บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) มีชื่อสามัญว่า black tiger shrimp, giant tiger shrimp เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอยู่ใน Class Crustacea มีเปลือกหุ้มตัวอยู่ภายนอก ลำตัวแบ่งเป็นปล้อง แต่ละข้อปล้องมีระยางค์ยื่นออกมา 1 คู่ รวม 19 คู่ แบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอก ซึ่งรวมกันอยู่ในเปลือกคลุมหัว (carapace) และส่วนของลำตัว

2.1 ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrate Immune System)

ภูมิคุ้มกัน (Immunity) หมายถึง กลไกตามธรรมชาติที่ทำให้ร่างกายสามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมได้ และพยายามกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นด้วยวิธีการต่างๆ ซึ่งอาจมีผลทำให้เกิดหรือไม่เกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อของตนเอง (สุทธิพันธ์และคณะ, 2529)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังหรือไม่มีกระดูกสันหลัง โดยทั่วไปแบ่งได้ 2 ชนิด คือ ภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองโดยเซลล์ (Cellular immune response) และภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองโดยสารน้ำ (Humoral immune response) เมื่อมีการสัมผัสเชื้อก่อโรคจากภายนอก จะทำให้เกิดความต้านทานเกิดขึ้น 2 แบบ คือ แบบที่เกิดโดยธรรมชาติเมื่อสัมผัสกับเชื้อโรคครั้งแรก (innate resistance) และแบบที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่มีการบุกรุกของเชื้อโรค (acquired resistance) ซึ่งทำให้เกิดความต้านทานต่อการเกิดโรค การตอบสนองโดยเซลล์ประกอบด้วย การเกิด Phagocytosis, Hemocytosis, Coagulation และ Encapsulation ส่วนการตอบสนองโดยสารน้ำ ประกอบด้วย Agglutinins, Lysins, Precipitins และ Bactericidins (Sindermann, 1990) ดังแสดงในรูปที่ 1

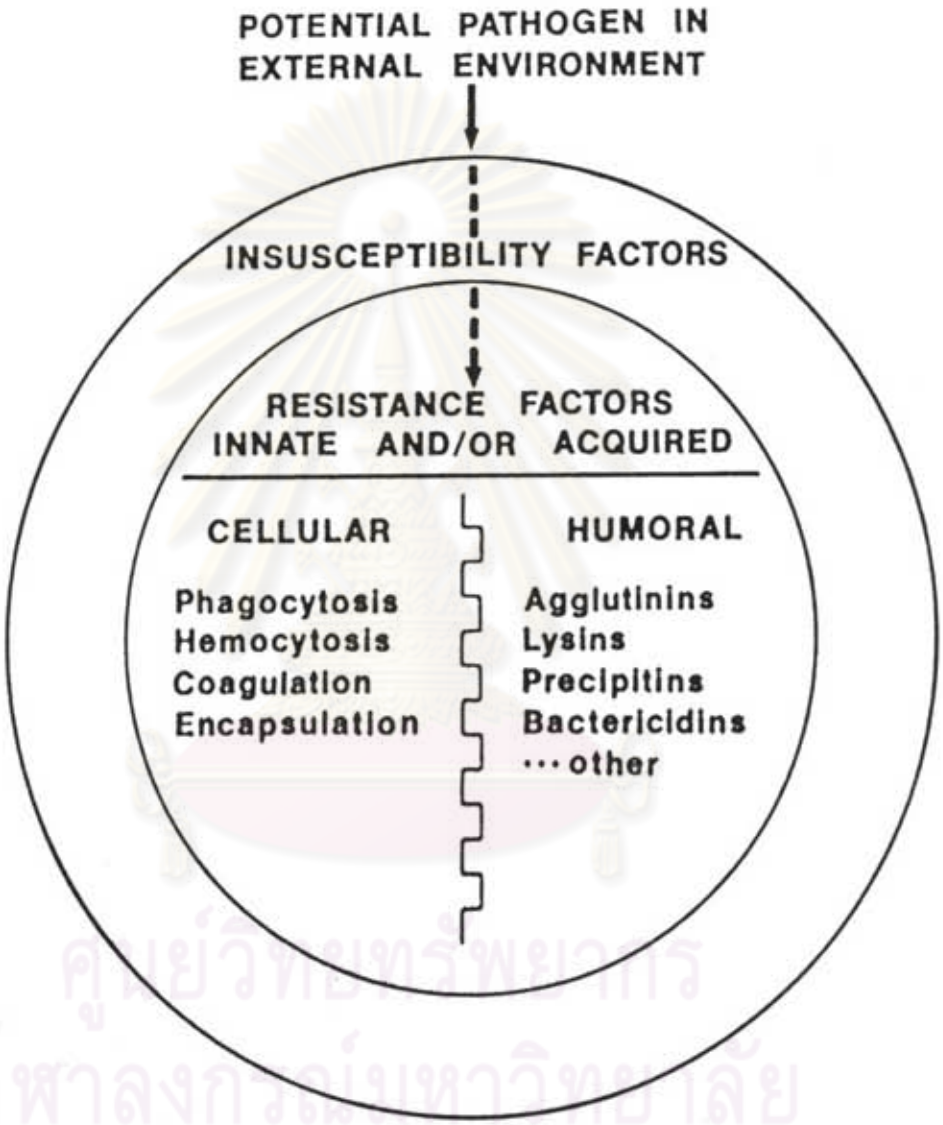
ลักษณะที่สำคัญของภูมิคุ้มกันในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง คือ

1. ไม่มีการสร้างสารอิมมูโนโกลบุลิน (immunoglobulin)

2. มีความสามารถที่จะแยกความแตกต่างระหว่างตัวเองและสิ่งแปลกปลอม (self and nonself)

3. เนื่องจากเป็นสัตว์ที่มีระบบเลือดแบบเปิด ดังนั้นจึงมีกลไกในการป้องกันในทันทีโดยไม่ต้องอาศัยการชักนำให้เกิดขึ้น ซึ่งเกิดจากขบวนการ coagulation เพื่อจับสิ่งแปลกปลอมและป้องกันการสูญเสียเลือดในขณะที่เกิดบาดแผลขึ้น โดยอาศัยการทำงานของเม็ดเลือดโดยสิ่งแปลก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 กลไกการป้องกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

ที่มา: Sindermann, 1990

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปลอมที่มีขนาดเล็กจะเกิด phagocytosis ส่วนอนุภาคสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่จะเกิด encapsulation

4. มีการตอบสนองโดยสารน้ำที่ชักนำให้เกิดขึ้นได้ในระยะยาวโดยอาศัยโปรตีนที่มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial protein) ซึ่งจะเกิดขึ้นในขณะที่มีการติดเชื้อหรือเกิดมีบาดแผล (Lackie, 1980; Matin and Graves, 1985)

ส่วนเซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังแสดงไว้ในตารางที่ 1 (Rattcliffe, 1985)

การเกิด phagocytosis ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเป็นการตอบสนองของเซลล์แบบไม่จำเพาะ (non-specific cellular response) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับการจดจำความแตกต่างทางกายภาพระหว่างเซลล์ของเจ้าบ้านและของเชื้อก่อโรค โดยพบว่าความจำเพาะของการเกิด phagocytosis มีความแตกต่างกัน คือ เมื่อใช้อนุภาคสิ่งแปลกปลอมที่แตกต่างกัน อัตราการเกิด phagocytosis จะต่างกันด้วย (Anderson, 1975)

ส่วนการตอบสนองโดยสารน้ำในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีการศึกษาและพบว่า agglutinin เป็นสารพวก lectin-like substance (Sharon and Lin, 1972) มีความจำเพาะในช่วงกว้างเมื่อทดสอบกับสารพวกคาร์โบไฮเดรต ซึ่งอาจจะทำหน้าที่เป็นโมเลกุลที่จดจำ (recognition) Lie และคณะ (1976) ได้ศึกษาภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาภายหลังในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง พบว่าในการตอบสนองครั้งที่สอง จะมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้นยังมีการศึกษาเกี่ยวกับสารน้ำอื่น ๆ แต่ไม่มากนัก

2.2 กลไกการป้องกันโรคในครัสเตเชียน

กลไกการป้องกันโรคในครัสเตเชียนนั้น แตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลัง คือ ไม่มีการสร้างสารอิมมูโนโกลบุลิน ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความจดจำจำเพาะ ส่วนในครัสเตเชียนนั้นตรวจพบว่ามีความสามารถที่จะกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายได้ ซึ่งแสดงว่าต้องมีการจดจำเกิดขึ้นเช่นกัน McCumber และ Clem (1983) ได้ศึกษาการจดจำสิ่งแปลกปลอมใน blue crab, *Callineces sapidus* โดยฉีดสารแปลกปลอม คือ โปรตีนที่แปลกปลอม (xenogenic protein), bovine serum albumin (BSA) และไวรัสต่าง ๆ กล่าวคือ bacteriophage เช่น T_2, T_3, T_4, T_7, $\varnothing_2$ และ poliovirus เปรียบเทียบกับ hemocyanin จากน้ำเหลืองของสัตว์ทดลอง พบว่าสาร BSA จะถูก

ตารางที่ 1 เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

Cells/tissues	Role(s) in immunity/physiology
(A) Mucus, cuticle, shells, tests and/or gut barrier.	Physico-chemical barriers to invasion.
(B) Five groups of free and sessile blood cells :	Responsible for most of the cellular and many of the humoral defence reaction
1. Progenitor cells	Many act as stem cells for other cell types
2. Phagocytic cells	Phagocytosis, encapsulation, clotting, wound healing and killing
3. Haemostatic cells	Plasma gelation and clotting by cell aggregation. Non self recognition, and lysozyme and agglutinin production
4. Nutritive cells	Encapsulation reaction and wound healing? Nutitive role?
5. Pigmented cells	Role, if any, in defence unknown. Respiratory function
(C) Permanently fixed cells such as pericardial cells or nephrocytes or pore cells etc.	Pinocytose collids and small particulates. Synthesise lysozyme (pericardial cells) and other anti microbial factors?
(D) Haemopoetic organs-well organised in some invertebrates	Haemopoesis, and also phagocytosis and the synthesis of anti microbial factor in a few animals.
(E) Fat body (insects), mid gut and sinus lining cells (molluscs, crustracean)	Synthesis of immune proteins and agglutinin (fat body), phagocytosis (midgut cells) and clearance of foreing particle (sinus lining cells)

ที่มา : Ratcliffe, 1985

กำจัดออกจากน้ำเลือดได้เร็วกว่า hemocyanin และยังพบการจดจำที่จำเพาะ คือ มีการกำจัด T_2, T_4 และ poliovirus ได้ภายใน 1 ชั่วโมง โดยไม่มีการกำจัด T_3, T_7 และ$\varnothing_2$

กลไกการป้องกันโรคในครัสเตเชียนเหมือนกับในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทั่วไป คือ แบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ ภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองโดยเซลล์ และภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองโดยสารน้ำ

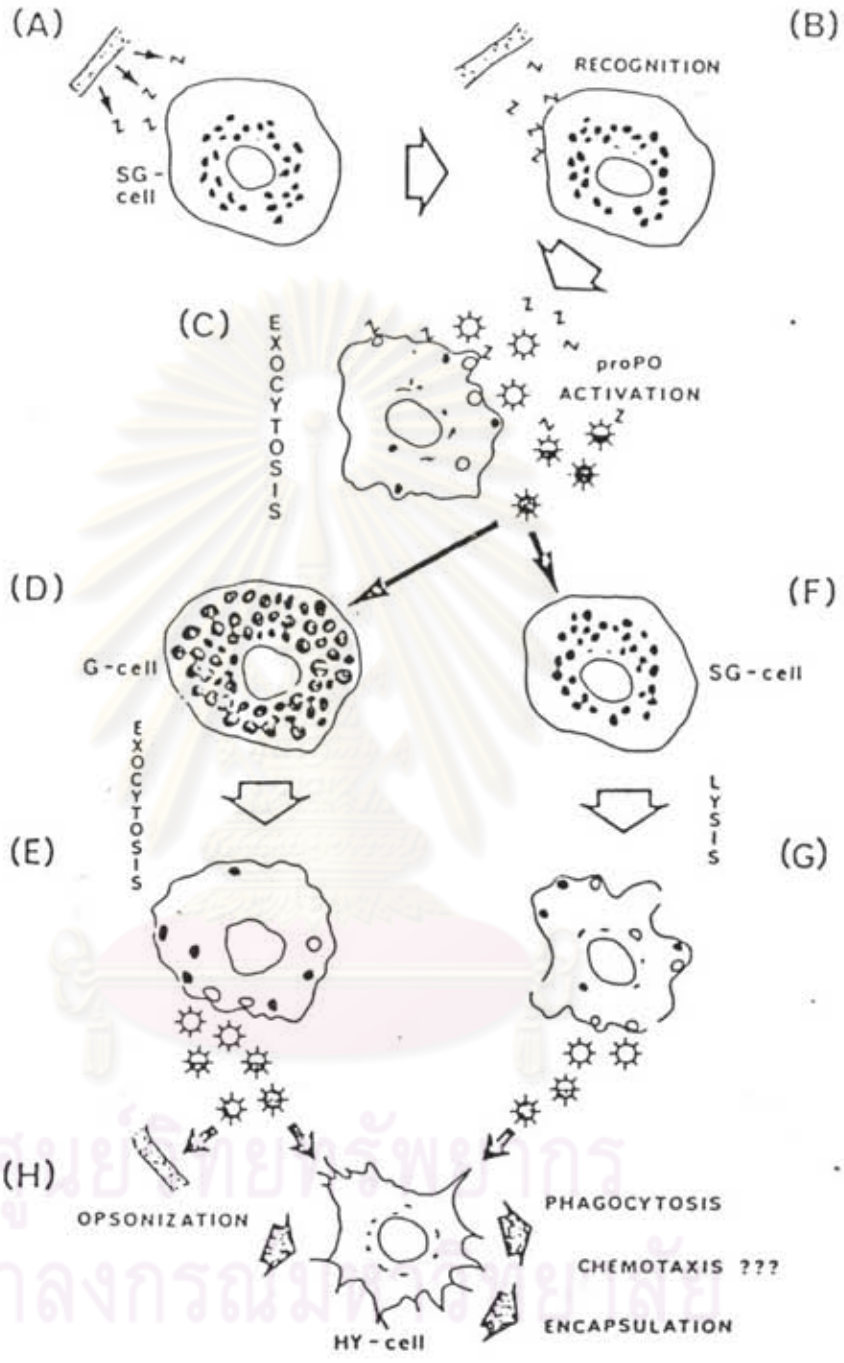
สำหรับกลไกการตอบสนองโดยเซลล์ ส่วนใหญ่จะเกิดจากเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งจัดแบ่งได้ 3 ชนิด ตามขนาดและรูปร่างของแกรนูลภายในเซลล์ คือ

1. Hyaline cell เป็นเซลล์ที่ไม่มีแกรนูล
2. Semigranular cell เป็นเซลล์ที่มีแกรนูลอยู่จำนวนเล็กน้อย
3. Granular cell เป็นเซลล์ที่มีแกรนูลอยู่จำนวนมาก

เม็ดเลือดชนิด hyaline จะเกี่ยวข้องกับขบวนการ phagocytosis โดยไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดของระบบ phenoloxidase สำหรับเม็ดเลือดชนิด semigranular และ granular จะเกี่ยวข้องกับระบบ phenoloxidase โดยจะเกิดการ degranulation ของเม็ดเลือดชนิด semigranular ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเกิด phagocytosis และ encapsulation ขึ้นได้ ดังแสดงในรูปที่ 2 (Söderhäll and Smith, 1983; Smith and Söderhäll, 1983b; Söderhäll and Smith, 1986; Hose et al.,1987; Hose and Martin, 1989; Söderhäll and Cerenius, 1992)

สำหรับสารน้ำต่างๆ นั้นส่วนใหญ่มีการหลั่งจากแกรนูลของเซลล์เม็ดเลือดซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรีย หรือทำให้เกิดการแตกของเซลล์ และทำลายจุลินทรีย์ที่แปลกปลอมได้ (Sindermann, 1990) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานอื่นๆ (Ratcliffe, 1985; Smith and Söderhäll, 1986) การศึกษาด้านการตอบสนองโดยสารน้ำนั้นมีการศึกษากันน้อยมาก โดยที่มีรายงาน คือ agglutinin, bactericidin และ precipitin (Ratcliffe, 1985; Sindermann, 1990) สารน้ำที่พบในครัสเตเชียนและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังแสดงในตารางที่ 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 กลไกการทำงานของเซลล์ในการป้องกันโรค

ที่มา: Söderhäll and Smith, 1986

Hypothetical scheme of cell cooperation in host cellular defense reactions of crustaceans. (A) Foreign anent releases nonself signals (Z), such as LPS or β-1,3-glucans, in the vicinity of a host's semigranular cell. (B) Nonself signals interact with the semigranular cell. (C) Semigranular cell is stimulated to degranulate and release proPO-system (☼) into the surrounding medium. The proPO system is then activated (☼) by the nonself molecules (N) to form the attaching and other active proPO proteins (✲). (D,E) The active proPO proteins interact with and trigger exocytosis of adjacent granulocytes. (F,G) Other semigranular cells (SG) are further stimulated to undergo degranulation, and ultimately lysis, by the active proPO proteins, thereby amplifying the cellular response to the foreign agent. The active proPO proteins then opsonize the foreign material and or induce reactivity by the plasmatocytes. (SG, semigranular cell; G, granulocytes; HY, plasmatocytes.)

ตารางที่ 2 การตอบสนองโดยสารน้ำ (Humoral factor) ที่พบในครัสเตเชียนและในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด

Factor	Function	Crustraceans	Other Invertebrates
Agglutinins	Aggregate foreign particles. Include bacterial agglutinins, haemagglutinins and/or lectins	Present in nearly all species. Appear to aid seqeustration of infective agents but little evidence for a role in recognition	Widely distributed in all groups Some evidence that haemagglutinins mediate recognition in molluscs and insects
Killing factor :			
Lytic agents	Bactericidal	Bacteriolysins and lysozyme seldom reported. Haemolysins present in spiny lobsters	Bacteriolysins and lysozyme present in most groups, especially in molluscs and insects
Peptides	Bactericidal	Not known	Cecropins in insects
Pigments	Microbicidal	Melanin or it's precursors are fungicidal and possibly bactericidal	Melanin or it's precursors in insects, Echinochrome A in echinoderms
Neutralising factors	Antiviral	Reported for *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*	Occasionaly reports but poorly understood
Cytotoxic agents	Destroy cells	Crayfish granular cells are cytotoxic for normal and tumour vertebrate cells *in vitro*	Demonstrate for various phyla. Mechanism unknown
Precipitins	Sequester soluble 'antigens' from blood	Few reports (mostly in older literature)	Few reports

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Factor	Function	Crustraceans	Other Invertebrates
Cytokines	Non-antibody proteins with diverse immunological and homeostatic functions. Produced by blood cells	Few reports. Factor associated with proPO* activation influence exocytosis, phagocytosis and cell adhesion in decapods	Poorly understood. Some report for echinoderms
Modulators	Regulate the activity of immunological aggressive molecules	Poorly studied. a_2 Macroglobulin cages proteinases and is found in crayfish plasma	Poorly studied. a_2 Macroglobulin found in insects and chelicerate blood
Clotting factors	Prevent blood loss and seal wounds	all species. involve plasma gelation as well as cell aggregation	Cell aggregation in all coelomate groups. only arthropods display plasma gelation as well as cell aggregation
Recognition factors	Bind specifically to non-self molecules and trigger cell response	proPO factors released from cells. β 1,3-glucan-binding factor found in crayfish plasma	proPO factors and β 1,3-glucan-binding factor present in some arthopods. Some evidence for lectins mediated recognition in insects and molluscs

ที่มา : Smith and Chisholm (1992)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.1 ภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองโดยเซลล์ (Cellular Immune Response)

2.2.1.1 Phagocytosis

phagocytosis เป็นกลไกพื้นฐานที่สำคัญในการป้องโรคของครัสเตเชียนส่วนใหญ่ โดยอาศัยสารน้ำในการช่วยเสริมการทำงานของการเกิด phagocytosis และมีความจำเพาะต่ำ (Sindermann, 1971; 1990)

McKay และ Jenkin (1970) ศึกษาการเกิด phagocytosis ในกุ้ง freshwater crayfish, *Parachaeraps bicarinatus* พบว่าในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีการเกิดกิจกรรม phagocytosis สูงขึ้น แสดงว่ามีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นโดยไม่พบว่ามีความจำเพาะต่อชนิดของวัคซีน และพบว่ากิจกรรมที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับความต้านทานต่อการเกิดโรค เม็ดเลือดที่เกิด phagocytosis เป็นชนิด hyaline ซึ่งแตกต่างจากในกุ้งมังกร American lobster, *Homerus americanus* ที่พบการเกิด phagocytosis ในเม็ดเลือดชนิด granular และพบว่าการเกิดขบวนการ phagocytosis ไม่มีความจำเพาะ เมื่อกระตุ้นด้วยแอนติเจนของแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas perolens* จะเกิดการ phagocytosis เม็ดเลือดแดงแกะ (SRBC) และแบคทีเรียแกรมบวก *Aerococcus viridans* var. *homari* สูงกว่าต่อ *P. perolens* ซึ่งใช้ในการกระตุ้น (Paterson and Stewart, 1974; Paterson et al., 1976)

Hose และ Martin (1989) ศึกษาการทำงานของเม็ดเลือดกุ้ง ridgeback prawn, *Sieyonia ingentis* ในหลอดทดลองพบว่าเม็ดเลือดชนิด hyaline จะเกิดการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมโดยเกิด coagulation ส่วนเม็ดเลือดชนิด granular จะเกิดขบวนการ phagocytosis และ encapsulation

การเพิ่มขึ้นของการเกิด phagocytosis นั้นมีการศึกษาและรายงานกันมาก คือ

McKay และ Jenkin (1970) ศึกษาโดยการฉีดสาร lipopolysaccharide เข้าไปในกุ้ง Australian crayfish, *Cherax destructor* พบว่าสามารถทำให้เกิดกิจกรรม phagocytosis ต่อเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพิ่มขึ้น นอกจากนั้น Paterson และคณะ (1976) ทำการศึกษาโดยการฉีด endotoxin และแบคทีเรียที่ตายแล้วในกุ้งมังกร *H. americanus* พบว่ามีการตอบสนองโดยการเพิ่มประสิทธิภาพและอัตราเร็วของการเกิด phagocytosis ต่อเม็ดเลือดแดงแกะและแบคทีเรีย ส่วนการศึกษาใน *H. americanus* พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการ phagocytosis เพิ่มขึ้นได้ด้วยการฉีดสาร lipopolysaccharide (Sindermann,1990)

Paterson และคณะ (1976) พบว่าในกุ้งมังกร *H. americanus* ไม่มีการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือด แต่มีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรม phagocytosis หลังจากให้วัคซีน ส่วน McKay และ Jenkin (1970) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเม็ดเลือดซึ่งสัมพันธ์กับการเกิด phagocytosis เพิ่มขึ้นใน

freshwater crayfish ต่อมามีการศึกษาในกุ้งมังกรและพบว่าการเพิ่มขึ้นของกิจกรรม phagocytosis จะทำให้มีการสร้างเม็ดเลือดขึ้นใหม่ในเวลาต่อมา (Paterson and Stewart, 1979)

ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิด phagocytosis และการตอบสนองโดยสารน้ำในกุ้งมังกร *H. americanus* พบว่าหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วย *Pseudomonas perolens* หรือ endotoxin ของ *P. perolens* มีการเพิ่มขึ้นของการเกิด phagocytosis และ bactericidin titre โดยไม่พบการเพิ่มขึ้นของ agglutinin (Paterson et al., 1976) และมีการรายงานว่าในกุ้งมังกร จะเกิด phagocytosis ต่อ A. viridans สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงต่อการเกิดโรคต่ำกว่าสายพันธ์ที่ไม่รุนแรงต่อการเกิดโรค (Schapiro et al., 1977) การเกิด phagocytosis เป็นกลไกที่สำคัญในการป้องกันโรคของครัสเตเชียนน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองโดยสารน้ำเช่น bactericidins, lysins และ agglutinins โดยพบว่าประสิทธิภาพของการเกิด phagocytosis เพื่อกำจัดเชื้อโรคที่บุกรุกเข้ามาจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และสภาพทางสรีรวิทยาของเจ้าบ้าน รวมทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ การเพิ่มกิจกรรม phagocytosis โดยสารน้ำนั้นน่าจะเกิดจากการตรึงและทำให้จุลินทรีย์เกิดการเกาะกลุ่ม และเกิดการ phagocytosis ตามมาในภายหลัง (Sindermann, 1971)

2.2.1.2 Cell aggregation / Nodule formation

ในกรณีที่จุลินทรีย์บุกรุกเข้ามาเป็นจำนวนมากเกินกว่าที่จะกำจัดด้วยการ phagocytosis เพียงอย่างเดียว อาจจะเกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์ และเกิดเป็นก้อนขึ้น จากนั้นจึงมีการทำลายจุลินทรีย์เหล่านี้ต่อไป

2.2.1.3 Encapsulation

ในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมมีขนาดใหญ่ไม่สามารถกำจัดด้วยขบวนการ phagocytosis จะเกิดการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยขบวนการ encapsulation (Fontain and Lightner, 1975) และพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบ prophenoloxidase (Smith and Söderhäll, 1986)

2.2.1.4 Wound healing / Coagulation

ในกรณีที่เกิดบาดแผลขึ้น กลไกที่สำคัญในการป้องกันการสูญเสียน้ำของร่างกาย และป้องกันการบุกรุกของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการปิดแผลอย่างรวดเร็ว โดยเกิดการแข็งตัวของเม็ดเลือดโดยอาศัยระบบ phenoloxidase ร่วมด้วย (Bang, 1983)

2.2.1.5 ระบบ prophenoloxidase (proPO)

กลไกการตอบสนองโดยอาศัยเซลล์ในครัสเตเชียน เช่น การเกิด phagocytosis, coagulation และ encapsulation รวมทั้งกลไกในการทำลายจุลินทรีย์ต่างๆ เกี่ยวข้องกับสารซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากระบบ proPO (Söderhäll,1981, 1982) สารเหล่านี้ประกอบด้วย opsonin, cytotoxic, fungicidal และสารซึ่งช่วยส่งเสริมการทำงานของเซลล์ในการเกิด encapsulation

ระบบ proPO นี้เกี่ยวข้องกับการจดจำสิ่งแปลกปลอม (nonself recognition) และการติดต่อระหว่างเซลล์ (cellular communication) โดยส่วนใหญ่จะศึกษาใน freshwater crayfish, *Astacus astacus* ระบบ proPO นี้จะเกี่ยวข้องกับเม็ดเลือดชนิด granular และ semigranular โดยไม่พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับเม็ดเลือดชนิด hyaline (Jonnson and Soderhall, 1985; 1988; 1989; Soderhall et al. 1986) และพบว่าส่วนของเหลวที่ได้หลังจากทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกและทดสอบกับแบคทีเรีย พบว่าเกิดการชักนำให้เม็ดเลือดชนิด semigranular เกิด degranulation โดยไม่มีผลต่อเม็ดเลือดชนิด granular และ hyaline โดยการเกิด degranulation น่าจะเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่ทำให้เกิดการหลั่งส่วนประกอบต่างๆ ของระบบนี้ (Ashida and Söderhäll, 1983; Söderhäll and Smith, 1983; Smith and Söderhäll, 1983b)

ระบบ proPO มีกลไกในการกระตุ้นที่ซับซ้อนและประกอบด้วยเอ็นไซม์หลายตัวเป็นขั้นตอน โดยมี serine protease ร่วมอยู่ด้วยอย่างน้อยหนึ่งขั้นตอน พบว่าการเปลี่ยนของโปรเอ็นไซม์ (pPO) เป็น active enzyme คือ phenoloxidase (PO) ต้องอาศัย phenoloxidase activating enzyme (ppa) ซึ่งเป็น serine protease ที่มีความจำเพาะสูง (Söderhäll, 1982; 1983)

ระบบ proPO นี้จะมีความจำเพาะต่อการถูกกระตุ้นด้วยโมเลกุลที่แปลกปลอม เช่น β-1,3 glucans จากผนังเซลล์ของเชื้อรา (Ashida et al., 1982; Unestam and Söderhäll, 1979; Söderhäll and Unestam, 1979) หรือ lipopolysaccharides (LPS) จากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Söderhäll and Hall, 1983) โดยที่สารเหล่านี้จะมีผลต่อการกระตุ้นระบบ proPO ได้ในบางขั้นตอน

2.2.2 ภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองโดยสารน้ำ (Humoral immune response)

2.2.2.1 Agglutinins

มีการศึกษาถึง agglutinin ในครัสเตเชียนหลายชนิด เช่นใน *H. americanus* (Cornick and Stewart, 1968, 1973; Hall and Rolands, 1974a,b; Paterson et al., 1976) ในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (Huang et al., 1981; Vasta et al., 1983) และในกุ้งกุลาดำ

P. monodon (Adams, 1991; Sritunyalucksana, 1995) โดยพบว่าแอคติวิตีในแต่ละส่วนของน้ำเลือดจะแตกต่างกันไปในสัตว์ต่างชนิดกัน สำหรับในกุ้งกุลาดำพบว่ามีมากในส่วนของซีรัม

agglutinin ที่พบในครัสเตเชียนส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละตัว (Smith and Chisholm, 1992) โดยมีฤทธิ์ทำให้แบคทีเรียและเม็ดเลือดแดงของสัตว์เกาะกลุ่ม Adams (1991) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการสร้าง agglutinin ขึ้นได้ ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ของ agglutinin กับความต้านทานต่อการเกิดโรค มีการรายงานถึงความสัมพันธ์ในทางบวกโดยศึกษาใน Spider crab, Maia และพบความต้านทานต่อการติดเชื้อ Anophrys ซึ่งเป็นโปรโตซัวในกลุ่ม ciliate ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของ agglutinin (Bang, 1962) ต่างจากการศึกษาใน red crab, *Geryon quinqucdens* พบความต้านทานต่อการติดเชื้อ *Gaffkeya homari* โดยไม่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ agglutinin (Cornick and Stewart, 1985)

McKay และ Jenkin (1970) ทำการศึกษาใน freshwater crayfish, *P. bicarinatus in vitro* พบว่าการเกิด phagocytosis ต่อเม็ดเลือดแดงที่ทดสอบกับ agglutinin จากน้ำเลือด มีผลต่อการเกิด phagocytosis โดยอาจจะมีผลต่อการเกาะติด ทำให้ประสิทธิภาพของการเกิด phagocytosis ดีขึ้น ซึ่ง Paterson และคณะ (1976) เสนอว่า agglutinin อาจจะมีบทบาทในการจดจำสิ่งแปลกปลอม ซึ่งช่วยเสริมการทำงานของการเกิด phagocytosis ต่อมา Söderhäll และ Smith (1986) พบว่าระบบ proPO มีผลต่อการเสริมประสิทธิภาพของการเกิด phagocytosis ไม่ใช่ agglutinin

สมบัติทั่วไปของ agglutinin ที่พบในครัสเตเชียนส่วนใหญ่เป็นโปรตีน ถูกทำลายด้วยความร้อน การทำงานต้องอาศัย divalent cation (Cornick and Stewart, 1973; Hall and Rolands, 1974; Goldenberg and Greenberg, 1983; Vesta et al., 1983) และพบว่าใน brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes agglutinin จะถูกยับยั้งได้ด้วยสาร lipopolysaccharide (Vargas-Albores et al, 1993) การศึกษา agglutinin มักใช้เม็ดเลือดแดงของสัตว์เป็นตัวทดสอบ เรียกว่า hemagglutinin

Huang และคณะ (1981) ได้ศึกษา agglutinin ในกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* พบว่าเกิดปฏิกิริยาต่อแบคทีเรียได้ดีเช่นเดียวกับเม็ดเลือดแดงของสัตว์ แต่ไม่ถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นด้วยวัคซีน แต่การศึกษาใน *Penaeus setiferus* พบว่าหลังการฉีดด้วย *Vibrio alginolyticus* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน สามารถชักนำให้เกิด agglutinin ต่อ *V. alginolyticus*, *E. coli* และเม็ดเลือดแดง (Lewis and Lawrence, 1983)

การศึกษาในกุ้งกุลาดำพบว่า agglutinin เป็นสารที่ถูกทำลายด้วยความร้อนอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที การทำงานต้องการแคลเซียม และมีความจำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (Sritunyalucksana, 1995)

2.2.2.2 Bactericidins

ปัจจุบันมีการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ (killing factor) ในสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจกันมาก โดยส่วนใหญ่จะศึกษาผลต่อแบคทีเรีย (Evan at el., 1968a,b, 1969; Weinheimer et al., 1968; McKay and Jenkin, 1970; Stewart and Zwicker, 1972; Mori and Stewart, 1978a,b; Smith and Pistole, 1985; Söderhäll and Smith, 1986; Adams, 1991; Smith and Chisholm, 1992; Chisholm and Smith, 1995; Sritunyalucksana, 1995) ดังแสดงในตารางที่ 3

bactericidin เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรีย การศึกษาส่วนใหญ่มักทำในสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ คือ ปูและกุ้งมังกร เพื่อศึกษาถึงกลไกและบทบาทของสารนี้ต่อการต้านทานโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ส่วนการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและบทบาทในการป้องกันโรคมีการศึกษากันน้อยมาก เดิมมีการตั้งสมมติฐานว่า bactericidin อาจจะเป็นสารอิมมูโนโกลบุลิน เนื่องจากสามารถชักนำให้มีระดับสูงขึ้นได้ในการตอบสนองครั้งที่สองด้วยแอนติเจน(Evans, 1968; Evan et al., 1969; Weinheimer et al., 1968) แต่พบว่า bactericidin แตกต่างจากอิมมูโนโกลบูลิน คือ ขาดความจำเพาะและไม่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแอนติเจน bactericidin เป็นสารที่ทนความร้อน การทำงานไม่ต้องอาศัย divalent cation ไม่ถูก inactivate ด้วย EDTA หรือ caragenin

มีการรายงานว่า bactericidin มีความจำเพาะบางส่วน (partial specific) โดยพบว่าในกุ้งมังกร *H. americanus* จะมีการตอบสนองโดยสร้าง bactericidin ที่มีผลต่อ *Pseudomonas perolens* ซึ่งไม่ใช่เชื้อก่อโรคที่ไตเตอร์สูง แต่ไม่มีผลต่อ *Gaffkeya hamori* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้งมังกร(Cornic and Stewart, 1968; Stewart and Zwicker, 1972) ในกุ้งมังกร spiny lobster พบว่า bactericidin มีความจำเพาะเพียงบางส่วนเช่นกัน คือ เมื่อทำการกระตุ้นด้วยการฉีด pneumococci ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และ BSA พบว่าไตเตอร์ของ bactericidin มีค่าต่ำเมื่อทดสอบด้วยแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง และพบว่าหลังการกระตุ้นโดยการฉีดด้วยแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งจะเกิดการตอบสนองของ bactericidin ต่อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Salmonella typhosa* และ *Escherichia coli* แต่ไม่มีผลต่อ *Pseudomonas aeruginosa* และแบคทีเรียแกรมบวก (Weinheimer et al., 1968)

การศึกษา bactericidin ในครัสเตเชียน มีการรายงานครั้งแรกโดย Bang (1967) ซึ่งเป็นการทดสอบหา bactericidin ที่มีอยู่ตามธรรมชาติของสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง รวมทั้งครัสเต

ตารางที่ 3 สารที่มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ (antibacterial, antiviral และ fungicidal factor) ที่พบในน้ำเลือดครัสเตเชียน

Species	Test organisms	Inducibility	Requirement for divalent cation	Heat stability	Comments	References
Panulirus argus	Gram negative bacteria	yes	No	Stable below 60° Cinactivate at 65°C Freeze stable -25°C	Not agglutinination Enhanced 2° and 3° responsed	Evan et al.(1968) Evan et al (1969) Weinheimer et al (1969)
Panulirus interruptus	Gram negative bacteria	yes		Stable at 56°C Inactivate at 65°C	Not agglutination 2° responses noted in	Evan et al (1969)
Homarus americanus	*Pseudomonas perolenes* *Aerococcus viridans* var *homari*	Yes			Mainly in hepatopancrease	Acton et al (1969) Stewart&Zwicke(1972) Mori& Stewart (1978)
Callinectes sapidus	Bacteriophages Poliovirus		No	Stable at 56°C	Plasma more effective than serum 6-13S 80kDa polymer	McCumber et al (1979) McCumber&Clem
Carcinus maenas	Marine bacteria		No	Stable at 60°C Freeze stable at -20 and -70°C	Maximally effective against Gram negative organism active at higtiter	Soderhall& Smith(1986) Chisholm& Smit(1991)
Penaeus monodon	Gram negative bacteria	Yes			Partial specificity to vibrios	Adams (1991)
Pascifastacus leniusulus	Aphanomyces astaci	Yes			May be due to melanin or melanin precursors	Nyhlen&Unestam (1980)

ที่มา : Smith and Chisholm (1992)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เชียนด้วย ต่อมา Evans และคณะ (1968) ได้ศึกษาการเพิ่มขึ้นของ bactericidin ใน west indian spiny lobster, *Panulirus argus* โดยนำแบคทีเรียแกรมลบซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหาร (EMB-1) ของกุ้งมังกรปกติ มาฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน และชักนำให้เกิดการสร้าง bactericidin พบว่าหลังการกระตุ้นสัตว์ทดลองบางตัวเท่านั้นที่มีค่า bactericidin สูงขึ้นกว่าที่มีอยู่ตามธรรมชาติ โดยระดับของ bactericidin ที่ได้รับหลังการกระตุ้นจะขึ้นสูงสุดที่เวลาแตกต่างกันและแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละตัว มีการรายงานว่าหลังจากกระตุ้นด้วยแอนติเจนเดิมเป็นครั้งที่สองและสามในกุ้งมังกร spiny lobster พบว่า bactericidin titre มีค่าสูงกว่าการกระตุ้นในครั้งแรกและมีอัตราการเพิ่มขึ้นเร็วกว่าการกระตุ้นในครั้งแรก และยังพบว่าใน spiny lobster, *P. interruptus* มีความจำเพาะบางส่วนเช่นเดียวกับใน *P. argus* (Evans et al., 1969)

Stewart และ Zwicker (1972) ศึกษาในกุ้งมังกร *H. americanus* พบว่า bactericidin เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาจากส่วนพลาสมาและสารในเซลล์เม็ดเลือด จากการทดลองโดยชักนำด้วย *P. perolens* ซึ่งแยกจากทางเดินอาหารของกุ้งมังกรปกติ พบว่ากลุ่มที่มีการชักนำจะมีค่า bactericidin titre สูงกว่าในกลุ่มควบคุมและมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อผสมส่วนที่สกัดจากเม็ดเลือด (hemocyte extract) จากสัตว์ทดลองที่ชักนำแล้วกับพลาสมาที่แยกเม็ดเลือดออก bactericidin จะอยู่ในรูป inactivate จนกว่าจะได้รับการกระตุ้นจากส่วนที่สกัดจากเม็ดเลือด

McKay และ Jenkin (1969) ทำการศึกษาใน Australian freshwater crayfish, *Parachacraps bicarinatus* พบว่าหลังจากให้วัคซีนซึ่งเตรียมจาก Pseudomonas CP ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคใน crayfish สัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน 4 ครั้ง จากนั้นเหนี่ยวนำด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์เดิมโดยใช้ความเข้มข้น 100 เท่าของค่า LD_{50} พบว่าสัตว์ทดลองมีอัตรารอด 80% และเมื่อเก็บซีรัมมาทดสอบหาค่า bactericidin ต่อ *Pseudomonas* CP พบว่ามีค่าเหมือนกันในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นแสดงว่าความต้านทานต่อการติดเชื้อที่เกิดขึ้นไม่มีความสัมพันธ์กับสาร bactericidin

สำหรับการศึกษาในกุ้งกุลาดำโดยการฉีดด้วย *V. alginolyticus* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนพบว่า bactericidin สามารถถูกชักนำให้เพิ่มขึ้นได้ และมีความจำเพาะบางส่วน โดยพบว่าไตเตอร์ต่อ *V. angiullarum* จะสูงกว่า *E. coli* โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (Adams, 1991) และพบว่าการศึกษา bactericidin ควรทำการลดแอคติวีตีของ agglutinin ที่มีในน้ำเลือดโดยดึงแคลเซียมออกก่อนการทดสอบ (Sritunyalucksana, 1995)

Cornic และ Stewart (1968) พบว่าปัจจัยทางกายภาพ เช่น ค่าความเป็นกรด ด่างของระบบที่ใช้ทดสอบ อุณหภูมิที่ใช้ในสัตว์ทดลองมีผลต่อแอคติวีตีของ bactericidin โดยพบว่าแอคติวีตีของ bactericidin จะเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเป็นกรดเป็นด่าง และเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น โดย

อุณหภูมิของสภาพแวดล้อมไม่มีผลต่อแอคติวีตีของ bactericidin และยังพบว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนในความเข้มข้นสูงจะมีค่า bactericidin สูงด้วย

2.2.2.3 Lysins

ปัจจุบันบทบาทของ lysin ต่อกลไกการป้องกันโรคในครัสเตเชียนยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การศึกษาส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับ hemolysin โดยดูกิจกรรมที่มีผลต่อเม็ดเลือดแดงของสัตว์มีกระดูกสันหลัง Weinheimer และคณะ (1968) พบว่าใน west indian spiny lobster มี hemolysin ซึ่งเกิดโดยธรรมชาติและมีผลต่อเม็ดเลือดแดงแกะ hemolysin ของ lobster นี้จะถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 52°C

Guzman และคณะ (1993) ศึกษาการเกิด hemolysin ใน brown shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, พบว่ามี hemolysin ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยแอคติวีตีจะแปรผันตามความเข้มข้นและเวลา และคาดว่า hemolysin นี้น่าจะเป็นเอ็นไซม์ชนิดหนึ่ง

2.2.2.4 Precipitins

สำหรับในครัสเตเชียนนั้น Stewart และ Foley (1969) พบว่าใน *H. americanus* มี precipitin เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและมีความคงทนที่ 50°C รวมทั้งเสนอว่า precipitin จะมีอยู่เสมอในน้ำเลือด และน่าจะมีบทบาทที่สำคัญในการกำจัดโปรตีนที่แปลกปลอม โดยมีกลไกในการแยกความแตกต่างระหว่างโปรตีนที่แปลกปลอม และโปรตีนที่มีอยู่ตามธรรมชาติ

2.3 การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulant, Immunoenhancer) คือ สารเคมี ยา stressor หรือปฏิกิริยาที่ช่วยเพิ่มกลไกการตอบสนองแบบจำเพาะหรือไม่จำเพาะ การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันอาจใช้โดยให้เพียงอย่างเดียวเพื่อช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ หรือใช้ร่วมกับวัคซีนเพื่อช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ (Anderson, 1992)

สำหรับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการใช้ทั้งในคน สัตว์เลี้ยงต่างๆ รวมทั้งในสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ คือ ปลาและกุ้ง เพื่อช่วยลดปัญหาในการเกิดโรคติดเชื้อ เนื่องจากการเกิดโรคขึ้นอยู่กับปัจจัย 3 อย่าง คือ เจ้าบ้าน เชื้อก่อโรค และสิ่งแวดล้อมซึ่งมีความสัมพันธ์กัน การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการลดการเกิดโรคโดยช่วยเพิ่มความต้านทานของ

เจ้าบ้านต่อการเกิดโรค ดังแสดงในรูปที่ 3 ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้งกุลาดำพบปัญหาโรคติดเชื้อหลายชนิด แต่ยังไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจึงเป็นแนวทางที่จะสามารถนำมาใช้ในการป้องกันโรคได้ (Bachere et al., 1995; Mialhe et al., 1995; Raa et al., 1992)

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบ่งออกได้เป็นหลายกลุ่ม เช่น oil-based adjuvant เช่น CFA ซึ่งช่วยทำให้แอนติเจนอยู่ในเนื้อเยื่อได้นานขึ้นและช่วยกระตุ้นการทำงานของ T-cell สารสังเคราะห์ต่างๆ เช่น muramyldipeptide, polynucleolide, polyadenylic-polyuridilic acid ใช้เป็นสารกระตุ้นในสัตว์ สารจากธรรมชาติ เช่น จากพืช สัตว์ แบคทีเรีย เช่น lipopolysaccharides และ lectin ช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Anderson, 1992) ดังแสดงในตารางที่ 4

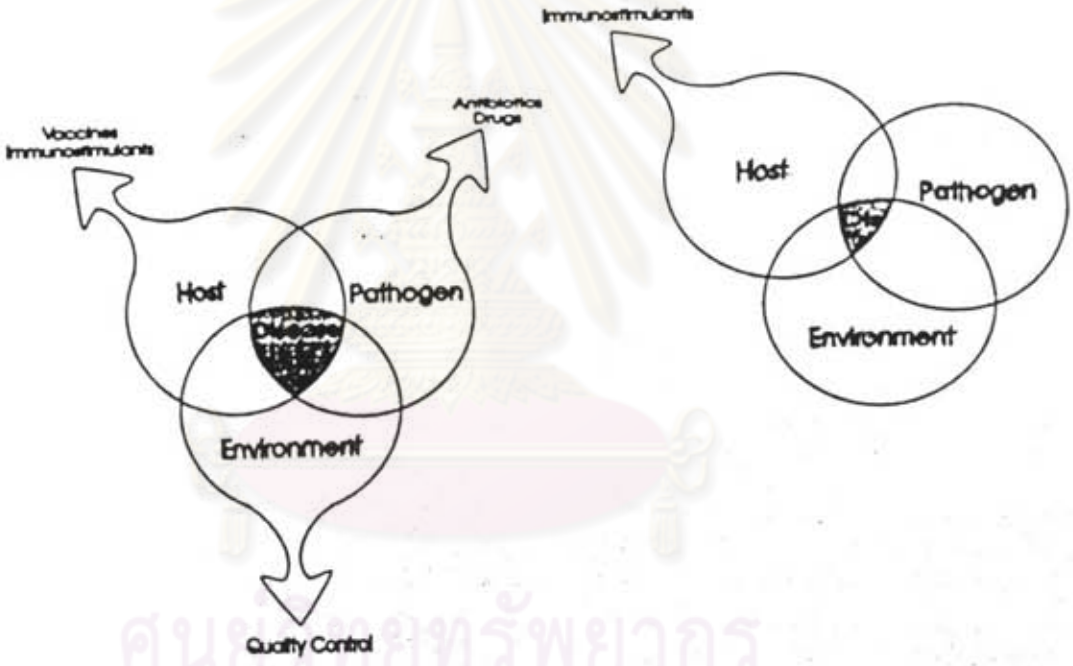
Söderhäll (1981) ศึกษาและพบว่าใน crayfish, *Astacus astacus* และ *Pacifastacus leniusculus* สามารถกระตุ้นด้วย β-1,3 glucan จากเชื้อรา ทำให้เกิดการแข็งตัวและเกิดการหลั่งโปรตีนของระบบ proPO เพิ่มขึ้น และต่อมาพบว่า β-1,3 glucan สามารถกระตุ้นใน crayfish ให้มีการหลั่ง serine protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในระบบ ProPO เพิ่มขึ้น (Söderhäll, 1983)การศึกษาใน crayfish, *Astacus astacus* และในปู shore crab, *Careinus maenas* พบว่าในหลอดทดลอง β-1,3 glucan สามารถกระตุ้นให้เกิด phagocytosis ต่อ *Moraxella* sp. เพิ่มขึ้น ทั้งจำนวนเซลล์ที่เกิด phagocytosis และจำนวนแบคทีเรียที่ถูกจับกินต่อเซลล์เพิ่มขึ้น ส่วนในสัตว์ทดลองพบว่าเมื่อฉีด β-1,3 glucan เข้าในแอ่งเลือดจะทำให้จำนวนเม็ดเลือดลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและเพิ่มขึ้นในภายหลังแสดงว่าเริ่มมีการกระตุ้นการตอบสนองโดยเซลล์และระบบ proPO (Smith and Söderhäll, 1983)

Söderhäll และ Hall (1983) ทดลองใช้สาร lipopolysaccharide (LPS) ใน crayfish พบว่าความเข้มข้นของ LPS 10^{-10} g/ml กระตุ้นให้เกิดการทำงานของระบบ proPO เพิ่มขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของ LPS สูงๆ (10^{-4} g/ml) ไม่สามารถกระตุ้นระบบ proPO ได้

Sakai และคณะ (1993) ทดลองใช้ bacterin ที่เตรียมจาก *C. butyricum* ใน rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* โดยการกินพบว่าปลามีการเกิด phagocytosis สูงขึ้น และสามารถกำจัด *V. anguillarum* ที่เหนี่ยวนำเข้าไปได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม

การศึกษาในกุ้ง *P. japonieus* โดยให้กินเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 30 และ 300 ไมโครกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่ากุ้งมี % phagocytosis และ phagocytic index สูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมและมีอัตรารอดหลังเหนี่ยวนำด้วย *Vibrio* sp. สูงกว่ากลุ่มควบคุม (Takahashi, 1993)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ของเจ้าบ้าน เชื้อก่อโรคและสิ่งแวดล้อมต่อการเกิดโรค

ที่มา: Anderson, 1992

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulant) ที่มีการใช้ในปลาและสัตว์อื่น

Reserviors and depots:	Cell membrane modifiers:
Freund's Complete Adjuvant (CFA)	Detergents
Freund's Incomplete Adjuvant (ICA)	Sodium dodecyl sulfate (SDS)
Liposomes	Quaternary ammonium compounds
Mineral oil	Saponin (plant extracts)
Lanolin	Animal extracts:
Parafin oil	*Ecteinascidia turbinata* extract (Ete)
Dextran sulfate	*Haliotis discus* extract (HDe)
Ethlene vinyl acetate	Fish extract
T cell stimulators:	Mitogens (lectins, plant extracts)
Mycobacterium sp	Pokeweed mitogen (PWM)
Muramyl dipeptide (MDP)	Photohaemagglutinin (PHA)
Glucans (yeast extract)	Concanavalin A (Con A)
Metalic salts	Nutritional factors:
Alum (potassium aluminum sulfate)	Vitamin C
Aluminium hydroxide gels	Vitamin E
Levamisole	Cytokines:
Bacille Calmette Guerin (BCG)	Interleukins:
Corynebacterium parvum	Leukotriene B_4
Polynucleotides	Interferon
B cell stimulators:	Heavy metals:
Lipopolysaccharides	Cadmium
	Germanium

ที่มา: Anderson, 1992

Song และ Sung (1990) ศึกษาในกุ้งกุลาดำโดยใช้ bacterin ที่เตรียมจาก *V. vulnificus* พบว่ากุ้งมีการเจริญดีกว่ากลุ่มควบคุม ต่อมา Sung และคณะ (1991) ทดลองโดยแช่กุ้ง PL_{13} ในbacterin ที่เตรียมจาก *V. vulnificus* เป็นเวลา 13 ชั่วโมง พบว่ากุ้งมีการเจริญดีกว่ากลุ่มควบคุม ส่วน Itami และ Takahashi(1991) ศึกษาในกุ้งกุลาดำระยะ Zoeal โดยใช้ Vibrio ที่ทำให้ตายด้วยฟอร์มาลินผสมในอาหารความเข้มข้น 0.05, 0.5 และ 5% พบว่ากุ้งมีอัตรารอดดีกว่ากลุ่มควบคุม

Boonyaratpalin และคณะ (1994) ศึกษาในกุ้งกุลาดำโดยใช้ peptidoglycan (PG) จาก *Brevibacterium lactofermentum* เสริมลงในอาหารพบว่ากุ้งที่ได้รับในความเข้มข้น 0.01% มีการเจริญ อัตรารอด และ FCR ดีกว่าในกลุ่มควบคุม รวมทั้งพบว่ามีกิจกรรม phagocytosis เพิ่มขึ้นและมีความต้านทานต่อการเกิดโรคสูงขึ้นด้วย

Sung และคณะ (1994) ทำการศึกษาโดยแช่กุ้งกุลาดำในระยะ postlarval ใน β-glucan พบว่ากุ้งที่ได้รับ β-glucan ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/ml มีความต้านทานต่อการติดเชื้อ ส่วนในกลุ่ม 0.25 และ 2 mg/ml ไม่พบความต้านทานและเมื่อทดสอบในหลอดทดลองพบว่า β-glucan สามารถกระตุ้นระบบ proPO ในเม็ดเลือดของกุ้งได้ การกระตุ้นที่เกิดมีผลในระยะสั้น

Song และ Hsicht (1994) ศึกษาการใช้สารกระตุ้นในกุ้งกุลาดำด้วย β-glucan phobol-12, myristale 13-acetate (PMA) และ Zymosan พบว่า β-glucan, Zymosan และ PMA มีผลต่อการกระตุ้นให้เม็ดเลือดหลั่งสาร super anion มากกว่ากลุ่มควบคุม 2.5, 2 และ 1.3 เท่าตามลำดับ

Sritunyalucksana (1995) ศึกษาการใช้สารกระตุ้นในกุ้งกุลาดำในหลอดทดลอง พบว่า 0.02% LPS และ 0.4% PG มีผลต่อการกระตุ้นให้มีเอนไซม์ phenol oxidase สูงขึ้น แต่ไม่มีผลต่อ agglutinin และ bactericidin ส่วน 0.8% β-glucan ไม่มีผลต่อการกระตุ้นเอนไซม์ phenol oxidase, agglutinin และ bactericidin ส่วนการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยใช้สารกระตุ้นทางการค้า พบว่ามีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง แต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ phenol oxidase, agglutinin และ bactericidin

ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Anderson, 1992)

1.เวลาที่จะให้สารกระตุ้น(ควรใกล้ช่วงเวลาที่คาดว่าสัตว์จะได้รับเชื้อโรคหรือความเครียด)

2. อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม (อุณหภูมิต่ำอาจมีผลทำให้การกระตุ้นเกิดขึ้นช้า)

3. ชนิดของสัตว์ ซึ่งมีกลไกในการป้องกันต่างกัน

4. ขนาด (dose) ที่ให้ ถ้าสูงเกินไป (overdose)จะกดกลไกการป้องกันได้และถ้าต่ำเกินไป (underdose) อาจไม่มีผลในการกระตุ้น

5. ระยะเวลาที่สารกระตุ้นจะยังคงมีประสิทธิภาพ

6. ชนิดของสารกระตุ้น

7. สิ่งแวดล้อมต่างๆ

การศึกษาการใช้สารกระตุ้นในกุ้งกุลาดำเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มความแข็งแรงและเพิ่มความต้านทานต่อการเกิดโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย