บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาผลของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ จากการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 เปรียบเทียบสูตรอาหารผสมเซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรียซึ่งฆ่าด้วยฟอร์มาลีน 2 เปอร์เซ็นต์ (F-BS11) อัตราส่วนต่างๆ กับ สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางการค้า (BG) ขณะทำการทดลองควบคุมคุณภาพน้ำ และปริมาณแบคทีเรียก่อโรค ให้อยู่ในช่วงมาตรฐาน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำมีผลต่อระดับภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Moullac และHaffner, 2000) หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 90 วัน จากการทดลองครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 การรอดชีวิตของกุ้งในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันโดยกลุ่มF-BS11-3 มีการรอดชีวิตสูงที่สุด และในการทดลองครั้งที่ 3 เลือกกลุ่มทดลองที่ให้อาหารผสมเซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย (F-BS11) สูตร F-BS11-2 ซึ่งมีอัตราส่วนอาหารต่อเซลล์ BS11 ซึ่งฆ่าด้วยฟอร์มาลีน 2 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 3 ต่อ1 (น้ำหนักแห้งต่อน้ำหนักเปียก) เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้อาหารกุ้งผสมบีตากลูแคน (BG) 2 กรัม/กิโลกรัม กลุ่มที่ให้อาหารผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย (BS11) ซึ่งมีอัตราส่วนอาหารต่อ BS11 3 ต่อ1 (น้ำหนักแห้งต่อน้ำหนักเปียก) และกลุ่มที่ให้อาหารสูตรปกติ (กลุ่มควบคุม) สำรวจผลการรอดชีวิตของกุ้ง 2 ช่วง คือ ช่วงอายุ 60 วัน และอายุ 90 วัน จากการทดลองพบว่ากุ้งในกลุ่ม BS11 ช่วงอายุ 60 วัน และ 90 วัน มีการรอดชีวิตสูงที่สุด เนื่องจากโครงสร้างของสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ บีตากลูแคน และ โพรไบโอติกแบคทีเรียBS11 มีส่วนประกอบของผนังเซลล์เป็นเพพทิโดไกลแคน (PG) ซึ่งสารดังกล่าวเหล่านี้ได้มีการศึกษาโดย Stephen และ Newman (1999) พบว่าไลโพโพลิแซคคาไลด์ (LPS) จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เพพทิโดไกลแคนจากผนังเซลล์ของจุลินทรีย์หลายชนิด และกลูแคน (Glucan) จากผนังเซลล์ของยีสต์ ทำให้อัตราการรอดชีวิตของกุ้งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ให้อาหารสูตรปกติ โดยช่วยต้านทานต่อการเกิดโรคได้ดี โดย LPS และ PG แสดงคุณสมบัติของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่ากลูแคน เนื่องจากทนต่อความร้อน และไม่เสียสมบัติทางชีวภาพเมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของกุ้ง และจากการเลี้ยงกุ้งในครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มีปริมาณของกุ้งในบ่อหนาแน่นเกินไป และกุ้งอาจมีการกินกันเอง เนื่องจากขนาดของกุ้งในบ่อมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก ทำให้การรอดชีวิตของกุ้งน้อยและไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลอง

การทดลองครั้งที่ 1 และ 2 ซึ่งติดตามผลจากน้ำหนัก และความยาวของกุ้งทุก 20 วัน จากการทดลองครั้งที่ 1 เมื่อกุ้งมีอายุ 85 วัน พบว่ากลุ่ม F-BS11-1 มีน้ำหนักและความยาวมากที่สุด

รองลงมาคือกลุ่ม F-BS11-2 และกลุ่ม BG ตามลำดับ การทดลองครั้งที่ 2 เมื่อกุ้งอายุ 65 วัน กุ้งกลุ่ม F-BS11-1 มีน้ำหนักและความยาวมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่ม BG และกลุ่ม F-BS11-2 ตามลำดับ และจากการทดลองครั้งที่ 3 หลังจากเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่ากุ้งกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักและความยาวน้อยที่สุด เมื่อกุ้งอายุ 85 วัน กลุ่ม BS11 มีน้ำหนักและความยาวมากที่สุด ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับ การรายงายของ Rengpipat และคณะ (1998, 2000, 2002) ซึ่งศึกษาการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย (*Bacillus* สายพันธุ์ S11) ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่ามีผลให้อัตราการรอดชีวิต การเจริญเติบโตของกุ้งสูงกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนั้นยังช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และต้านทานต่อการเกิดโรคของกุ้งหลังการชักนำให้เกิดโรค และจากการศึกษา โพรไบโอติกสามารถกระตุ้นการกระบวนการย่อยอาหาร และการดูดซึมสารอาหารดีขึ้น โดยมีการสังเคราะห์ วิตามิน โคแฟคเตอร์ หรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ (Fuller, 1989; Gatesoupe, 1999; Jory, 1998; Ziemer และGibson, 1998) จึงทำให้กุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติกมีน้ำหนักสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ซึ่งการทำงานของโพรไบโอติกต่อการรอดชีวิต และการเจริญเติบโตยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด แต่พบว่ากุ้งมีการบริโภคอาหารสูงขึ้น โดยสังเกตจากปริมาณอาหารที่เหลือตกก้นบ่อหลังการให้อาหารในแต่ละครั้ง โดยพบว่ากลุ่มที่ให้อาหารผสมเซลล์ (F-BS11) และกลุ่มที่ให้อาหารผสม โพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11(BS11) มีปริมาณอาหารเหลือน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มBG

จากการศึกษาพบว่า β-1,3-glucan เมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของกุ้งจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ บีตากลูแคนเนส (β-glucanase) ให้คาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นสารอาหารที่ให้พลังงานแก่กุ้ง จึงทำให้กุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมบีตากลูแคนมีการเจริญเติบโตดีขึ้น (Lópenz และคณะ, 2003)

นอกจากความสมดุลของปริมาณสารอาหารที่กุ้งได้รับจากสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งแล้ว ยังพบว่าช่วยเสริมสุขภาพของกุ้งให้สามารถต้านทานต่อการเกิดโรคดีขึ้นอีกด้วย (Cuzon และคณะ, 2004)

Verschuere และคณะ (2000) รายงานการทำงานของโพรไบโอติกแบคทีเรีย ต่อสิ่งแปลกปลอม พบว่ามีการกระตุ้นสารหลายชนิดเพื่อใช้ต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค เช่น สารปฏิชีวนะ สารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เอนไซม์ Lysozymes เอนไซม์Proteases ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และการเปลี่ยนค่ากรด-ด่าง จากกรดอินทรีย์ เป็นต้น และเนื่องจากมีการรายงานพบว่า *Bacillus* สร้างสารปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ โพลิไมซิน(Polymyxin) แบคซิทราซิน (Bacitracin) และแกรมิซิดิน (Gramicidin) (Sugita และคณะ, 1998) จึงทำให้ *Bacillus* มีความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่เข้าสู่เซลล์ได้ดี

จากการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อการเกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml ซึ่งผ่านการตรวจสอบเชื้อด้วยวิธี Dot blot พบว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกับ *V. harveyi* 639 ซึ่งมีความจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีVH3-3H ในการทดลองครั้งที่ 1 และ

ครั้งที่ 2 กุ้งกลุ่มควบคุมมีการตายสะสมสูงที่สุด โดย มีการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 4 และหลังการชักนำให้เกิดโรค 5 วัน กลุ่ม F-BS11-1 มีการตายสะสมต่ำที่สุด การทดลองครั้งที่ 3 เมื่อกุ้งอายุ 90 วันไม่พบการตายของกุ้งในกลุ่มที่ไม่ชักนำให้เกิดโรคตลอดระยะเวลาการทดลอง ขณะที่กุ้งกลุ่มที่ชักนำให้เกิดโรค กลุ่มควบคุมมีการตายสะสมสูงที่สุด กลุ่ม BS11 มีการตายสะสมต่ำที่สุด หลังจากนั้นนำกุ้งกลุ่มที่ไม่ชักนำให้เกิดโรคที่อายุ 90 วัน มาทำการทดลองชักนำให้เกิดโรคอีกครั้งเมื่อกุ้งอายุ 120 วัน พบว่าให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองชักนำให้เกิดโรคเมื่อกุ้งอายุ 90 วัน คือ กุ้งในกลุ่ม BS11 มีการตายสะสมต่ำที่สุด กลุ่มควบคุมมีการตายสะสมสูงที่สุด สอดคล้องกับการรายงานของ Gomez-Gil และคณะ (2000) ซึ่งพบว่าการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย 10^3 cell/ml ใส่ในน้ำเลี้ยงกุ้งสามารถยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรค ความเข้มข้น 10^7 cell/ml ในลูกกุ้งขาวได้ เมื่อปริมาณแบคทีเรียก่อโรคลดลง การตายสะสมของกุ้งเนื่องจากการเกิดโรคจึงลดลงด้วย

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ และในน้ำเลี้ยงกุ้ง ในการทดลองครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ตรวจปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp.ในลำไส้กุ้งที่ตายหลังการชักนำให้เกิดโรค 2 วัน พบ ปริมาณเชื้อประมาณ 7.10 Log CFU/ml ในทุกกลุ่มทดลอง และพบปริมาณ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ หลังการชักนำให้เกิดโรคตั้งแต่วันที่สองของการทดลอง การทดลองครั้งที่ 3 เมื่อกุ้งอายุ 90 และ 120 วัน ปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มBGมีปริมาณ มากกว่า กลุ่มF-BS11-2 และกลุ่มBS11 และในน้ำเลี้ยงกุ้ง พบปริมาณแบคทีเรียรวม *E. coli* และ *Vibrio* spp. ลดลงเรื่อยๆ หลังการชักนำให้เกิดโรคตั้งแต่วันที่สองของการทดลอง เนื่องจากในน้ำเลี้ยงกุ้งไม่มีสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *E. coli* และ *Vibrio* spp. โดยเฉพาะในกลุ่มBS11 มีปริมาณลดลงมากที่สุดอาจเกิดจากการแข่งขันกันของโพรไบโอติกแบคทีเรียกับเชื้อก่อโรคจึงทำให้ปริมาณ *E . coli* และ *Vibrio* spp. ลดลง และพบ BS11 ในลำไส้และในน้ำเลี้ยงกุ้งเฉพาะกลุ่มที่ให้อาหารผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Oggioni และคณะ (2003) ซึ่งใช้สปอร์ *Bacillus* เป็นวัคซีน เนื่องจากมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม และมีอายุการเก็บได้นาน โดยสปอร์สามารถยึดเกาะกับสิ่งแปลกปลอมและกำจัดให้ออกไปอยู่ในต่อมน้ำเหลืองด้วยวิธี phagocytosis หลังจากนั้นสปอร์จะงอกเป็นเซลล์ปกติ (vegetative bacilli) ซึ่งจะทำลายสิ่งแปลกปลอม และปล่อยออกสู่กระแสเลือดอีกครั้งหนึ่ง โดยสปอร์ของ *Bacillus* เจริญได้ทั้งใน ช่องท้อง ระบบทางเดินอาหาร และลำไส้ ของเจ้าบ้านที่มันอาศัยอยู่ และในสัตว์เลือดอุ่น พบการชักนำของแอนติเจนในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ (Duc และคณะ, 2003; Casula และ Cutting, 2002)

ปัจจุบันมีการศึกษาการใช้สารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะบีตากลูแคน พบว่าช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยส่งเสริมการทำงานของโพรฟีนอลออกซิเดส การทำงานของสารต้านจุลินทรีย์ ในพลาสมากุ้ง กระตุ้นกระบวนการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม การยึดเกาะระหว่างเซลล์ และการสร้างซุปเปอร์ออกไซด์ในเม็ดเลือด (Song และHsieh, 1994; Itami และคณะ, 1994;

Sung และคณะ, 1996; Chang และคณะ, 2000; Campa-Cordova และคณะ, 2002) นอกจากนั้นยังพบการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าสามารถชักนำให้ เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซีส ฟาโกไซติก อินเด็กซ์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเม็ดเลือดรวม และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในทุกกลุ่มทดลอง และหลังการชักนำให้เกิดโรคพบว่า จำนวนเม็ดเลือดรวมลดลง เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซีส ฟาโกไซติก อินเด็กซ์ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมีปริมาณสูงขึ้น (Rengpipat และคณะ, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ และสารน้ำ จากการทดลองครั้งที่ 1 และ ครั้งที่ 2 หลังการเลี้ยงกุ้งอายุ 90 วัน ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองมีปริมาณเม็ดเลือดรวมประมาณ 10^7 cell/ml และหลังการชักนำให้เกิดโรคลดลงเหลือประมาณ 10^5 cell/ml และ จากการทดลองครั้งที่ 3 เมื่อกุ้งอายุ 90 วัน ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งในกลุ่มBS11มีมากที่สุด คือ 5.12×10^7 cell/ml ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งมีเม็ดเลือดรวมน้อยที่สุด คือ 3.26×10^7 cell/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังการชักนำให้เกิดโรค ปริมาณเม็ดเลือดรวมของทุกกลุ่มการทดลองลดลงเหลือประมาณ 1.38×10^6 cell/ml และ เมื่อกุ้งอายุ 120 วัน ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งในทุกกลุ่มการทดลองประมาณ 10^7 cell/ml หลังการชักนำให้เกิดโรคลดลงเหลือประมาณ 10^6 cell/ml ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Gullian และคณะ (2004) ซึ่งทำการศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมในกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ให้อาหารเสริม *Bacillus* P62, *V. alginolyticus, Vibrio* P64 และกลุ่มควบคุมพบว่ามีปริมาณเม็ดเลือดรวมประมาณ 10^7 cell/ml ในทุกกลุ่มทดลอง

ความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ โดยเปรียบเทียบจากการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดกุ้ง เมื่อกุ้งอายุ 90 และ120 วันก่อนการชักนำให้เกิดโรค พบว่ากุ้งกลุ่มBS11 สร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดกุ้งโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากที่สุด ซึ่งอาจเนื่องจากโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11มีโครงสร้างของผนังเซลล์ประกอบด้วยเพพทิโดไกลแคนซึ่งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ และเนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในลำไส้กุ้งจึงทำให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของกุ้งกลุ่มโพรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Itami และคณะ (1998) ซึ่งศึกษาประสิทธิภาพของเพพทิโดไกลแคนจาก *Bifidobacterium thermophilus* ในกุ้ง *Penaeus japonicus* พบว่าหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio penaeicida* กุ้งกลุ่มที่ได้รับเพพทิโดไกลแคน มีความต้านทานต่อการเกิดโรคสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังการชักนำให้เกิดโรค พบว่าในทุกกลุ่มการทดลองสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแบคทีเรียในเลือดมากขึ้น และไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม สอดคล้องกับการทดลองของ Rengpipat และคณะ (2000) ซึ่งศึกษาการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังการชักนำให้ให้เกิดโรคพบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของกุ้งกลุ่มที่ให้อาหารผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย และกลุ่มควบคุมไม่มีแตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าหลังการชักนำให้เกิดโรคมีเปอร์เซ็นต์สูงขึ้นมากกว่าก่อนชักนำให้เกิดโรคอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ และจากการศึกษาของ Panigrahi และคณะ (2005) ซึ่งทำการศึกษาการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 ในรูปเซลล์ตาย (heat-kill), เซลล์ที่มีชีวิต(live-sprayed) และเซลล์ที่อยู่ในรูปแช่แข็ง (freeze-dried) พบว่าการใช้เซลล์ในรูปเซลล์ที่มีชีวิต (live-sprayed) และเซลล์ที่อยู่ในรูปแช่แข็ง (freeze-dried) มีผลให้ระบบภูมิคุ้มกันในปลาทะเล rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* สูงกว่ากลุ่มที่ให้อาหารปกติ และกลุ่มที่ให้อาหารผสมโพไบโอติกในรูปเซลล์ตาย (heat-kill) และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโพรไบโอติกแบคทีเรียดังกล่าว พบว่าระดับภูมิคุ้มกันลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกแบคทีเรียสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้น

ระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นเองของสัตว์กลุ่มครัสเตเซียน พบสารที่มีฤทธิ์ต้านต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial peptides) มากกว่า 400 ชนิด ซึ่งเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และโมเลกุลเป็นประจุบวก โครงสร้างส่วนมากมีลักษณะเป็นวง ประกอบด้วยกรดอะมิโนซีสเทอีน (cysteine) และพันธะไดซัลไฟ (disulfide bond) ซึ่งจากโครงสร้างดังกล่าวทำให้มีความทนทานต่อเอ็นไซม์ (proteases) และไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ แต่มีการทำงานยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวก รา ยีสต์ และบางกรณีสามารถยับยั้ง ไวรัส และโปรโตซัว ได้อีกด้วย จากการศึกษาพบสารที่น้ำหนักโมเลกุล 11.5 kDa ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก สารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 12 kDa ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และ สารที่มีฤทธิ์ต้านต้านจุลินทรีย์ พีเนียดิน (Penaeidins) มีน้ำหนักโมเลกุล 5.5-6.5 kDa มีฤทธิ์ยับยั้งรา แบคทีเรียแกรมบวก และสิ่งแปลกปลอมที่มีคุณสมบัติchitin-binding (Bachère, 2003)

หลังจากทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อการเกิดโรคของกุ้งกุลาดำทุกกลุ่มทดลองจากการทดลองทั้ง 3 ครั้ง เก็บกุ้งที่ตายมาทำการศึกษาพยาธิสภาพของการเกิดโรค ต่อ *V. harveyi* ของกุ้ง ทั้งภายนอก และภายในตัวกุ้ง โดยพยาธิสภาพต่อการเกิดโรคภายนอกสังเกตพบการเรืองแสงของกุ้งบริเวณหัว หลังการชักนำให้เกิดโรค พยาธิสภาพต่อการเกิดโรคภายใน ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH3-3H ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi* 639 จากการตรวจสอบ พบมีการติดเชื้อทั้งบริเวณตับ อวัยวะสร้างเม็ดเลือด และหัวใจของกุ้ง ทุกกลุ่มการทดลองที่ชักนำให้เกิดโรค สอดคล้องกับการศึกษาเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำ ที่ทดสอบโดยการแช่กุ้งในน้ำที่มีแอนติเจนจาก *Vibrio vulnificus* ซึ่งทำให้เสียสภาพพิษด้วยความร้อน 10^7 CFU/ml เนื้อเยื่อส่วนที่พบแอนติเจนนี้ได้แก่ เหงือก ท้อง ตับ ลำไส้ แอ่งเลือด และอวัยวะสร้างเม็ดเลือด โดยพบในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน (Sung และSong, 1996) ซึ่งจากผลทางภูมิคุ้มกันวิทยาของเนื้อเยื่อ นี้ชี้ให้เห็นว่าแอนติเจนเข้าสู่ตัวกุ้งได้ทั้งการดูดซึมจากทางเดินอาหารและระบบหมุนเวียนของเลือด ซึ่งระบบการทำงานเช่นนี้ส่งผลกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในทุกส่วนของตัวกุ้งแต่เป็นการกระตุ้นในช่วงระยะเวลาสั้นๆเท่านั้น

จากการตรวจหาสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อเยื่อกุ้งในการทดลองครั้งที่ 3 ทุกกลุ่มทดลองใช้ชุดตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ (CM-Test) ของคณะสัตวแพทย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากการตรวจสอบไม่พบสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อกุ้งทุกกลุ่มทดลอง ซึ่งจากการศึกษาสอดคล้องกับการรายงานของ ศิริเพ็ญ สังข์ชัย (2546) ซึ่งศึกษาการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (BP11) ที่คัดแยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำ ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ หลังจากนั้นทดสอบหาสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อเยื่อกุ้งด้วยวิธี CM-Test ไม่พบสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อเยื่อกุ้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย