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 เช่นการศึกษาของTsing 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 แกรนูลติดสีน้ำเงิน 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 reticulum

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

ในกุ้งมังกรเซลล์ชนิดนี้รู้จักเรียกว่า 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 แกนูลในไซโตพลาสมจะแตก ออมาเซลล์จะล้อมรอบผิวของสิ่งแปลกปลอม 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 เสนอแนะการนับปริมาณและศึกษาชนิดของเม็ดอดซึ่งพบว่าการนับปริมาณเม็ดเลือดจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนให้ผลที่แม่นยำ าการใช้กล้อง Phase contrast ในกุ้ง *Panulirus interruptus* มีปริมาณเม็ดเลือด HY สูง 56 % ในขณะที่กุ้ง *Loxorhynchus grandis* และ *H. americanus* มีปริมาณที่ต่ำกว่า 21 และ 27 % ตามลำดับ ส่วนปริมาณของเม็ดเลือด LGH อยู่ระหว่าง 10 % ถึง 13 % ะเม็ดเลือด SGH ปริมาณ 65 % ในกุ้งมังกร และ กุ้ง *L. grandis* ส่วนกุ้ง *P. interruptus* ริมาณของ SGH เท่ากับ 31 % ทั้งนี้กุ้งทั้งสามชนิดเป็นกุ้งในระยะ Intermolt

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

ะการลอกคราบ	THC	UH	SGH	LGH	HL
31	11,500	8.9	20.3	15.4	55.4
	4,900	10.3	22.4	14.6	52.7
	7,600	10.9	18.5	12.6	58.0
	8,400	10.6	20.2	19.6	49.6
D4	14,600	9.1	23.1	15.9	51.9
	5,400	10.8	20.1	13.8	55.3

C = Total Number of Hemocyte per Cubic Millimeter of Blood

= Cells which lysis in vitro

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

จอกมาทันทีระหว่างระยะ Intermolt และ ระยะ D ต้นๆ อย่างไรก็ตามก็จะถูกปล่อยออก
งาครั้งที่สองแต่มีปริมาณน้อยกว่าในระหว่างระยะ A2 ส่วนเซลล์ที่เหลือจะสะสมอยู่ใน
งวัยวะผลิตเม็ดเลือดระหว่างระยะ B และถูกปล่อยอีกครั้งในระยะ C ซึ่งขนาดของเซลล์
Granulocyte ค่อนข้างใหญ่ที่พบในกุ้งระยะ D 0-2 และมีการสร้างแกรนูลจากปริมาณ
น้อยจนเห็นเต็มในไซโตพลาสม สัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสมจะมีค่าสูงกว่าใน
Granulocyte ที่โตเต็มที่ซึ่งไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด ส่วนเม็ดเลือดชนิด SGH จะถูก
ปล่อยระหว่างระยะ A และมีขนาดค่อนข้างใหญ่ซึ่งยังไม่เจริญเต็มที่เมื่อ เปรียบเทียบกับ
เนาดที่ถูกปล่อยในระยะ B และ C ขนาดของ SGH มีขนาดเล็กและ มีปริมาณแกรนูลมาก
ใน สำหรับผลผลิตของ HY มีปริมาณสูงสุดในระยะ D 3-4 เซลล์ HY จะถูกปล่อยออกมา
นทีระหว่างระยะ C ไปจนถึงระยะ D1-2 เซลล์ส่วนใหญ่หลังจาก ถูกปล่อยออกมาใน
ระแสเลือดเกือบจะเจริญเต็มที่ อัตราส่วนของนิวเคลียส ต่อ ไซโตพลาสมมีค่าต่ำกว่าเซลล์
อยู่ในกระแสเลือด และไซโตพลาสมส่วนใหญ่จะไม่มีแกรนูล อย่างไรก็ตามกุ้งระหว่าง
ะยะ D 3-4 และ A 1 ปริมาณการปล่อย HY จะลดลงอย่างเด่นชัด และจะถูกปลดปล่อย
กครั้งในระยะ A2 และระยะ B ซึ่งสังเกตุได้จากขนาดของเซลล์ HY มีขนาดใหญ่

- *ปริมาณและชนิดของเม็ดเลือดหลังการติดเชื้อหรือสิ่งกระตุ้นกับระยะการลอกคราบของกุ้ง*

โรคในกุ้งที่เกิดจากแบคทีเรียในกลุ่ม Vibriosis ก่อปัญหาการตายสูงสุดหรือ ทำให้งอ่อนแอแล้วติดเชื้อชนิดอื่นซึ่งก่อการตายในกุ้งเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับการตายของกุ้งบบอื่นๆ (Sano and Fukuda, 1987) ในการเลี้ยงกุ้งในน้ำกร่อยและทะเล ชนิดของibriosis ที่ก่อให้เกิดปัญหาในกุ้งได้แก่ ชนิด *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. arahaemolyticus*, *V. anguillarum*, และ *V. penaecida* (Lighter 1988, 1996; ravanichpaisal etal. 1994; Ishimura etal. 1995)

Le Moullac, 1997 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงและปริมาณรวมของเม็ดเลือดกุ้ง *P. ylirostris* ในช่วงระหว่างวงจรการลอกคราบเมื่อกุ้งมีการติดเชื้อแบคทีเรีย Vibriosis รวมงวัดค่า ProPO activity จากผลการทดลองได้จำแนกเซลล์เม็ดเลือดออกเป็นสามชนิดดัง ชนิดแรกคือ HY มีขนาดเล็กแต่นิวเคลียสเกือบเต็มเซลล์ มีปริมาณ 80 % ของปริมาณอดทั้งหมด 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 % อัตราวมของ 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 เม็ดเลือดกุ้งในกลุ่มไม่ใส่สิ่งกระตุ้นจะถูกนับอยู่ 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 แต่ทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันเอง 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

อดรวมจะลดลงหลังจากกุ้งถูกฉีดด้วยเชื้อ และลดลง ต่ำสุดที่ 24 ชั่วโมง แล้วปริมาณจะ
ับสู่ระดับปกติภายใน 72-96 ชั่วโมง

การศึกษาการยึดติดของเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำซึ่งจะมีความสำคัญต่อ
เรเชื้อแบคทีเรียจากกุ้งที่ป่วย รายงานของ Chen and Hanna (1994) พบว่า เชื้อ *V.*
ginolyticus และ *V. parahaemolyticus* ที่เป็น Pathogenic bacteria เท่านั้นมีการยึด
ดเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ และดีกว่าชนิด *V. anguillarum* ทั้งนี้ได้ใช้ เทคนิคทาง Monoclonal
ntibody โดยวิธี Indirect FITC-immunofluorescense

- *เม็ดเลือดกุ้งกับสารเพิ่มภูมิคุ้มกันและวัคซีน*

Itami etal., 1989 รายงานการทดลองศึกษาวัคซีนที่ผลิตจากการฆ่าเชื้อ *Vibrio*
วยฟอร์มาลิน แล้วเปรียบเทียบการฉีด, แช่ และพ่นวัคซีนในกุ้ง *P. japonicus* ผลการ
ดลองสามารถลดอัตราการตายของกุ้งได้ทั้งสามวิธีหลังจากกุ้งถูกฉีดด้วยเชื้ออีกครั้ง และ
รวจผลอัตราการรอดตายภายใน 30 วัน โดยอัตราการตายของกุ้งมีค่า 31, 28, และ 36 %
ว่ยการป้องกันการตายโดยใช้วัคซีนวิธี ฉีด แช่ และพ่นตามลำดับ และเปรียบเทียบกับกุ้ง
เลุ่มไม่ใช้วัคซีนมีค่าอัตราการตายเท่ากับ 80% นอกจากนี้ยังศึกษาการตอบสนองของเม็ด
ลือดกุ้งต่อเลือดกุ้งที่ติดเชื้อซึ่งทำให้เซลล์แตก ด้วยวิธี Boyden assay ผลการนับเม็ดเลือด
ที่ตอบสนองโดยเคลื่อนที่ผ่าน Boyden chamber filter พบว่าเฉพาะการกระตุ้นที่เตรียม
จากทั้งมีเม็ดเลือดกุ้งและเลือดกุ้งปั่นที่มีเชื้อ *Vibrio* เท่านั้นสามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดกุ้ง
คลื่อนที่ได้อย่างมีนัยยะสำคัญ

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

- *การผลิตเม็ดเลือดของกุ้ง (Hemopoiesis)*

บริเวณที่ผลิตเม็ดเลือดเรียกว่า Hemopoietic tissue (HT) or nodule ในสัตว์พวก capod โครงสร้างและตำแหน่งจะแตกต่างกันออกไป แม้ว่าสัตว์จะถูกจำแนกอยู่ในกลุ่ม าล้เคียงกันก็ตาม เช่น กุ้งมังกร ปู และ Crayfish โครงสร้างของ HT มีลักษณะเป็นแผ่น มห่อหุ้มส่วนของด้านท้องที่ตำแหน่งกระเพาะและหัวใจ เม็ดเลือดที่ยังอ่อน จะอยู่ที่ตอน ายของแต่ละ Lobule และถูกปล่อยมายัง Hemal space ก่อนถูกปลดปล่อยเข้าสู่ :แสเลือด ในกุ้ง Penaeid shrimp มีลักษณะเป็น 1 คู่ ถูกเรียกว่า Epigastric matopoietic Nodules (HPN) และในบางชนิด อาจมี Ancillary site ของ HT อยู่ล้อม ม Antenna artery และฐานของ Maxilliped การศึกษาของ Hose etal., 1992 ในกุ้ง *S. entis* เกี่ยวกับการผลิตและปลดปล่อยเม็ดเลือดจาก HPN ในระหว่างวงจรลอกคราบ งสร้างของ HPN ประกอบด้วยแขนงเส้นเลือดมากมายมาหล่อเลี้ยง ผนังท่อของเส้น ดเหล่านี้เป็นแหล่งผลิตเม็ดเลือดซึ่งยังเป็นเซลล์ในระยะเริ่มแรก จะถูกเรียกว่า matopoietic stem cells (HSC) อัตราการแบ่งตัวของเม็ดเลือดจะเริ่มมากขึ้นในระยะ C งระยะ D1-2 ประมาณ 2-4 % การพัฒนาของเม็ดเลือดเป็นไปอย่างรวดเร็ว จนกระทั่ง เลือด Granulocyte แต่ละเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมา การแบ่งตัวของเม็ดเลือดใน ง จะลดลงจากระยะ D3-4 จนกระทั่งหลังลอกคราบคือระยะ A1 เมื่อกุ้งอยู่ในระยะ งลอกคราบ (Ecdysis) ปริมาณเม็ดเลือด Hyaline stem cells มีการพัฒนาและจะถูก ปล่อยสู่กระแสเลือดทันทีหลังจากที่คราบของกุ้งหลุดออกจากตัว การแบ่งตัวของ n cells จะถูกกระตุ้นอีกครั้งระหว่างระยะ A2 และ ระยะ B ในช่วงนี้ Stem cells ที่ นาอาจมีปริมาณสูงถึง 7 เท่าตัวเมื่อเทียบกับ Stem cells ของระยะ C