เชื้อไวรัสสามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อใต้ผิวเปลือก เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ต่อมน้ำเหลืองและเม็ดเลือด เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กระเพาะอาหารและท่อทางเดินอาหาร เป็นต้น (Hameed *et al*., 1998; Nunan *et al*., 1998; Wongteerasupaya *et al*., 1995; Takahashi *et al*., 1994 อ้างโดย เอื้อมนัส, 2545) กุ้งที่เป็นโรคนี้มีลักษณะเป็นจุดสีขาว หรือดวงขาวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1-2 มิลลิลิตร กุ้งจะว่ายน้ำอยู่บริเวณผิวน้ำหรือเกยขอบบ่อ ไม่มีแรงดีดตัว กินอาหารลดลง บางครั้งพบกุ้งมีอาการลอกคราบไม่ออก หรือลอกคราบแล้วไม่แข็งตัว ตัวนิ่ม อัตราการตายของกุ้งหลังการเกิดโรคขึ้นกับแหล่งที่เลี้ยงและฤดูกาล ในช่วงที่มีอากาศหนาว หรือฝนตกติดต่อกันนานๆ อัตราการตายของกุ้งสูงถึง 80-100% ภายใน 4-5 วัน โดยอาการของกุ้งตัวแดงหรือดวงขาวพบได้ในกุ้งอายุตั้งแต่ 25 วันขึ้นไปจนถึงขนาดจับขาย การวินิจฉัยโรคสามารถตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้โดยวิธี PCR (พรเลิศ, 2538)

A  B 

รูปที่ 2 แสดงอนุภาคของไวรัสตัวแดงดวงขาว (A) และนิวคลีโอแคปสิด (B) จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

Figure 2 Electron microscopic of WSSV virions (A) and nucleocapsids (B)

ที่มา : Van Hulten และคณะ (2000)

4. ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง

กุ้งเป็นสัตว์ในกลุ่มครัสตาเชียนจึงมีกลไกการป้องกันตัวเป็นแบบไม่จำเพาะ โดยสามารถแบ่งระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งออกได้เป็น กลไกการป้องกันภายนอก (External defense) ได้แก่ คิวติเคิล (cuticle) และกลไกการป้องกันภายใน (Internal defense) ได้แก่ กลไกการป้องกันตัวโดยเซลล์ (Cellular defensive) เช่น กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis), nudule formation, encapsulation เป็นต้น และกลไกการป้องกันตัวโดยสารน้ำ (Humoral defensive) เช่น กระบวนการ agglutinin, lectin, antimicrobial peptide เป็นต้น

4.1 เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

เซลล์เม็ดเลือด (haemocyte) จัดเป็นเซลล์หลักในการก่อให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในกุ้งซึ่งเป็นสัตว์ในกลุ่มครัสตาเชี่ยน โดยสามารถจำแนกเซลล์เม็ดเลือดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และองค์ประกอบของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ออกได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

4.1.1 Agranulocyte หรือ hyaline cell หรือ hyalocytes

เป็นเซลล์ที่ไม่มีแกรนูลหรือมีจำนวนน้อยมากในไซโตพลาสซึม สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) ในกุ้งแต่ละชนิด (species) จะมีจำนวน hyaline cell แตกต่างกัน เช่น ใน *Penaeus japonicus* มี 10% ของระบบหมุนเวียนเลือด *Pacitastacus leniusculus* มี 3% ของระบบหมุนเวียนเลือดแต่ไม่พบ hyaline cell เลยใน *P.*

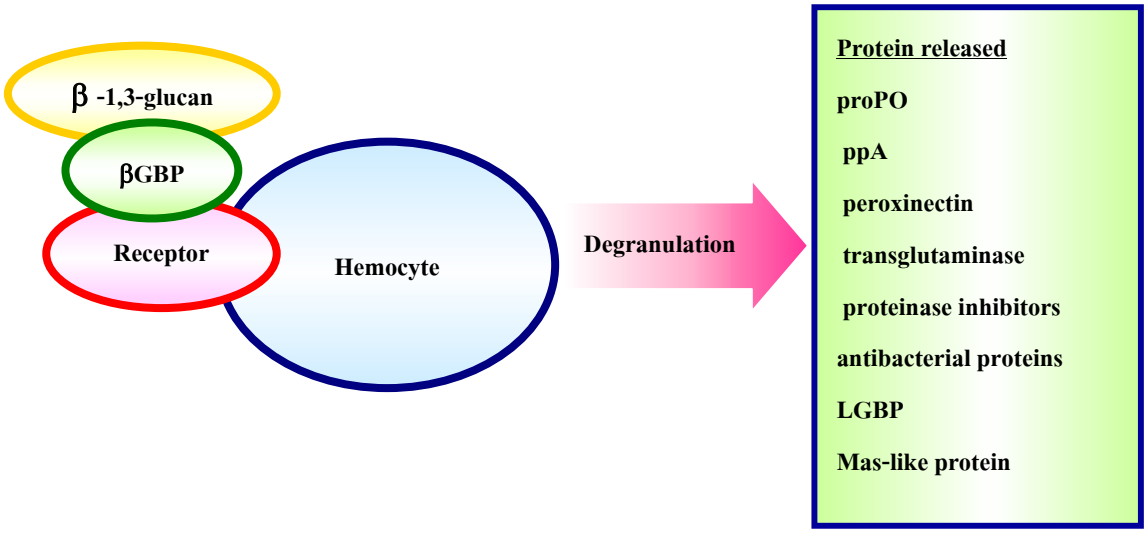
adespersus และ *Macrobrachium rosenbergii* (Tsing *et al*., 1989; Homblad and Soderhall, 1999)

4.1.2 Semi-granulocytes หรือ semi-granular cell

เป็นเซลล์ที่มีแกรนูลขนาดเล็ก ทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการกักล้อม (encapsulation) และเกี่ยวข้องกับกระบวนการ phagocytosis เซลล์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการจดจำและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ตัวกุ้ง และเกิดการจับกับผิวของสิ่งแปลกปลอม (Johasson and Soderhall, 1989) โดยทำปฏิกิริยากับสาร polysaccharide ของจุลินทรีย์ เช่น Lipopolysaccharide และ β-1,3-glucans เกิดการหลั่งสารสำคัญที่อยู่ในแกรนูล เช่น สารในระบบโปรพีโอ เป็นต้น ดังรูปที่ 3 (Soderhall and Cerenius, 1992)

4.1.3 Granulocytes หรือ granular cells หรือ eosinophilic granulocytes

มีขนาดของแกรนูลใหญ่ เป็นเซลล์ที่สะสม Prophenoloxidase activating system หรือระบบโปรพีโอ (proPO) แต่จะไม่หลั่งสารจากแกรนูลเมื่อกระตุ้นด้วยสารโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์และไม่เกิดกระบวนการ encapsulation (Soderhall and Cerenius, 1992)



รูปที่ 3 การตอบสนองต่อ β-1,3-glucans ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งก่อให้เกิดการสลายแกรนูลปลดปล่อยสารสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน

Figure 3 Degranulation of haemocytes activated by β-1,3-glucans

ที่มา : ดัดแปลงจาก Lee และคณะ (2002)

4.2 กระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของครัสตาเซี่ยน

4.2.1 ฟาโกไซโทซิส (phagocytosis)

เป็นกระบวนการภายหลังจากที่เชื้อบุกรุกผ่านชั้นของคิวติเคิล (cuticle) (Smith and Soderhall, 1983) โดยเกิดการเกาะของเม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอม และเกิดการกลืนกินเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมนั้น (Holmblad and Soderhall, 1999) โดยจะเกิดกับสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็ก และมีจำนวนน้อย จากการศึกษาพบว่าสัตว์พวกครัสตาเซี่ยนมีอัตราการเกิดฟาโกไซโทซิสของเม็ดเลือดอยู่ในช่วง 1-28% โดยพบว่าประสิทธิภาพของการเกิดฟาโกไซโทซิสขึ้นกับองค์ประกอบต่าง ๆ ที่มีอยู่ในน้ำเลือด และปัจจัยแวดล้อมภายนอก (Smith and Soderhall, 1983)

4.2.2 โนดูลฟอร์เมชัน (nodule formation)

เมื่อสิ่งแปลกปลอมมีจำนวนมากทำให้กระบวนการฟาโกไซโตซิสไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายได้หมด จึงต้องอาศัยกระบวนการสร้างโนดูล (Nodule) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่จะมารวมตัวกันรอบสิ่งแปลกปลอม เช่น จุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์ถูกจับอยู่ในชั้นต่าง ๆ ของเม็ดเลือดและกลายเป็นสีดำ (melanized) เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) (Soderhal and Cerenius, 1992) พบว่าในกุ้งกุลาดำกระบวนการโนดูลฟอร์เมชันมักเกิดบริเวณเหงือก เนื้อเยื่อตับ ต่อมน้ำเหลืองและหัวใจ (กิจการ และคณะ, 2543)

4.2.3 เอนแคปซูเลชัน (encapsulation)

เกิดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมขนาดใหญ่ ซึ่งเกินความสามารถที่กระบวนการฟาโกไซโตซิสจะกำจัดได้ กระบวนการนี้เกิดจากการที่เซลล์เม็ดเลือดแดงโดยเฉพาะเซมิแกรนูลาร์ฮีโมไซต์เข้าล้อมสิ่งแปลกปลอมในระบบไหลเวียนให้รวมกันด้วยเม็ดเลือดหลาย ๆ ชั้นแล้วกำจัดออกจากร่างกาย จากการศึกษาในกุ้งกุลาดำ พบกระบวนการเอนแคปซูลเลชันได้อย่างชัดเจนในแอ่งเลือด (กิจการ และคณะ, 2543)

4.2.4 ไซโทท็อกซิกซิตี (cytotoxicity)

การศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ที่ทำให้เกิดไซโตท็อกซิคซิตี ในสัตว์พวกครัสตาเซี่ยนมีน้อยมาก พบว่ากุ้งน้ำจืดในประเทศออสเตรเลียสามารถทำให้เกิดกระบวนการนี้โดยการใช้เซลล์มะเร็งเป็นเซลล์เป้าหมาย (Tyson and Jenkin, 1973 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) สำหรับกุ้งน้ำจืดในแถบยุโรป (*Astacus astacus*) เซลล์เม็ดเลือดจะทำการกำจัดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง (Soderhall *et al.*, 1985)

4.2.5 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเลคติน (lectin)

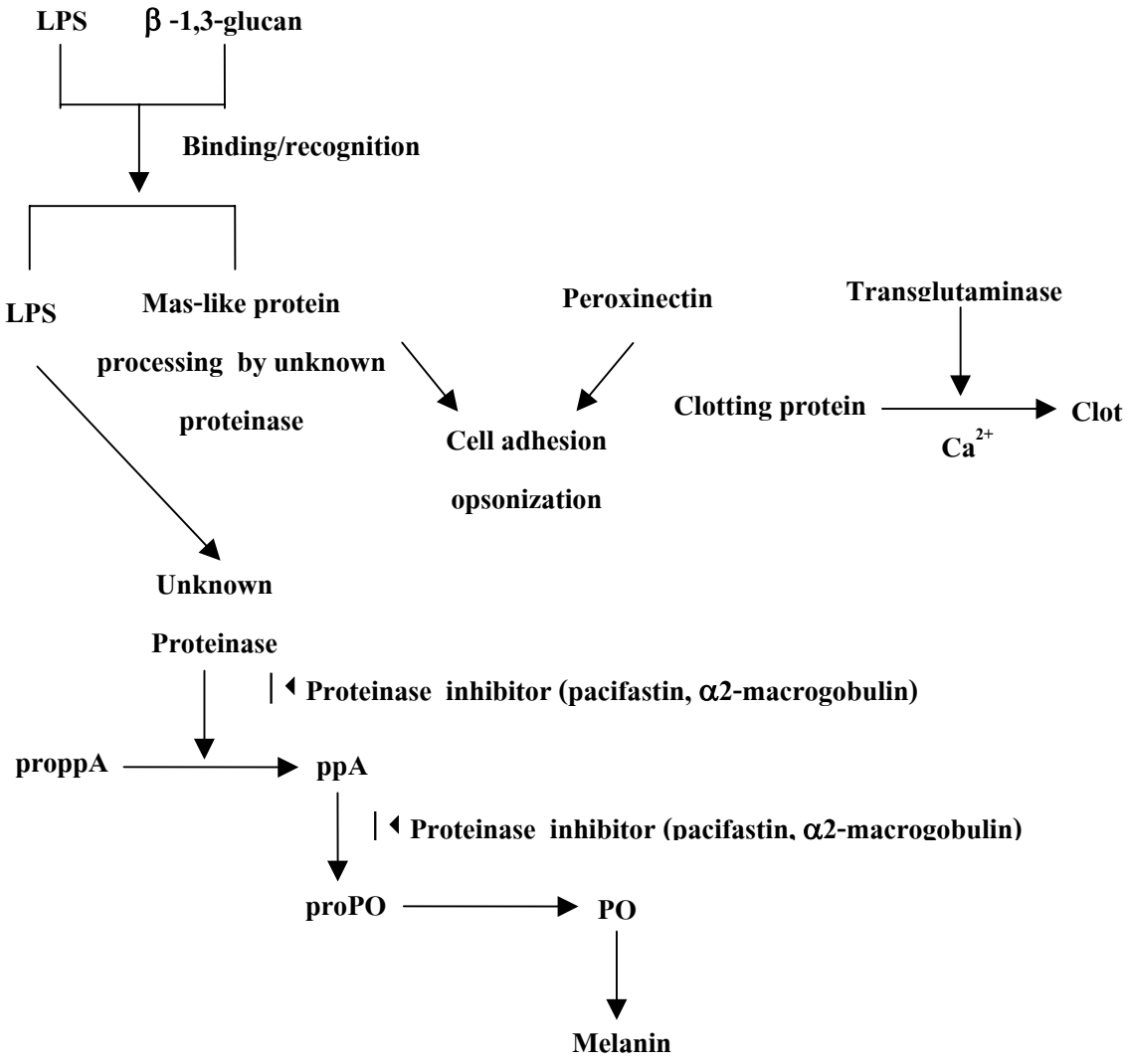
เลคติน (lectin) เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการจับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะเลคตินแต่ละชนิดจะจับกับน้ำตาลแตกต่างกันออกไป การจับของเลคตินทำให้สารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนหรือทำให้เซลล์เกาะกลุ่มกันได้ (agglutination) (Goldstein *et al.*, 1980) ในสัตว์จำพวกกุ้งเลคตินเป็นตัวการสำคัญในระบบการรับรู้ถึงการแทรกแซงของสิ่งแปลกปลอม (recognition system) (Ratcliffe *et al.*, 1985 อ้าง

โดย Soderhall and Cerenius, 1992) เลคตินสามารถทำให้จุลินทรีย์เกาะกลุ่มกันได้ (agglutination) และช่วยในกระบวนการเชื่อมต่อระหว่างเม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอมโดยการทำหน้าที่เป็นออพโซนิน (opsonins) Ratanapo และ Chulavatnatol (1990) ได้ทดลองแยกเลคตินที่บริสุทธิ์มาจากซีรัมของกุ้งกุลาดำ มีชื่อว่า โมโนดิน (monodin) มีน้ำหนักโมเลกุล 420 kDa และมี 27 kDa subunits ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับน้ำตาล N-acetylneuraminic acid (NANA), N-acetylgalactosamin (GalNAc), N-acetylglucosamine (GlcNAc) และ N-acetylmannosamine (ManNAc) นอกจากนี้พบว่า monodin สามารถชักนำให้เซลล์ของแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* เกาะกลุ่มกันโดยการเกาะกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งอย่างจำเพาะเจาะจงโดยน้ำตาล NANA

4.2.6 ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแอกทิเวติ้ง (prophenoloxidase activating system, proPO system)

เอนไซม์ตัวสำคัญในระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแอกทิเวติง คือ โปรฟีนอลออกซเดส (prophenoloxidase, pro PO) ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเมลาไนเซชัน (melanization reaction) เพื่อตอบสนองต่อจุลินทรีย์ที่เข้ามาในร่างกาย ปกติเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่อยู่ในแกรนูลจะอยู่ในรูปของโปรเอนไซม์ที่ไม่แอกทีฟ การเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปของเอนไซม์ phenoloxidase นั้นต้องอาศัยการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอนโดยพบว่าระบบนี้สามารถถูกกระตุ้นด้วยสารประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ได้แก่ lipopolysacharide (LPS), peptidoglycan และ β-1,3 glucan ซึ่งจะจับกับโมเลกุลจดจำได้แก่ β-1,3 glucan-binding protein (BGBP) และ lipopolysaccharide-β-1,3 glucan-binding protein (LGBP), (Duvic and Soderhall, 1990; Lee *et al*., 2000) เกิด complex จับกับเซลล์เม็ดเลือดก่อให้เกิดการสลายแกรนูลโดยมีการหลั่งของเอนไซม์ prophenoloxidase activating enzyme (ppA) พร้อมกับเอนไซม์ proPO โดยเอนไซม์ ppA ในรูปที่แอคทีฟสามารถเปลี่ยนเอนไซม์ prophenoloxidase ไปเป็น phenoloxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวสำคัญของกระบวนการ melanization โดยจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเพื่อเปลี่ยนสารกลุ่ม phenol ไปเป็น quinone และเปลี่ยนเป็น melanin ซึ่งจะช่วยยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้ (Soderhall and Cerenius, 1998) โดย melanin ที่เกิดขึ้นสามารถเห็นเป็นจุดสีดำบนเปลือกและเหงือกรวมทั้งบริเวณรอบ ๆ บริเวณที่เกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิส โนดูลฟอร์เมชั่น และเอนแคปซูลเลชั่น โดยกระบวนการโปรพีโอจะถูกควบคุมไม่ให้มีมากเกินไปด้วยเอนไซม์ proteinase inhibitor เช่น pacifastin และ α2-macroglobulin เป็นต้น ดังรูปที่ 4 นอกจากนี้ในระบบ prophenoloxidase ยังพบการทำงานของ peroxinetin ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการเกาะติดของเซลล์ (cell adhesion molecules) โดย peroxinectin ใน semi-granular และ granular hemocytes จะจับกับสิ่งแปลกปลอมและบางส่วนของโมเลกุลจับกับ integrin และ 90 kDa peripheral cell surface superoxide dismutase (SOD) ซึ่งเป็น transmembrane protein ทำหน้าที่เป็นตัวรับและจดจำสิ่งแปลกปลอมทำให้เอนไซม์กลุ่ม SOD และ peroxidase เปลี่ยนซุป

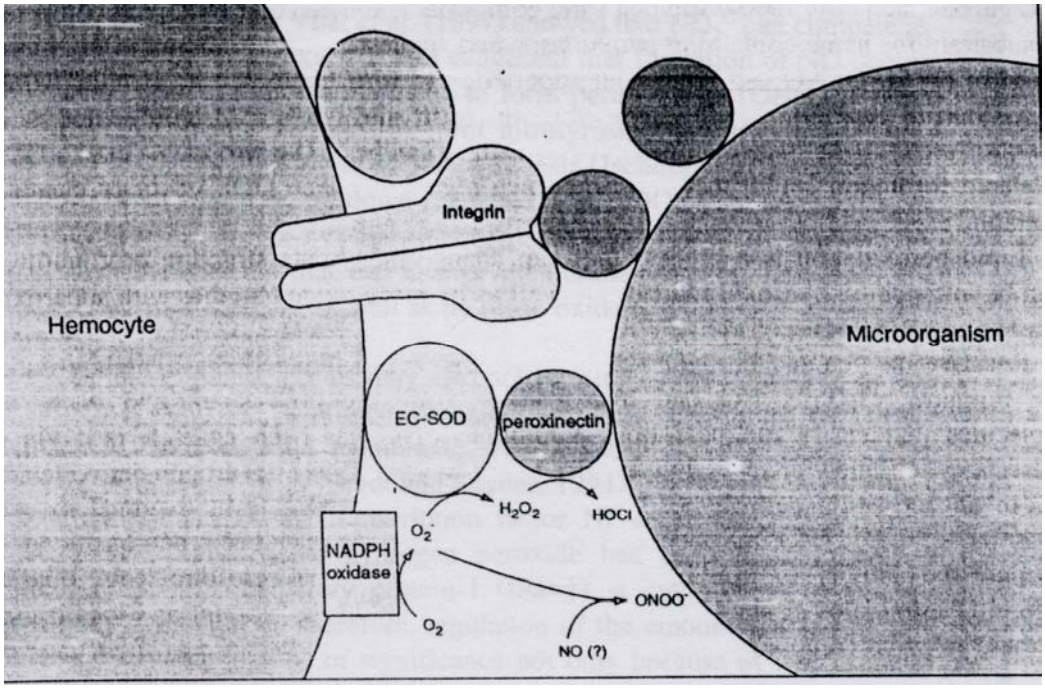
เปอร์ออกไซม์แอนไอออน (O_2^-) ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ (H_2O_2) ซึ่ง peroxinectin จะใช้ H_2O_2 สร้างสารพิษ เช่น hypochlorous acid (HOCl) หรือในสภาวะที่มี nitric oxide (NO) จะเปลี่ยนเป็น peroxynitrite ($ONOO^-$) เข้าทำลายเซลล์ของเชื้อโรคได้ ดังรูปที่ 5 (Sung *et al*., 1998 ; Holmblad and Soderhall, 1999)



รูปที่ 4 แสดงการเริ่มต้นกระบวนการต่าง ๆในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมโดยโมเลกุลจดจำ

Figure 4 Innitiation of several immune responses by pattern recognition protein.

ที่มา : Lee และ Soderhall (2002)



รูปที่ 5 แสดงการทำงานของ peroxinectin ในการทำลายสิ่งแปลกปลอม

Figure 5 Peroxinectin molecules opsonize the microorganism.

ที่มา : Holmblad and Soderhall (1999)

4.2.7 กระบวนการแข็งตัวของเลือดและการสมานบาดแผล (Clotting and wound healing)

สัตว์ในกลุ่มครัสตาเชี่ยนต้องมีกลไกกลุ่มนี้ที่มีประสิทธิภาพมากพอเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดจากรอยเปิดของบาดแผลที่เปลือกอันเนื่องมาจากการลอกคราบและการถูกโจมตีโดยเชื้อโรค โดยกระบวนการแข็งตัวของเลือดกุ้งแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของ plasma clot และส่วนของ cloting protein ในส่วนของ plasma clot จะมีสารคล้าย fibrinogen อยู่ในพลาสมา สามารถเปลี่ยนไปเป็น fibrin โดยมี transglutaminase ซึ่งได้จากไฮยาลินเซลล์และแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) เป็นส่วนสำคัญในการก่อให้เกิดการแข็งตัวของเลือด (Vargus-Albores *et al*., 1998) สำหรับการสมานบาดแผลนั้นเกิดจากแกรนูลาร์ฮีโมไซท์ (granular haemocyte) เป็นเซลล์ที่รับรู้การถูกทำลายเนื้อเยื่อจะมีการหลั่งสารกระตุ้นให้เซลล์ชนิดอื่นทำหน้าที่ในการสมานบาดแผลโดยการชักนำ coagulation (clot-forming substance) ได้แก่ plasma coagulagen ซึ่งหลั่งจาก fat body และ haemocyte coagulagen ที่หลั่งจากไฮยาลินเซลล์และเซมิแกรนูลาร์เซลล์ (Ghidalia *et al*., 1981 อ้างโดย Vargas-Albores *et al*., 1998)

4.2.8 กระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยใช้สารประกอบออกซิเจน (Reactive Oxygen Intermediates, ROIs)

เกิดจากสารอนุมูลอิสระในเมทาบอลิซึมของออกซิเจนซึ่งมีอยู่หลายชนิดเรียกรวมๆ กันว่า ROS (Reactive oxygen species) ได้แก่ superoxides ion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ Hydroxy radical (OH^-) โดยสารเหล่านี้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค โดยพบว่าในกุ้งกุลาดำจะมีการเกิด O_2^- ในปริมาณสูงเมื่อมีการกำจัดจุลินทรีย์และสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (Song and Hsieh, 1994)

4.3 ระบบภูมิคุ้มกันแบบกึ่งจำเพาะ (Quasi-immune response)

เป็นกระบวนการตอบสนองซึ่งเกิดจากการที่กุ้งมีการต้านทานต่อเชื้อไวรัสเนื่องมาจากการชักนำโดยการทำให้กุ้งได้รับเชื้อไวรัสหรือได้รับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเชื้อไวรัส จากการศึกษาของ Wu และคณะ (2002) พบการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวใน kuruma shrimp ปรากฏ 3 สัปดาห์ หลังจากได้รับเชื้อและยังคงอยู่ได้เป็นเวลา 1 เดือน โดยการตรวจสอบ virus neutralizing factor ใน hemolymph และจากการศึกษาของ Namikoshi และคณะ (2003) พบว่าการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวใน kuruma shrimp (*P. japonicus*) เพิ่มสูงขึ้นเมื่อทำการฉีดด้วยด้วยวัคซีนจากเชื้อตัวแดงดวงขาวเพียงอย่างเดียวและจะยิ่งมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันอื่นๆ เช่น β-1,3 glucan หรือวัคซีนจาก *Vibrio penaeicida* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลิน นอกจากนี้โปรตีนลูกผสม (recombinant protein) จากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ได้แก่ rVP26 และ rVP28 ยังมีคุณสมบัติในการเสริมการต้านทานต่อเชื้อตัวแดงดวงขาวอีกด้วย นอกจากนี้ Venegas และคณะ (2000) ได้ทำการทดลองใน kuruma shrimp โดยการฉีดไวรัส PRDV (penaeid rod-shaped DNA virus) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค PAV (penaeid acute viremia) ให้กับ kuruma shrimp ที่รอดตายจากโรค PAV พบว่ากุ้งมีการต้านทานต่อเชื้อ PRDV เพิ่มสูงขึ้น และจากการศึกษาของ พจนพร (2543) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะมียีนที่แตกต่างจากกุ้งปกติ เช่น ยีนที่มีความเหมือนกับ chromosome 21 interferon/interleukin จากโคลน pTE70 โดยยีนดังกล่าวจะทำหน้าที่ควบคุมการสร้างสารในกลุ่มไซโตไคน์ที่สามารถขัดขวางการเพิ่มจำนวนของไวรัสและเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบต่างๆในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Cooper *et al*., 1996; Boydan, 2000 อ้างโดย พจนพร, 2543) นอกจากนี้ เอื้อมนัส (2545) ได้ทำการศึกษายีนที่มีปฏิกิริยากับไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ พบว่ายีนจากโคลน pCR154 ในกุ้งที่ติดเชื้อตัวแดงดวงขาวมีความเหมือนกับยีน ribosomal protein L26 (RPL26) ที่ได้จากการสกัดแยก cDNA ของ *P. japonicus* (Watanabe, 1998) 98.6% และเหมือนกับยีน RPL26 จาก *Mus musculus* คิดเป็น 63.1% โดยโปรตีน RPL26 มีการแสดงออกเป็นตัวกระตุ้น macrophage activating factor (Segade *et al*., 1995 อ้างโดย เอื้อมนัส, 2545) จรีพร (2546) ได้ทำการชักนำระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ด้วยเชื้อไว

รัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) และไวรัสหัวเหลือง (YHV) พบว่ากุ้งที่รอดตายและมีความสามารถในการกำจัดเชื้อครั้งแรกออกได้หมดจะมีความสามารถในการต้านทานต่อการติดเชื้อซ้ำได้สูงขึ้น โดยเชื้อ WSSV มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันให้กุ้งต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ได้ดีกว่าเชื้อ YHV โดย WSSV สามารถเหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดต้านทานไวรัสได้ดีที่สุดหลังได้รับเชื้อครั้งแรก 43 วัน ในขณะที่ YHV สามารถเหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดต้านทานไวรัส WSSV และ YHV ได้ดีที่สุดหลังได้รับเชื้อครั้งแรก 46 และ 60 วัน ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาเหล่านี้พอจะชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ว่าเมื่อกุ้งเกิดการติดเชื้อไวรัส หรือได้รับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อไวรัสจะสามารถชักนำให้เกิดการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันมายับยั้งไวรัสได้ โดยกลไกในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัสนั้นยังต้องมีการศึกษากันต่อไป

5. การกระตุ้นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage activation)

จากการทดลองของ Segade และคณะ (1995) พบว่าเมื่อทำการทดลองเลี้ยงเซลล์ macrophage-like cell line RAW 264.7 โดยการกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS), interferon γ (IFN γ) และซิลิกาซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอมพบว่าจะมีปริมาณ mRNA ของ RPL26 ซึ่งมีการแสดงออกเป็นตัวกระตุ้น macrophage activating factor เพิ่มขึ้นมากกว่าสภาวะปกติ นอกจากนี้ยังมีรายงานในปลา rainbow trout พบว่าเมื่อกระตุ้น leucocyte ด้วย mitogen พบ macrophage activating factor ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านทานไวรัสด้วยโดยพบ interferon activating (Graham and Secombes, 1990) Tafalla และคณะ (2001) ได้ศึกษาผลของการติดเชื้อ viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) ต่อการผลิต Nitric oxide (NO) ของ turbot posses head kidney macrophage โดยเปรียบเทียบระหว่าง macrophage ที่มีการตอบสนองต่อ LPS (LPS-responsive macrophage) กับ macrophage ที่ไม่ตอบสนองต่อ LPS (LPS-non-responsive macrophage) พบว่าเมื่อใช้ LPS เพียงอย่างเดียวสามารถกระตุ้น 1 ใน 3 (30.2 %) ของ LPS- responsive macrophage ให้สร้าง NO ได้มากขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ขณะที่ LPS-non-responsive macrophage ในสภาวะที่มี LPS เพียงอย่างเดียวจะมีการสร้าง NO ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่เมื่อใช้ LPS ร่วมกับ tumor necrosis factor α (TNFα), macrophage activating factor (MAF) และ interferon (IFN) พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้าง NO ใน LPS-non-responsive macrophages จากการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นถึงความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจโดยการใช้สารต่างๆ เช่น เชื้อไวรัส และ LPS ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแบคทีเรีย เป็นต้น

6. การใช้สารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Immunostimulants) ในกุ้ง

สารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเป็นสารซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวทำให้เกิดความต้านทานต่อโรคติดเชื้อจากไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และช่วยลดความเสี่ยงของการระบาดของโรคโดยควรให้ก่อนที่สัตว์จะเกิดสภาวะเครียด หรือสภาวะที่เสี่ยงต่อการทำให้เกิดการอ่อนแอ เช่น การจับ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและสภาพแวดล้อม (Raa, 2000) ปัจจุบันพบว่ามีการนำสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากแหล่งต่าง ๆ (ตารางที่ 2) มาประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรคติดเชื้อในกุ้ง ดังนี้

6.1 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากจุลินทรีย์

สารที่เป็นส่วนประกอบแบคทีเรีย ได้แก่ lipopolysaccarides (LPS), lipopeptides, capsular glycoproteins และ muramylpeptides โดย Itami และคณะ (1989) ทำการทดลองถึงประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันโรค vibriosis ใน *P. japonicus* โดยใช้ *Vibrio* sp. NU1 ที่ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.5% แล้วให้วัคซีนโดยวิธีการฉีด การแช่ และการสเปรย์ พบว่าการให้วัคซีนทั้ง 3 แบบ สามารถป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio* sp. NU-1 ได้นอกจากนี้เมื่อนำเชื้อ Vibrio ซึ่งฆ่าด้วยฟอร์มาลิน 0.5% มาผสมในอาหาร (microencapsulated diet) สำหรับลูกกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ระยะ zoea พบอัตราการรอดตายของลูกกุ้งทดลองที่ได้รับอาหารดังกล่าวสูงกว่ากลุ่มควบคุม (Itami *et al.*, 1991) แต่จากการทดลองของกิจการและสิทธิ (2538) เมื่อใช้วัคซีนจากเชื้อ *Vibrio sp.* กับกุ้งกุลาดำโดยวิธีการแช่พบว่าหลังจากแช่วัคซีนเป็นเวลา 7 วัน ค่าความว่องไวของเม็ดเลือดกุ้งในการจับกินสิ่งแปลกปลอมมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และพบว่าไม่มีความต้านทานต่อ *Vibrio sp.* โดยอัตราการตายใกล้เคียงกับชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ สาวิตรีและกิจการ (2543) ใช้วัคซีนจาก *V. harveyi* ด้วยวิธีการให้กินและวิธีการแช่พบว่าสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง เช่น ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* แต่พบว่าการให้โดยวิธีการกินและวิธีการแช่ยังมีประสิทธิภาพต่ำในการป้องกันเชื้อโดยมีค่า RPS (relative percent survival) เพียง 60% เท่านั้น นอกจากนี้ Itami และคณะ (1992) ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่ป้องกันโรควิบริโอซิส (Vibriosis) โดยใช้วัคซีนจากเชื้อ *Vibrio* sp. NU-1 ที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลินทดสอบโดยการแช่กุ้งลงในวัคซีนความเข้มข้น 10, 1, 0.5 และ 0.1% เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจาก 2 สัปดาห์ นำกุ้งไปแช่เชื้อ *Vibrio* sp. NU-1 พบว่าวัคซีนความเข้มข้น 1% มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ดีที่สุดคือ 50 วัน นอกจากนี้ยังได้มีการทดลองเตรียมวัคซีนในรูปแบบต่าง ๆ คือ วัคซีนที่ใช้เชื้อทั้งตัว (whole vaccine) วัคซีนที่ใช้เชื้อที่ได้จาการปั่นแยกแล้วกรองเอาเฉพาะส่วนน้ำ (cell free vaccine) วัคซีนที่ได้จากเชื้อที่ได้ที่มีการปั่นแยกโดยไม่ต้องมีการกรอง (cell vaccine) วัคซีนที่มีการทำให้เซลล์แตกออกเป็นชิ้นส่วนต่าง ๆ (ultrasonicated vaccine) และวัคซีนที่มีการฆ่าเชื้อให้ตายด้วยความร้อน (heat killed vaccine) โดยให้วัคซีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที พบว่าวัคซีนแบบ ultrasonicated vaccine ให้ประสิทธิภาพในการ

ป้องกันเชื้อได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพลาสมาที่ได้จากกุ้ง *P. vannamei* ปกติจะไม่มีคุณสมบัติยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ แต่เมื่อทำการฉีดวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *V. harveyi* พบว่าพลาสมาที่ได้หลังการฉีดวัคซีนมีคุณสมบัติยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์โดยเริ่มตั้งแต่ 6 ชั่วโมงถึง 7 วัน หลังฉีดเชื้อ (Alabi *et al*., 2000) นอกจากนี้ยังพบคุณสมบัติในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสโดยจากการศึกษาของ Takahashi และคณะ (2000) พบว่าสาร lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งสกัดได้จาก *Pantoea agglomerans* นำผสมอาหารให้แก่กุ้ง *P. japonicus* ในปริมาณ 20, 40 และ 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน แล้วทำการเก็บตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดที่ 1 วัน 5 วัน และ 7 วัน ไปทดสอบ phagocytic activity และ phenoloxidase (PO) activity พบว่ามีค่าสูงสุดในกลุ่มซึ่งได้รับอาหารผสม LPS เป็นระยะเวลา 7 วัน นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบอัตราการมีชีวิตรอดจากเชื้อไวรัส PRDV หลังได้รับอาหารผสม LPS ปริมาณ 20, 40 และ 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน โดยให้อาหารเป็นระยะเวลา 8 วัน แล้วจึงทำการให้เชื้อไวรัส PRDV โดยวิธีแช่เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดหลังได้รับเชื้อไวรัสไป 10 วัน เป็น 75% 64.7% และ 52.9% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 0%

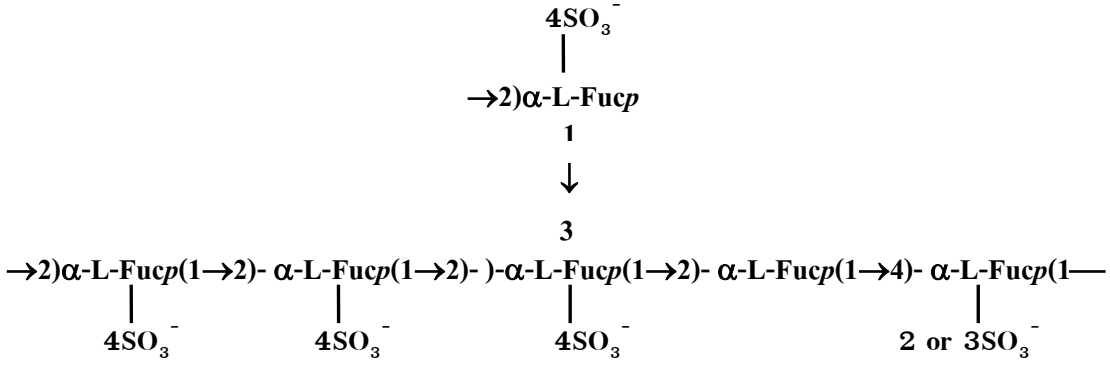
β-1,3-glucan สามารถพบได้ในแบคทีเรีย และ mycelial fungi สำหรับผนังเซลล์ของยีสต์ขนมปัง (Baker 's yeast) พบสาร β-1,3/1,6-glucan (Raa, 2000) จากการทดลองของมลฤดี และคณะ (2543) โดยใช้สารสกัดบีต้ากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* นำไปผสมในอาหารให้มีปริมาณบีต้ากลูแคน 0.1% แล้วนำไปเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 45 วัน โดยแบ่งอาหารออกเป็น 4 สูตร คือ อาหารชุดควบคุม อาหารผสมผนังเซลล์ยีสต์ อาหารผสมสารบีต้ากลูแคนก่อนทำให้บริสุทธิ์และอาหารผสมสารบีต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมบีต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ให้ผลในการต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* สูงสุด

peptidoglycan เป็นสารที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนและน้ำตาล พบได้ในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์หลายชนิด จากการทดลองของ Hennig และคณะ (1998) พบว่า kuruma shrimp (*P. japonicus)* ที่ได้รับอาหารที่ผสม peptidoglycan จะมีความสามารถในการต่อเชื้อ PR-DV ได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Itami และคณะ (1998) ซึ่งศึกษาการเสริมการต้านทานต่อโรคใน kuruma shrimp (*Penaeus japonicus)* ภายหลังจากได้รับอาหารซึ่งผสม peptidoglycan จาก *Bifidobacterium thermophilum* โดยพบการต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio penaeicida* และไวรัสตัวแดงดวงขาวสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

6.2 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากพืช

สาร Fucoidan เป็น sulfate polysaccharide (รูปที่ 6) ชนิดหนึ่งที่มักพบสาหร่ายสีน้ำตาล โดย Takahashi และคณะ (1998) ได้เตรียม fucoidan จากสาหร่าย *Cladosiphon okamuranus* ใช้ในการควบคุมโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้ง kuruma shrimp โดยกุ้งน้ำหนัก 12.2 กรัม เมื่อได้รับสาร fucoidan ที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน พบอัตรา

การรอด 78.9% และที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน พบอัตราการรอด 82.4% ในระยะเวลา 15 วัน ซึ่งสอดคล้องกับวิจัยของ Chotigeat และคณะ (2003) โดยการทดลองใช้สาร fucoidan ที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Sargassum polycystum*) ผสมกับอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่าสามารถลดอัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ ที่ระดับความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ทำให้กุ้งกุลาดำอายุ 60 วัน มีอัตราการรอดเป็น 46% และที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ทำให้กุ้งกุลาดำอายุ 90 วัน มีอัตราการรอดเป็น 93% โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่ม sulfate polysacharide จะไปยับยั้งการดูดซึมของ enveloped virus เนื่องจากประจุลบของ sulfate group จะไปจับกับ amino acid site chain ซึ่งมีประจุบวกของไวรัส ทำให้ไม่สามารถเข้าเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้าน จึงเป็นการป้องกันการติดเชื้อจากไวรัสได้ (Witvrouw and De Clercq, 1997)



รูปที่ 6 โครงสร้างและองค์ประกอบของ fucoidan

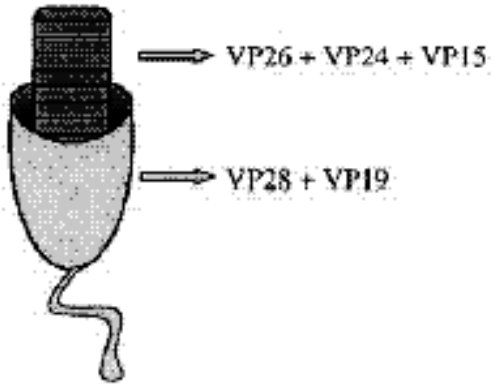
Figure 6 Structure and composition of fucoidan

ที่มา : Doner และ Whistler (1973)

6.3 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากไวรัส

จากการศึกษาของ Venegus และคณะ (2000) ใน kuruma shrimp โดยการฉีดไวรัส PRDV (penaeid rod-shaped DNA virus) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค PAV (penaeid acute viremia) ให้กับ kuruma shrimp ที่รอดตายจากโรค PAV พบว่ากุ้งมีการต้านทานต่อเชื้อ PRDV เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wu และคณะ 2002 พบการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวใน kuruma shrimp ปรากฏ 3 สัปดาห์ หลังจากได้รับเชื้อและยังคงอยู่ได้เป็นเวลา 1 เดือน โดยการตรวจสอบ virus neutralizing factor ใน hemolymph นอกจากนี้จากการศึกษาของ Namikoshi และคณะ (2003) ทำการทดลองการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวใน kuruma shrimp (*P. japonicus*) โดยการฉีดวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำให้อ่อนกำลังโดยฟอร์มาลีนหรือความร้อน พบว่าวัคซีนทีผลิตจากเชื้อตัวแดงดวงขาวที่ทำให้อ่อนกำลังโดยฟอร์มาลีนให้ผลในการต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ดีกว่าการทำให้อ่อนกำลังโดยใช้ความร้อน และการใช้วัคซีนจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำให้อ่อนกำลังโดยฟอร์มาลีนร่วมกับกลูแคน หรือร่วมกับวัคซีนที่ผลิตจาก *V. penaeicida* ช่วยเสริมประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว นอกจากนี้การใช้โปรตีนลูกผสมของไวรัสตัวแดงดวงขาว ได้แก่ rVP26 และ rVP28 ฉีดเข้าสู่กุ้งโดยมีการฉีดซ้ำหลังจากฉีดวัคซีนครั้งแรกไป 30 วัน พบว่า rVP28 มีการกระตุ้นให้เกิดการต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้สูงกว่า rVP26 Wittveldt และคณะ (2004) ได้นำโปรตีนลูกผสมของไวรัสตัวแดงดวงขาว ได้แก่ VP19 และ VP28 ฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำแล้วจึงให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในวันที่ 2 และ 25 หลังได้รับวัคซีน พบว่ากลุ่มซึ่งได้รับโปรตีน VP19 มีค่า relative percent survival เป็น 33% และ 57% ตามลำดับ สำหรับกลุ่มซึ่งได้รับโปรตีน VP28 และ โปรตีนผสมระหว่าง VP19 และ VP28 มีค่า RPS สูงกว่ากลุ่มควบคุมภายหลังได้รับโปรตีนในวันที่ 2 เท่านั้น โดยมีค่า RPS เป็น 44% และ 33% ตามลำดับ และจากการศึกษาในปีเดียวกัน เมื่อทำการผสมโปรตีนลูกผสม VP19 และ VP28 กับอาหารให้แก่กุ้งกุลาดำ เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วจึงทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธีแช่ พบว่าโปรตีน VP28 มีคุณสมบัติในการลดอัตราการตายของกุ้งกุลาดำได้ โดยมีอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 61% แต่ไม่พบคุณสมบัติดังกล่าวในโปรตีน VP19 นอกจากนี้ได้มีการทดลองให้โปรตีน VP28 ผสมอาหาร แล้วจึงทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังไดรับ VP28 เป็นระยะเวลา 3 วัน 7 วัน และ 24 วัน พบว่ามีอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 64% 77% และ 29% ตามลำดับ

จากการศึกษาดังกล่าวเป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อไวรัสที่ทำให้อ่อนกำลังแล้ว รวมทั้งโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัส (รูปที่ 7) จะเป็นตัวชักนำให้กุ้งเกิดต้านทานต่อไวรัสชนิดนั้นๆ ได้ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรคติดเชื้อจากไวรัสซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในปัจจุบัน



รูปที่ 7 แบบจำลองแสดงโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของอนุภาคของไวรัสตัวแดงดวงขาว
Figure 7 Simplified model of WSSV virion proteins.

ที่มา : Van Hulten และคณะ (2002)

ตารางที่ 2 แสดงกลุ่มของสารที่ใช้กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในครัสเตเชียน

Table 2 Summary of the key groups of compounds reported to stimulate the crustacean immune system

Immunostimulant	Crustacean species	Nature of study	Study duration	Rout of administration
(i) Live bacteria				
V. harveyi (strain DPEX)	*Litopenaeus vannamei*	In vivo challenge	7 days	Haemocoelic injection
(ii) Killed bacteria				
V. vulnificans	*Penaeus monodon*	Phenoloxidase and Superoxidedetermination	72 h	Immersion
V. harveyi (Strains BP03, BP04, BP05 and IN7)	*Penaeus monodon*	Survival rate	48 h	Immersion
Vibrio spp. (ANM 708)	*Macrobrachium Rosenbergii*	Survival rate	35 days	Immersion
(iii) Glucan				
β-1,6-/β-1,3-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*	*Penaeus monodon*	Phenoloxidase determination and survival rates	43 days	Immersion
β-1,6-/β-1,3-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*	*Penaeus monodon*	Stress tolerance,growth and survival rate	154 days	Immersion
	Litopenaeus vannamei	Survival rates and growth studies	7 weeks	Dietary component

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Immunostimulant	Crustacean species	Nature of study	Study duration	Route of administration
β-1,3-glucan from *Laminaria digitata*	*Penaeus monodon*	In vitro assays	1 h	In vitro addition
β-1,3-glucan from *Schizophyllum commune*	*Penaeus monodon*	Survival rates and in vitro assays	40 days	Dietary component
(iv) Peptidoglycans				
From Brevibacterium *Lactofermentum*	*Penaeus monodon*	Survival rates and growth studies	8 weeks	Dietary component
From *Bifidobacterium Thermophilum*	*Marsupenaeus japonicus*	Survival rate and phagocytosis assay	95 days	Dietary component
Commercial formulation	*Penaeus monodon*	In vitro assays	1 h	In vitro addition
(v) Lipopolysaccharides				
From *Escherichia coli serotype* 055:135	*Penaeus monodon*	In vitro assay	1 h	In vitro addition
From *Pantea agglomerans*	*Marsupenaeus japonicus*	Survival rates and in vitro assays	10 days	Dietary component

ที่มา: ดัดแปลงจาก Smith และคณะ (2003)

7. Ribosomal protein L26 (RPL26)

Ribosome ของสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (eukaryotes) ประกอบด้วย ribosomal RNAs 4ชนิด และ ribosomal proteins ประมาณ 80 ชนิด ribosomal protein มีบทบาทสำคัญในการทำงานของ ribosomes โดยพบทั้งใน large และ small subunits โดย ribosomal protein ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ในบริเวณ active center ของ ribosome มีบทบาทสำคัญในการทำปฏิกิริยากับ ribosomal protein จากอีก subunit ในการเกิดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนั้น ribosomal proteins ยังเป็นตัวควบคุมการเริ่มของกระบวนการแปลรหัส (translation) ในส่วนของ peptidyl transferase และการทำปฏิกิริยากับ elongation factor -2 (EF-2) (Nygard *et al.*, 1987) หนึ่งใน ribosomal protein ที่กล่าวมาแล้วทั้งหมดนี้ก็คือ ribosomal protein 26 (RPL26) จากการศึกษา ribosome ในยีสต์ พบว่าศูนย์กลางการทำงานมีตำแหน่งใกล้กับบริเวณผิวของ ribosome ซึ่ง RPL26 อาจมีตำแหน่งอยู่ใน A site โดยมีส่วนร่วมใน subunit interaction (Lee and Horowitz, 1992) RPL26 สามารถ Label ด้วย affinity labeling ที่เป็น aminoacyl-t RNA (Perez-Goselbez *et al.*, 1978) และสามารถ cross-linked กับ RPL 29 (Xiang and Lee, 1988) บริเวณ A site และ peptidyl transferase center (Yeh *et al.*, 1986) RPL26 ในหนูสามารถ cross-linked กับ elongation factor 2 ชี้ให้เห็นว่า RPL26 เป็นส่วนหนึ่งของการจับระหว่าง EF-2 กับ 60s ribosomal subunit ในการย้าย peptidyl-tRNA จาก A site ไปยัง P site ระหว่างการเกิดพันธะเปปไทด์ (peptide bond) (Nygard *et al.*, 1987)

การแสดงออกของยีนของ ribosomal protein และกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนมีความเกี่ยวข้องกับสภาวะต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับเซลล์ เช่น การปรับตัวและการตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์ (Mager, 1998) พบ ribosomal protein จำนวนมากในการพัฒนาเป็นระยะต่างๆ ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังได้แก่ ใน insects (Craig and Denlinger, 2000) crustaceans (Watanabe, 1998 and Synder, 1999) และใน molluscs (Rhodes and Van Beneden, 1997) ในการค้นหายีนที่ทำให้เกิดการต้านทานต่อยา พบว่ายีน RPL26 มีการแสดงออกสูงใน drug-sensitive lung cancer cell line ในคน (Zaman, 1993) Watanabe (1998) ได้ทำการแยก cDNA ของ RPL26 ได้จาก *Penaeus japonicus* ในช่วงที่มีการลอกคราบ (molt cycle) โดยมีการแสดงออกในระดับที่คงที่ตลอดช่วงที่มีการลอกคราบ ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเข้าสู่สภาวะที่จำเพาะที่เกิดขึ้นได้ เช่น การลอกคราบ นอกจากนี้ Larade และคณะ (2001) ได้ทำการค้นหายีนจาก hepatopancreas cDNA library ของทากทะเล (*Littorina littorea*) ที่ถูกรบกวนการรับออกซิเจน (anoxia exposure) พบการแสดงออกของยีน RPL26 สูงขึ้น และพบว่า cGMP ซึ่งมีส่วนร่วมในกระบวนการส่งสัญญาณของสารต่างๆ เช่น hormone neurotransmitters, protein kinase, cyclic nucleotide-gated channels และ phosphodiesterases (Lucas *et al.*, 2000) นั้นมีบทบาทสำคัญในการแสดงออกของ RPL26 ที่สูงขึ้น โดยผ่านทาง cGMP-mediated signaling cascade เพื่อให้มีการสังเคราะห์โปรตีนกลับคืนมาใช้ในการมีชีวิต

รอดของ *L. littorea* จากการศึกษาของ Segard และคณะ (1996) พบว่ายีน RPL26 มีการแสดงออกสูงขึ้นใน macrophage cell line ของหนูเพื่อตอบสนองต่อสารที่มากระตุ้น (macrophag activators) ได้แก่ silica, LPS และ IFNγ ซึ่งระดับการแสดงออกของ RPL26 ที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงระดับการสังเคราะห์องค์ประกอบของ ribosome ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อใช้ในการกระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจ (macrophage activation) และจากการทดลองของ เอื้อมนัส (2545) เพื่อค้นหายีนที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ WSSV ในเลือดของกุ้งกุลาดำ พบการแสดงออกของยีน RPL 26 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rojtinakorn และคณะ (2002) พบการแสดงออกของยีน RPL 26 ในเลือดของกุ้งคุรุมา (*P. japonicus*) ที่ติดเชื้อ WSSV เช่นกัน

ในการศึกษาในครั้งนี้จึงได้ใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ในการป้องกันกุ้งกุลาดำจากการติดเชื้อ WSSV และใช้ระดับการแสดงออกของยีน RPL26 ที่สูงขึ้นจากการชักนำด้วยสารเหล่านั้นเป็นตัวชี้ถึงการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบการแสดงออกของ Ribosomal protein L26 (Macrophage activating protein) ของกุ้งจากการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำให้อ่อนกำลัง เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ทำให้อ่อนกำลัง และสาร fucoidan โดยใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน
2. เพื่อทดสอบการป้องกันโรคกุ้งโดยการกระตุ้นการสร้าง Ribosomal protein L26
3. เพื่อทดสอบคุณสมบัติของ Ribosomal protein L26 ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง

วัตถุประสงค์

4. ทดสอบการแสดงออกของ Ribosomal protein L26 (Macrophage activating protein) ของกุ้งจากการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) ได้แก่ เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำให้อ่อนกำลัง เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ทำให้อ่อนกำลัง และสาร fucoidan โดยใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน
5. ทดสอบการป้องกันโรคกุ้งโดยการกระตุ้นการสร้าง Ribosomal protein L26
6. ทดสอบคุณสมบัติของ Ribosomal protein L26 ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง