สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัย
เรื่อง

ระบบการต่อต้านการเกิดโรคของกุ้งกุลาดำ
(Body Defence System of *Peneaus monodon* Fabricius)

โดย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์

เริ่มบริการ
31 มี.ค. 2552
26 มี.ค. 2552
249193

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา
พ.ศ. 2543

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ปี 2540

หมายเหตุ รายงานนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยเพียงหนึ่งปี จากการของบประมาณสามปี จึงเป็นงานการวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกันขั้นพื้นฐานระดับเซลล์

ประกาศกิตติคุณ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิจัยประจำปีจากมหาวิทยาลัยบูรพา และภาควิชา วาริชศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือ ขอขอบคุณบุคคลที่มีรายชื่อ ต่อไปนี้ที่ช่วยเหลืองานวิจัยให้สำเร็จลุล่วง คุณรัตนพรที่เอื้อเฟื้อแบคทีเรีย คุณรานี พสุจิรจรัส และคุณเทิดศักดิ์ สุขเกษม ทั้งสองท่านที่ช่วยเหลือตลอดการทดลองและงาน อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ

ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์

บทคัดย่อ

การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำจะใช้แบคทีเรียที่จำแนกได้ว่าเป็นชนิด *Vibrio alginolyticus* สามารถเจริญบนอาหารวุ้น TCBS มีโคโลนีสีเหลืองเป็นชนิด non pathogenic bacteria ระบบเม็ดเลือดพื้นฐานสามารถจำแนกชนิดของเม็ดเลือด กุ้งกุลาดำออกเป็นสามชนิดได้ดังนี้ Hyalince cell (HY), Small granule hemocyte (SGH), และ Large granule hemocyte (LGH) โดยการย้อมสีเม็ดเลือดและจากการ ส่องเลือดกุ้งสดด้วยกล้องจุลทรรศน์ เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำทั้งสามชนิดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหลังการทำให้เกิดติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* รวมทั้งการแตกตัวของ แกรนูลของเม็ดเลือด SGH ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำในหนึ่งวงจรการลอกคราบ ถูกศึกษาสุ่มนับปริมาณเม็ดเลือดโดยใช้ค่าปริมาณ Total hemocyte counts (THC) เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งพบว่าหนึ่งวงจรการลอกคราบ THC มีค่าเฉลี่ย 26.6 $\pm$ 11.2 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร จากกุ้งตัวอย่าง 77 ตัว ปริมาณ THC มีค่าผันแปรแตกต่างกันไป ในแต่ละระยะคราบของกุ้ง ระยะก่อนลอกคราบจนถึงหลังลอกคราบ (Stage D4, E และ Stage A) ค่า THC จะต่ำ และจะสูงขึ้นในระยะหลังลอกคราบ (Stage B1) และจะลดลงใน ระยะ Stage C และ Stage D0 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของหนึ่งวงจรลอกคราบ และจะสูงที่สุดใน Stage D1 และ Stage D3 ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำมีความผันแปร เมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* โดยพบว่าที่ 6 ชั่วโมง หลังการฉีดแบคทีเรียเข้าร่างกาย ปริมาณค่า THC ลดลง 16 % และปริมาณเม็ดเลือดจะกลับสู่สภาพปกติในวันที่สอง จากนั้นจะเพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม 50 % ในระหว่างวันที่สาม และวันที่หก ในที่สุดปริมาณเม็ดเลือดจะลดลงต่ำสุด (52%) ในวันที่เจ็ดของการทดลอง ชนิดเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำมีความผันแปรเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่า HY ต่อ Granulocyte (SGH+LGH) เมื่อนับชนิดของเม็ดเลือดจำนวน 200 เซลล์ ซึ่งพบว่าค่าปริมาณ HY มีแนวโน้มลดลง และค่าปริมาณ Granulocyte มีแนวโน้มสูงขึ้นตลอดระยะการทดลอง 1-7 วัน และชนิดของ Granulocyte ที่พบมาก คือ SGH และมีการแตกตัวของแกรนูลเป็นส่วนใหญ่ การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำในครั้งนี้ ปริมาณและชนิดของเม็ดเลือดมีความใกล้เคียงกับกุ้งชนิดอื่นและเมื่อทำให้กุ้งกุลาดำติดเชื้อ *V. alginolyticus* ปริมาณและชนิดของเม็ดเลือดมีการ

เปลี่ยนแปลงแตกต่างจากกุ้งปกติและช่วงระหว่างก่อนจนถึงหลังการลอกคราบเป็นระยะที่กุ้งกุลาดำมีระบบภูมิคุ้มกันระดับเซลล์อ่อนแอมากที่สุด

สารบัญ

	หน้า
ประกาศกิตติคุณ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
- ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
- วัตถุประสงค์ของโครงการปีที่หนึ่ง	3
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับในการศึกษาเบื้องต้นในปีที่หนึ่ง	3
บทที่ 2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
- ระบบภูมิคุ้มกันของ Crustacean	4
- ชนิดเม็ดเลือดของกุ้ง	4
- หน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือด	6
- ปริมาณของเม็ดเลือดในกระแสเลือดกับระยะการลอกคราบของกุ้ง	7
- ปริมาณและชนิดของเม็ดเลือดหลังการติดเชื้อหรือสิ่งกระตุ้นกับระยะการลอกคราบของกุ้ง	8
- เม็ดเลือดกุ้งกับสารเพิ่มภูมิคุ้มกันและวัคซีน	11
- การผลิตเม็ดเลือดของกุ้ง (Hemopoiesis)	12

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการศึกษา 13

- น้ำยาและสารเคมี 13
- แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 13
- กุ้งกุลาดำและแผนการทดลอง 14
- การเก็บตัวอย่างและบันทึกผลทดลอง 15
- การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ 15
- การศึกษาด้านเลือดกุ้ง 15

บทที่ 4 ผลการทดลอง 16

- คุณสมบัติของแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* 16
- การจำแนกชนิดเม็ดเลือด 17
- ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำในวงจรการลอกคราบ 19
- ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำกับการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* 21
- ชนิดของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำกับการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* 24
- ภาพถ่ายผลการทดลอง 26

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผล 31

- อภิปรายผล 31
- สรุปผล 35

เอกสารอ้างอิง 37

สารบัญตาราง

หน้าที่

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* 16

ตารางที่ 2 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดกุ้งปกติ(THC) เซลล์/มิลลิลิตร ตามระยะคราบ 20

ตารางที่ 3 ปริมาณเฉลี่ย Total hemocyte counts, THC (ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) ± ค่าเบี่ยงเบน ในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ V. alginolyticus ด้วยวิธีต่าง ๆ กัน ในเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง และ1, 2, 3, 6 และ 7 วัน 22

ตารางที่ 4 อัตราส่วนของ The Hyaline hemocyte cells (HY) ต่อ Granulocytes(G, คือ SGH+LGH) จากปริมาณเม็ดเลือด 200 เซลล์ ในเลือดกุ้งที่ติดเชื้อ *V. alginolyticus* ด้วยวิธีต่างๆกันในเวลา 1, 2, 3, และ 7 วัน 25

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่ทำรายได้เข้าสู่ประเทศไทยสูงมากและให้ผลตอบแทนแก่ผู้เลี้ยงมากกว่าการทำธุรกิจด้านอื่นๆ ทำให้มีผู้สนใจเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างกว้างขวางตลอดแนวชายฝั่งที่ติดทะเลและแหล่งน้ำกร่อยและน้ำจืดเป็นต้น ทำให้สะภาพแหล่งน้ำเสื่องคุณภาพลงประกอบกับผู้เลี้ยงปล่อยจำนวนกุ้งในอัตราความหนาแน่นต่อพื้นที่สูงมากจึงเป็นปัจจัยโน้มเอียงให้เกิดโรคระบาดอย่างกว้างขวาง เช่น โรคหัวเหลือง โรคตัวแดง โรคเสี้ยนดำ โรคติดเชื้อจากแบคทีเรียในกุ้งอายุหนึ่งถึงสองเดือนเป็นต้น การลดอัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่เกิดจากการติดเชื้อประเภทต่างๆ จำเป็นต้องเข้าใจความรู้พื้นฐานในเรื่องกลไกการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น ระบบการป้องกันตัวเองต่อสิ่งกระตุ้นต่างๆ ระบบภูมิคุ้มกันพื้นฐานระดับเซลล์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมอย่างมาก ประกอบกับการหมุนเวียนของเลือดในกุ้งเป็นแบบระบบเปิดซึ่งง่ายต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบสรีระวิทยาเมื่อสิ่งแวดล้อมภายนอกมีการเปลี่ยนแปลง เป็นที่รู้กันทั่วไปว่าระบบการหมุนเวียนของเลือดในกุ้งมีหน้าที่ตอบสนองและขจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย อย่างดีเยี่ยม นอกจากนั้นเซลล์เม็ดเลือดยังมีบทบาทที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันซึ่งมีหลักฐานการทดลองที่ตรวจสอบปริมาณเซลล์เม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นหลังจากฉีดสารแปลกปลอม (Lipopolysaccharide) เข้าสู่ร่างกายของกุ้ง *Peneaus japonicus* (Sequeira etal, 1996) แสดงให้เห็นว่า เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งสามารถจำแนกเซลล์ของตัวเองออกจากสิ่งแปลกปลอมที่มาจากภายนอกร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งถูกผลิตและปลดปล่อยออกมาจากเนื้อเยื่อที่เรียกว่า Hematopoietic tissue (HPT) ซึ่งมีหลักฐานจากรายงานของ Hose etal, 1992 ที่ศึกษาการผลิตและปลดปล่อยเซลล์เม็ดเลือดจาก HPT ระหว่างการลอกคราบของกุ้ง *Sicyonia ingentis* ซึ่งพบว่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่ปลดปล่อยมีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับระยะการลอกคราบ และรายงานของ Le Moullac etal., 1997 พบว่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดในระยะก่อนการลอกคราบเมื่อเปรียบเทียบกับระยะ Intermolt ในกุ้ง *P. stylirostris* และจะไวต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย

Vibriosis ในระยะก่อนการลอกคราบ นอกจากนี้เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งยังมีหน้าที่อื่นๆ ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเช่น ทำการกินสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดของตัวเอง (Phagocytosis) ถ้ามีขนาดใหญ่กว่าตัวเองจะทำการขจัดสิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่า Encapsulation และ Nodule formation วิธีอื่นๆ ที่กุ้งต่อต้านสิ่งแปลกปลอมได้แก่ Melanin formation, Cytotoxicity, และ the proPO-system(Prophenoloxidase activating system) มีการรายงานว่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดในกุ้งก้ามกรามจะเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ เมื่อทดลองให้กุ้งก้ามกรามติดเชื้อแบคทีเรียชนิด *Enterococcus* (Cheng and Chen, 2000) การติดเชื้อจากแบคทีเรีย Vibriosis ในกุ้งกุลาดำมีการศึกษาและรายงานว่าเป็นโรคที่มีปัญหาต่อการเลี้ยงกุ้งอย่างมากโดยเฉพาะพื้นที่ส่วนกลางของประเทศไทย ชนิดของแบคทีเรียคือ *Vibrio parahaemoliticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, และ *V. alginolyticus* (Nash, etal., 1992) ความพยายามในการศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและแนวทางการใช้วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ซึ่งค่าความว่องไว (Phagocytosis) ของเม็ดเลือดสูงขึ้นเล็กน้อยจากค่าปกติ ซึ่งการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยนี้ไม่มีผลต่อความต้านทานโรคในกุ้งที่ได้รับวัคซีนแตกต่างจากไม่ได้รับการแช่กุ้งด้วยวัคซีน(กิจการและสิทธิ 1995)

อย่างไรก็ตามการศึกษาและทดลองในกุ้งยังคงไม่เพียงพอต่อการแก้ปัญหาหรือยับยั้งการตายของกุ้งที่เลี้ยงในฟาร์ม งานวิจัยฉบับนี้พยายามที่จะศึกษาชนิดและปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรและมีความสัมพันธ์กับการลอกคราบระยะต่างๆ และหลังจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. alginolyticus* จากข่าวกุ้งประจำเดือนเมษายนของปี 2540 รายงานว่าโรค Vibriosis ที่เกิดโทษต่อกุ้งอย่างรุนแรงเป็นแบคทีเรียโคโลนีสีเขียว เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะชนิด TCBS มากกว่าชนิดที่เป็นโคโลนี สีเหลือง ในการทดลองครั้งนี้จะใช้ชนิดโคโลนีสีเหลืองเพราะว่าเมื่อกุ้งได้รับเชื้อแล้ว กุ้งจะไม่ตายอย่างเฉียบพลันแต่ระบบภูมิคุ้มกันและระบบเลือดจะมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นจึงสามารถศึกษาระบบการเปลี่ยนของเลือดได้ ซึ่งผลของการศึกษาครั้งนี้จะทำให้ทราบชนิดและปริมาณของเม็ดเลือดที่มีบทบาทต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำและเปลี่ยนแปลงไปอย่างไรในสภาวะที่ติดเชื้อ ทั้งนี้หลังจากทราบการเปลี่ยนแปลงในระบบเลือดของกุ้งที่มีความอ่อนแอแล้วจะสามารถหาแนวทางการป้องกันการตายของกุ้งกุลาดำต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการปีที่หนึ่ง

- เพื่อจัดจำแนกชนิดของเม็ดเลือดและปริมาณเม็ดเลือดในกระแสเลือดของกุ้งกุลาดำในสภาพปกติไม่มีการติดเชื้อตามระยะลอกคราบ
- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ชนิดและปริมาณของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่อาจเปลี่ยนแปลงไปเมื่อกุ้งมีการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับในการศึกษาเบื้องต้นในปีที่หนึ่ง

- ทราบถึงระบบภูมิคุ้มกันพื้นฐานระดับเซลล์ของกุ้งกุลาดำ
- เพื่อหาแนวทางการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ

บทที่ 2
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ระบบภูมิคุ้มกันของ Crustacean

ในแหล่งน้ำกร่อย น้ำทะเล รวมทั้งน้ำจืด ที่สัตว์ Crustacean อาศัยอยู่จะมีเชื้อโรคมากมายอยู่ทั่วไปจำเป็นที่สัตว์ Crustacean ต้องมีระบบป้องกันตัวเองไม่ให้เชื้อโรคเข้าสู่ร่างการนั่นคือเปลือกที่มีความแข็ง แต่โอกาสของเชื้อโรคที่เป็นพวก oppotunistic หรือ pathogenic จะเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านบาดแผลในช่วงที่สัตว์ลอกคราบ Crustacean ก็เหมือนกับสัตว์อื่นทั่วไปคือมีเซลล์เม็ดเลือดที่มีความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกนอกร่างกายโดยวิธี phagocytosis หรือ encapsulation การพัฒนาวิธีการในการแยกชนิดของเม็ดเลือดทำให้สามารถศึกษาและจำแนกชนิดของเม็ดเลือดใน Crustacean โดยมีหลักเกณฑ์การจัดจำแนกตาม Morphology, Function และ Cytochemistry เช่น เซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่ม Decapod (Hose etal.,1990) เป็นต้น โดยทั่วไปหลังจากแยกปั่นเม็ดเลือดโดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวที่เรียกว่า น้ำยา EDTA-citrate buffer(pH 4.6) ต่อจากนั้นจะย้อมสีในแต่ละชั้นของเม็ดเลือด

- *ชนิดเม็ดเลือดของกุ้ง*

เม็ดเลือดจากกระแสเลือดของสัตว์ Crustacean ถูกจำแนกออกได้เป็นสามชนิดดังนี้

1. The Hyaline cell (HY) ของสัตว์กลุ่ม Decapod มีลักษณะที่ไม่มีแกรนูลใน ไซโตพลาสมของเซลล์ และเมื่อกระจายเลือดบนแผ่นสไลด์ เซลล์ HY จะเกาะติดบนผิวแก้วทันที สำหรับสัดส่วนจากปริมาณเลือดรวมจะแตกต่างกันระหว่างชนิดของ สัตว์แต่ละกลุ่ม อย่างไรก็ตามกุ้งบางชนิดไม่มีเม็ดเลือดชนิดนี้และอาจถูกเรียกเป็นชื่ออื่นๆ เช่นการศึกษาของ Tsing etal.(1989) พบว่าในกุ้ง *P. japonicus* ประกอบด้วยเม็ดเลือด ที่คล้าย HY แต่ใช้ชื่อว่า Undifferentiated Hemocytes (UH) ส่วนในกุ้งก้ามกรามและกุ้ง *Palaemon adspersus* จะไม่มีเม็ดเลือดชนิดนี้เลย ลักษณะของ UH มีรูปร่างยาวรี ขนาดเซลล์ประมาณ 8.6 X 3.5 ไมโครเมตร nuclear chromatin กระจายอยู่ในนิวเคลียส ส่วนในไซโตพลาสมมี ribosome และ endoplasmic reticulum กระจายอยู่ปริมาณปานกลาง บางครั้งอาจพบว่ามีแกรนูลกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 0.1 ไมโครเมตร แต่มีโอกาสพบได้น้อยมาก

ในกุ้งมังกรชนิด *Homarus americanus* เม็ดเลือด HY ถูกแบ่งเป็นสองชนิดย่อย ชนิดแรกเรียกว่า Prohyalocyte มีปริมาณในกระแสเลือด 1.8 % ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 8.4 X 8.5 ไมโครเมตร มีขนาดเล็กที่สุดเมื่อเทียบกับเม็ดเลือดชนิดอื่นๆ เมื่อย้อมสีด้วย Giemsa นิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้มโดยล้อมรอบด้วยชั้นบางๆ ของไซโตพลาสม ชนิดที่สองถูกเรียกว่า Hyalocyte มีปริมาณในกระแสเลือด 64.2 % ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 20.9 X 8.6 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่จะมีรูปร่างกระสวยแต่บางเซลล์ค่อนข้างรี มีแกรนูลขนาดเล็กมากในไซโตพลาสม นิวเคลียสไม่รวมตัวกันหนาแน่นมากและติดสีน้ำเงินจางๆ (Cornick and Stewart, 1978)

1. Small Granule Hemocyte (SGH) หรือ Semigranular cell รูปร่างไม่แน่นอน ขนาดเซลล์เฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 X 5.7 ไมโครเมตร นิวเคลียสเป็นรูปเกือกม้า เซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้จำแนกได้เมื่อในไซโตพลาสมมีแกรนูลกลมปริมาณมากกระจายอยู่ทั่วไป เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนสามารถวัดได้ว่าแกรนูลมีขนาดตั้งแต่เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.09 ไปจนถึง 0.3 ไมโครเมตร มีคุณสมบัติของ acid phosphatase activity ในกุ้ง *P. japonicus* (Tsing etal., 1989) เซลล์ SGH ค่อนข้างบอบบางและ เปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ง่าย ดังนั้นในการศึกษาเซลล์ชนิดนี้จำเป็นต้องระวังการแตกของเซลล์

ในกุ้งมังกรเซลล์ชนิดนี้ถูกเรียกว่า Eosinophilic granulocyte มีปริมาณในกระแสเลือด 12.2 % ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 24.8 X 9.1 ไมโครเมตร สามารถจำแนกออกเป็นสองชนิดย่อย ชนิดแรก ' Early eosinophil ' มีรูปร่างกระสวยจนถึงรี แกรนูลติดสีน้าเงิน นิวเคลียสติดสีน้ำเงินอ่อน ชนิดที่สอง ' Late eosinophil ' ส่วนใหญ่มีรูปร่างแบบกระสวย แกรนูลติดสีแดง และนิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้ม (Cornick and Stewart, 1978)

2. Large Granule Hemocyte (LGH) หรือ The granular cell เซลล์รูปไข่ มีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 10.0 X 7.0 ไมโครเมตร มีโครมาตินรวมตัวกันหนาแน่นบริเวณขอบของนิวเคลียส ในไซโตพลาสมประกอบด้วยแกรนูลจำนวนมากและรูปร่างต่างๆ กัน เช่น รี, กระสวย แต่พบน้อยมาก แบบกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 0.3 จนถึง 1.5 ไมโครเมตร และมีคุณสมบัติของ Phenoloxidase activity ในกุ้ง *P. japonicus* (Tsing

etal., 1989) เม็ดเลือด LGH ทั้งหมดจะมีรูปร่างแบบเดียวกัน ในขณะที่กุ้งกุลาดำและกุ้งก้ามกรามสามารถแยกออกเป็นสองชนิดย่อยตามขนาดของแกรนูลและนิวเคลียสที่ใหญ่และการพัฒนาของ Rough endoplasmic recticulum

Bachere etal., 1995 จำแนกชนิดของเม็ดเลือดกุ้ง *P. japonicus* ตามรูปร่างลักษณะและหน้าที่ ซึ่งพบว่าผลสอดคล้องกับ Tsing etal., 1989 ที่ปริมาณของ HY มีปริมาณน้อยกว่าพวก Decapod อื่นๆ และยังพบว่าในการศึกษาเม็ดเลือดที่ดึงออกจากร่างกายกุ้ง (In vitro) เม็ดเลือด HY จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ง่ายและไม่มีหน้าที่เกี่ยวกับ Phagocytosis จึงสามารถจำแนกในกลุ่มนี้เป็น UH อย่างไรก็ตามสามารถบ่งชี้ว่าเป็น เม็ดเลือดชนิดนี้ตามลักษณะดังต่อไปนี้ อัตราส่วนนิวเคลียสต่อไซโตพลาสมสูง การมี Electron dense สะสมอยู่ในไซโตพลาสมรวมทั้งแกรนูลที่มีลายขวางอยู่ภายในเมื่อส่อง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน จากการศึกษาด้วย Immunofluorescent ประชากรเม็ด เลือดโดยใช้ Monoclonal antibody ในการจำแนกชนิดเม็ดเลือดที่มี Antigen แตกต่าง กันในไซโตพลาสม และสามารถปลดปล่อยออกมาใน Plasma

ในกุ้งมังกรเซลล์ชนิดนี้ถูกเรียกว่า Chromophobic granulocyte มีปริมาณ ในกระแสเลือด 21.9 % ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 20.0 X 8.7 ไมโครเมตร เซลล์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกระสวย พบน้อยรูปร่างรี ในไซโตพลาสมเต็มไป ด้วยแกรนูลติดสีแดงอ่อน (Cornick and Stewart, 1978)

- *หน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือด*

Soderhall and Cerenius (1993) ได้สรุปหน้าที่ของเซลล์ทั้งสามชนิดดังนี้

ชนิดของเม็ดเลือด	Phagocytosis	Encapsulation	Cytotoxicity	ProPO* activating system
Hyaline	ทำงาน	ไม่ทำงาน	ยังศึกษาน้อย	ไม่ทำงาน
Semiganular	ทำงานน้อย	ทำงาน	ทำงาน	ทำงาน
Granular	ไม่ทำงาน	ทำงานน้อยมาก	ทำงาน	ทำงาน

* ProPO = Prophenoloxidase

อนึ่ง Semigranular มีหน้าที่รับผิดชอบในการรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอม จากนั้น แกรนูลในไซโตพลาสมจะแตก ต่อมาเซลล์จะล้อมรอบผิวของสิ่งแปลกปลอม ซึ่งมีหลักฐาน

การศึกษาที่อธิบายถึงการแตกตัวของแกรนูลเมื่อเซลล์รับรู้ถึงจุลชีพที่มีผนังภายนอกประกอบด้วย Lipopolysaccharide และ β-1, 3-glucans สำหรับหน้าที่ เหล่านี้จะไม่พบในเซลล์ Granular แต่มีหน้าที่หลักเกี่ยวกับ ProPO โดยมีกลไกการทำงานหลังจากปล่อย ProPO จากเซลล์ ProPO ประกอบด้วยโปรตีนสองชนิด ชนิดแรกมีคุณสมบัติ 76 kD factor และอีกชนิดคือ β-1, 3-glucan binding protein ถ้าตอบสนองต่อ β-1, 3-glucan

- *ปริมาณของเม็ดเลือดในกระแสเลือดกับระยะการลอกคราบของกุ้ง*

การศึกษาของ Hose etal., 1990 เสนอแนะการนับปริมาณและศึกษาชนิดของเม็ดเลือดซึ่งพบว่าการนับปริมาณเม็ดเลือดจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนให้ผลที่แม่นยำกว่าการใช้กล้อง Phase contrast ในกุ้ง *Panulirus interruptus* มีปริมาณเม็ดเลือด HY สูงสุด 56 % ในขณะที่กุ้ง *Loxorhynchus grandis* และ *H. americanus* มีปริมาณที่ต่ำกว่าคือ 21 และ 27 % ตามลำดับ ส่วนปริมาณของเม็ดเลือด LGH อยู่ระหว่าง 10 % ถึง 13 % และเม็ดเลือด SGH ปริมาณ 65 % ในกุ้งมังกร และ กุ้ง *L. grandis* ส่วนกุ้ง *P. interruptus* มีปริมาณของ SGH เท่ากับ 31 % ทั้งนี้กุ้งทั้งสามชนิดเป็นกุ้งในระยะ Intermolt

การศึกษาของ Tsing etal., 1989 รายงานสัดส่วนปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดในแต่ละชนิดของกุ้ง *P. japonicus* ระยะ Intermolt

ระยะการลอกคราบ	THC	UH	SGH	LGH	HL
A-B1	11,500	8.9	20.3	15.4	55.4
B2	4,900	10.3	22.4	14.6	52.7
C	7,600	10.9	18.5	12.6	58.0
D2	8,400	10.6	20.2	19.6	49.6
D3-D4	14,600	9.1	23.1	15.9	51.9
D4	5,400	10.8	20.1	13.8	55.3

THC = Total Number of Hemocyte per Cubic Millimeter of Blood

HL = Cells which lysis in vitro

การศึกษาของ Hose etal., 1992 รายงานการผลิตและปลดปล่อยเม็ดเลือดในระหว่างการลอกคราบของกุ้ง *S. ingentis* เม็ดเลือดชนิด Granulocyte จะถูกปล่อย

ออกมาทันทีระหว่างระยะ Intermolt และ ระยะ D ต้นๆ อย่างไรก็ตามก็จะถูกปล่อยออกมาครั้งที่สองแต่มีปริมาณน้อยกว่าในระหว่างระยะ A2 ส่วนเซลล์ที่เหลือจะสะสมอยู่ในอวัยวะผลิตเม็ดเลือดระหว่างระยะ B และถูกปล่อยอีกครั้งในระยะ C ซึ่งขนาดของเซลล์ Granulocyte ค่อนข้างใหญ่ที่พบในกุ้งระยะ D 0-2 และมีการสร้างแกรนูลจากปริมาณน้อยจนเห็นเต็มในไซโตพลาสม สัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสมจะมีค่าสูงกว่าใน Granulocyte ที่โตเต็มที่ซึ่งไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด ส่วนเม็ดเลือดชนิด SGH จะถูกปล่อยระหว่างระยะ A และมีขนาดค่อนข้างใหญ่ซึ่งยังไม่เจริญเต็มที่เมื่อ เปรียบเทียบกับขนาดที่ถูกปล่อยในระยะ B และ C ขนาดของ SGH มีขนาดเล็กและ มีปริมาณแกรนูลมากขึ้น สำหรับผลผลิตของ HY มีปริมาณสูงสุดในระยะ D 3-4 เซลล์ HY จะถูกปล่อยออกมาทันทีระหว่างระยะ C ไปจนถึงระยะ D1-2 เซลล์ส่วนใหญ่หลังจาก ถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือดเกือบจะเจริญเต็มที่ อัตราส่วนของนิวเคลียส ต่อ ไซโตพลาสมมีค่าต่ำกว่าเซลล์ที่อยู่ในกระแสเลือด และไซโตพลาสมส่วนใหญ่จะไม่มีแกรนูล อย่างไรก็ตามกุ้งระหว่างระยะ D 3-4 และ A 1 ปริมาณการปล่อย HY จะลดลงอย่างเด่นชัด และจะถูกปลดปล่อยอีกครั้งในระยะ A2 และระยะ B ซึ่งสังเกตุได้จากขนาดของเซลล์ HY มีขนาดใหญ่

- *ปริมาณและชนิดของเม็ดเลือดหลังการติดเชื้อหรือสิ่งกระตุ้นกับระยะการลอกคราบของกุ้ง*

โรคในกุ้งที่เกิดจากแบคทีเรียในกลุ่ม Vibriosis ก่อปัญหาการตายสูงสุดหรือ ทำให้กุ้งอ่อนแอแล้วติดเชื้อชนิดอื่นซึ่งก่อการตายในกุ้งเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับการตายของกุ้งแบบอื่นๆ (Sano and Fukuda, 1987) ในการเลี้ยงกุ้งในน้ำกร่อยและทะเล ชนิดของ Vibriosis ที่ก่อให้เกิดปัญหาในกุ้งได้แก่ ชนิด *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, และ *V. penaecida* (Lighter 1988, 1996; Jiravanichpaisal etal. 1994; Ishimura etal. 1995)

Le Moullac, 1997 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงและปริมาณรวมของเม็ดเลือดกุ้ง *P. stylirostris* ในช่วงระหว่างวงจรการลอกคราบเมื่อกุ้งมีการติดเชื้อแบคทีเรีย Vibriosis รวมทั้งวัดค่า ProPO activity จากผลการทดลองได้จำแนกเซลล์เม็ดเลือดออกเป็นสามชนิดดังนี้ ชนิดแรกคือ HY มีขนาดเล็กแต่นิวเคลียสเกือบเต็มเซลล์ มีปริมาณ 80 % ของปริมาณเลือดทั้งหมด ชนิดที่สองและสามคือ SGH และ LGH และมีปริมาณ 10-13 % และ 4-10

% ของปริมาณเลือดรวมตามลำดับ ปริมาณเม็ดเลือดรวมในกุ้งระยะ Intermoult (ปริมาณต่ำ) และ Premoult (ปริมาณสูง) มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะ สำคัญ อัตราการตายของกุ้งถูกบันทึกภายใน 6 วันซึ่งพบว่ากุ้งหลังจากแช่ในเชื้อ *Vibrio* ที่ความเข้มข้น 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร กุ้งมีอัตราการตายแตกต่างอย่างเด่นชัด ระหว่างกุ้งระยะ Intermoult อัตรา 21 % (13 ตัวจาก 62 ตัว) และการตายในระยะ Premoult อัตรา 48 % (34 ตัวจาก 72 ตัว) ค่า ProPO activity ต่อปริมาณเซลล์ เม็ดเลือดรวมในกุ้งระยะ Intermoult มีค่า 2.551 ซึ่งสูงกว่าและ แตกต่างอย่าง มีนัยยะสำคัญในระยะ Premoult ซึ่งมีค่า 1.325 ทั้งนี้ค่า ProPO activity มีความ สัมพันธ์กับค่าเม็ดเลือด LGH ที่สูงขึ้นมีค่า 10 % (เปรียบเทียบกับระยะ B มีค่า 4 % และแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ) ในระยะ Intermoult ความสัมพันธ์ของค่าเม็ดเลือด LGH ในทางเดียวกับค่า ProPO activity บ่งบอกถึงเม็ดเลือด LGH มีหน้าที่รับผิดชอบ เกี่ยวกับระบบ ProPO activity อย่างแท้จริง

Goarant and Boglio, 2000 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเม็ดเลือดในกุ้ง *Litopenaeus stylirostris* หลังการฉีดด้วยเชื้อ *V. alginolyticus* (sublethal infection) ความเข้มข้น 10^4 CFU/ml และหลังการให้กินและฉีดวัคซีนจาก Formalin-killed ของเชื้อ*V. panaeicida* ทำการนับปริมาณเม็ดเลือดในกลุ่มฉีดทุกวันที่ 2, 4, 6, 8, และ 13 ส่วนกลุ่มให้กินวัคซีนทำการตรวจสอบทุกวันที่ 2, 6, 9, 13, 16, และ 20 ผลการนับ ค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดรวมพบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อหรือวัคซีนมีค่า 27.4 ล้านและ 31.3 ล้านต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ฉีดเชื้อค่า THC ลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญใน วันที่สอง ในกลุ่มที่ฉีดวัคซีนมีค่า THC น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่ม ในวันที่สี่ ค่า THC ของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ในวันที่หกกลุ่มที่ฉีดวัคซีนมีค่า THC สูงสุดกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยยะสำคัญ ในวันที่แปดกลุ่มที่ฉีดวัคซีนและ Sublethal มีค่า THC ใกล้เคียงกันและสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ในวันที่สิบสามกลุ่มที่ฉีดวัคซีนมีค่า THC สูงกว่ากลุ่ม อื่นๆอีกครั้ง สำหรับกลุ่มกุ้งที่ได้รับวัคซีนโดยการกินทางอาหารภายในสามสัปดาห์ของ การวัดค่า THC ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มกุ้งที่ไม่ได้กินวัคซีน

Hose etal.,1990 ศึกษาประสิทธิภาพการเก็บกินสิ่งแปลกปลอม(Phagocytosis) โดยการใส่เชื้อ *Cytophaga* sp. (Long rod, gram- negative bacteria) ปริมาณ 10^4 CFU/ml ผสมเซลล์ของแบคทีเรียลงในสไลด์ที่มีเม็ดเลือดปริมาณ 0.3 ซีซีแล้วเก็บ สไลด์ที่

อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง หลังจากเม็ดเลือด หยุดกิจกรรมการกินแบคทีเรียแล้ว ทำการย้อมเม็ดเลือดด้วยสี Grunwald-Giemsa และนับแยกชนิดของเม็ดเลือด 200 เซลล์ ที่แสดง Phagocytosis ผลการทดลองพบว่าเม็ดเลือดชนิด SGH อยู่ในช่วง 83-96 % ในขณะที่ชนิด LGH อยู่ในช่วง 30-67 % อัตรารวมของ Phagocytosis ต่อปริมาณรวม ของเม็ดเลือดที่มีชีวิตมีอัตรา 79, 88 และ 54 % ในกุ้ง *H. americanus*, *L. grandis*, และ *P. interruptus* ตามลำดับ

Sequeira etal., 1996 ใช้เทคนิค Flow cytometry (FC) ในการนับเม็ดเลือด ของกุ้ง *P. japonicus* หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้น แล้วเม็ดเลือดมีการแบ่งตัวได้หรือไม่ ทั้งนี้ได้ใช้เทคนิคการใส่ ^{3}H Thymidine ในเม็ดเลือดกุ้งเพื่อยืนยันการแบ่งตัวของ เม็ดเลือดกุ้ง ผลการกระตุ้นกุ้งโดยใช้ Lipopolysaccharide (LPS from *Samonella abortus*) และ โปรตีนที่สกัดจาก *Candida albicans* ซึ่งเป็น an immunosuppressive lymphocyte mitogen (ISM) protein เม็ดเลือดกุ้งในกลุ่มไม่มีสิ่งกระตุ้นจะถูกนับอยู่ ในช่วง G0/G1โดย FC และยืนยันเปรียบเทียบโดยใช้ Thymidine พบว่าเม็ดเลือดกุ้ง มีการกิน Thymidine เข้าไปในเซลล์ 26 เท่าภายใน 5 ชั่วโมง หลังการกระตุ้นด้วย LPS ส่วนกุ้งทดลองที่กระตุ้นด้วย LPS, ISM, และ LPS+ISM ภายใน 5 วัน โดยนับจำนวน เม็ดเลือดที่แบ่งตัวพบว่าทั้งสามกลุ่มมีเม็ดเลือดกุ้งถูกนับด้วย FC จะอยู่ในระยะ S+G2+M (เซลล์มี DNA แสดงว่าเซลล์จะมีการแบ่งตัว) และแตกต่างอย่างมีนัยยะ สำคัญจากกลุ่มที่ไม่ใช้สิ่งกระตุ้นซึ่งมีเฉพาะระยะ G0/G1 แต่ทั้งสามกลุ่มไม่มีความ แตกต่างกันเอง การทดลองมีต่อไปโดยการให้เปลือกกุ้งติดเชื้อรา *Fusarium* พบว่ากุ้งติดเชื้อมีระยะ S+G2+M อยู่ 4.6 % เมื่อเทียบกับกุ้งไม่ติดเชื้อมีปริมาณ 0.8 % จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปโดยภาพรวมได้ว่าเม็ดเลือดในกระแสเลือดของกุ้งสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างมีนัยยะสำคัญถ้ากุ้งมีการติดเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอมภายนอกตัวมากระตุ้น (Mitogenic stimulation)

การกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากร่างกายกุ้งได้ถูกทดลองโดย Martin etal. (1993) รายงานการฉีดเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิดคือ *Bacillus cereus*, *Aerococcus viridance*, *Pseudomonas fluorescens* และ *V. alginolyticus* ในกุ้ง *S. ingentis* ผลการทดลองพบว่ากุ้งสามารถกำจัดเชื้อ *Bacillus* และ *Aerococcus* อย่างรวดเร็ว ภายใน 5 นาที แต่ในเวลา 1 ชั่วโมงยังคงพบ *Pseudomonas* และ *Vibrio* ปนเปื้อน ในเลือดกุ้งและปริมาณเม็ด

- *การผลิตเม็ดเลือดของกุ้ง (Hemopoiesis)*

บริเวณที่ผลิตเม็ดเลือดเรียกว่า Hemopoietic tissue (HT) or nodule ในสัตว์พวก Decapod โครงสร้างและตำแหน่งจะแตกต่างกันออกไป แม้ว่าสัตว์จะถูกจำแนกอยู่ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันก็ตาม เช่น กุ้งมังกร ปู และ Crayfish โครงสร้างของ HT มีลักษณะเป็นแผ่นคลุมห่อหุ้มส่วนของด้านท้องที่ตำแหน่งกระเพาะและหัวใจ เม็ดเลือดที่ยังอ่อน จะอยู่ที่ตอนปลายของแต่ละ Lobule และถูกปล่อยมายัง Hemal space ก่อนถูกปลดปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด ในกุ้ง Penaeid shrimp มีลักษณะเป็น 1 คู่ ถูกเรียกว่า Epigastric Hematopoietic Nodules (HPN) และในบางชนิด อาจมี Ancillary site ของ HT อยู่ล้อมรอบ Antenna artery และฐานของ Maxilliped การศึกษาของ Hose etal., 1992 ในกุ้ง *S. ingentis* เกี่ยวกับการผลิตและปลดปล่อยเม็ดเลือดจาก HPN ในระหว่างวงจรลอกคราบ โครงสร้างของ HPN ประกอบด้วยแขนงเส้นเลือดมากมายมาหล่อเลี้ยง ผนังท่อของเส้นเลือดเหล่านี้เป็นแหล่งผลิตเม็ดเลือดซึ่งยังเป็นเซลล์ในระยะเริ่มแรก จะถูกเรียกว่า Hematopoietic stem cells (HSC) อัตราการแบ่งตัวของเม็ดเลือดจะเริ่มมากขึ้นในระยะ C จนถึงระยะ D1-2 ประมาณ 2-4 % การพัฒนาของเม็ดเลือดเป็นไปอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งเม็ดเลือด Granulocyte แต่ละเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมา การแบ่งตัวของเม็ดเลือดใน HPN จะลดลงจากระยะ D3-4 จนกระทั่งหลังลอกคราบคือระยะ A1 เมื่อกุ้งอยู่ในระยะกำลังลอกคราบ (Ecdysis) ปริมาณเม็ดเลือด Hyaline stem cells มีการพัฒนาและจะถูกปลดปล่อยสู่กระแสเลือดทันทีหลังจากที่คราบของกุ้งหลุดออกจากตัว การแบ่งตัวของ Stem cells จะถูกกระตุ้นอีกครั้งระหว่างระยะ A2 และ ระยะ B ในช่วงนี้ Stem cells ที่พัฒนาอาจมีปริมาณสูงถึง 7 เท่าตัวเมื่อเทียบกับ Stem cells ของระยะ C

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

- น้ำยาและสารเคมี

Cold Fixative โดยเตรียม 1 % ของ Glutaraldehyde ในน้ำทะเลกรองที่มีน้ำตาล 1 %

Hemocyte Anti-Aggregate Solution (HAAS) เตรียม Phosphate buffer 0.1 M ที่ pH 7.6 จากสารละลาย A 43.5 ml + สารละลาย B 6.5 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึง 100 ml (A = $Na_2HPO_4.2H_2O$ 3.56 g +water 100ml, B = $NaH_2PO_4.H_2O$ 2.76 g +water 100ml) สุดท้ายเติม EDTA 1.5 g ใน Phosphate buffer

Hemalum solution เตรียมจาก Potassiumalum 25 g + Hematoxylin 1 g ผสมในน้ำกลั่น 350 ml ให้ความร้อนจนสารละลาย หลังจากทิ้งให้เย็นแล้วผสมกับสารละลาย KIO_3 0.1 g + water 50 ml สุดท้ายเติม Glecerol สามารถใช้หลังจากทิ้งไว้ 1 เดือน

Eosin 0.1 % ผสม Eosin จำนวน 0.1 g ในน้ำกลั่น 100 ml

Ethanol

Xylene

Permount

Microscope slide and Cover glass

Paraffin, Stainless mold and Cassette

Syringe

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารใช้ในการทดสอบ Biochemical test : Triptic soy agar, Gram stain(Crystal violet, Iodine, Deionized alcohol, Saffranin),Hydrogen peroxide, MR-VP test, Citrate test, Nitrate test, Oxidase test, 0/129 sensitivity test, NaCl, and TCBS agar.

- แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เขี่ยเชื้อได้จากน้ำทะเลในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย ในปี 1995

เชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* เตรียมจากการเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่เจริญบน Triptic soy agar ลงใน Triptic soy broth และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง ต่อมา

เลือดรวมจะลดลงหลังจากกุ้งถูกฉีดด้วยเชื้อ และลดลง ต่ำสุดที่ 24 ชั่วโมง แล้วปริมาณจะกลับสู่ระดับปกติภายใน 72-96 ชั่วโมง

การศึกษาการยึดติดของเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำซึ่งจะมีความสำคัญต่อการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากกุ้งที่ป่วย รายงานของ Chen and Hanna (1994) พบว่า เชื้อ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ที่เป็น Pathogenic bacteria เท่านั้นมีการยึดติดเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ และดีกว่าชนิด *V. anguillarum* ทั้งนี้ได้ใช้ เทคนิคทาง Monoclonal antibody โดยวิธี Indirect FITC-immunofluorescense

- *เม็ดเลือดกุ้งกับสารเพิ่มภูมิคุ้มกันและวัคซีน*

Itami etal., 1989 รายงานการทดลองศึกษาวัคซีนที่ผลิตจากการฆ่าเชื้อ *Vibrio* ด้วยฟอร์มาลิน แล้วเปรียบเทียบการฉีด, แช่ และพ่นวัคซีนในกุ้ง *P. japonicus* ผลการทดลองสามารถลดอัตราการตายของกุ้งได้ทั้งสามวิธีหลังจากกุ้งถูกฉีดด้วยเชื้ออีกครั้ง และตรวจผลอัตราการรอดตายภายใน 30 วัน โดยอัตราการตายของกุ้งมีค่า 31, 28, และ 36 % ด้วยการป้องกันการตายโดยใช้วัคซีนวิธี ฉีด แช่ และพ่นตามลำดับ และเปรียบเทียบกับกุ้งกลุ่มไม่ใช้วัคซีนมีค่าอัตราการตายเท่ากับ 80% นอกจากนี้ยังศึกษาการตอบสนองของเม็ดเลือดกุ้งต่อเลือดกุ้งที่ติดเชื้อซึ่งทำให้เซลล์แตก ด้วยวิธี Boyden assay ผลการนับเม็ดเลือดที่ตอบสนองโดยเคลื่อนที่ผ่าน Boyden chamber filter พบว่าเฉพาะการกระตุ้นที่เตรียมจากทั้งมีเม็ดเลือดกุ้งและเลือดกุ้งปั่นที่มีเชื้อ *Vibrio* เท่านั้นสามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดกุ้งเคลื่อนที่ได้อย่างมีนัยยะสำคัญ

การใช้สารกระตุ้นเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ จากรายงานของ Sung etal., 1994 พบว่าการแช่กุ้งกุลาดำใน beta-glucan ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 3 ชั่วโมงมีผลช่วยในการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำและเมื่อทดลองกุ้งที่เสริมภูมิคุ้มกันนี้ให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ในความเข้มข้น ของเชื้อ 5 X 10^7 CFU/ml นาน 12 ชั่วโมง แล้วบันทึกการตายของกุ้งนาน 3 เดือน พบว่าที่ความเข้มข้นของ beta-glucan 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นจะช่วยปกป้องการตายและเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำได้นาน 18 วัน ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่า beta-glucan เป็นสาร immunostimulant ที่เสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งเพียงระยะสั้น

คำนวณปริมาณจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียด้วยวิธี Total plate count ซึ่งจะได้ ปริมาณของเชื้อในหน่วย CFU/ml (Colony forming unit/milliliter).

- กุ้งกุลาดำและแผนการทดลอง

แบ่งกุ้งทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม

1. กุ้งควบคุม ไม่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย ถูกฉีดด้วยน้ำเกลือ
2. กุ้งถูกฉีดด้วยแบคทีเรียความเข้มข้นสูง โดยฉีดกุ้งแต่ละตัวด้วยปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มีจำนวนแบคทีเรียเฉลี่ย 9.06 X 10^4 CFU/ml/กุ้ง 20 กรัม
3. กุ้งถูกฉีดด้วยแบคทีเรียความเข้มข้นต่ำ โดยฉีดกุ้งแต่ละตัวด้วยปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มีจำนวนแบคทีเรียเฉลี่ย 4.53 X 10^3 CFU/ml/กุ้ง 20 กรัม
4. กุ้งถูกแช่ด้วยแบคทีเรียปริมาณสูง โดยแช่กุ้งด้วยจำนวนเชื้อเฉลี่ย 4.53 X 10^6 CFU/ml ของน้ำในถังเลี้ยงกุ้ง
5. กุ้งถูกแช่ด้วยแบคทีเรียปริมาณต่ำ โดยแช่กุ้งด้วยจำนวนเชื้อเฉลี่ย 2.27 X 10^5 CFU/ml ของน้ำในถังเลี้ยงกุ้ง

กุ้งกุลาดำจะถูกลำเลียงจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งมาที่ ภาควิชาว่าริชศาสตร์และถูกเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงที่มีน้ำความเค็ม 10 ppt และพักฟื้น นาน 7 วัน ก่อนการทดลอง กุ้งจะถูกตรวจสอบระยะการลอกคราบ กุ้งในถังทดลองถูก ปล่อย 48 ตัวต่อถัง

แผนที่ 1 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเม็ดเลือดตามระยะการลอกคราบ โดยใช้ค่า Total hemocyte counts (THC) จากการสุ่มเลือดกุ้งกุลาดำ และตัดปลายระยางค์ ขาเดินหรือหางกุ้ง เพื่อวิเคราะห์ระยะคราบของกุ้ง

แผนที่ 2 เพื่อเปรียบเทียบ THC ของกุ้งที่ฉีดด้วยน้ำเกลือและที่ถูกฉีดด้วย แบคทีเรีย *V. alginolyticus* กุ้งจะถูกสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดที่ 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง ที่ 1 วัน, 2 วัน, 3 วัน, 6 วัน, และ 7 วัน และแช่ด้วยแบคทีเรีย *V. alginolyticus* กุ้งจะถูกสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดที่ 1 , 2, 3, และ 7 วัน

แผนที่ 3 เพื่อเปรียบเทียบชนิดของเม็ดเลือดของกุ้งที่ถูกฉีดและ แช่ด้วยแบคทีเรีย *V. alginolyticus* กุ้งจะถูกสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดที่ 1 วัน, 2 วัน, 3 วัน, และ 7 วัน

- การเก็บตัวอย่างและบันทึกผลทดลอง
  1. วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในน้ำของถังเลี้ยงกุ้งตลอด 3 วัน
  2. เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งเพื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของเม็ดเลือด
  3. ตัดเก็บตัวอย่างปลายระยางค์ขาเดินหรือขาว่ายน้ำกุ้งเพื่อวิเคราะห์ระยะคราบของกุ้งตามเวลาเดียวกับในข้อ 2 การจำแนกระยะคราบของกุ้งกุลาดำ จะใช้การจำแนกจากกุ้ง *Penaeus esculentus* (Smith and Dall,1985) และจาก *Astacus leptodactylus* (Vranckx and Durliat, 1978)
  4. เก็บตัวอย่างกุ้งในส่วนที่เป็นอวัยวะผลิตเม็ดเลือดเพื่อศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อ
  5. บันทึกพฤติกรรมและการตายของกุ้งตลอดการทดลอง
- การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติใช้การวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ One Way Analysis of Variance (Minitab)ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
- การศึกษาด้านเลือดกุ้ง

การดูดเลือดกุ้ง โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรและเข็มเบอร์ 26 G ½ ทำการดูดน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของเลือด (HAAS) ปริมาณ 0.15 มิลลิลิตร แล้วดูดเลือดกุ้งอีกในปริมาณเท่ากันจากกุ้งบริเวณ Ventral abdominal artery ผสมน้ำยาและเลือดให้เข้ากัน หลังจากนั้นหนึ่งหยดของเลือดจะถูกหยดบนสไลด์ ชื่อ Hemacytometer เพื่อนับปริมาณ THC ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Phase contrast ส่วนเลือดที่เหลือ จะถูกศึกษาชนิดของเม็ดเลือดโดยหยดเลือดบนสไลด์ และเกลี่ยให้บางทิ้งให้เม็ดเลือดลงเกาะบนผิวสไลด์ ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20-30 นาที แล้วเติม น้ำยา Cold fixative ให้ท่วม ทิ้งไว้นาน 5 นาที แล้วซับน้ำยาทั้งหมดออกไป เติมน้ำ ยา Cold fixative อีกครั้งที่ อุณหภูมิ 9°C นาน 20-30 นาทีแล้วล้างน้ำยาออกด้วย น้ำกลั่น หลังจากผึ่งให้สไลด์แห้งทำการย้อมสีเม็ดเลือดด้วย Hemalum-Eosin staining ขั้นตอนมีดังนี้ สไลด์จะถูกแช่ใน hemalum solution นาน 5 นาทีแล้ว ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งก่อนแช่ใน Eosin solution นาน 3-4 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ในแอลกอฮอล์สองครั้ง และไซลีนก่อนปิด coverslip บนสไลด์ ให้หยดน้ำยา Permount หนึ่งหยด นำสไลด์ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา สุ่มนับเม็ดเลือด 200 เซลล์ต่อสไลด์เพื่อจัดจำแนกชนิดของเม็ดเลือด

บทที่ 4
ผลการทดลอง

คุณสมบัติของแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus*

แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. จากแหล่งน้ำทะเลจะถูกสุ่มเก็บตัวอย่างโดยเขี่ยน้ำทะเลบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะแบคทีเรียชนิด *Vibrio* เท่านั้นที่สามารถเจริญ บนอาหารชื่อ Thiosulphate Citrate Bile salts (TCBS) agar โคโลนีของ *Vibrio* เมื่อเจริญบนอาหารเฉพาะนี้จะสร้างสีต่างกันคือโคโลนีสีเขียวและโคโลนีสีเหลือง (ภาพที่ 1A) สำหรับชนิดของแบคทีเรียที่จะใช้ในการทดลองครั้งนี้คือโคโลนีสีเหลือง โดยการถ่ายโคโลนีสีเหลืองจากอาหารวุ้น เดิมไปยังอาหารวุ้นใหม่ก็จะได้แบคทีเรีย โคโลนีสีเหลืองชนิดเดียวที่ไม่มีโคโลนีสีเขียว(ภาพที่ 1B) จากนั้นจะศึกษาคุณสมบัติ ทางชีวเคมีเพื่อจำแนกว่าเป็นแบคทีเรียชนิด *Vibrio alginolyticus* ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus*

คุณลักษณะ	ผล
โคโลนีบน Marine agar	สีครีมขาว
โคโลนีบน TCBS agar	สีเหลือง
ย้อมสีแกรม	ติดสีแดง (แกรมลบ)
รูปร่างเซลล์	ท่อนสั้นเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และคู่เล็กน้อย
Catalase	ผล
Methyl red (MR)	ผล
Vauges-Proskauer (VP)	ผล
Citrate	ผล
Citrate	+
Oxidase	+
10 μg ของ 0/129	Resistance
150 μg ของ 0/129	Sensitive

คุณลักษณะ	ผล
เลี้ยงในอาหาร Peptone ที่มี % NaCl	ผล
0 %	ผล
● %	+
● %	+
● %	+
● %	+
10 %	+

การจำแนกชนิดเม็ดเลือด

การศึกษาจำแนกชนิดของเม็ดเลือดในครั้งนี้จะใช้วิธีการย้อมสีแบบ Haemalum-Eosin เพื่อแยกแยะการติดสีที่แตกต่างกันของนิวเคลียส และไซโตพลาสม การมีและ ไม่มีแกรนูลในไซโตพลาสม สามารถจำแนกเม็ดเลือดออกเป็นสามกลุ่มดังนี้

1. Hyaline cells (HY) ลักษณะของเซลล์ส่วนใหญ่กลมเล็กมีขนาดเฉลี่ยระหว่าง 6-8 ไมโครเมตร เซลล์ที่เริ่มผลิตและถูกปลดปล่อยสู่กระแสเลือดจะมีลักษณะของ นิวเคลียสใหญ่เกือบเต็มเซลล์ติดสีน้ำเงินเข้มและล้อมรอบด้วยไซโตพลาสมบางๆ ติดสี น้ำเงินจางๆ(ภาพที่ 2A) และเมื่อเซลล์เจริญเต็มที่จะมีขนาดเล็กลงกว่าเดิมแต่คงสภาพ นิวเคลียสเกือบเต็มเซลล์ รอบๆ เซลล์จะยื่นส่วนของเซลล์ออกมาเป็นกิ่งซึ่งเรียกว่า pseudopodia เซลล์ HY ที่อยู่ในกระแสเลือดมีรูปร่างดังภาพที่2B ซึ่งแสดงให้เห็นลักษณะของเซลล์ HY ที่คล้ายๆกัน และเมื่องกุ้งมีการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ในกระแสเลือดกุ้งสามารถพบเซลล์ HY รูปร่างแบบอื่นๆอีกเช่น รูปกระสวย และรูปรี (ภาพที่6) และยังคงสภาพแสดง pseudopodia และเซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิม เฉลี่ยระหว่าง 8-10 ไมโครเมตร

2. Small granule hemocyte (SGH) เซลล์มีขนาดเฉลี่ยระหว่าง 10-12 ไมโครเมตร เซลล์ที่เริ่มผลิตและถูกปลดปล่อยออกมาในกระแสเลือดจะมีนิวเคลียสใหญ่กว่าเซลล์ที่พัฒนา สัดส่วนของไซโตพลาสมต่อนิวเคลียสจะมีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ HY ลักษณะเซลล์ SGH ที่เริ่มพัฒนาดังภาพที่ 4A และเซลล์ที่พัฒนาแล้ว ดังภาพที่ 4B ซึ่งจะมีลักษณะดังนี้ นิวเคลียสจะมีขนาดเล็กลงมีรูปร่างกลมหรือรูปถั่วติดสี

น้ำเงินเข้ม ในไซโตพลาสมที่ติดสีน้ำเงินจางๆจะประกอบด้วยแกรนูลที่ติดสีแดงเข้มและรอบๆ ขอบเซลล์จะแสดง pseudopodia และเมื่อกุ้งมีการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* เซลล์ SGH จะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิม เฉลี่ยระหว่าง 14-16 ไมโครเมตรและยังคงแสดง pseudopodia ดังภาพที่ 7A

3. Large granule hemocyte (LGH)) เซลล์มีขนาดเฉลี่ยระหว่าง 18-22 ไมโครเมตร เซลล์ที่เริ่มผลิตและถูกปลดปล่อยออกมาในกระแสเลือดจะมีนิวเคลียสใหญ่กว่าเซลล์ที่พัฒนา ลักษณะเซลล์ LGH ที่เริ่มพัฒนามีลักษณะคล้ายๆกับเซลล์ SGH แต่จะแสดง pseudopodia มากกว่าดังภาพที่ 5A และเซลล์ LGH ที่พัฒนาแล้วใน ไซโตพลาสมจะมีแกรนูลติดสีแดงเข้ม มี vacuole กระจัดกระจายอยู่ทั่วๆไปใน ไซโตพลาสม และมีแกรนูลขนาดใหญ่กว่าแกรนูลของเซลล์ SGH สามารถแยกเซลล์ LGH ออกเป็นสองชนิดดังนี้ ชนิดแรกเซลล์ส่วนใหญ่จะมีรูปร่างกลมแสดง pseudopodia น้อย (ดังภาพที่ 5B) และเซลล์มีขนาดเล็กกว่าชนิดที่สองที่มีรูปร่างไม่แน่นอนและ แสดง pseudopodia ที่เห็นอย่างเด่นชัด (ดังภาพที่ 5C) และเมื่อกุ้งมี การติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* เซลล์ LGH ทั้งสองชนิดจะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเฉลี่ยระหว่าง 22-26 ไมโครเมตรและยังคงแสดง pseudopodia ทั้งยังเห็น vacuole ใหญ่ขึ้นเด่นชัดเช่นกัน (ดังภาพที่ 7 B) บางส่วนของเซลล์ LGH ในกุ้งที่ติดเชื้อนานกว่าสองวันจะแสดงการแตกตัวของแกรนูลที่เรียกว่า Degranulation ดังภาพที่ 8

การศึกษาเซลล์เม็ดเลือดกุ้งสดโดยส่องจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase Contrast โดยการหยดเลือดกุ้งสดหนึ่งหยดบนสไลด์แก้วที่สะอาดแล้ววาง cover slip ลงบนหยดเลือดกุ้ง จากนั้นส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ทันทีสามารถจำแนกเซลล์เม็ดเลือดดังนี้ เซลล์ Hy จะมีรูปร่างกลมเล็กที่สุดเมื่อเทียบขนาดกับเซลล์ SGH และ LGH ลักษณะของเซลล์ SGH ดังภาพที่ 3A และเซลล์ LGH ดังภาพที่ 3B เซลล์ทั้งสองชนิดจะมี Inclusion body อยู่ในไซโตพลาสมแต่เซลล์ LGH จะมีปริมาณมากกว่า

อวัยวะสร้างเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ (Hematopoietic tissue, HMT) ตั้งอยู่ในบริเวณเหล่านคือ เนื้อเยื่อล้อมThe lateral arterial vessel ที่บริเวณฐานของกรีกุ้ง, เนื้อเยื่อบริเวณThe first and second maxilliped, Epigastric, Supraesophageal gangeal และด้านบนของกระเพาะ สำหรับพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของ HMTจะเป็น Lobule ภายในจะมี Hematopoietic stem cells จำนวนมากมาย (ดังภาพที่ 9) เซลล์เม็ดเลือด ทุกชนิดจะถูกปล่อยสู่กระแสเลือดตามท่อเล็กๆ ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดเหล่านี้ยังไม่พัฒนา และจะถูกพัฒนาเต็มที่เมื่อเดินทางเข้าสู่กระแสเลือดในช่วงเวลาหนึ่ง

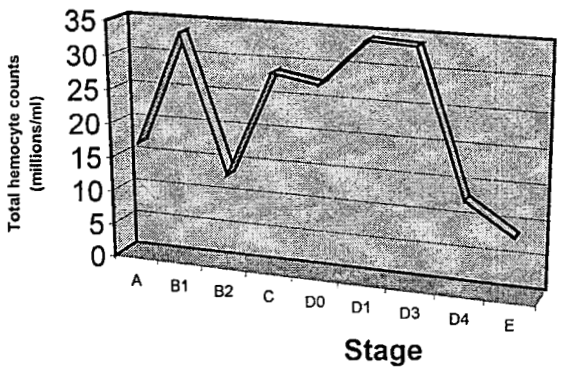
ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำในวงจรการลอกคราบ

การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดกุ้งโดยการนับปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte counts, THC) มีหน่วยเป็นล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร จากจำนวนกุ้งตัวอย่าง 77 ตัว เมื่อคำนวนค่า THC ตลอดระยะลอกคราบแล้วมีค่าเฉลี่ย 26.6±11.2 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตรของเลือด กุ้งในระยะลอกคราบ D0-D4 มีความยากในการแยกแยะ ออกจากกัน ดังนั้นจึงไม่มีระยะ D2 ที่สังเกตได้ และเมื่อคำนวณปริมาณ THC แยกตามระยะการลอกคราบ ของกุ้งแล้วแสดงผลอยู่ดังตารางที่ 2 และ กราพที่1 เมื่อเริ่มต้นหลังการลอกคราบจะเป็นระยะ A ซึ่งปริมาณ THC มีน้อยและจะสูงขึ้นเกือบเท่าตัว ในระยะ B1 จากนั้นจะลดลงอีกครั้งในระยะ B2 และปริมาณสูงขึ้นอีกครั้งในระยะ C และไม่แตกต่างกันมากกับระยะ D0, D1, และ D3 จากนั้นปริมาณจะลดลงในระยะ D4 มีปริมาณใกล้เคียงกับระยะ B2 สำหรับช่วงกุ้งกำลังสลัดคราบคือระยะ E (ecdysis) ค่าปริมาณ THC มีน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับระยะอื่นๆ(8.6±4.4 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร และน้อยกว่า 4 เท่าตัวของปริมาณ THC (34.2±13.8 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งสูงสุดของระยะ D1 ที่นับได้ในครั้งนี้

ตารางที่2 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดกุ้งปกติ(THC) เซลล์/มิลลิลิตร ตามระยะคราบ

ระยะคราบกุ้ง	จำนวนกุ้งตัวอย่าง	THC X10^6 เซลล์/มิลลิลิตร (ค่าเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบน)
A	2	17.0±2.3
B1	2	17.0±2.3
B1	2	13.5±4.3
C	29	28.7±7.6
D1	29	13.5±4.3
D1	2	34.2±13.8
D1	2	17.0±2.3
D1	2	13.5±4.3
C	2	8.6±4.4

Fig1 An average of Total hemocyte counts, THC (N=77 shrimp) in the course of molt cycle



ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำกับการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus*

ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ผลการทดลองมีดังนี้ เมื่อทำการฉีดแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นสูงปริมาณแบคทีเรียเฉลี่ย $9.0X10^4$ CFU/ml ต่อกุ้งน้ำหนัก 20 กรัม ปริมาณค่า THC เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลืออย่างเดียวให้ผลดังนี้ หลังจาก 6 ชั่วโมงผ่านไปเมื่อแบคทีเรียถูกฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้ง เมื่อสุ่มนับเม็ดเลือด THC มีค่าเฉลี่ย 20.7 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (24.78 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร)ในอัตรา 16 % และเม็ดเลือดจะลดลงกว่าเดิมเรื่อยๆเมื่อเวลาผ่านไปที่ 12 ชั่วโมงและ 1 วันแล้วค่า THC จะเพิ่มกลับมาเท่าเดิมในวันที่ 2 จากนั้นจะเพิ่มปริมาณสูงสุดใกล้เคียงกัน (39.1-39.2 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ของการสุ่มนับเม็ดเลือด และมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุมในอัตรา 50 % ในที่สุดค่า THC จะลดลงต่ำสุดอย่างรวดเร็วในวันที่ 7 (15.0 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) ในอัตรา 52 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และค่าเม็ดเลือดเฉลี่ยทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อ แบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ในความเข้มข้นสูงเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมสรุปให้เห็นได้ดังภาพที่ 2 และตารางที่ 3

ความสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ด้วยวิธีอื่นอีก 3 แบบ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม วิธีที่หนึ่งคือการทดลองฉีดแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ในความเข้มข้นต่ำที่ปริมาณแบคทีเรียเฉลี่ย $4.53X10^3$ CFU/ml ต่อกุ้งน้ำหนัก 20 กรัม วิธีที่สองคือการแช่กุ้งด้วยแบคทีเรียในความเข้มข้มสูงที่ปริมาณแบคทีเรียเฉลี่ย $4.53X10^6$ CFU/ml ของน้ำในถังเลี้ยงกุ้ง และวิธีที่สามแช่กุ้งด้วยแบคทีเรียในความเข้มข้นต่ำที่ปริมาณ แบคทีเรียเฉลี่ย $2.27X10^5$ CFU/ml ของน้ำในถังเลี้ยงกุ้ง ผลการทดลองมีดังนี้ ความสัมพันธุ์ระหว่างเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย ทั้งสามวิธีโดยการสุ่มนับเม็ดเลือดในวันที่ 1 วันที่ 2 วันที่ 3 และวันที่ 7 ให้ผลปริมาณ เม็ดเลือดกุ้งผันแปรไปในทางเดียวกับการฉีดกุ้งด้วยแบคที่เรียในความเข้มข้นสูงและค่าเม็ดเลือดเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่าง

มีนัยยะสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ในวันที่สาม กลุ่มทดลองที่ฉีดด้วยแบคทีเรียความเข้มข้นสูงมีความแตกต่างจากกลุ่มทดลองที่แช่แบคทีเรียความเข้มข้นต่ำ และในวันที่เจ็ด กลุ่มควบคุมมีความแตกต่างจากกลุ่มฉีดด้วยความเข้มข้นต่ำ และค่าเม็ดเลือดทุกกลุ่มสรุปให้เห็นได้ดังภาพที่ 3 และตารางที่ 3 การทดลองครั้งนี้ การฉีดและแช่กุ้งด้วยแบคทีเรีย กุ้งกุลาดำมีอัตราการรอดตาย 98 %

ตารางที่3 ปริมาณเฉลี่ย Total hemocyte counts, THC (ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) ± ค่าเบี่ยงเบน ในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ V. alginolyticus ด้วยวิธีต่างๆกันในเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง และ1, 2, 3, 6 และ 7 วัน

เวลา	Control (ค่าเฉลี่ยรวม)	High injection	Low injection	High bath	Low bath
6 ชั่วโมง	24.78±8.68	20.7±10.0	ไม่ได้นับ	ไม่ได้นับ	ไม่ได้นับ
12 ชั่วโมง	32.7±6.78	18.9±10.3	ไม่ได้นับ	ไม่ได้นับ	ไม่ได้นับ
1 วัน	26.12±6.49	16.2±10.9	18.6±7.8	14.4±7.2	19.0±7.12
2 วัน	32.26±7.46	20.7±12.9	22.6±10.4	27.2±14.6	19.3±9.8
3 วัน	24.56±5.68	39.1±18.2	33.9±19.3	28.6±12.2	25.3±13.7
6 วัน	28.25±8.87	39.2±22.6	ไม่ได้นับ	ไม่ได้นับ	ไม่ได้นับ
7 วัน	31.0±8.74	15.0±8.7	10.1±4.8	20.6±8.4	20.8±14.5

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

Fig2 The average changed in total hemocyt counts (millions of hemocytes per ml) in *Peneaus monodon* injected with high dose of *V. alginolyticus* over time

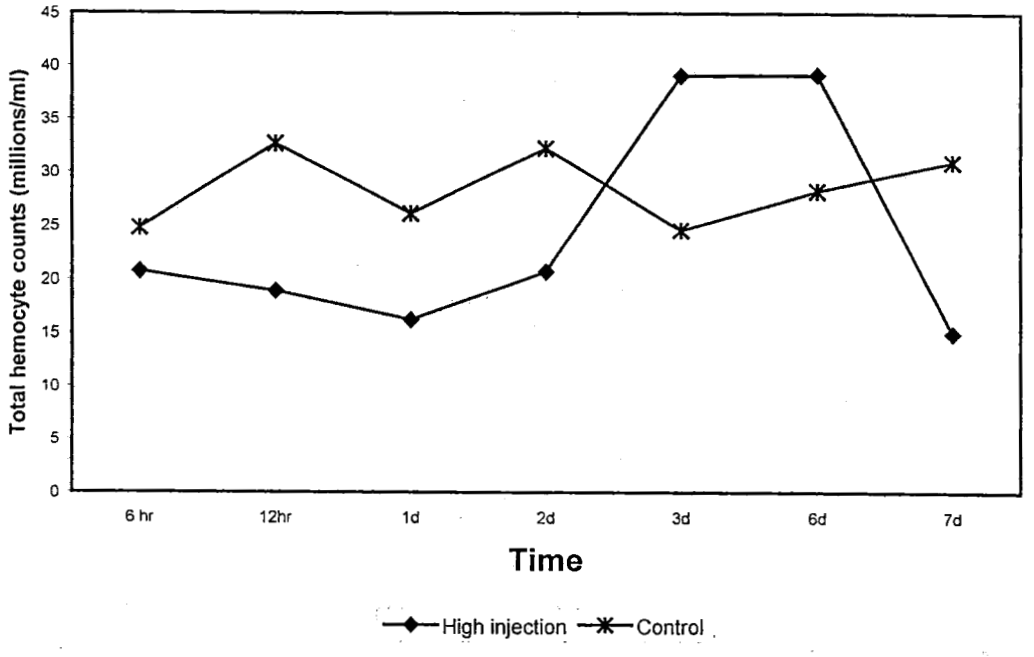
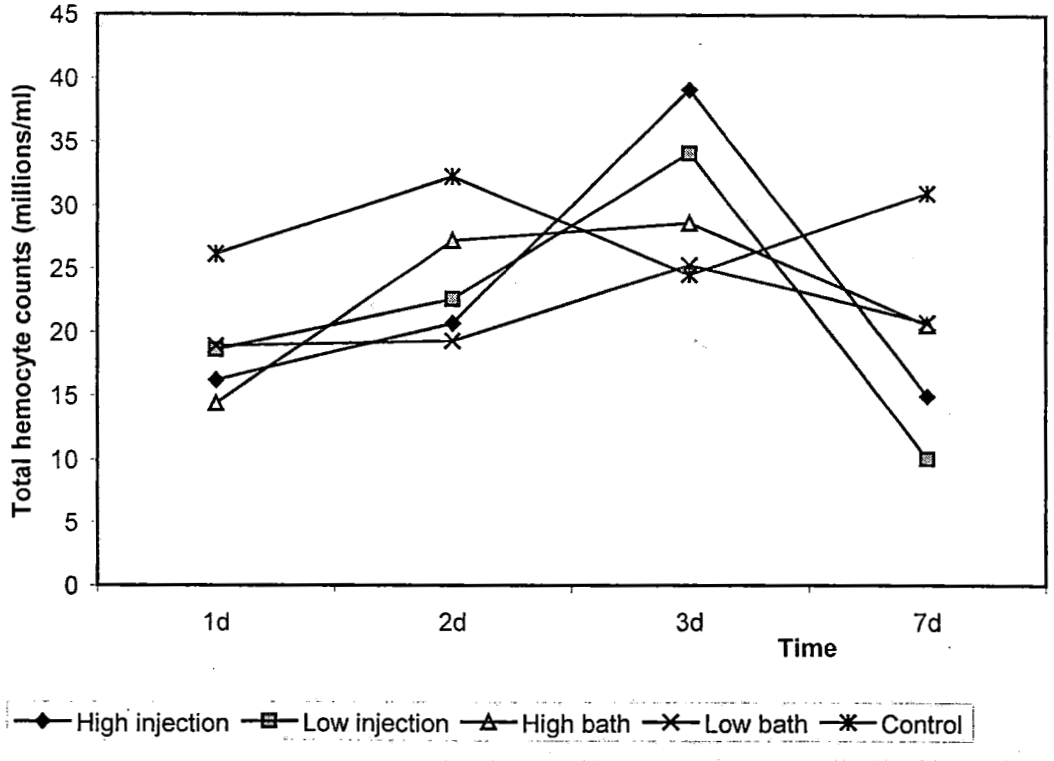


Fig3 The average changed in total hemocyt counts (millions of hemocytes per ml) in *Peneaus monodon* injected and immersed with high and low concentrations of *V. alginolyticus* over time



639.68
ว164ร
ป.4
249193

ชนิดของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำกับการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus*

ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำเมื่อทำให้กุ้งกุลาดำเกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* โดยการนับปริมาณเม็ดเลือดชนิด Hyaline hemocyte cells (HY) ต่อ ชนิด Granulocytes (LGH+SGH) จากกล้องจุลทรรศน์ ในปริมาณ 200 เซลล์ ผลการทดลองมีดังนี้ กลุ่มควบคุมปริมาณ HY มีค่าเฉลี่ย 3 เท่าตัว เมื่อเทียบกับค่า G ซึ่งมีปริมาณ 1 เท่า ตลอดการทดลองของวันที่ 1, 2, 3, และ 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองทั้ง 4 แบบ พบว่าค่าปริมาณของ HY มีแนวโน้มลดลง และ ค่าปริมาณของ G มีแนวโน้มสูงขึ้น สรุปให้เห็นได้ดังตารางที่ 4

ในวันแรกของการติดเชื้อค่า HY ลดลงเฉลี่ยสองเท่าในกลุ่มทดลองแบบ High injection และแบบ Low injection และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % และค่า HY ลดลงเฉลี่ยหนึ่งเท่าในกลุ่มทดลองแบบ High bath และแบบ Low bath แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

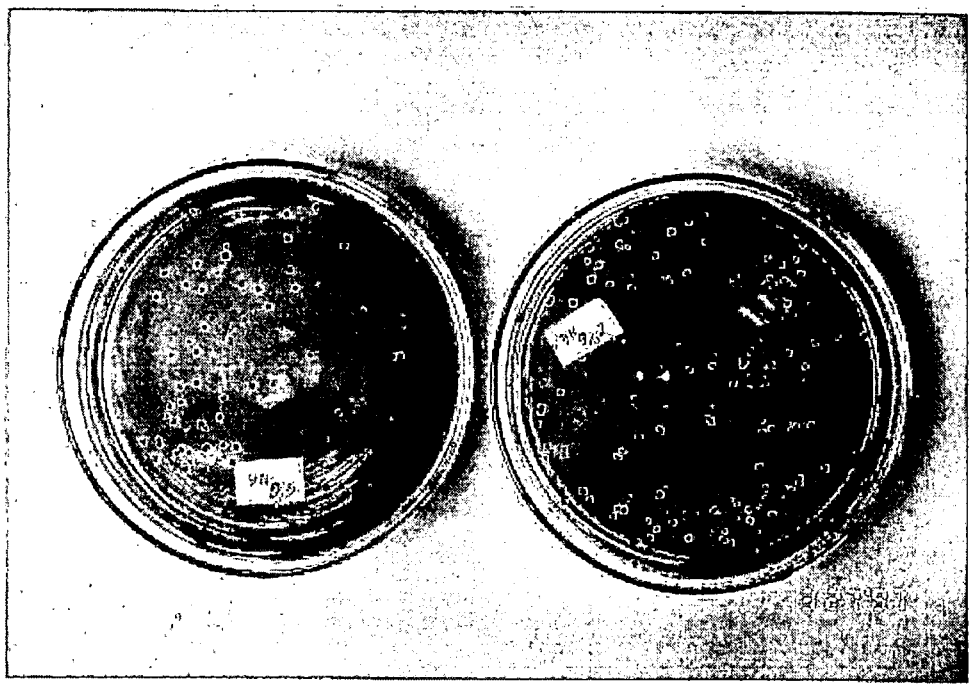
ในวันที่สองค่าอัตรา HY:G ของกลุ่มทดลองแบบ Low injection มีค่า 1:1 ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติจากกลุ่มควบคุมส่วนอีกสามกลุ่มทดลองมีค่าอัตราใกล้เคียงกัน คือ 1.6-1.7:1 และไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากกลุ่มควบคุม

ในวันที่สามพบว่าค่า HY ของทุกกลุ่มทดลองลดลงมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % และในทำนองเดียวกันค่า G ของทุกกลุ่มทดลองเพิ่มขึ้นมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % โดยอัตรา HY จะลดลงเกือบสองเท่าในกลุ่มทดลองแบบ Low injection และแบบ High bath และในทำนองเดียวกัน อัตราค่า G สูงขึ้นอย่างเด่นชัดเกือบสองเท่าของกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ค่า HY ของกลุ่ม High injection และกลุ่ม Low bath ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่ทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างจากกลุ่ม Low injection และแบบ High bath และกลุ่มทดลอง High injection และแบบ Low bath ค่าอัตราของ HY:G มีค่าใกล้เคียงกับในวันที่สอง

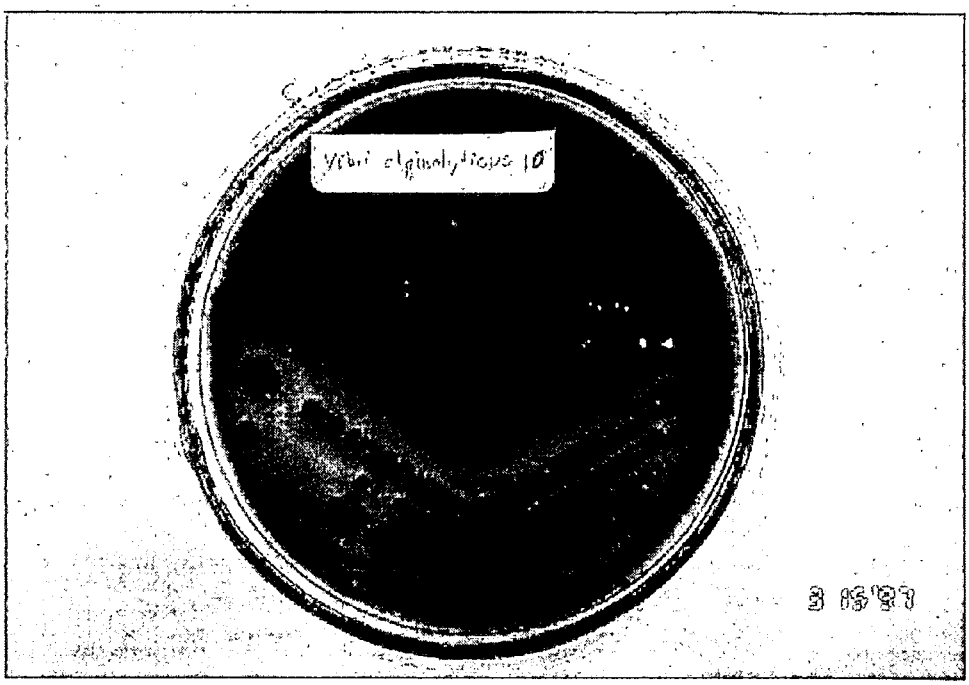
ในวันที่เจ็ดพบว่าค่า HY ของทุกกลุ่มทดลองลดลงมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % ซึ่งการลดลงของ HY ทุกกลุ่มทดลองมีค่าเกือบสองเท่าของกลุ่มควบคุมในทำนองเดียวกันการเพิ่มขึ้นของค่า Granulocyte จะสูงกว่ากลุ่มควบคุมเฉลี่ย 2.5 เท่า อนึ่งส่วนใหญ่ของ Granulocyte คือเม็ดเลือด SGH

ตารางที่4 อัตราส่วนของ The Hyaline hemocyte cells (HY) ต่อ Granulocytes(G, คือ SGH+LGH)จากปริมาณเม็ดเลือด 200 เซลล์ ในเลือดกุ้งที่ติดเชื้อ *V. alginolyticus* ด้วยวิธีต่างๆกันในเวลา 1, 2, 3, และ 7 วัน

HY:G (day)	Control	High injection	Low injection	High bath	Low bath
Ratio1 day	151:49±7.5 3.1 : 1	104:96±37.5 1.1 : 1	111:89±37.5 1.2 : 1	135:65±21.3 2 : 1	136:64±3.1 2.1 : 1
Ratio2 day	153:47±8.2 3.2 : 1	125:75±14.7 1.6 : 1	101:99±19.8 1 : 1	126:74±30.1 1.7 : 1	123:77±10.6 1.6 : 1
Ratio3 day	155:45±5.3 3.4 : 1	115:85±23.2 1.3 : 1	61:149±29.5 1 : 2.5	52:148±4.3 1 : 2.8	123:77±10.6 1.6 : 1
Ratio3 day	150:50±12 3.0 : 1	78:122±36.6 1 : 1.6	70:130±23.8 1 : 1.8	61:139±16.9 1 : 2.2	67:133±24.4 1 : 2

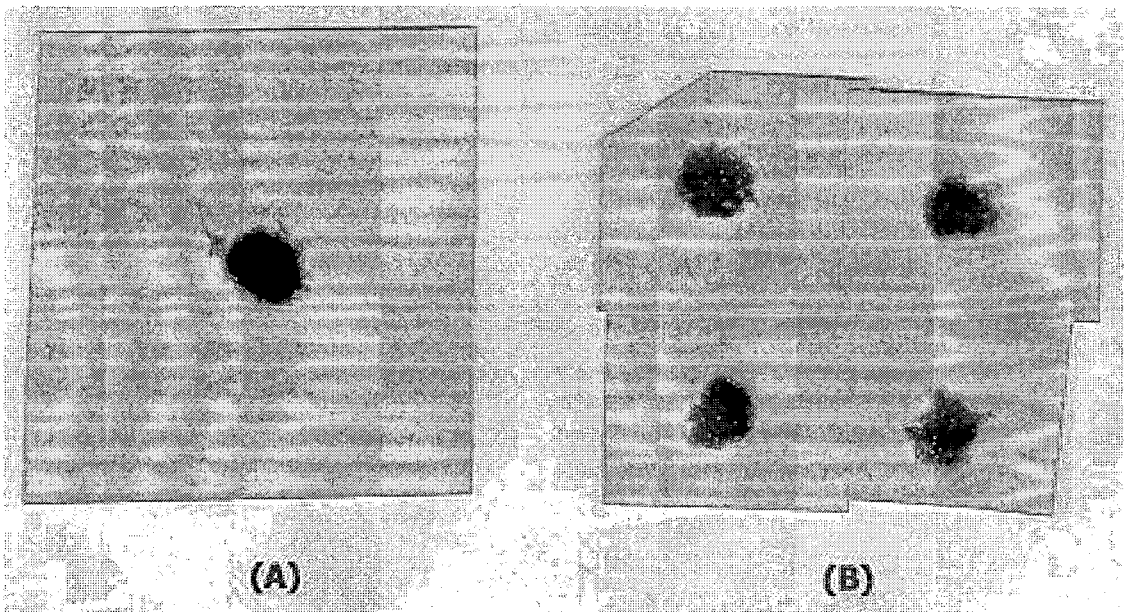


(A)



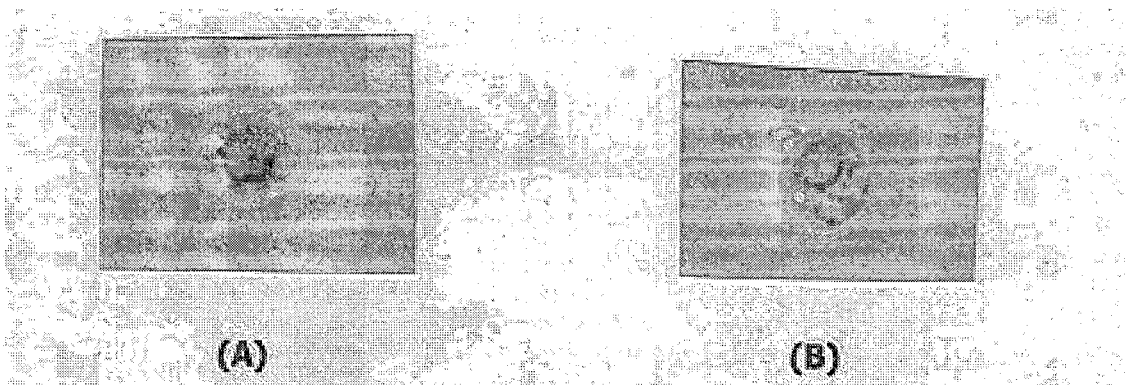
(B)

ภาพที่1 การเจริญของแบคทีเรีย V. alginolyticus บนอาหารเฉพาะชื่อ TCBS (A) โคโลนีสีเขียวและสีเหลือง (B) โคโลนีสีเหลือง



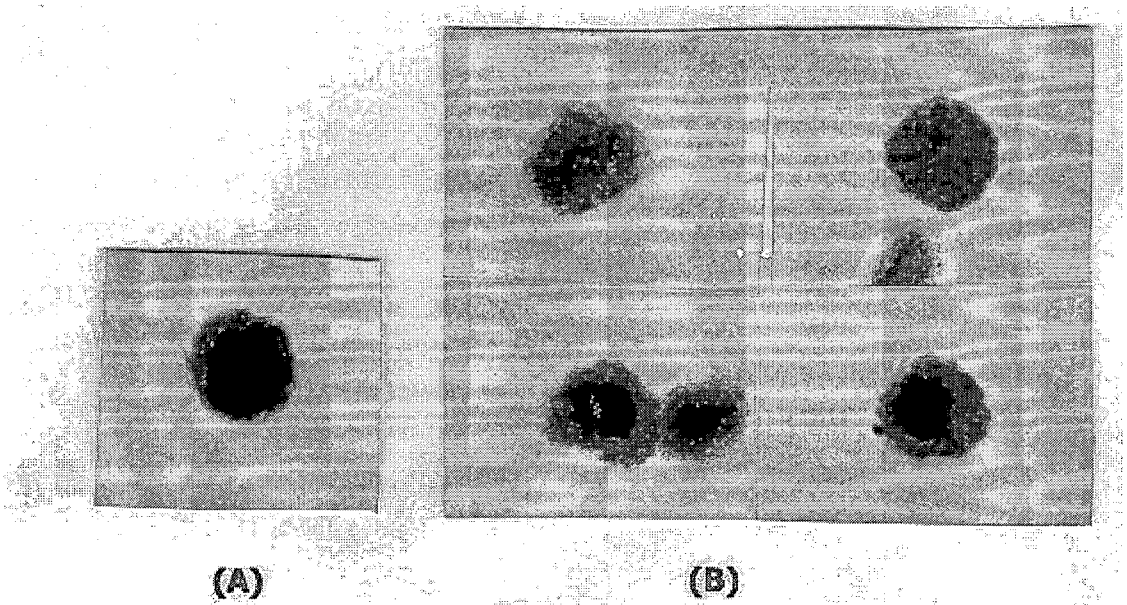
(A) (B)

ภาพที่2 The hyaline cell (HY) ขนาดเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือด 6-8 ไมโครเมตร ย้อมสีแบบ Haemalum-Eosin
(A) Young HY (B) Mature HY



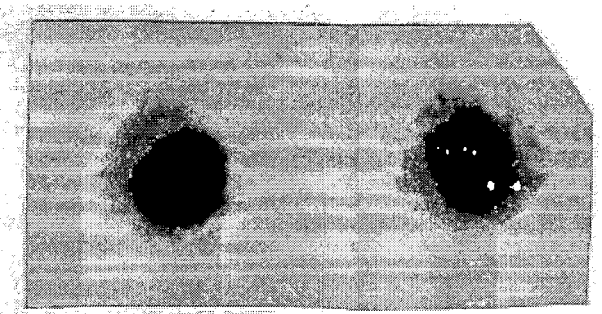
(A) (B)

ภาพที่3 ลักษณะเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่ไม่เติมน้ำยาเคมี ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ Phase Contrast (A) Small granule hemocyte
(B) Large granule hemocyte

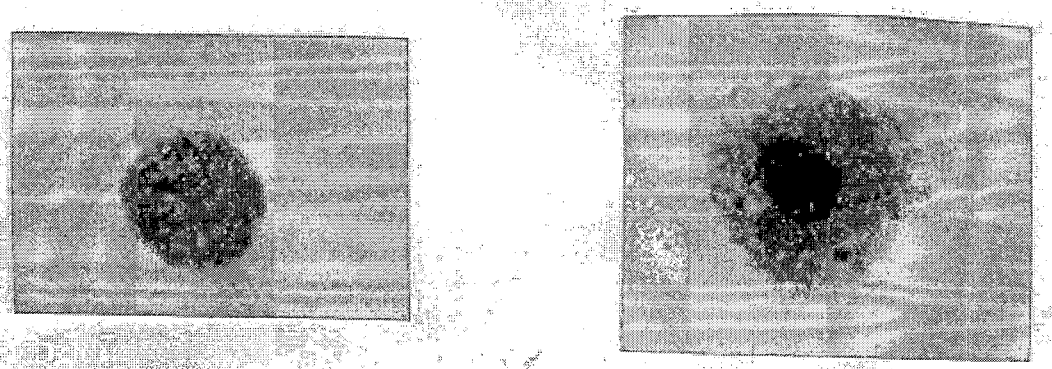


(A) (B)

ภาพที่4 รูปร่างลักษณะของ Small granule hemocyte (SGH) เซลล์มีขนาดเฉลี่ย 10-12 ไมโครเมตร ย้อมสีแบบ Haemalum-Eosin
(A) Young SGH (B) Mature SGH

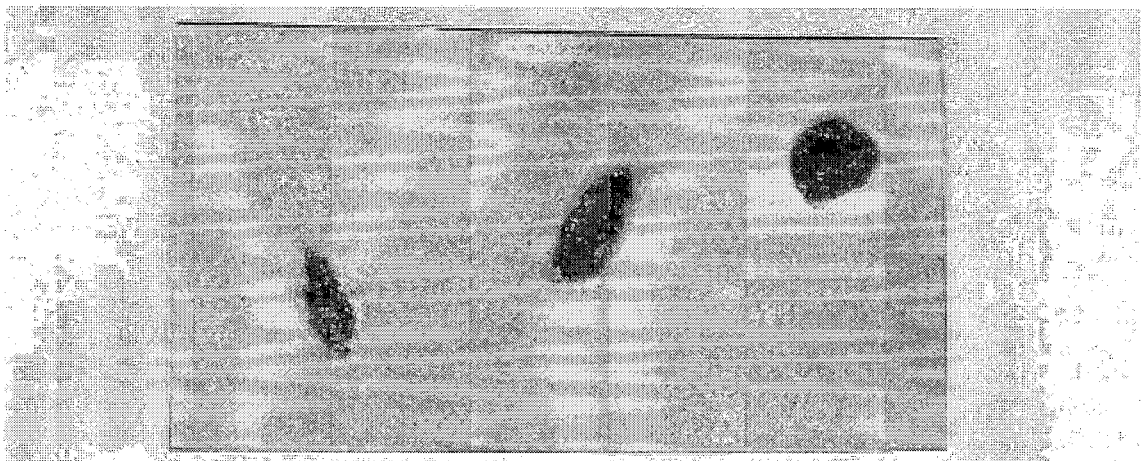


(A)

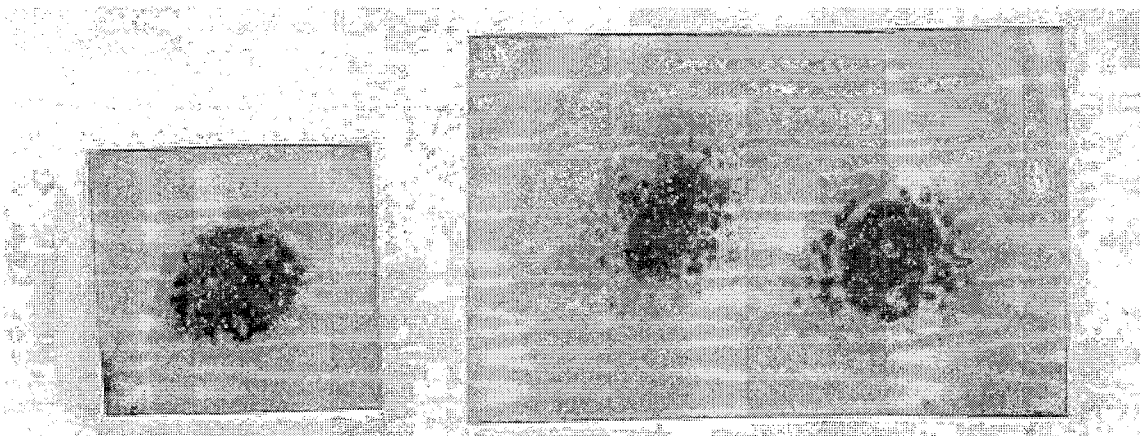


(B) (C)

ภาพที่5 รูปร่างลักษณะของ Large granule hemocyte (LGH) เซลล์มีขนาดเฉลี่ย 18-22 ไมโครเมตร ย้อมสีแบบ Haemalum-Eosin
(A) Young LGH (B) Mature LGH ชนิดที่1 (C) Mature LGH ชนิดที่2



ภาพที่6 รูปร่างลักษณะของ The Hyaline cells หลังการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* รูปร่างของเซลล์จากซ้ายไปขวาคือ กระสวย, รี, และกลม ขนาดของเซลล์เฉลี่ย 8-10 ไมโครเมตร ย้อมสีแบบ Haemalum-Eosin



(A) (B)

ภาพที่7 เซลล์เม็ดเลือดกุ้งหลังการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ย้อมสีแบบ Haemalum-Eosin

(A) Small granule hemocyte ขนาดเฉลี่ยของเซลล์ 14-16 ไมโครเมตร

(B) Large granule hemocyte ขนาดเฉลี่ยของเซลล์ 22-26 ไมโครเมตร

ภาพที่8 สภาพของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งชนิดที่มีแกรนูลจะปลดปล่อยแกรนูลออกจากเซลล์ (Degranulation) ย้อมสีแบบ Haemalum-Eosin

ภาพที่9 พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเม็ดเลือดของกุ้ง (Hematopoietic tissue) ลักษณะเป็น Lobule ภายในจะมี Hamatopoietic stem cells (HSC) อยู่ทั่วไป เซลล์เม็ดเลือดจะถูกปล่อยออกตามท่อเลือด (Vessel,V) เพื่อเข้าสู่กระแสเลือด ย้อมสีแบบ Hamatoxin-Eosin

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

แบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถจำแนกชนิดเป็น *Vibrio alginolyticus* (Shewan and Veron, 1974, Bergey's manual of determination,8th) เมื่อแบคทีเรียเจริญบนอาหารวุ้นชื่อ TCBS จะสร้างโคโลนีสีเหลือง ซึ่งเป็นชนิดที่เกิดโทษรุนแรงน้อยกับสัตว์น้ำเรียกว่า non pathogenic (ข่าวกุ้ง 2540) และตลอดการทดลองครั้งนี้ การฉีดและแช่กุ้งด้วยแบคทีเรีย กุ้งกุลาดำมีอัตราการรอดตาย 98 % คุณสมบัติของแบคทีเรียในการเจริญบนอาหารวุ้นที่มีเกลือแกงพบว่า แบคทีเรียสามารถ ทนทานและเจริญในอาหารที่มีเกลือแกงปนในความเข้มข้นกว้างช่วง 1-10 % แต่ไม่สามารถเจริญเมื่อไม่มีเกลือแกงในอาหารเลย ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ที่ต้องการเกลือแกงในการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในปริมาณ 2 % (Buxton and Fraser, 1977)

เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำสามารถจำแนกออกเป็นสามชนิดคือ Hyaline cell (HY), Small granule hemocyte (SGH) ที่มีแกรนูลขนาดเล็กและ Large granule hemocyte (LGH) ที่มีแกรนูลขนาดใหญ่ ความแตกต่างในการจัดจำแนกชนิดในการทดลองครั้งนี้ ใช้การย้อมสี Haemalum-Eosin แล้วจำแนกความแตกต่างลักษณะทาง morphology ของเม็ดเลือดดังนี้ ขนาดของเม็ดเลือดและนิวเคลียส ขนาดและการติดสีของแกรนูลการมีและไม่มีแกรนูลการมี pseudopodia และ inclusion body ในการจำแนกชนิดของเม็ดเลือดของรายงานอื่นๆ ได้ใช้เทคนิคด้านอื่นประกอบพิจารณาร่วม เช่น cytochemical and functional criteria (Hose and Martin, 1989; Hose et al, 1992; Tsing et al, 1989; Le Moullac et al, 1997) และการใช้ความจำเพาะของ monoclonal antibody ในการจำแนกคุณสมบัติ antigenic and function characteristics ของเม็ดเลือด (Bachere et al, 1995) ผลการจำแนกชนิดของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำของการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานอื่น ที่จำแนกกลุ่มเม็ดเลือด granulocyte คือ SGH และ LGH ในกุ้ง *P. japonicus* และ *P. monodon* (Tsing et al, 1989) และในกุ้ง *P. stylirostris* (Le Moullac et al, 1997)) และในกุ้ง *S. ingentis* และกุ้ง *P. califoriensis* (Martin and Graves, 1985) โดยทุกรายงานจะใช้ความแตก

ต่างขนาดของแกรนูลในการจำแนก ส่วนเม็ดเลือดชนิด HY มีความแตกต่างในการใช้ชื่อและคุณสมบัติในการจำแนก ในรายงานของ Tsing et al (1989) ได้ใช้ชื่อ Undifferential hemocyte (UH) อันเนื่องจากการไม่มีแกรนูลเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แต่ถ้าส่องด้วยกล้อง electron microscopy พบว่าส่วนน้อยของเม็ดเลือดที่ไม่มีแกรนูลในกุ้ง *P. japonicus* และ *P. monodon* และยังได้รายงานเพิ่มเติมอีกว่าเม็ดเลือด UH ไม่สามารถตรวจพบในกุ้ง *P. adspersus* และกุ้งก้ามกราม เมื่อส่องดูด้วยกล้อง electron microscopy แต่สามารถพบได้ถ้าส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

ค่าเฉลี่ย Total hemocyte counts (THC) ของเม็ดเลือดได้ถูกใช้ในการเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับการลอกคราบและหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* กับกุ้งปกติ(กลุ่มควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ) ผลการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยของ THC ในกุ้งกุลาดำของการทดลองครั้งนี้มีค่า 26.6 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร (SD= 11.2 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากกุ้งกุลาดำตัวอย่าง 77 ตัว ซึ่งค่า THC มีค่าใกล้เคียงกับ Penaieds ในรายงานอื่นๆดังนี้ จากกุ้ง *L. stylirostris* ค่าของ THC เท่ากับ 27.4 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร (SD= 9.3 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากจำนวนกุ้ง 97 ตัว (Goarant and Boglio, 2000) จากกุ้ง *S. ingentis* ค่าของ THC เท่ากับ 27.0 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร จากจำนวนกุ้ง 34 ตัว((Martin et al, 1993) จากกุ้งกุลาดำ ค่าของ THC เท่ากับ 23.3 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร (SD=1.4 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) เมื่อนับด้วย Haemocytometer และเมื่อนับด้วย The Cell-Dyn 3000 Flow Cytometer ค่าของ THC เท่ากับ 21.0 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร (SD= 0.79 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากจำนวนกุ้ง 40 ตัว (Owens and O'Neill, 1997) สำหรับความสัมพันธ์ของระยะการลอกคราบของกุ้งกุลาดำกับค่า THC ของการทดลองครั้งนี้มีความผันแปรตามระยะของคราบ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Le Moullac et al (1997) ศึกษาในกุ้ง *P. stylirostris* พบว่าระยะคราบช่วง intermolt (Stage C) มีค่า THC ต่ำกว่าระยะคราบช่วง postmolt (Stage B) และระยะคราบช่วง premolt (Stages D0 D1 D2) การปลดปล่อยของเม็ดเลือดจากอวัยวะผลิตเม็ดเลือดในระหว่างระยะการลอกคราบของกุ้ง *S. ingentis* โดยศึกษาอัตราการแบ่งตัว (Mitotic rates) ของ Haematopoietic stem cells ในอวัยวะผลิตเม็ดเลือดซึ่งพบว่าชนิดของเม็ดเลือดและปริมาณที่ถูกผลิตและมีการปลด ปล่อยออกสู่กระแสเลือดมีความ

สัมพันธ์กับกิจกรรมของอวัยวะผลิตเม็ดเลือดและหน้าที่ของเม็ดเลือดชนิดนั้นๆ (Martin et al, 1993)

ปริมาณเม็ดเลือดในกระแสเลือดของกุ้งกุลาดำมีความผันแปรหลังการทำให้เกิดการติดเชื้อ *V. alginolyticus* การลดลงของค่า THC ถูกสังเกตได้รวดเร็วเมื่อสุ่มตัวอย่างเลือดกุ้งที่ 6 ชั่วโมงหลังการฉีดแบคทีเรียเข้าร่างกาย ส่วนการแช่กุ้งในน้ำที่มีแบคทีเรีย ค่า THC ก็ลดลงเช่นเดียวกันเมื่อสุ่มตัวอย่างเลือดกุ้งที่ 1 วัน การลดลงของปริมาณเม็ดเลือดมีสาเหตุเป็นไปได้ว่าเมื่อกุ้งเกิดบาดแผลจากการฉีด เม็ดเลือดจะมาสะสมล้อมรอบ บริเวณบาดแผลเพื่อหยุดยั้งการไหลของเลือดออกจากร่างกาย ทั้งต้องทำหน้าที่ในการ กินสิ่งแปลกปลอมไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียที่มีชีวิตหรือตายซึ่งเรียกว่า Phagocytosis (Bacuchau and Mengeot, 1978; Ratchiffe and Rowley, 1979; Martin et al, 1993; Goarant and Boglio, 2000) นอกจากบริเวณบาดแผลที่เกิดการติดเชื้อแล้ว มีรายงานว่าเม็ดเลือดกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกสู่นอกร่างการทางเหงือก แต่อวัยวะ Digective gland ไม่มีส่วนเกี่ยวข้อง(Martin et al, 1993) ดังนั้นเม็ดเลือดกุ้งในกระแสเลือดจึงลดลงเพราะเม็ดเลือดส่วนใหญ่จะไปอยู่ที่เนื้อเยื่อบาดแผลและเนื้อเยื่อเหงือก ต่อมาเมื่อสุ่มตัวอย่างเลือดกุ้งในวันที่ 2 พบว่าค่า THC กลับมามีปริมาณปกติก่อนการติด เชื้อและใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงว่าการรักษาบาดแผลและกำจัดสิ่งแปลกปลอมบางส่วนได้ประสบความสำเร็จ ระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดสู่ภาวะ ปกติมีความแตกต่างกันไป จากการทดลองในกุ้ง *S. ingentis* จะใช้เวลา 72-96 ชั่วโมง (Martin et al, 1993) และในกุ้ง *L. stylirostris* จะใช้เวลา 4 วัน (Goarant and Boglio, 2000) ต่อมาเมื่อสุ่มตัวอย่างเลือดกุ้งกุลาดำในวันที่ 3 และวันที่ 6 พบว่าค่า THC ในกลุ่มติดเชื้อจะสูงกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าร่างกายกุ้งมีการเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดมากขึ้น เพราะแบคทีเรียอาจมีค้างอยู่ในร่างกายกุ้งโดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีชีวิตสามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มปริมาณในร่างกายสัตว์ได้ มีหลักฐานการแบ่งตัวของเม็ดเลือดใน ร่างกายกุ้ง *P. japonicus* เพิ่มปริมาณสามเท่าตัว หลังจากกุ้งถูกกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น Lipopolysaccharide จากแบคทีเรีย *Salmonella abortus* และ Immunosuppressive lymphocyte mitogen (ISM) protein จากเชื้อรา *Candida albicans* (Sequeira et al, 1996) สำหรับการสุ่มตัวอย่างเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำในวันที่ 7

ค่า THC จะลดลงอีกครั้งอันอาจเนื่องมาจากการกำจัดแบคทีเรีย ซึ่งสามารถพบเม็ดเลือด Granulocyte มีการแตกตัว ของแกรนูล (Degranulation) และเม็ดเลือดมีการเสื่อมสลาย

ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำหลังการติดเชื้อ *V. alginolyticus* โดยพบว่าอัตราส่วนของเม็ดเลือดจำนวน 200 เซลล์เพื่อแยกเป็นชนิด Hyaline cell (HY) ต่อชนิด Granulocyte (SGH+LGH) มีความผันแปรแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญโดยอัตราของ HY มีแนวโน้มลดลงและอัตราของ Granulocyte มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมเมื่อสุ่มนับตัวอย่างชนิดเม็ดเลือดตลอด 7 วันหลังการติดเชื้อ ในกลุ่มควบคุมอัตราของ HY ต่อ Granulocyte มีค่า 75 % ต่อ 25 % ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาในกุ้ง *P. stylirostris* มีค่า 80 % ต่อ 14-23 % (Le Moullac et al,1997) เมื่อกุ้งมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย การผลิตชนิดเม็ดเลือดประเภทใดของกุ้งขึ้นอยู่กับหน้าที่ของเม็ดเลือดนั้นๆ ในกระแสเลือด อย่างไรก็ตามมีการรายงาน ขัดแย้งเกี่ยวกับหน้าที่ของเม็ดเลือดของสัตว์ Decapod ดังต่อไปนี้ Soderhall and Cerenius (1993) รายงานเม็ดเลือด HY มีหน้าที่ในการ Phagocytosis และเม็ดเลือด Granulocyte มีหน้าที่เกี่ยวกับ Encapsulation, Cytotoxicity, The ProPO activating system ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Hose and Martin (1989) และ Hose et al (1990)ที่กล่าวว่าเม็ดเลือด HY มีหน้าที่เกี่ยวข้องใน การกระตุ้นน้ำเลือดหลังเกิดบาดแผล ในขณะที่เม็ดเลือด Granulocyte เท่านั้นที่ทำหน้าที่ Phagocytosis และ Encapsulation ในการทดลองการติดเชื้อใน กุ้ง *S. ingentis* ต่อ แบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยในน้ำทะเลชนิด *Cytophaga* sp พบว่าเม็ดเลือด SGH ส่วนใหญ่ทำหน้าที่ Phagocytosis และน้อยมากในเม็ดเลือด LGH และเม็ดเลือด HY ไม่มี ส่วนเกี่ยวข้องเลย (Hose and Martin 1989) เมื่อพิจารณาอัตราเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำหลังการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ของการทดลองครั้งนี้พบว่าเม็ดเลือด Granulocyte ที่มีการแตกตัวของแกรนูล อย่างมากคือเม็ดเลือดชนิด SGH (พบน้อยมากใน LGH) หลังจากแกรนูลแตกตัวจะปลดปล่อยเอนไซม์ Lysozyme (Hose and Martin, 1989) และ Prophenoloxidase (Le Moullac et al, 1997; Tsing et al, 1989) จึงมีความเป็นไปได้ว่าเม็ดเลือด HY จะ

มีหน้าที่ในการ Phagocytosis และการแข็งตัวของเลือดบริเวณบาดแผลในระยะเริ่มแรก เมื่อสุ่มตัวอย่างที่ 6 และ 12 ชั่วโมง ค่า HY มีแนวโน้มลดลงในกระแสเลือดกุ้งกุลาดำ เพราะถูกใช้ไปในหน้าที่เหล่านั้น และเมื่อเวลาผ่านไปเมื่อสุ่มตัวอย่างเลือดจะพบการแตกตัวของแกรนูลอย่างมากมายของเม็ดเลือด SGH และค่า Granulocyte มีการเพิ่มในอัตราที่แตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญกับกลุ่มควบคุม ระบบการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายกุ้งด้วยระบบ The ProPO activating system (แกรนูลจะมีการแตกตัว) เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสูงในสัตว์ Decapod (Soderhall and Cerenius 1993; Le Moullac et al, 1997; Tsing et al, 1989) โดยสารกระตุ้นที่รายงานทำให้เกิดการแตกตัวของแกรนูลในเม็ดเลือด SGH คือสาร Polysaccharide จากแบคทีเรีย และสารโปรตีน ที่มีคุณสมบัติ 76 KD factor และ β-1,3-glucan (Soderhall and Cerenius 1993) อย่างไรก็ตามสาร Beta-glucan เป็นสารกระตุ้นในกุ้งกุลาดำระยะสั้นเท่านั้นหลังจาก กุ้งกุลาดำถูกทำให้เกิดการติดเชื้อ Vibriosis (Sung et al, 1994) มีการรายงานกิจ กรรมของ The ProPO activating system มีการเปลี่ยนตามระยะลอกคราบของกุ้งที่พบว่าระยะก่อนการลอกคราบ (Premolt) กิจกรรมของ Phenoloxidase จะต่ำดังนั้น จึงเป็นเหตุผลที่ว่าโอกาสที่กุ้งเกิดการติดเชื้อได้ง่ายอันเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ ซึ่งการทดลองในกุ้ง *P. stylirostris* ต่อโรค Viriosis กุ้งมีอัตราการตาย 48 % (Le Moullac et al, 1997)

จากการศึกษาการวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารวุ้นเฉพาะชื่อ TCBS มีโคโลนีสีเหลือง และจำแนก ได้ว่าเป็นชนิด *Vibrio alginolyticus*

2. ชนิดของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำถูกจำแนกออกเป็นสามชนิดได้ดังนี้ Hyalince cell (HY), Small granule hemocyte (SGH), และ Large granule hemocyte (LGH) โดยการย้อมสีเม็ดเลือดและจากการส่องเลือดกุ้งสดด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำทั้งสามชนิดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหลังการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* รวมทั้งการแตกตัวของแกรนูลของเม็ดเลือด SGH และ LGH

4. ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำในหนึ่งวงจรการลอกคราบถูกศึกษาสุ่มนับปริมาณเม็ดเลือดใช้ค่าปริมาณ Total hemocyte counts (THC) เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งพบว่า ค่าปริมาณ THC มีการผันแปรแตกต่างกันไปในแต่ละระยะคราบของกุ้ง

5. ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำมีความผันแปรเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* โดยพบว่าที่ 6 ชั่วโมงหลังการฉีดแบคทีเรียเข้าร่างกาย ซึ่งปริมาณค่า THC ลดลง 16 % และปริมาณเม็ดเลือดจะกลับสู่สภาพปกติในวันที่สอง จากนั้นจะเพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม 50 % ในระหว่างวันที่สามและวันที่หก ในที่สุดปริมาณเม็ดเลือดจะลดลงต่ำสุดในวันที่เจ็ดของการทดลองในปริมาณ 52 %

6. ชนิดเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำมีความผันแปรเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่า HY:G(SGH+LGH) เมื่อนับชนิดของ เม็ดเลือดในปริมาณ 200 เซลล์ ซึ่งพบว่าค่าปริมาณ HY มีแนวโน้มลดลง และค่าปริมาณ Granulocyte มีแนวโน้มสูงขึ้นตลอดระยะการทดลอง 1-7 วันและชนิดของ Granulocyte ที่พบมากคือ SGH และมีการแตกตัวของแกรนูลเป็นส่วนใหญ่

เอกสารอ้างอิง

REFERENCES

กิจการ สุภมาตย์ และ สิทธิ บุณยรัตผลิน. 2539. การศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและแนวทางการใช้วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). รายงานการวิจัย. 17 หน้า.

ข่าวกุ้ง. 2540. เมษายน.

Bachere, E., E. Mialhe, and J. Rodriguez. 1995. Identification of Defense Effectors in The Hemolymph of Crustaceans with Particular Reference to The Shrimp *Penause japonicus*: prospects and applications. **Fish and Shellfish Immunology**. 5:597-612.

Buxton, A. and G. Fraser. 1977. **Animal Microbiology, Vol. 1.** Blackwell Scientific Publications. 357 p.

Cheng, W. and J-C. Chen. 2000. Effects of pH, Temperature, and Salinity on Immune Parameters of The Fresh Water Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish and Shellfish Immunity**. 10:387-391.

Cornick, J. W., and J. E. Stewart. 1978. Lobster (*Homarus americanus*) Hemocytes: Classification, Differential Counts, and Associated Agglutinin Activity. **Journal of Invertebrate Pathology**. 31:194-203.

Goarant, C. and E. Boglio. 2000. Changes in Hemocyte Counts in *Litopenaeus stylirostris*. Subjected to Sublethal Infection and to Vaccination. **Journal of The World Aquaculture Society**.31(1):123-129.

Hose, J. E., G. G. Martin, and A. S. Gerard. 1990. A Decapod Hemocyte Classification Scheme Integrating Morphology, Cytology, and Function. **Biology Bulletin**. 178:33-45.

Ishimaru, K., M. Akagawa-Matsushita, and K. Muroga. 1995. *Virio penaeicida* sp. nov., a Pathogen of Kuruma Prawn (*Penaeus japonicus*). International **Journal of Systemic Bacteriology**. 45:134-138.

Itami, T., Y. Takahashi, and Y. Nakamura. 1989. Efficacy of Vaccination Against Vibriosis in Cultured Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*. **Journal of Aquatic Animal Health**. 1:238-242.

Itami, T., Y. Takahashi, K. Yoneoka, and Y. Yan. 1991. Survival of Larval Giant Tiger Prawns *Penaeus monodon* after addition of Killed *Vibrio* Cells to a Microencapsulated Diet. **Journal of Aquatic Animal Health**. 3:151-152.

Jiravanichpaisal, P., T. Miyasaki, and C. Limsuwan. 1994. Histopathology, Biochemistry and Pathogenicity of *Vibrio harveyi* Infecting Black Tiger Prawn *Penaeus monodon*. **Journal of Aquatic Animal Health**. 6:27-35.

Le Maoullac, G., M. Le Groumellec, D. Ansquer, S. Froissard, P. Levy, and Aquacop. 1997. Haematological and Phenoloxydase Activity Changes in The Shrimp *Penaeus stylirostris* in Relationship with The Moult Cycle: Protection Against Vibriosis. **Fish and Shellfish Immunology**. 7:227-234.

Lighter, D. V. 1988. ***Vibrio* Disese of Penaeid Shrimp**. In: C. J. Sinderman and D. V. Lighter (eds). Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture and Fisheries Science. Vol. 17:42-47.

Lighter, D. V. 1996. Epizootiology, Distribution and the Impart on International Trade of Two Penaied Shrimp Virus in Americas. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties**. 15:579-601.

Liu, C-I. 1989. **Shrimp Disease, Prevention and Treatment**: In Proceedings of The

Southeast Asia Shrimp Farm Management Workshop. Akiyama, D.M. (ed). 64-74

Martin, G. G., D. Poole, C. J. E. Hose, M. Arias, L. Reynolds, N. McKrell, and A. Whang. 1993. Clearance of Bacteria Injected into The Hemolymph of The Penaeid Shrimp, *Sicyona ingentis*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 62:308-315.

Nash, G., C. Nithimathachoke, C. Tungmandi, A. Arkarjamorn, P. Prathanpipat and P. Ruamthaveesub. 1992. **Vibriosis and Its Control in Pond-Reared *Penaeus monodon* in Thailand.** In: Diseases in Asian Aquaculture. I. M. Shariff, R. P. Subasinghe, and J. R. Arther (eds). 143-155.

Owens, L. and A. O' Neill. 1997. Use of a Clinical Cell Flow Cytometer for Differential Counts of Prawn *Penaeus monodon* Haemocytes. **Diseases of Aquatic Organisms.** 31:147-153.

Pizarro, F. and J. Alfaro. 1994. Reproductive performance of *Penaeus stylirostris* Females Injected with Heat-Killed *Virio alginolyticus*. **Journal of The World Aquaculture Society**. 25:576-578.

Sano, T. and H. Fukuda. 1987. Principal Microbial Diseases of Mariculture in Japan. **Aquaculture.** 67: 59-69.

Sequeira, T., D. Tavarest, and M. Arala-Chavesy. 1996. Evidence for Circulating Hemocyte Proliferation in The Shrimp *Penaeus japonicus*. **Developmental and Comparative Immunology**. 20(2): 97-104.

Shewan, J. M. and M. Veron. 1974. **Family II Vibrionaceae**: In Bergey's Manual of Determination Bacteriology 8th, Buchanan et al, (eds.), 340-345.

Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. **Crustacean Immunity.** In: Annual Review of Fish Diseases-1993. Faisal, M. and F. M. Hetrick (ed.). Pergamon Press. 3-23.

Smith, D. M. and W. Dall. 1985. Moult Staging The Tiger Prawn *Penaeus esculentus*. **Second Australian National Prawn Seminar**. 85-93.

Sung, H. H., G. H. Kou, and Y. L. Song. 1994. Vibriosis Resistance Induced by Glucan Treatment in Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish Pathology**. 29 (1):11-17.

Tsing, A., J.-M. Arcier, and M. Brehelin. 1989. Hemocytes of Penaeid and Palaemonid Shrimps: Morphology, Cytology, and Hemograms. **Journal of Invertebrate Pathology**. 53:64-77.

Vranckx, R. and M. Durliat. 1978. Comparison of The Gradient of Setal Development of Uropods and Scaphognathites in *Astacus leptodactylus*. **Biology Bulletin**. 155:627-639.