

การตอบสนองภูมิคุ้มกันกึ่งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) ต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว

จรีพร เรืองศรี¹ อมรรัตน์ พงศ์ดารา² พูนสุข ประเสริฐสรรพ³ และ กิจการ สุภมาตย์⁴

Abstract

Ruang Sri, J.¹, Phongdara, A.², Prasertsan, P.³ and Supamattaya, K.¹

Immune response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) to yellow head virus (YHV) and white spot syndrome virus (WSSV)

Songklanakar J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1) : 239-252

Immunological responses of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) were induced under laboratory conditions by injecting white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV). The survivors from WSSV and YHV infection showed improvement in their immunity against the re-challenging by both viruses. The WSSV survivors showed higher capability than that of YHV survivors in developing the immunity. The highest relative percent survival (RPS) against WSSV and YHV noted after a 43-day period of WSSV injection was 67 and 37.5%, respectively. While the RPSs against both viruses after periods of 46 and 60 days of the YHV injection were 37.5 and 12.1%. Similarly, an *in vitro* neutralization activity of plasma

¹Aquatic Animal Health Research Center, Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources,

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, ³Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

¹วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) นักวิชาการประมง ⁴Dr. rer. nat. (Aquatic Animal Disease) รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ³D.Eng. (Biotechnology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ⁴Ph.D. (Biotechnology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: kidchakan.s@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 27 กรกฎาคม 2547

รับลงพิมพ์ 15 พฤศจิกายน 2547

separated from the survivors with WSSV injection showed preference of virus being eliminated over the plasma from YHV injection.

Blood parameters for survivors with WSSV injection for 43 days showed an increase in phenoloxidase activity, while the YHV injected survivors exhibited higher level of total hemocytes and phenoloxidase activity. Histopathological examinations in survivors revealed changes of lymphatic tubes into spheroids higher than those in normal individual.

Key words : immune response, black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, YHV, WSSV

บทคัดย่อ

จรีพร เรืองศรี อมรรัตน์ พงศ์ดารา พูนสุข ประเสริฐสรรพ และ กิจการ สุขมาตย์
การตอบสนองภูมิคุ้มกันกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) ต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง
และไวรัสตัวแดงดวงขาว

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1) : 239-252

การเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในห้องปฏิบัติการด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) และไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) พบว่ากุ้งกุลาดำที่รอดตายมีความสามารถต้านทานต่อการติดเชื้อซ้ำได้สูงขึ้น โดยที่เชื้อ WSSV มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันให้กุ้งต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าเชื้อ YHV ผลการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสของกุ้งรอดตายชี้ให้เห็นว่าเชื้อ WSSV สามารถเหนี่ยวนำให้กุ้งสร้างระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต้านทานต่อเชื้อไวรัสได้ดีที่สุดหลังได้รับเชื้อครั้งแรก 43 วัน โดยมีค่า RPS ต่อเชื้อ WSSV และ YHV 67 และ 37.5% ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ YHV เหนี่ยวนำระบบภูมิคุ้มกันให้กุ้งต้านทานต่อเชื้อทั้ง 2 ชนิดหลังการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ 46 และ 60 วัน ด้วยค่า RPS สูงสุด 37.5 และ 12.10% ตามลำดับ เช่นเดียวกับผลการทดสอบปฏิกิริยาการกล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของน้ำเลือดกุ้งรอดตายจากการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV และ YHV ที่พบน้ำเลือดกุ้งรอดตายสามารถกล้างเชื้อ WSSV ได้มากกว่า YHV

องค์ประกอบเลือดชี้ให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV 43 วัน มีระดับของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเพิ่มสูงขึ้น ขณะที่กุ้งรอดตายจากการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ YHV 46 วัน มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดและระดับของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงขึ้นอย่างชัดเจน การตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบท่อน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่รอดตายจากการติดเชื้อไวรัสเปลี่ยนเป็น spheroid เซลล์มากกว่ากุ้งปกติ

ปัจจุบันมาตรการการควบคุมและป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำโดยเฉพาะโรคไวรัสที่มีความรุนแรงสูงคือ WSSV TSV และ YHV ในประเทศไทยมีเพียงการเตรียมบ่อเลี้ยงที่ปลอดเชื้อ การนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์และลูกกุ้งก่อนปล่อย รวมทั้งตรวจสอบภาวะการติดเชื้อในช่วงการเลี้ยง เพื่อแยกและทำลายกุ้งที่ติดเชื้อได้ทันเวลา หรือนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ตรวจหาพาหะนำเชื้อ และป้องกันไม่ให้ปะปนในบ่อเลี้ยง เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีต่างๆ เหล่านี้ก็ไม่สามารถจำกัดพื้นที่ระบาดของโรคได้ ดังนั้นแนวทางอื่นๆ ที่น่าจะนำมาใช้ในการป้องกันและควบคุมการติดเชื้อไวรัสได้คือการใช้

วัคซีน สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สารเสริมในอาหารเพื่อลดการติดเชื้อ หรือการคัดเลือกพันธุ์สัตว์น้ำที่ทนต่อโรคติดเชื้อ และวิธีการดังกล่าวจะนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อผู้ใช้ต้องมีความรู้ความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งอย่างชัดเจน จากข้อสันนิษฐานของ Flegel และคณะ (1997) ที่ว่ากุ้งที่เลี้ยงในบ่อที่มีประวัติการระบาดของโรคมามาก่อนจะมีความต้านทานต่อโรคได้มากขึ้น จึงเป็นไปได้ว่ากุ้งสามารถพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันต้านต่อโรคเดิมได้ และจากรายงานของ Pasharapipas และคณะ (1997) พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในบ่อที่มีโรค YHV ระบาดรุนแรงในอดีตมีการเจริญเติบโต และมีผลผลิตดีขึ้น แม้ว่าจะยังคงตรวจพบเชื้อ

YHV ในกึ่งบางตัว รวมทั้งมีการตั้งข้อสังเกตว่าการระบาด
 ของโรคไวรัสในระยะหลังๆ มีความรุนแรงลดลง เพื่อพิสูจน์
 และหาข้อสนับสนุนข้อสังเกตข้างต้น การวิจัยนี้จึงมีจุด
 ประสงค์ที่จะศึกษาการตอบสนองต่อเชื้อ YHV และ WSSV
 ของกึ่งภูลาต้าที่รอดตายจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อไวรัส
 ทั้ง YHV และ WSSV ในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งศึกษา
 การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด พยาธิสภาพของ
 เนื้อเยื่อหลังการรอดตาย ข้อมูลที่ได้อาจเป็นประโยชน์ต่อ
 การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาวิธีการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และสามารถ
 ใช้เป็นข้อมูลศึกษารายละเอียดในระดับยีนและการวิจัย
 อื่นๆ ให้ครอบคลุมยิ่งขึ้นไปในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. กึ่งภูลาต้าและเชื้อไวรัส

นำกึ่งภูลาต้าที่เลี้ยงในบ่อดินอายุ 40-50 วัน ซึ่งมี
 ขนาด 3-4 กรัม มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลมที่โรงเพาะฟัก
 ของศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ก่อน
 ทดลองทำการตรวจสอบว่ากึ่งไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ WSSV
 และ YHV โดยวิธี PCR และ RT-PCR ตามวิธีการที่
 รายงานใน Takahashi และคณะ (1996) และ Tang และ
 Lightner (1999)

เตรียมเชื้อ WSSV และ YHV ที่ทราบค่าความ
 เข้มข้นที่ทำให้กึ่งขนาด 4-6 กรัม ตาย 50% ภายในระยะ
 เวลา 15 วัน (LD₅₀) จากแหล่งเชื้อของศูนย์วิจัยสุขภาพ
 สัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

**2. การเหนี่ยวนำให้กึ่งภูลาต้าเกิดการติดเชื้อไวรัสในห้อง
 ปฏิบัติการและการตรวจสอบการคงอยู่ของเชื้อไวรัส
 ในตัวกึ่ง**

ทำการเจือจางเชื้อไวรัส WSSV และ YHV ให้มีค่า
 ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า LD₅₀ 10,000 เท่า และ 100,000
 เท่า ตามลำดับ ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บเชื้อ
 แต่ละชนิดที่เจือจางแล้วในกระบอกน้ำแข็ง และนำมาฉีดเข้า
 กึ่งภูลาต้าที่ปลอดเชื้อไวรัสชนิดละ 1,000 ตัวๆ ละ 20
 ไมโครลิตร ชุดควบคุม 500 ตัว ฉีดด้วยสารละลายฟอสเฟต
 บัฟเฟอร์ปริมาณเท่ากันเลี้ยงกึ่งทดลองในถังไฟเบอร์กลม

ขนาดบรรจุ 3 ตัน ที่ความเต็มของน้ำทะเล 20 ส่วนใน
 พันส่วน ดังละ 250 ตัว ให้อาหารเม็ด ทำความสะอาดตู้
 ดูดตะกอน หมุนเวียนน้ำผ่านระบบกรองที่มีแผ่นกรอง
 เปลือกหอย ทราบ หินและถ่าน และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ
 ประมาณ 30-40% ทุก 3 วัน เก็บกึ่งตายและโก๊ตตายออก
 จากระบบการเลี้ยงวันละ 4-5 ครั้ง ระยะเวลาห่างกันครั้งละ
 4-5 ชั่วโมง เพื่อหลีกเลี่ยงการติดเชื้อซ้ำจากกรณีกึ่งปกติ
 กินกึ่งที่ตายหรือโก๊ตตาย ทำการตรวจยืนยันสาเหตุการ
 ตายของกึ่งทุกชุดด้วยวิธี PCR และ RT-PCR

ทำการสุ่มตัวอย่างกึ่งภูลาต้าที่ไม่แสดงอาการของ
 โรคหลังการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV และ YHV ทุก
 5-7 วัน ครั้งละ 6-10 ตัว นำมาตรวจสอบการคงอยู่ของ
 เชื้อ WSSV ในตัวกึ่งโดยวิธี PCR และ RT-PCR

**3. การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อโรคไวรัส
 ของกึ่งภูลาต้าที่รอดตายจากการติดเชื้อ**

นำกึ่งภูลาต้ารอดตายหลังจากการเหนี่ยวนำให้ติด
 เชื้อ WSSV นาน 29 43 และ 57 วัน กึ่งภูลาต้าที่รอด
 ตายจากการทดลองติดเชื้อ YHV นาน 26 32 46 60
 และ 73 วัน และกึ่งกลุ่มควบคุมแต่ละชุดการทดลอง มา
 ฉีดเชื้อ WSSV และ YHV ที่มีค่าการเจือจางเท่ากับค่า
 LD₅₀ ตัวละ 20 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบความต้านทานโรค
 เลี้ยงกึ่งทุกชุดการทดลองในถังไฟเบอร์ที่เติมน้ำ 200 ลิตร
 ตัวละ 10 ตัว ให้อาหารเม็ด ทำความสะอาดตู้ ดูดตะกอน
 เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ตรวจสอบจำนวนกึ่งที่ตายทุกวันเป็น
 เวลา 15 วัน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาอัตราการรอดตาย และ
 คำนวณค่าประสิทธิภาพการต้านทานต่อโรค (Relative
 percent survival; RPS) เพื่อเปรียบเทียบความสามารถ
 ในการต้านทานต่อโรคของกึ่งรอดตายเทียบกับกึ่งที่ไม่เคย
 ได้รับเชื้อมาก่อน โดยใช้สูตรคำนวณคือ

$$RPS = \frac{(1 - \% \text{ การตายของกึ่งชุดทดลอง}) \times 100}{\% \text{ การตายของกึ่งชุดควบคุม}}$$

**4. การทดสอบปฏิบัติกริยาการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของน้ำ
 เลือกึ่งรอดตาย (Neutralization Test)**

นำเลือกึ่งภูลาต้ารอดตายจากการติดเชื้อ WSSV
 และ YHV นาน 43 และ 60 วัน ตามลำดับ (น้ำเลือกึ่ง

ชุดที่มีอัตราการรอดตายสูงสุดหลังทดสอบความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อไวรัสจากผลการทดลองในข้อ 3) มาเหวี่ยงแยกเม็ดเลือดด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 1,600 xg อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที นำส่วนใส 900 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายเชื้อไวรัส แต่ละชนิดที่เตรียมเข้มข้นกว่าค่า LD₅₀ 100 เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 3 ชั่วโมง และนำสารละลายเชื้อมาเจือจางอีก 10 เท่า ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำไปฉีดกึ่งกลาดำปกติขนาด 4-6 กรัม ตัวละ 20 ไมโครลิตร เลี้ยงกึ่งทดลองในถังไฟเบอร์ที่เติมน้ำ 200 ลิตร ถึงละ 10 ตัว ให้อาหารเม็ด ทำความสะอาดตู้ดูดตะกอน เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ตรวจนับจำนวนกุ้งที่ตายทุกวันเป็นเวลา 15 วัน คำนวณอัตราการรอดตายในแต่ละชุด การทดลองเทียบกับกุ้งชุดควบคุม

5. การศึกษาองค์ประกอบเลือดกึ่งกลาดำ

เก็บตัวอย่างเลือดกึ่งกลาดำที่รอดตายจากการเหี่ยวนำไปเกิดการติดเชื้อ WSSV นาน 29 43 และ 57 วัน ชุดการทดลองที่เหี่ยวนำไปติดเชื้อ YHV นาน 32 46 และ 60 วัน และกุ้งปกติในชุดควบคุมของแต่ละชุดการทดลองที่ระยะเวลาเดียวกัน มานับจำนวนเม็ดเลือดรวมตามวิธีการของกิจการ และสิทธิ (2538) วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Söderhäll และคณะ (1988) ปริมาณโปรตีนในซีรัมตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) ปริมาณกลูโคสในเลือดตามวิธีการของ Hyvarinen และ Nikkila (1962) ปริมาณทองแดงในซีรัมด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer

6. การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกึ่งกลาดำ

กึ่งกลาดำรอดตายในแต่ละชุดการทดลอง และกุ้งในชุดควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกันกับการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด นำมาเก็บรักษาสภาพโดยใช้น้ำยาดองเดวิดสัน (Davidson's fixative) (Bell and Lightner, 1988) และผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อเตรียมเป็นสไลด์ถาวรโดยย้อมสีฮีมาท็อกซิลินและอีโอซิน (H&E) (Humason, 1979) ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะเซลล์และเนื้อเยื่อที่เกิดการเปลี่ยนแปลง

หลังการเหี่ยวนำไปเกิดการติดเชื้อ WSSV และ YHV ในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดลอง

1. การเหี่ยวนำไปเกิดการติดเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ และการคงอยู่ของเชื้อไวรัสในตัวกุ้ง

การเหี่ยวนำไปเกิดการติดเชื้อ WSSV โดยวิธีฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าค่า LD₅₀ 10,000 เท่า พบกุ้งแสดงอาการติดเชื้อวันที่ 7 หลังการฉีด และทยอยตายอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 10-17 แต่หลังจากวันที่ 21 ของการทดลอง ไม่พบการตายของกุ้งในชุดดังกล่าว โดยอัตราการรอดตายของกุ้งทดลองหลังการเหี่ยวนำไปเกิดการติดเชื้อ 29 วัน ประมาณ 31% ขณะที่ชุดควบคุมมีอัตราการรอดตายประมาณ 89%

ส่วนกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ YHV ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า LD₅₀ 100,000 เท่า พบว่ากุ้งที่ได้รับเชื้อเริ่มตายวันที่ 3 และมีอัตราการตายสูงสุดวันที่ 14 หลังฉีดเชื้อ และจำนวนการตายลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่มีกุ้งตายติดต่อกัน 5 วัน ตั้งแต่วันที่ 22-26 หลังการฉีด โดยอัตราการรอดตายของกุ้งทดลองหลังการเหี่ยวนำไปเกิดการติดเชื้อ 26 วัน ประมาณ 60% ชุดควบคุมมีอัตราการรอดตายประมาณ 95%

เมื่อตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV พบว่าหลังจากฉีดเชื้อ 2 วัน กุ้งมีการติดเชื้อ 100% และลดเหลือ 75 25 และ 16.7% ที่ 7 14 และ 21 วัน ตามลำดับ หลังจากนั้นตรวจไม่พบเชื้อไวรัสในกึ่งชุดดังกล่าว และไม่พบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสอื่นในกึ่งชุดทดลองและชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการทดลอง เมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของเชื้อ YHV ในตัวกึ่งกลาดำหลังฉีดเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า LD₅₀ 100,000 เท่า พบกุ้งที่ตายระหว่างวันที่ 4-21 ติดเชื้อ YHV 100% ขณะที่กุ้งมีชีวิตในระยะเวลาเดียวกันยังมีเชื้อไวรัสชนิดเดิมอยู่ในตัว 80% และผลการสุ่มตัวอย่างหลังการเหี่ยวนำไปติดเชื้อ 26 และ 32 วัน ตรวจพบกุ้งยังมีเชื้อไวรัสอยู่ในตัว 40 และ 16.7% ตามลำดับ หลังจากนั้นตรวจไม่พบการติดเชื้อไวรัสในตัวกุ้งรอดตายจากการสุ่มทุกๆ 14 วัน ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อไวรัส WSSV ในกึ่งชุดทดลอง และไม่พบเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดในกึ่งชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการทดลอง

2. ความสามารถในการต้านทานต่อโรคของกึ่งกลาดำรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ

2.1 ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสของกึ่งรอดตายจากการติดเชื้อ WSSV

การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสของกึ่งกลาดำที่รอดตายหลังฉีดเชื้อครั้งแรก 29 วัน ซึ่งตรวจไม่พบเชื้อคงอยู่ในตัวกึ่งก่อนนำมาเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อซ้ำโดยการฉีด พบว่ากึ่งชุดทดลองมีอัตราการรอดตาย 22 และ 6% เมื่อฉีดซ้ำด้วยเชื้อ WSSV และ YHV ตามลำดับ ส่วนกึ่งชุดควบคุมมีอัตราการรอดตาย 32% จากการฉีดด้วยเชื้อ WSSV และไม่มีกึ่งรอดตายเมื่อฉีดด้วยเชื้อ YHV สำหรับกึ่งรอดตาย 43 วัน มีอัตราการรอดตาย 85 และ 75% หลังการฉีดเชื้อ WSSV และ YHV ตามลำดับ ในขณะที่กึ่งชุดควบคุมมีอัตราการรอดตาย 60 และ 55% หลังการฉีดเชื้อเดียวกัน กึ่งรอดตายหลังจากติดเชื้อครั้งแรก 57 วัน มีอัตราการรอดตายหลังจากฉีดเชื้อเดิมซ้ำ 12% และมีอัตราการรอดตายเมื่อฉีดเชื้อ YHV 7% ส่วนชุดควบคุมมีอัตราการรอดตาย 20 และ 60% หลังการฉีดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำเป็นระยะเวลา 15 วัน (Figure 1)

เมื่อคำนวณหาค่า RPS ในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการติดเชื้อไวรัสซ้ำ พบว่ากึ่งที่รอดตายหลังการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV 29 และ 57 วัน ไม่มี RPS ต่อเชื้อไวรัสชนิดเดิม แต่กึ่งที่รอดตายนาน 43 วัน มี RPS 67% สำหรับกึ่งรอดตายชุดเดียวกันมี RPS ต่อเชื้อ YHV ซึ่งเป็นไวรัสต่างชนิดกับเชื้อที่กึ่งได้รับครั้งแรกเพียง 6 และ 37.5% ตามลำดับ (Table 1)

2.2 ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสของกึ่งรอดตายจากการติดเชื้อ YHV

เมื่อนำกึ่งรอดตายหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ YHV ในห้องปฏิบัติการมาทำการติดเชื้อไวรัสชนิดเดิม และเชื้อ WSSV ซ้ำ พบกึ่งรอดตาย 26 วัน สามารถต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดได้น้อยกว่าชุดควบคุม สำหรับกึ่งรอดตาย 32 วัน สามารถต้านทานต่อเชื้อ WSSV ได้ 66.7% สูงกว่าชุดควบคุมที่ติดเชื้อเดียวกันที่มีอัตราการรอดตาย 53.3% และพบกึ่งชุดดังกล่าวต้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดเดิมที่ติดเชื้อซ้ำได้เพียง 40% น้อยกว่าชุดควบคุมที่มีอัตราการรอดตาย 53.3% เมื่อทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อโรคของกึ่งรอดตาย 46 วัน พบให้ผลเช่นเดียวกับครั้งที่ 2 (32 วัน) โดยกึ่งรอดตายต้านทานต่อเชื้อ WSSV 67% สูงกว่ากึ่งชุดควบคุม ซึ่งมีอัตราการรอดตาย 47% กึ่งรอดตาย 60 วัน มีอัตราการรอดตายเมื่อติดเชื้อ WSSV 42.9% ต่ำกว่ากึ่งชุดควบคุมที่กึ่งมีอัตราการรอดตาย 46.7% ส่วนกึ่งรอดตาย 73 วัน มีอัตราการรอดตายเมื่อติดเชื้อ WSSV ซ้ำเท่ากับกึ่งในชุดควบคุม 12.5% ผลการทดลองพบกึ่งรอดตาย 60 วัน มีอัตราการรอดตายถึง 40% เมื่อฉีดด้วยเชื้อชนิดเดิมซ้ำ สูงกว่าชุดควบคุมที่มีอัตราการรอดตายเพียง 33.3% ส่วนที่ 73 วัน มีอัตราการรอดตาย 9.5% สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีกึ่งรอดตายเลย (Figure 2)

ผลการคำนวณหาค่า RPS ในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการทดลองติดเชื้อไวรัสซ้ำ พบว่ากึ่งรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ YHV 26 60 และ 73 วัน ไม่มี RPS ต่อโรค WSSV ในขณะที่กึ่งรอดตาย 32 และ 46 วัน มีค่า RPS ต่อเชื้อดังกล่าว 28.6 และ 37.5% ตาม

Table 1. Relative percent survival (RPS) against WSSV and YHV of survivors induced by WSSV under laboratory condition.

Survivor after infection with WSSV (day)	Re-challenging of virus	RPS (%)
29	WSSV	-14.7
43	WSSV	67.0
57	WSSV	-105.0
29	YHV	6.0
43	YHV	37.5
57	YHV	-16.3

ลำดับ สำหรับค่า RPS ต่อเชื้อเดิมพบว่าที่ 26 และ 32 วัน กุ้งรอดตายไม่มีประสิทธิภาพในการต้านทานเชื้อเดียวกันที่ ติดซ้ำ แต่หลังรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ 46 60 และ 73 วัน กุ้งรอดตายมี RPS ต่อเชื้อชนิดเดิม 10 12.1 และ 9.5% ตามลำดับ (Table 2)

3. ปฏิบัติการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของน้ำเลือดกุ้งรอดตาย

เมื่อนำน้ำเลือดกุ้งกุลาดำรอดตายหลังการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV 43 วัน มาผสมกับเชื้อชนิดเดิมแล้วฉีดเข้ากุ้งปกติ พบกุ้งปกติหลังได้รับเชื้อ 15 วัน มีอัตราการรอดตาย 50% สูงกว่ากุ้งชุดที่ได้รับเชื้อไวรัสผสมกับน้ำเลือดกุ้งปกติ ที่มีอัตราการรอดตายเพียง 40% ไม่มีกุ้งรอดตายเลยเมื่อฉีดด้วยสารละลายเชื้อ YHV ที่ผสมกับน้ำเลือดกุ้งปกติ และน้ำเลือดกุ้งรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV มาก่อน ในขณะที่กุ้งปกติในชุดควบคุมที่ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์มีอัตราการรอดตาย 90% (Figure 3)

เมื่อนำน้ำเลือดกุ้งกุลาดำรอดตายจากการติดเชื้อ YHV มาผสมกับเชื้อเดิมและ WSSV แล้วนำไปฉีดเข้ากุ้งกุลาดำปกติ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเลือดในการลบล้างเชื้อไวรัส พบน้ำเลือดกุ้งรอดตายจากการติดเชื้อ YHV มาก่อนสามารถลบล้างเชื้อไวรัสได้ โดยหลังที่กุ้งปกติได้รับเชื้อ WSSV ที่ผสมน้ำเลือดกุ้งรอดตาย มีอัตราการรอดตาย 40% สูงกว่าอัตราการรอดตายของกุ้งชุดที่ได้รับเชื้อ

เดียว กันแต่ผสมกับน้ำเลือดกุ้งปกติที่มีอัตราการรอดตายเพียง 20% ส่วนอัตราการรอดตายของกุ้งปกติที่ฉีดด้วยน้ำเลือดกุ้งรอดตาย และน้ำเลือดกุ้งปกติผสมเชื้อ YHV มีค่าเท่ากับ 10% สำหรับอัตราการรอดตายของชุดควบคุมคือ กุ้งปกติที่ฉีดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ผสมเชื้อ WSSV และสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ผสมเชื้อ YHV มีค่า 90 10 และ 20% ตามลำดับ (Figure 4)

4. องค์ประกอบเลือดกุ้งกุลาดำ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด พบเลือดกุ้งปกติ และกุ้งรอดตายหลังเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV 29 วัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่กุ้งรอดตาย 43 วัน มีปริมาณของกลูโคสในเลือด และระดับของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ 72.88 ± 47.12 มก.% และ 445.12 ± 120.49 ยูนิต/นาที่/มก.โปรตีน สูงกว่าชุดควบคุมที่มีค่า 32.22 ± 17.49 มก.% และ 324.41 ± 146.86 ยูนิต/นาที่/มก.โปรตีน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนปริมาณทองแดงในซีรัมกุ้งรอดตาย 57 วัน มีค่า 158.96 ± 42.46 มก./ลิตร สูงกว่าชุดควบคุมที่มีค่า 120.46 ± 24.70 มก./ลิตร แต่ระดับกลูโคสในเลือดของกุ้งรอดตายมีค่า 33.21 ± 13.67 มก.% ต่ำกว่าเลือดกุ้งปกติที่มีค่า 45.47 ± 9.02 มก.% อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนองค์ประกอบเลือดอื่น ไม่พบความแตกต่างระหว่าง 2 ชุดการทดลอง

Table 2. Relative percent survival (RPS) against WSSV and YHV of survivors induced by YHV under laboratory condition.

Time after infection with YHV (day)	Re-challenging of virus	RPS (%)
26	WSSV	-50.0
32	WSSV	28.6
46	WSSV	37.5
60	WSSV	-9.9
73	WSSV	-12.5
26	YHV	-80.0
32	YHV	-28.6
46	YHV	10.0
60	YHV	12.1
73	YHV	9.5

Table 3. Blood parameters of normal and WSSV-induced survivors from different periods of infestation (Experiment 3).

Parameters	Sample from day 29		Sample from day 43		Sample from day 57	
	Control	Survivor	Control	Survivor	Control	Survivor
Total haemocyte count (x10 ⁴ cell/mm ³)	4.38 ± 3.95 ^a (15)	5.49 ± 2.55 ^a (14)	3.69 ± 2.09 ^a (13)	4.90 ± 2.07 ^a (12)	5.82 ± 1.43 ^a (15)	4.83 ± 2.83 ^a (12)
Blood glucose (mg%)(12)	28.32 ± 11.70 ^a (12)	19.25 ± 11.29 ^a (12)	32.22 ± 17.49 ^b (12)	72.88 ± 47.12 ^a (15)	45.47 ± 9.02 ^a (15)	33.21 ± 13.67 ^b (15)
Serum protein (g%) (15)	12.03 ± 3.03 ^a (13)	9.78 ± 4.38 ^a (14)	12.57 ± 2.66 ^a (13)	12.07 ± 3.20 ^a (15)	8.66 ± 1.76 ^a (15)	9.72 ± 2.82 ^a (15)
Copper (mg/L)	123.37 ± 41.65 ^a (10)	82.01 ± 62.09 ^a (8)	188.25 ± 31.49 ^a (9)	182.27 ± 37.71 ^a (9)	120.46 ± 24.70 ^b (10)	158.96 ± 42.46 ^a (8)
PO activity (unit/min/mg prot.)	195.62 ± 98.19 ^a (12)	208.37 ± 127.20 ^a (12)	324.41 ± 146.86 ^b (12)	445.12 ± 20.49 ^a (12)	420.57 ± 57.21 ^a (13)	430.97 ± 172.34 ^b (11)

Means ± SD. Values in the same row sharing a common superscript are not statistically different (p>0.05). Value in parentheses = n

Table 4. Blood parameters of normal and YHV-induced survivors from different periods of infestation.

Parameters	Sample from day 32		Sample from day 46		Sample from day 60	
	Control	Survivor	Control	Survivor	Control	Survivor
Total haemocyte count (x10 ⁴ cell/mm ³)	6.87 ± 1.81 ^a (14)	6.52 ± 2.26 ^a (14)	6.32 ± 1.63 ^a (14)	9.30 ± 1.84 ^b (11)	6.37 ± 2.60 ^a (13)	7.51 ± 1.87 ^a (13)
Blood glucose (mg%)(15)	34.76 ± 14.08 ^a (15)	38.61 ± 11.24 ^a (12)	40.20 ± 13.30 ^b (14)	37.71 ± 7.56 ^a (13)	41.29 ± 26.26 ^a (13)	47.57 ± 12.99 ^a (13)
Serum protein (g%) (16)	12.09 ± 2.53 ^a (15)	12.46 ± 2.87 ^a (15)	9.51 ± 2.98 ^a (15)	9.99 ± 2.27 ^a (18)	12.09 ± 2.53 ^a (15)	12.58 ± 4.18 ^a (15)
Copper (mg/L)	157.16 ± 41.93 ^a (10)	157.90 ± 30.14 ^a (10)	163.65 ± 29.66 ^a (10)	154.60 ± 25.66 ^a (10)	167.77 ± 42.48 ^b (9)	162.31 ± 19.99 ^a (10)
PO activity (unit/min/mg prot.)	237.82 ± 93.36 ^a (10)	260.92 ± 80.09 ^a (10)	664.01 ± 110.37 ^b (10)	754.88 ± 135.52 ^a (10)	360.61 ± 75.56 ^a (14)	291.88 ± 74.99 ^a (14)

Means ± SD. Values in the same row sharing a common superscript are not statistically different (p>0.05). Value in parentheses = n

(Table 3)

เมื่อเปรียบเทียบเลือดกุ้งกุลาดำรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ YHV 32 46 และ 60 วัน กับเลือดกุ้งปกติในชุดควบคุม พบว่าปริมาณกลูโคสในเลือด โปรตีนและทองแดงในซีรัม รวมทั้งระดับของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ เว้นแต่ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งรอดตาย 46 วัน มีค่า 9.30 ± 1.84 เซลล์/ลบ.มล. สูงกว่ากุ้งปกติที่มีค่า 6.32 ± 1.63 เซลล์/ลบ.มล. อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (Table 4)

5. การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ

ผลการตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองกุ้งกุลาดำโดยการย้อมสีฮีมาทอกซาลินและอีโอซิน พบว่าท่อน้ำเหลือง (lymphoid organ, LO) ของกุ้งปกติที่ไม่ฉีดสิ่งแปลกปลอมมีลักษณะการเรียงตัวของเซลล์น้ำเหลืองที่มีลักษณะเป็น eosinophilic รอบๆ ท่อเลือดที่เรียกว่า lumen (Figure 5) ในขณะที่กุ้งในชุดควบคุมซึ่งฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์พบท่อน้ำเหลืองบางท่อกลายเป็นก้อนกลมที่ไม่มี lumen ตรงกลาง (spheroid, LOS) แต่ยังคงพบท่อน้ำเหลืองปกติกระจายอยู่ทั่วไป (Figure 6) ส่วนกุ้งรอดตายจากการติดเชื้อ WSSV และ YHV 4-7 สัปดาห์ พบท่อน้ำเหลืองส่วนใหญ่กลายเป็น spheroid ที่มีเซลล์จับกันกับที่เซลล์เม็ดเลือด และเศษเซลล์ต่างๆ รวมกัน (Figure 7 and 8) เมื่อกุ้งรอดตายนานขึ้น 8-10 สัปดาห์สามารถพบท่อน้ำเหลืองปกติได้มากขึ้น ส่วนเนื้อเยื่ออื่นของกุ้งรอดตายจากการเตรียมตัวอย่างและย้อมสีดังกล่าวไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับกุ้งปกติ

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการทดลองติดเชื้อไวรัสเข้าในกุ้งกุลาดำที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV มาก่อน พบกุ้งมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสสูงขึ้น โดยเฉพาะกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ 43 วัน สามารถต้านทานต่อเชื้อเดิมได้อย่างมีประสิทธิภาพ (RPS 67%) ในขณะที่กุ้งรอดตายที่ระยะเวลาเดียวกันต้านทานต่อเชื้อ YHV ได้ต่ำกว่า (RPS 37.5%) แสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV มีการสร้างระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสได้สูงขึ้น

โดยระบบที่สร้างขึ้นเป็นลักษณะกึ่งจำเพาะกับเชื้อไวรัสชนิดเดิมได้เป็นอย่างดี สอดคล้องกับผลการศึกษาในกุ้งครุมาที่รอดตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (PAV) มีความต้านทานต่อเชื้อเดิมสูงขึ้นอย่างชัดเจน (RPS 64-77%) (Venegas *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวไม่ได้ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ YHV หรือเชื้อโรคอื่น นอกจากนั้นประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อ WSSV ได้ดีกว่า YHV ยังคงพบในกุ้งที่รอดตายจากการติดเชื้อ YHV อีกด้วย (RPS 37.5% เมื่อได้รับเชื้อ WSSV และ 12.1% เมื่อได้รับเชื้อไวรัสชนิดเดิม) แสดงว่าระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ YHV มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ และเป็นการตอบสนองแบบไม่จำเพาะเนื่องจากกุ้งสามารถต้านทานต่อเชื้อต่างกลุ่มได้ดีกว่าเชื้อเดิมที่เหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับข้อสันนิษฐานของ Flegel และ Pasharawipas (1998) ที่ว่าการเลี้ยงกุ้งในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองจะทำให้กุ้งมีความสามารถต้านทานต่อเชื้อเดิมได้มากขึ้น เนื่องจากกุ้งรอดตายสามารถต้านทานต่อเชื้อเดิมได้ดีกว่ากุ้งในชุดควบคุม แต่การที่กุ้งกุลาดำรอดตายจากการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ YHV มี RPS ต่อเชื้อไวรัส 2 ชนิดได้ต่ำกว่าการกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV ในการทดลองเดียวกัน และต่ำกว่าการกระตุ้นด้วยเปปติโดกลัยแคนในกุ้งกุลาดำที่พบมีค่า RPS ต่อโรค YHV ถึง 55.6% (Boonyaratpalin *et al.*, 1995) อาจจะมีผลมาจากลักษณะโครงสร้างของเชื้อ YHV ที่มีเปลือกหุ้ม (envelope) ค่อนข้างหนาแต่ส่วนที่มีผลเหนี่ยวนำให้กุ้งสร้างระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อเชื้อ อาจไม่ใช่เป็นส่วนที่อยู่บนเปลือกหุ้ม เช่นเดียวกับที่พบว่าการใช้ยีสต์ทั้งเซลล์จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้ดีและช้ากว่าการใช้เฉพาะส่วนของกลูแคน (มฤตติ และคณะ, 2543) อย่างไรก็ตามจากผลศึกษานี้ก็พบว่าการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสดังกล่าวทำให้กุ้งสามารถต้านทานต่อเชื้อ YHV ได้ดีกว่าการใช้เซลล์แบคทีเรีย *Vibrio* sp. (กิจการ และ สิทธิ, 2538)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันกับความสามารถในการต้านทานต่อโรคไวรัส พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ WSSV สามารถสร้างระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต้านทานต่อเชื้อ YHV เพิ่มขึ้น

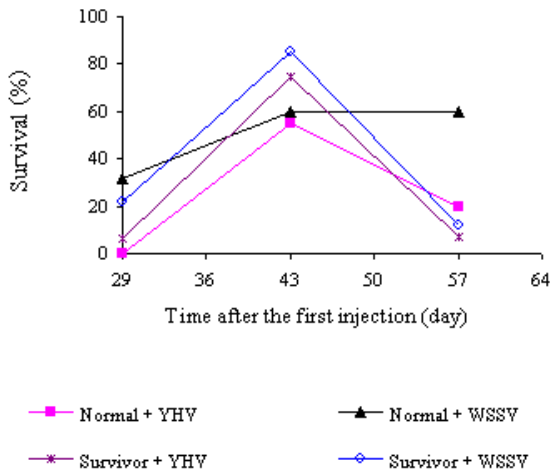


Figure 1. Survival rates after re-challenging with viruses of normal and survivor from WSSV induced under laboratory condition for 29, 43 and 57 days.

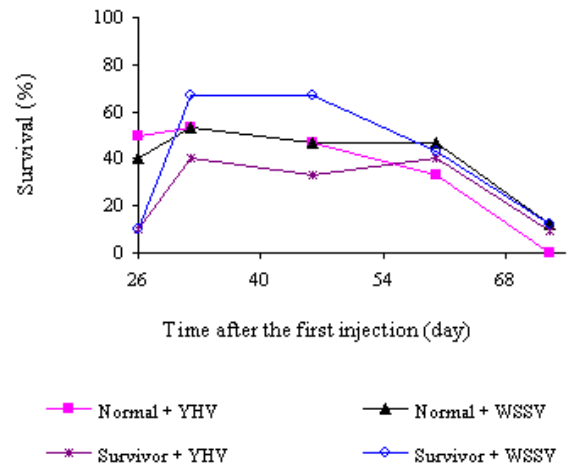


Figure 2. Survival rates after re-challenging with viruses of normal and survivor from YHV induced under laboratory condition for 26, 32, 46, 60 and 73 days.

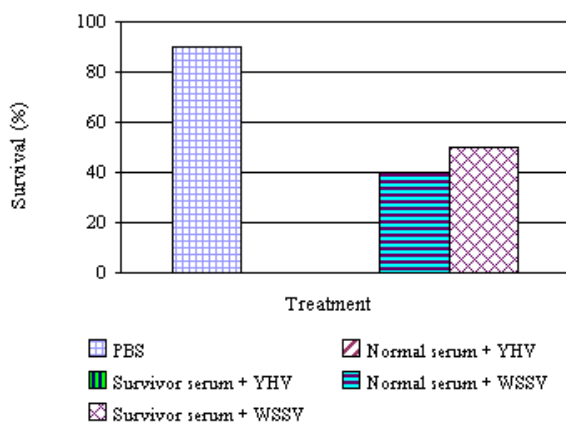


Figure 3. Survival rates of normal shrimp after challenge by WSSV and YHV neutralized by survivor's serum from a period of 43 day of WSSV injection.

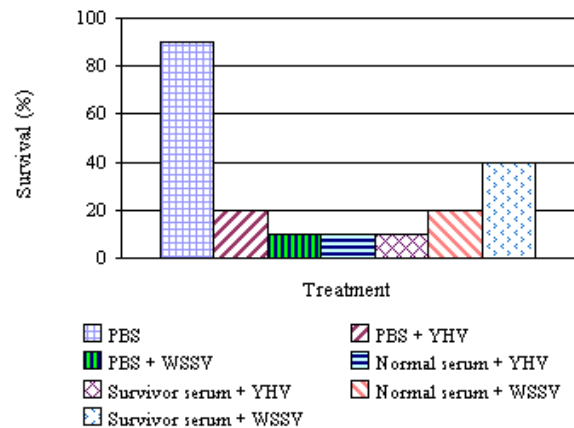


Figure 4. Survival rates of normal shrimp after challenge by WSSV and YHV neutralized by survivor's serum from a period of 46 day of YHV injection.

หลังได้รับเชื้อครั้งแรก นาน 29 วัน และคงอยู่ได้ถึง 43 วัน ขณะที่ใช้เวลาสร้างภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อเชื้อเดิมถึง 43 วัน ซึ่งช้ากว่าการสร้างระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต้านทานต่อเชื้อไวรัสเดิมของกุ้งクルマที่เพิ่มขึ้นหลังการติดเชื้อ PAV เพียง 21 วัน (Wu *et al.*, 2002) และช้ากว่าการกระตุ้นด้วยบีตา-1, 3 กลูแคน เพราะกุ้งกุลาดำมีการสร้างระบบภูมิคุ้มกัน

ต่อเชื้อ WSSV หลังได้รับอาหารผสมบีตา-1, 3 กลูแคน เพียง 20 วัน (Chang *et al.*, 1999) ส่วนการกระตุ้นด้วยเชื้อ YHV ทำให้กุ้งกุลาดำเริ่มสร้างระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ WSSV หลังได้รับเชื้อครั้งแรกนาน 32 วัน และคงอยู่ถึง 46 วัน ขณะที่ใช้เวลาในการสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อต้านทานต่อเชื้อเดิมนานถึง 46 วัน และยังคงมีอยู่จนถึง 73 วัน จาก

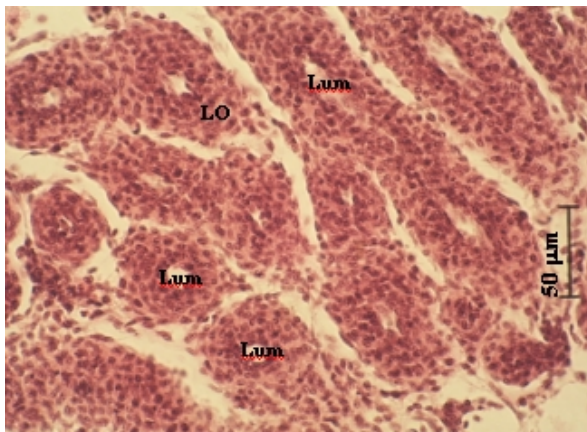


Figure 5. The lymphatic tube with central lumen of normal *Penaeus monodon* (LO, lymphoid organ tube; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μ m).

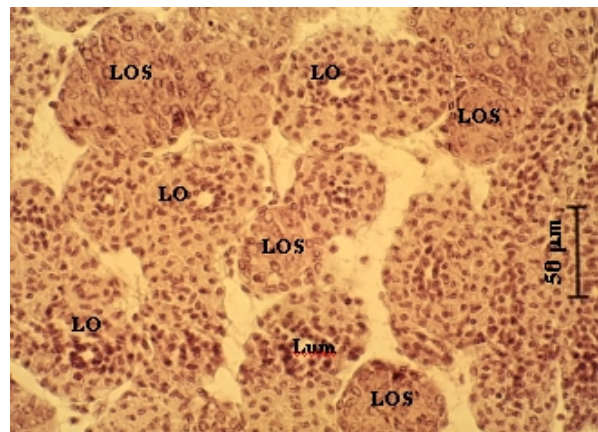


Figure 6. Lymphoid organ of *Penaeus monodon* with a period of 32 day of PBS injection. The figure shows numerous lymphatic tube with a central lumen. (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μ m).

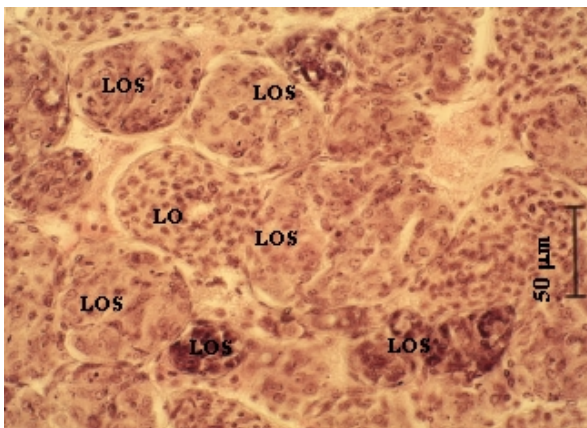


Figure 7. Lymphoid organ of *Penaeus monodon* induced by YHV after a 32 day period. The figure shows several spheroids around a normal lymphatic tube (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μ m).

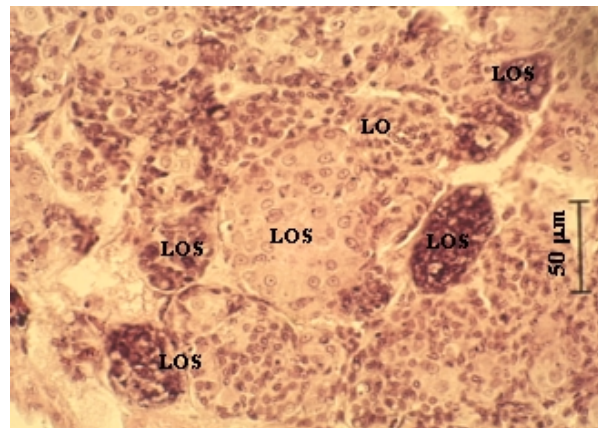


Figure 8. Lymphoid organ of shrimp induced by WSSV after a 43 day period. The lymphatic are of several sizes and show formation of spheroid (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μ m).

ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำค่อนข้างใช้ระยะเวลานานในการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต้านทานต่อเชื้อไวรัสที่เข้ามาในร่างกาย อีกทั้งระบบดังกล่าวคงตัวอยู่ได้เพียง

ระยะเวลาสั้นๆ เช่นเดียวกับกุ้งクルマที่ระดับของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเพิ่มขึ้นหลังได้รับเชื้อ 21 วัน และคงอยู่ได้เพียง 60 วัน (Wu et al., 2002) แต่ต่างกับคริสต์เซียกลุ่ม

อื่น เช่น American lobster (*Homarus americanus*) สามารถสร้างระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อโรค gaffkemia หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อตายที่เตรียมจาก *Aerococcus viridans* var. *homari* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเพียง 6 วัน และระบบดังกล่าวคงอยู่ถึง 93 วัน (Keith *et al.*, 1992)

อย่างไรก็ตามในสัตว์ชนิดเดียวกันก็อาจให้ผลที่แตกต่างกันได้ เช่น พบว่าหลังจากกึ่งภูลาตาได้รับวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *V. harveyi* โดยการผสมอาหารให้กินเพียง 10 วัน กึ่งก็สามารถต้านทานต่อเชื้อเดิมได้สูงขึ้น และมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ถ้าให้กินติดต่อกัน และเมื่อให้วัคซีนโดยการแช่พบว่ากึ่งสามารถต้านทานเชื้อเดียวกันหลังได้รับวัคซีนเพียง 6 วัน แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปอีก 10 วัน ความสามารถดังกล่าวกลับลดลง (สาวิตรี และกิจการ, 2543) ส่วน Chang และคณะ (1999) พบว่ากึ่งภูลาตาที่ได้รับอาหารผสมปีตา-1, 3 กลูแคน นาน 10 วัน ไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อ WSSV ได้ ในขณะที่กึ่งชุดที่ได้รับอาหารนาน 20 วัน มีความสามารถในการต้านทานโรคดังกล่าวได้สูงขึ้น ดังนั้นนอกจากระยะเวลาหรือชนิดของสารกระตุ้นที่ต่างกันจะมีผลต่อการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อเชื้อโรคของกึ่งภูลาตาได้ต่างกันแล้ว น่าจะมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบดังกล่าวด้วย เช่น อาจจะเป็นไปได้ว่ากึ่งที่มีอายุมากขึ้นมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อเชื้อโรคลดลง เนื่องจากในการศึกษานี้พบว่ากึ่งที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV 57 วัน หรือกระตุ้นด้วย YHV 73 วัน รวมทั้งกึ่งอายุเท่ากันในชุดควบคุมมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ต่ำกว่าชุดการทดลองเดียวกันแต่อายุกึ่งน้อยกว่า ทั้งที่ใช้ความเข้มข้นเชื้อเท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Song และคณะ (1997, อ้างโดย Chang *et al.*, 1999) ที่ว่ากึ่งภูลาตาที่ได้รับอาหารผสมกลูแคนสลับกับอาหารปกติตลอด 135 วัน เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ WSSV โดยการแช่ พบว่ากึ่งอายุ 60 วัน มีความสามารถในการต้านต่อเชื้อ WSSV สูงกว่ากึ่งอายุ 113 วัน จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำเพื่อตอบสนองต่อโรคติดเชื้อและสภาพความเครียดต่างๆ ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นชนิดและขนาดของสัตว์น้ำ ชนิด ปริมาณ และระยะเวลาการให้สารกระตุ้น ชนิดและ

ความรุนแรงของเชื้อโรค สภาพแวดล้อมที่อาศัย รวมทั้งวิธีการให้สารกระตุ้น เป็นต้น

การตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งภูลาด้านนอก จากพิจารณาจากอัตราการตายของกึ่งหลังทำการติดเชื้อซ้ำแล้ว ผลการทดสอบปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสพบว่าน้ำเลือดกึ่งมีประสิทธิภาพปลงฤทธิ์ของเชื้อ WSSV ได้ดีกว่า YHV ซึ่งผลดังกล่าวสัมพันธ์กับความสามารถต้านทานต่อเชื้อเดิมได้ดีกว่าเมื่อฉีดเชื้อซ้ำ van Hulten และคณะ (2001) พบว่าสารน้ำ (VP28-antiserum) ที่แยกจากกระต่ายซึ่งกระตุ้นด้วยโปรตีนขนาด 28 kDa ที่เป็นโครงสร้างของเปลือกหุ้มเชื้อ WSSV (VP28) สามารถลดปริมาณของเชื้อ WSSV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกับ Alday-Sanz และคณะ (1998) ที่พบว่าหลังจากการกระตุ้นโดยการฉีด WSSV- IgY นาน 15-30 นาที สามารถตรวจพบ anti-WSSV IgY ในกระแสเลือดกึ่งภูลาตาได้ จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าความสามารถในการต้านทานต่อโรคไวรัสของกึ่งภูลาตาส่วนหนึ่ง น่าจะมีผลจากสารน้ำบางชนิดที่กึ่งผลิตขึ้นหลังการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสทั้ง WSSV และ YHV โดยสารน้ำดังกล่าวอาจเป็นโปรตีนที่มีลักษณะกึ่งจำเพาะต่อเชื้อ WSSV ที่อาศัยกลไกในการจับ (binding) เชื้อไวรัสโดยตรง ซึ่ง van Hulten และคณะ (2001) คาดว่ากลไกของ VP 28-antiserum ในการลดเชื้อ WSSV ที่เป็นสาเหตุของโรคกึ่งภูลาตาเกิดจากสารบางชนิดที่มีอยู่ในซีรัมจับกับโปรตีนขนาด 28 kDa บนเปลือกหุ้มอนุภาค ทำให้ไวรัสสูญเสียความสามารถในการเข้าเกาะติดและหลอมรวมส่วนของเปลือกหุ้มกับเซลล์เป้าหมาย เช่นเดียวกับ Song และคณะ (2003) You และคณะ (2002) ที่คาดว่ากึ่งชวานาจะจดจำส่วนของโปรตีนเปลือกหุ้มเชื้อ TSV ไว้ แล้วสร้างสารน้ำบางชนิดขึ้นมาเพื่อต่อต้านเชื้อจึงทำให้กึ่งที่ได้รับเชื้อในครั้งแรกมีระบบภูมิคุ้มกันที่ต้านทานต่อเชื้อดังกล่าวเพิ่มขึ้น ส่วนผลจากการทดสอบการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของน้ำเลือด และจากการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสที่มีประสิทธิภาพไม่ถึง 100% อาจเป็นเพราะสารน้ำบางชนิดที่กึ่งผลิตขึ้นจากการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสเพียงครั้งเดียวมีปริมาณไม่มากพอที่จะลบล้างเชื้อไวรัสได้ทั้งหมด รายงานการศึกษาพบว่า VP 28 anti-serum สามารถลบล้างเชื้อไวรัส WSSV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เมื่อสารดังกล่าว

ถูกเชื้อจางลงประสิทธิภาพในการลดเชื้อก็ลดลงด้วย (van Hulten *et al.*, 2001) ส่วนผลที่น้ำเลือดของกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 กลุ่ม ลบล้างฤทธิ์ของเชื้อ YHV ได้น้อยมาก อาจเป็นเพราะสารน้ำที่สร้างขึ้นเพื่อยับยั้งเชื้อดังกล่าวมีปริมาณน้อยจนเห็นผลได้ไม่ชัดเจน หรืออาจเป็นเพราะกลไกการเข้าจับกับโครงสร้างอนุภาคไวรัส YHV ของโปรตีนที่กุ้งผลิตขึ้นมีประสิทธิภาพน้อย จึงพบกุ้งที่รอดตายจากการติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ YHV ได้น้อย อย่างไรก็ตามเป็นไปได้ว่ากุ้งไม่มีการสร้างสารใดๆ ที่จำเพาะสำหรับการยับยั้งเชื้อ YHV เนื่องจากวิถี (pathway) ที่ตอบสนองต่อเชื้อ YHV ไม่ถูกกระตุ้น

เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบเลือดบางประการของกุ้งกุลาดำที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อในระยะเวลาต่างกัน พบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสได้สูงสุดที่ 46-60 วัน มีความสัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือดที่เพิ่มขึ้นสูงสุดด้วยเช่นเดียวกัน ในขณะที่กุ้งชุดที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ YHV และมีความต้านทานต่อโรคจากการทดสอบเชื้อซ้ำสูงสุด (43 วัน) ไม่พบความแตกต่างของเม็ดเลือดรวมเมื่อเทียบกับกุ้งทดลองจากชุดอื่น จากผลดังกล่าวจึงเป็นไปได้ว่าความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ YHV ของกุ้งกุลาดำเกิดจากระบบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์มากกว่าสารน้ำต่างๆ แต่ระบบที่ถูกกระตุ้นให้สามารถต้านทานต่อเชื้อ WSSV เกิดจากทั้งระบบที่ดำเนินการโดยเซลล์และสารน้ำ ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์ที่เกี่ยวข้องอย่างชัดเจนจากการศึกษานี้ น่าจะเป็นกระบวนการในระบบโปรฟีโอเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ตรวจวัดได้จากกุ้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีค่าสูงขึ้น สอดคล้องกับความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อได้ดีขึ้น

การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ พบว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง WSSV และ YHV และสามารถกำจัดเชื้อได้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่อม้ำเหลืองโดยพบเซลล์ที่มีลักษณะเป็น spheroid มากขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Hasson และคณะ (1999) พบลักษณะ spheroid ในต่อม้ำเหลืองของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ TSV แบบเฉียบพลันจนถึงเรื้อรัง เช่นเดียวกับต่อม้ำเหลืองแม่กุ้ง

กุลาดำที่เคยติดเชื้อ YHV และกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. anguillarum* ก็สามารถพบ spheroid ภายในต่อม้ำเหลืองได้เช่นเดียวกัน (Flegel *et al.*, 1997; van de Braak *et al.*, 2002) จากผลการทดลองนี้และจากข้อมูลต่างๆ ข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเมื่อกุ้งติดเชื้อพยาธิสภาพของต่อม้ำเหลืองจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็น spheroid ซึ่งน่าจะเป็นกลไกในการกำจัดทั้งเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย และอาจรวมถึงเชื้อและสิ่งแปลกปลอมอื่นๆ ที่เข้าสู่ตัวกุ้งทะเล เพราะ van de Braak และคณะ (2002) พบ spheroid ในต่อม้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สอดคล้องกับผลการศึกษานี้ที่พบ spheroid ได้ในต่อม้ำเหลืองกุ้งชุดควบคุม อย่างไรก็ตามรูปแบบของ spheroid ส่วนใหญ่มีลักษณะเหมือนกับการฟอร์มตัวในระยะแรกๆ และมีจำนวนค่อนข้างน้อยกว่ากุ้งที่ติดเชื้อไวรัส ซึ่งขัดแย้งกับข้อสันนิษฐานของ Anggraeni และ Owens (2000) และ Flegel และคณะ (1997) ที่ว่าลักษณะ spheroid ที่เกิดขึ้นในต่อม้ำเหลืองน่าจะเป็นกลไกที่จำเพาะเจาะจงในการกำจัดเชื้อไวรัสของกุ้งตระกูลที่เนี่ยส ซึ่งรายละเอียดเกี่ยวกับ spheroid ในต่อม้ำเหลืองกุ้งกุลาดำที่เกิดขึ้นหลังจากติดเชื้อชนิดต่างๆ ทั้งรูปแบบและปริมาณที่เกิดหลังจากกำจัดเชื้อออกไปได้ในระยะเวลาต่างๆ มีความสัมพันธ์กันอย่างไรนั้นยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจน จึงน่าจะทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคอื่นๆ เช่น Immunohistochemistry *in situ* hybridization มาประกอบการศึกษาวิจัยด้วย แต่จากข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ นอกจากจะใช้ศึกษาเพื่อบ่งชี้ถึงการติดเชื้อหรือการเกิดโรคแล้ว น่าจะสามารถใช้บ่งชี้ถึงภาวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งได้ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศวทช.) และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กิจการ สุขุมมาตย์ และสิทธิ บุญยรัตผลิน. 2538. การศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและแนวทางการใช้วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 1-17.
- มฤฤดี สิทธิพันธ์ อรัญ หันพงษ์กิตติกุล และกิจการ สุขุมมาตย์. 2543. การสกัดสารบีตาไกลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ): 653-662.
- สาวิตรี ศิลาเกษ และกิจการ สุขุมมาตย์. 2543. การผลิตวัคซีนจากเชื้อ *Vibrio harveyi* และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ): 663-676.
- Alday-Sanz, V., Thaikua, S., Yousif, A.N., Albright, L.J. and Flegel, T.W. 1998. Studies on IgY for passive immunization of shrimp against white spot syndrome virus. **In:** Advances in Shrimp Biotechnology. (ed. Flegel, T. W.) pp.141-145. Asian Fisheries Forum, Chiang Mai, Thailand.
- Anggraeni, M.S. and Owens, L. 2000. The haemocytic origin of lymphoid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 40: 85-92.
- Bell, T.A. and Lightner, D.V. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA. 114 p.
- Boonyaratpalin, S., Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K. and Toride, Y. 1995. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune response and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **In:** Disease in Asian Aquaculture II. (eds. Shariff, M., Arthur, J.R. and Subasinghe, R.P.) pp. 469-477. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Phillippins.
- Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., Lo, C.F., Kou, G.H. and Liao, I.C. 1999. Effect of β -1,3 glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in post-larva and juvenile *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 36: 163-168.
- Flegel, T.W. and Pasharawipas, T. 1998. Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogens. **In:** Advances in Shrimp Biotechnology. (ed. Flegel, T.W.) pp. 245-253. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand.
- Flegel, T.W., Boonyaratpalin, S., Withyachumnarnkul, B. 1997. Current status of research on yellow head virus and white spot virus in Thailand. **In:** Diseases in Asian Aquaculture III. (eds. Flegel, T.W. and MacRae, I.H.) pp. 285-296. Asian Fisheries Society.
- Hasson, K.W., Lightner, D.V., Mohny, L.L., Redman, R.M. and White, B.M. 1999. Role of lymphoid organ spheroids in chronic taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. Dis. Aquat. Org. 38: 93-105.
- Humason, G. 1979. Animal Tissue Techniques. Freeman, W.H. and Company, San Francisco. 661 p.
- Hyvarinen, A. and Nikkila, E. 1962. Specific determination of blood glucose with O-toluidine. Clin. Chem. Acta. 7: 140-143.
- Keith, I.R., Paterson, W.D., Airdrie, D. and Boston, L.D. 1992. Defence mechanisms of American lobster (*Homarus americanus*): vaccination provided protection against gaffkemia infection in laboratory and field trials. Fish Shellfish Immunol. 2: 109-119.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Pasharawipas, T., Flegel, T.W., Sriurairatana, S., and Morrison, D.J. 1997. Latent yellow head infections in *Penaeus monodon* and implications regarding disease tolerance or resistance. **In:** Shrimp Biotechnology in Thailand. (eds. Flegel, T.W., Menasveta, P. and Paisarnrat, S.) pp. 45-53. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand.
- Söderhäll, K., Rogener, W., Newton, R.P. and Ratcliffe, N.A. 1988. The properties purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by β -1, 3- glucan. Insect Biochem. 18: 322-330.

- Song, Y.L., Yu, C.I., Lien, T.W., Huang, C.C. and Lin, M.N. 2003. Hemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with taura syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 14: 317-331.
- Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Suzuki, N., Kasornchandra, J., Supamattaya, K., Khongpradit, R., Boonyaratpalin, S., Kondo, M., Kawai, K., Kusuda, R., Hirono, I. and Aoki, T. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. *Fish Dis.* 19: 399-403.
- Tang, K.F.J. and Lightner, D.V. 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.* 35: 93-98.
- van de Braak, C.B.T., Botterblom, M.H.A, Taverne, N., van Muiswinkel, W.B., Rombout, J.H.W.M. and van der Knaap, W.P.W. 2002. The role of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 13: 293-309.
- van Hulten, M.C.W., Witteveldt, J., Snippe, M. and Vlak, J.M. 2001. White spot syndrome virus envelope protein VP-28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology* 285: 228-233.
- Venegas, C.A., Nonaka, L., Mushiake, K., Nishizawa, T. and Muroga, K. 2000. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod shaped DNA virus (PRDV). *Dis. Aquat. Org.* 42: 83-89.
- Wu, J.L., Nishioka, T., Mori, K., Nishizawa, T. and Muroga, K. 2002. A time course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 13: 391-403.
- You, Z., Cesar, E., Nadala, B., Yang, J., van Hulten, M.C.W. and Loh, P.C. 2002. Production of polyclonal antiserum specific to the 27.5 kDa envelope protein of white spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org.* 51: 77-80.