View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Directory of Open Access Journals

นิพนธ์ต้นฉบับ

การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำระยะต่าง ๆ

รัชนี โชติกจินดา[1] อมรรัตน์ พงศ์ดารา[2] จรีพร เรืองศรี[3] และ กิจการ ศุภมาตย์[4]

Abstract

Chotikachinda, R.[1], Phongdara, A.[2], Ruangsri, J.[1] and Supamattaya, K.[1]

MBV infection in various stages of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1) : 199-214

MBV infection in various stages of *Penaeus monodon* were studied. In hatcheries, MBV infection was detected early in nauplii stage using PCR technique, whereas rates of infection of 11.15-49.50% were observed in PL1 using histological technique, rising up to 15.26-100% in PL 10. In earthen ponds, the infection in PL15 was initially in the range of 68.68-96.00%. The infection was decreased toward the end of the first, second and third month of rearing period ranging between 13.63-54.83%.

The laboratory trial showed that types of feed might affect the rate of MBV infection of larvae. Postlarva fed with artemia showed lowest infection rate at 29.41±7.98%, whereas the infection rates of shrimp fed with minced cockle flesh and commercial feed were 39.09±12.08% and 52.81±11.91, respectively. In stress test trial, a significant MBV infection was detected in the group of larvae that were raised with 25ºC

[1]Aquatic Animal Health Research Center, Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, [2]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

[1]วท.ม. (วาริชศาสตร์) [3]วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) นักวิชาการประมง [4]Dr. rer. nat. (Aquatic Animal Pathology) รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ [2]D.Eng. (Biotechnology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

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

รับต้นฉบับ 26 กุมภาพันธ์ 2547 รับลงพิมพ์ 26 พฤษภาคม 2547

and 34ºC and the salinity at 6 ppt and 18 ppt for 12 hours then rearing in normal condition for 3 days. In the 24 hour-stress trial, and transferred to normal condition for 7 day, the groups that were exposed to stress conditions had significantly higher rates of infection than the control group ($p<0.05$). The 24 hour - transportation condition resulted in highest MBV infection rate (73.61±1.25%).

From the present study, it was concluded that MBV infection in larvae from hatcheries increases with period of rearing and stress exposure, but the infection tended to decreased with rearing period in earthen pond condition. Proper feeding management and prevention of stress conditions could reduce of MBV infection in black tiger shrimp.

Key words : MBV, *Penaeus monodon,* stress condition, feed

บทคัดย่อ

รัชนี โชติกจินดา อมรรัตน์ พงศ์ดารา จรีพร เรืองศรี และ กิจการ ศุภมาตย์

การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำระยะต่าง ๆ

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1) : 199-214

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งจากโรงเพาะฟักด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบกุ้งกุลาดำติดเชื้อดังกล่าวตั้งแต่ระยะนอเพลียส ส่วนการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาจะเริ่มตรวจพบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีได้ตั้งแต่ระยะโพสต์ลาวา 1 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้ออยู่ในช่วง 11.15-49.50% และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีเพิ่มขึ้นในระยะโพสต์ลาวา 10 มีค่าอยู่ในช่วง 15.26-100% การศึกษาในบ่อดินกุ้งระยะโพสต์ลาวา 15 ที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 68.68-96.00% เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมีแนวโน้มลดลงหลังจากการปล่อยเลี้ยงบ่อดิน 1, 2 และ 3 เดือน โดยมีโดยมีค่าระหว่าง 13.63-54.83%

การทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าชนิดของอาหารอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกุ้ง โดยกุ้งที่ได้รับอาร์ทีเมียมีการติดเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 29.41±7.98% ส่วนในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปและหอยแครงบดมีการติดเชื้อ 52.81±11.91 และ 39.09±12.08% ตามลำดับ ส่วนการศึกษาปัจจัยด้านความเครียด พบว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี โดยกุ้งที่เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 25 และ 34ºC ตลอดจนชุดการทดลองที่มีการเปลี่ยนแปลงความเค็มโดยไม่มีการปรับสภาพ (6 และ 18 ส่วนในพันส่วน) นาน 12 ชั่วโมง แล้วเลี้ยงต่อในสภาวะปกติ 3 วัน มีการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงที่ความเค็ม 12 ส่วนในพันส่วน และอุณหภูมิ 29ºC ($p<0.05$) ส่วนชุดการทดลองให้สภาวะความเครียดนาน 24 ชั่วโมง แล้วเลี้ยงต่อในภาวะปกติ 7 วัน พบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในลูกกุ้งสูงกว่าชุดควบคุมเช่นเดียวกัน ($p\leq0.05$) โดยชุดการทดลองที่ได้รับสภาวะจำลองการขนส่งติดเชื้อมากที่สุด 73.61±1.25%

จากผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าลูกกุ้งกุลาดำในโรงเพาะฟักจะมีการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงและความเครียดที่ได้รับ แต่เมื่อนำลูกกุ้งลงเลี้ยงในบ่อดินการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีจะลดลง ทั้งนี้ปัจจัยทางด้านอาหารและการป้องกันสภาวะความเครียดมีผลช่วยให้การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีลดลงได้

ปัญหาโรคระบาดในกุ้งกุลาดำ นับว่ามีส่วนสำคัญต่อปริมาณผลผลิตและส่งผลกระทบต่อการส่งออกกุ้งกุลาดำของประเทศ โรคติดเชื้อหลายชนิดทำให้ปริมาณผลผลิตลดลงอย่างรวดเร็ว เช่น โรคติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง โรคติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นต้น (Lin and Nash, 1996; Lightner, 1996) ในขณะที่จากรายงานการศึกษาพบว่าโรคบางชนิดก่อให้เกิดติดเชื้อในระดับที่ไม่รุนแรง แต่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต และอัตราอดตายของกุ้ง เช่น พบว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง รวมทั้งมีอัตราอดตาย

ต่ำ ส่งผลให้ผลผลิตลดลง (Chen *et al*., 1989; Lightner and Redman, 1981; Lightner *et al*., 1983; Chang and Chen, 1994) ในประเทศไทยมีรายงานเกี่ยวกับผลกระทบที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำบ้าง เช่น พบว่ากุ้งที่เจริญเติบโตช้าและมีขนาดเล็ก หรือกุ้งจิ๊กโก๋ในบ่อส่วนใหญ่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี อย่างไรก็ตามความชัดเจนของวงจรการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในระดับประชากรกุ้งกุลาดำ รวมทั้งปัจจัยบางประการ เช่น ชนิดของอาหารที่กุ้งได้รับ สภาพของความเครียดที่อาจมีผลเกี่ยวของต่อการติดเชื้อในระดับประชากรยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนมาก่อน ทั้งที่ปัจจัยเหล่านี้เป็นที่มีผลให้ภูมิคุ้มกันของครัสตาเซียลดลง อันจะนำไปสู่การเกิดโรคที่รุนแรงได้ ดังนั้นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับระดับการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกลุ่มประชากรระยะต่างๆ ผลของอาหารและปัจจัยที่ส่งเสริมความเครียดบางประการที่อาจมีผลต่อระดับการติดเชื้อในกลุ่มประชากรกุ้งกุลาดำ อาจนำมาซึ่งแนวทางประกอบการจัดการการเลี้ยงเพื่อตัดวงจรของการคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในตัวกุ้ง หรือการลดการติดเชื้อจากการควบคุมอาหาร ปัจจัยแวดล้อมที่นำมาซึ่งผลกระทบต่อระดับการติดเชื้อ การเจริญเติบโต อัตรารอด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกุ้งกุลาดำให้สูงขึ้นในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวาในโรงเพาะฟัก

ติดตามเก็บตัวอย่างลูกกุ้งในช่วงอายุต่างๆ ตั้งแต่นอเพลียส, ซูเอีย, ไมซิส, โพสต์ลาวา 1, 5 และ 10 จำนวน 10 บ่อ จากโรงเพาะฟักในเขต อ.ละงู จ.สตูล โดยลูกกุ้งระยะซูเอีย ไมซิส จนถึงโพสต์ลาวา 1 อนุบาลด้วยแพลงก์ตอนพืช คือ *Chaetoceros* sp. ส่วนระยะโพสต์ลาวา 5-10 อนุบาลลูกกุ้งด้วยอาร์ทีเมียมีชีวิต เก็บตัวอย่างกุ้งแต่ละบ่อๆ ละ 100 ตัว ตัวอย่างจำนวน 50 ตัว นำมาดองในน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) แล้วนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาตามวิธีการของ Bancroft (1967) แล้วตรวจหาเปอร์เซ็นต์ของลูกกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยกล้องจุลทรรศน์ กุ้งอีก 50 ตัว นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ตามวิธีการของ Belcher และ Yong (1998)

การทดลองที่ 2 การเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น (juvenile) ที่เลี้ยงในบ่อดิน

สำรวจลูกกุ้งจากบ่ออนุบาลระยะโพสต์ลาวา 10-15 ที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีระหว่าง 70-100% โดยวิธีอิมเพลสชั่นเสมียร์ จากบริเวณ อ.สทิงพระ จ.สงขลา เมื่อเกษตรกรซื้อลูกกุ้งจากบ่ออนุบาลที่ตรวจสอบไว้ข้างต้น จำนวน 7 บ่อ ไปเลี้ยงในบ่อดิน จะทำการติดตามการคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดินทุกๆ 1 เดือน จนกระทั่งจับขาย การเก็บตัวอย่างทำโดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากแต่ละบ่อๆ ละ 100 ตัว เก็บดองในน้ำยาเดวิดสันเพื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีและเอชพีวีด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาตามวิธีการของ Bancroft (1967)

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของอาหารชนิดต่างๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ

คัดเลือกลูกกุ้งจากบ่ออนุบาลระยะโพสต์ลาวา 10-15 ที่ปรับลดความเค็มลงเหลือ 12 ส่วนในพันส่วน และการตรวจเบื้องต้นโดยวิธีอิมเพลสชั่นเสมียร์พบติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีระหว่าง 70-100% จำนวน 10,000 ตัว นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาด 100 ลิตร น้ำความเค็ม 12 ส่วนในพันส่วน ความเป็นด่าง 75-80 ส่วนในล้านส่วน และระบบน้ำไหลหมุนเวียน ให้อากาศตลอดเวลา จำนวน 15 ถังๆ ละ 500 ตัว เลี้ยงกุ้งทดลองด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ ชุดการทดลองที่ 1 จำนวน 5 ถัง เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปเบอร์ 1 และ 2 ชุดการทดลองที่ 2 จำนวน 5 ถัง เลี้ยงกุ้งด้วยอาร์ทีเมียโตเต็มวัย และชุดการทดลองที่ 3 จำนวน 5 ถัง เลี้ยงกุ้งด้วยหอยแครงบด นาน 10 สัปดาห์ ในระหว่างการเลี้ยง เก็บตัวอย่างกุ้งจากแต่ละถังทุกๆ 2 สัปดาห์ ถังละ 50 ตัว นำมาดองในน้ำยาเดวิดสันเพื่อเตรียมตัวอย่างตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (Bancroft, 1967)

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ

ลูกกุ้งจากฟาร์มที่เริ่มเพาะอนุบาลตั้งแต่ระยะนอเพลียสในน้ำความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน เมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะไมซีสเลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนพืช *Chaetoceros* sp. อย่างเดียว แล้วปรับให้แพลงก์ตอนพืชและอาร์ทีเมียมีชีวิตในระยะโพสต์ลาวา 1-4 และให้อาร์ทีเมียมีชีวิตอย่างเดียวหลังเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวา 5 แล้วทำการสุ่มลูกกุ้งระยะโพสต์ลาวา 10 จำนวน 20,000 ตัว นำมาอนุบาลในถังไฟเบอร์ขนาด 3 ตัน น้ำความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ด้วยอาร์ทีเมียมีชีวิต พร้อมทั้งปรับลดความเค็มลงวันละ 4-5 ส่วนในพันส่วน จนเหลือ 12 ส่วนในพันส่วน เมื่อเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวา 15 ทำการสุ่มตัวอย่างจำนวน 100 ตัว เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อโดยวิธีอิมเพลสชั่นเสมียร์ พบกุ้งก่อนนำมาทดลองติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี 27.75±0.86% จากนั้นจึงแบ่งกุ้งใส่ถังทดลองขนาด 100 ลิตร จำนวน 24 ถัง ที่กำหนดสภาวะการทดลองแตกต่างกัน 6 ชุดการทดลองๆ ละ 4 ซ้ำคือ

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงในน้ำความเค็ม 12 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 29ºC (สภาวะปกติในโรงเพาะฟักเป็นชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงในน้ำความเค็ม 12 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 25ºC

ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงในน้ำความเค็ม 12 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 34ºC

ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงในน้ำความเค็ม 6 ส่วนในพันส่วน ที่อุณหภูมิ 29ºC

ชุดการทดลองที่ 5 เลี้ยงในน้ำความเค็ม 18 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 29ºC

ชุดการทดลองที่ 6 ใส่กุ้งจำนวน 2,000 ตัว/น้ำ 2 ลิตร ในถุงพลาสติกที่ใช้ขนส่งลูกกุ้งในน้ำความเค็ม 12 ส่วนในพันส่วน แล้วเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ 50 รอบ/นาที (ชุดจำลองสภาวะการขนส่ง)

แบ่งกุ้งชุดการทดลองที่ 1-5 จำนวนชุดละ 2 ถัง เลี้ยงในสภาวะที่กำหนดนาน 12 ชั่วโมง และที่เหลือชุดละ 2 ถัง เลี้ยงในสภาวะการทดลองที่กำหนดนาน 24 ชั่วโมง หลังทดสอบความเครียดตามระยะเวลาที่กำหนดนำลูกกุ้งมาเลี้ยงในสภาวะปกติในน้ำความเค็ม 12 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 29ºC ส่วนชุดการทดลองที่ 6 นำกุ้งจำนวน 2 ถุง เขย่านาน 12 ชั่วโมง และอีก 2 ถุงเขย่านาน 24 ชั่วโมง แล้วทำการวัดปริมาณออกซิเจนหลังการเขย่าตามระยะเวลาที่กำหนด ก่อนย้ายลงเลี้ยงในน้ำความเค็ม 12 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 29ºC หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างกุ้งในแต่ละถังหลังย้ายลงเลี้ยงในถังเลี้ยงที่สภาวะปกติ น้ำความเค็ม 12 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 29ºC นาน 0, 1, 3 และ 7 วัน ถังละ 50 ตัว นำมาดองในน้ำยาเดวิดสันเพื่อเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวาในโรงเพาะฟัก

จากการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำด้วยวิธีพีซีอาร์ไม่พบการติดเชื้อในตัวอย่างกุ้งบ่อ 4 ทุกระยะ ส่วนบ่อที่ 5 และ 6 พบกุ้งระยะนอเพลียสติดเชื้อเอ็มบีวี แต่ไม่พบการติดเชื้อตั้งแต่ซูเอียจนถึงโพสต์ลาวา 10 สำหรับบ่อที่ 1, 2, 3, 7, 8, 9 และ 10 เริ่มพบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกุ้งตั้งแต่ระยะโพสต์ลาวา 1, 5 และ 10 ส่วนการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อวิทยาไม่พบการติดเชื้อในลูกกุ้งทุกระยะจากตัวอย่างบ่อที่ 4, 5 และ 6 แต่พบการติดเชื้อในลูกกุ้งบ่อที่ 1, 2, 3, 7, 8, 9 และ 10 ตั้งแต่ระยะโพสต์ลาวา 1 จนถึงโพสต์ลาวา 10 (Table 1 และ Figure 1)

การทดลองที่ 2 ผลการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น (juvenile) ที่เลี้ยงในบ่อดิน

จากการศึกษาการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อดินจำนวน 7 บ่อ ในพื้นที่ จ.สงขลา จำนวน 5 บ่อ โดยมีบ่อขนาด 2 ไร่ จำนวน 2 บ่อ และ 1.5 ไร่ จำนวน 1 บ่อ บริเวณ ต.ท่านางหอม อ.หาดใหญ่ บ่อขนาด 3.5 ไร่ จำนวน 1 บ่อ บริเวณ ต.บางโหนด อ.หาดใหญ่ และบ่อขนาด 3 ไร่ จำนวน 1 บ่อ ที่ ต.จะโหนง อ.จะนะ บ่อในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ขนาด 3.5 ไร่ จำนวน

Table 1. Percent of MBV infection in various stags of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) sampling from concrete pond culture in hatchery system, diagnosis by PCR and histological technique.

No.	Percent of MBV infection											
	Nauplius		Zoea		Mysis		ostlarva 1		postlarva 5		postlarva 10	
	PCR technique	Histological technique	PCR technique	Histological technique	PCR technique	Histological technique	PCR technique	Histological technique	PCR technique	Histological technique	PCR technique	Histological technique
1	-	0	-	0	-	0	+	47.50±3.5	+	76.92±0.00	+	100±0.00
2	-	0	-	0	-	0	+	37.50±3.53	+	58.12±2.65	+	100±0.00
3	-	0	-	0	-	0	+	11.15±1.63	+	13.27±1.79	+	15.26±6.70
4	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
5	+	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
6	+	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
7	-	0	-	0	-	0	+	44.00±5.65	+	52.00±5.65	+	86.50±4.94
8	-	0	-	0	-	0	+	4.50±0.70	+	90.00±2.82	+	24.81±4.51
9	-	0	-	0	-	0	+	32.30±3.25	+	71.13±8.67	+	90.00±2.82
10	-	0	-	0	-	0	+	49.50±3.53	+	64.00±0.00	+	90.00±2.82

+ = MBV infection; - = non-infection
Value = $\bar{x}$ ± SD (50 shrimp/experiment).

1 บ่อ บริเวณ อ.หัวไทร และพื้นที่จังหวัดสตูล บ่อขนาด 3.5 ไร่ จำนวน 1 บ่อ ของสถานีวิจัยวาริชศาสตร์ อ.ละงู

ผลการศึกษาลูกกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีเริ่มต้น 68.68-96.00% จากการตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้เทคนิคอิมเพลสชั่นเสมียร์เซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกุ้ง และย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน พบลักษณะออกคลูชั่นบอดีมีลักษณะเป็นรูปหลายเหลี่ยมขนาดต่างๆ กัน โดยพบออกคลูชั่นบอดีบางส่วนที่ยังอยู่ในเซลล์ของท่อตับ และบางส่วนที่หลุดออกมาเดี่ยวๆ นอกเซลล์ (Figure 2) เมื่อนำกุ้งมาปล่อยเลี้ยงในบ่อดินนาน 1-3 เดือน พบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในลูกกุ้งทุกบ่อลดลงเมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเริ่มต้น โดยพบการติดเชื้อเฉลี่ยในตัวอย่างเดือนที่ 1 จากบ่อท่านางหอม 1, 2 และ 3 46.91±1.29, 48.83±0.26 และ 41.00±7.07% ตามลำดับ ส่วนบ่อดินบริเวณบางโหนด หัวไทร จะโหนง และละงู กุ้งติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีเฉลี่ย 29.75±1.22, 37.29±1.66, 37.74±3.20 และ 29.00±4.24% ตามลำดับ ในเดือนที่ 2 พบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ คือบ่อท่านางหอม 1, 2 และ 3 เฉลี่ย 46.74±2.23, 44.31±13.71 และ 50.42±6.24% ตามลำดับ บ่อบางโหนด หัวไทร จะโหนง และละงู เฉลี่ย 43.57±0.62, 25.00±16.07, 24.46±3.48 และ 24.47±5.00% ตามลำดับ ส่วนผลการตรวจสอบในเดือนที่ 3 จำนวน 2 บ่อ (5 บ่อเก็บเกี่ยวก่อนกำหนด) พบตัวอย่างจากบ่อท่านางหอม 2 และจะโหนง ติดเชื้อเฉลี่ย 40.87±4.76 และ 21.38± 8.06% ตามลำดับ (Table 2, Figure 3) และพบว่าตัวอย่างกุ้งชุดเดียวกัน ซึ่งไม่พบการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีเลยในช่วงเริ่มต้น แต่เมื่อปล่อยลงเลี้ยงในบ่อดินกลับตรวจพบกุ้งมีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้เพิ่มขึ้นทุกบ่อหลังปล่อยเลี้ยงนาน 1, 2 และ 3 เดือน (Table 3, Figure 4) โดยลักษณะของเซลล์ตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อจากการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตับและตับอ่อนปกติ (Figure 5) จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ พบออกคลูชั่นบอดีของไวรัสเอ็มบีวีในนิวเคลียสของเซลล์ท่อตับและตับอ่อน (Figure 6) และพบการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีในเซลล์ท่อตับและตับอ่อนด้วย โดยสามารถพบอินคลูชั่นบอดีของไวรัสติดสีน้ำเงินของฮีมาท็อกซิลินอยู่ภายในนิวเคลียสเช่นเดียวกัน (Figure 7) นอกจากนี้ยัง

Table 2. Percent of MBV infection in various stages of black tiger shrimp from earthen pond culture, diagnosis by histological technique.

Experimental pond	Intial	Time after reared in earthen pond		
		1 month	2 month	3 month
Tananghom no.1	96.00	46.91±1.29	46.74±2.23	nd
Tananghom no.2	96.00	48.83±0.26	44.31±13.71	40.87±4.76
Tananghom no.3	96.00	41.00±7.07	50.42±6.24	nd
Bangnhode	83.30	29.75±1.22	43.57±0.62	nd
Huasai	72.00	37.29±1.66	25.00±16.07	nd
Janhong	77.00	37.74±3.20	24.46±3.48	21.38±8.06
Langu	68.68	29.00±4.24	24.47±5.00	nd

nd = non detection

Table 3. Percent of HPV infection in various stages of black tiger shrimp from earthen pond culture, diagnosis by histological technique.

Experimental pond	Intial	Time after reared in earthen pond		
		1 month	2 month	3 month
Tananghom no.1	0	0	22.58±18.25	nd
Tananghom no.2	0	0	22.58±18.25	43.03±36.38
Tananghom no.3	0	9.00±12.73	33.23±37.87	nd
Bangnhode	0	12.97±6.80	19.80±0.28	nd
Huasai	0	0	32.95±8.03	nd
Janhong	0	1.00±1.41	29.46±3.59	33.82±22.88
Langu	0	11.00±1.41	16.47±6.31	nd

nd = non detection

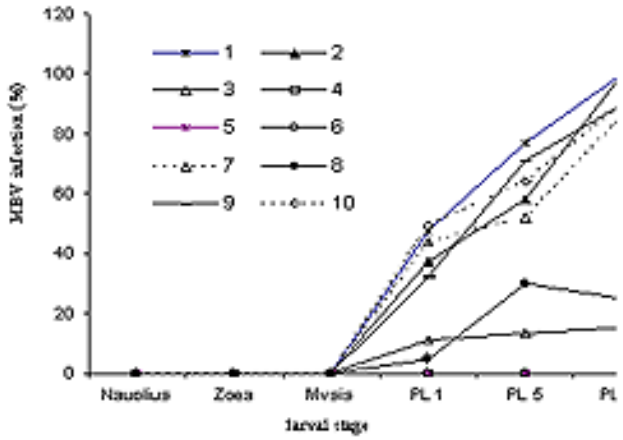

Figure 1. Percent of MBV infection in various stages of larva black tiger shrimp from concrete pond culture in hatchery system, diagnosis by histological technique.

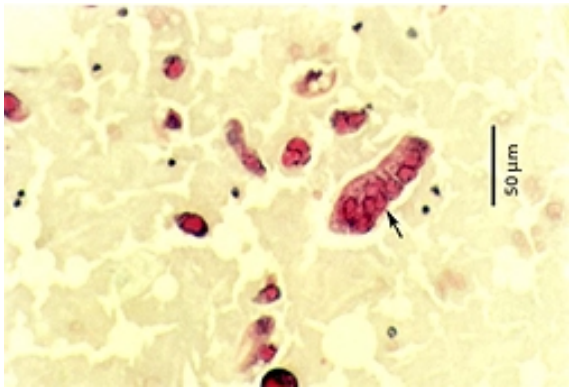

Figure 2. Occlusion bodies feature of *Monodon* baculovirus (MBV) from larva hepato-pancreas prerapation by impression smear technique, arrow indicated the occlusion bodies of virus (H&E, Bar = 50 µm).

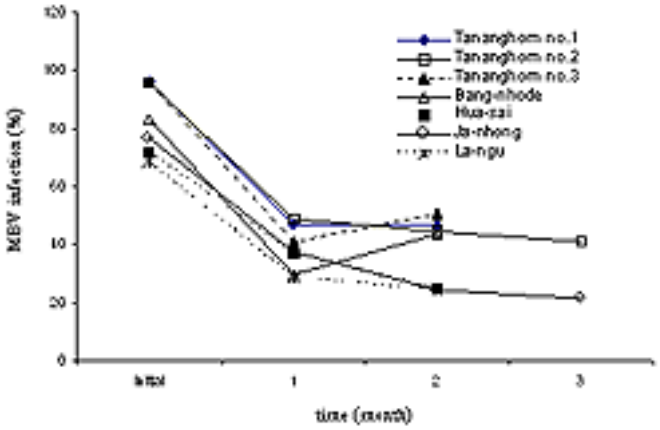

Figure 3. Percent of MBV infection in various stages of black tiger shrimp from earthen pond culture, diagnosis by histological technique.

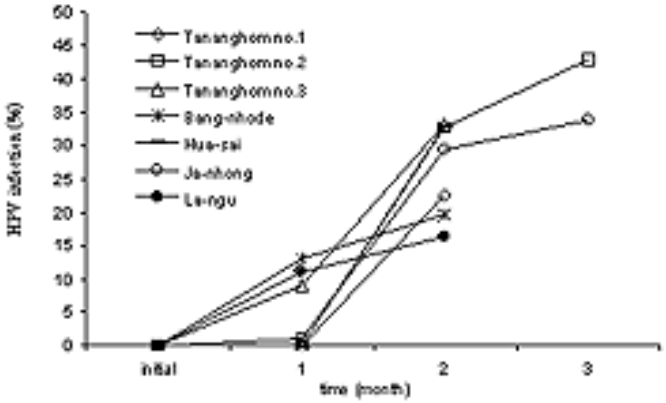

Figure 4. Percent of HPV infection in various stages of black tiger shrimp from earthen pond culture, diagnosis by histological technique.

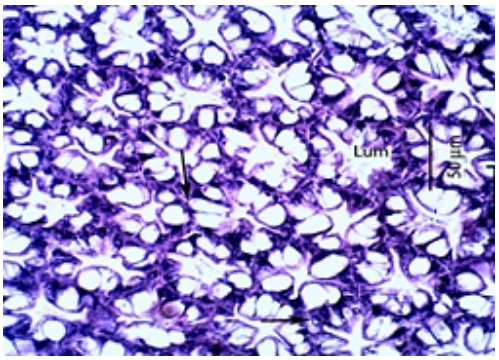

Figure 5. Normal hepatopancreas of *Penaeus monodon* , the figure showed star shape-like of lumen (Lum) and less interspace between hepatpancreatic tubule (arrow) (paraffin section, H&E , Bar = 50 µm).

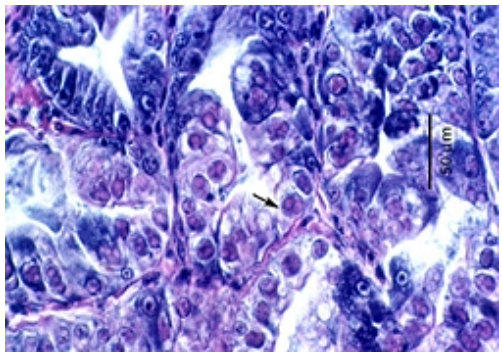

Figure 6. Histopathological feature of hepato-pancreatic tubule of *Penaeus monodon* infected with *Monodon* baculovirus (MBV), the figure showed numerous of eosinophilic occlusion bodies (arrow) (paraffin section, H&E, Bar = 50 µm).

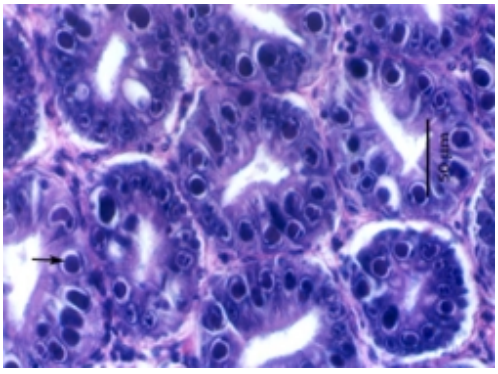

Figure 7. Histopathological feature of hepato-pancreatic tubule of *Penaeus monodon* infected with Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV), the figure showed numerous of basophilic inclusion bodies (arrow) (paraffin section, H&E, Bar = 50 µm).

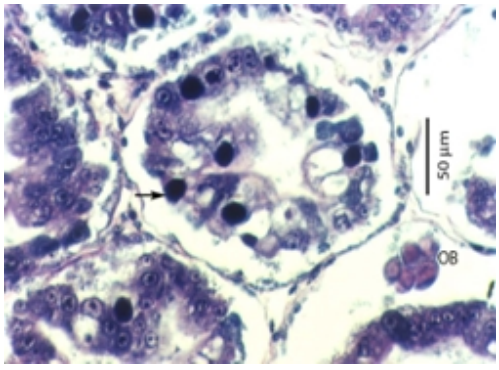

Figure 8. Histopathological feature of *Penaeus monodon*, the figure showed coinfection with *Monodon* baculovirus (MBV) (OB) and Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) (arrow) (paraffin section, H&E , Bar = 50 µm).

Table 4. Percent of MBV infection in experimental shrimp feeding different diets for 10 weeks period, diagnosis by histological technique.

Treatment	Initial	Percent of MBV infection				
		week 2	week 4	week 6	week 8	week 10
T1 (commercial feed)	100.00±0.00^{NS}	71.17±10.48^{b}	68.80±12.54^{ab}	58.25±6.65^{b}	68.19±12.69^{b}	52.81±11.91^{b}
T2 (artemia)	100.00±0.00^{NS}	93.44±9.15^{c}	79.54±5.63^{b}	56.10±2.86^{b}	45.06±11.97^{a}	29.47±7.98^{a}
T3 (minced cockle flesh)	100.00±0.00^{NS}	55.21±9.95^{a}	57.76±14.50^{a}	42.50±9.74^{a}	36.73±12.21^{a}	39.09±12.08^{ab}

Mean values in the same column sharing the same superscript are not significantly different (P>0.05).

Table 5. Percent of MBV infection in black tiger shrimp after being to different stress condition for 12 hours.

Treatment	Percent of MBV infection after stress test			
	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7
T1 12 ppt 29ºC (control)	31.15±8.70^{NS}	45.99±0.22^{NS}	46.64±1.63^{a}	55.97±4.47^{NS}
T2 12 ppt 25ºC	37.77±2.22^{NS}	46.77±6.84^{NS}	59.50±0.70^{b}	59.67±3.02^{NS}
T3 12 ppt 34ºC	37.97±6.56^{NS}	44.36±2.14^{NS}	57.77±6.44^{b}	56.88±3.85^{NS}
T4 6 ppt 29ºC	38.50±14.04^{NS}	55.09±0.36^{NS}	59.28±3.70^{b}	55.97±3.46^{NS}
T5 18 ppt 29ºC	41.53±5.98^{NS}	46.05±6.39^{NS}	58.30±6.14^{b}	59.54±5.46^{NS}
T6 transportation condition	37.62±9.01^{NS}	53.99±10.06^{NS}	54.37±3.91^{b}	59.59±7.51^{NS}

Initial of MBV infection in experimental shrimp is 27.75±0.86%.
Mean values in the same column sharing the same superscript are not significantly different (P>0.05).

Table 6. Percent of MBV infection in black tiger shrimp after being to different stress condition for 24 hours.

Treatment	Percent of MBV infection after stress test			
	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7
T1 12 ppt 29ºC (control)	42.55±13.04^{NS}	51.53±2.16^{NS}	60.89±3.44^{NS}	54.14±1.35^{a}
T2 12 ppt 25ºC	60.72±0.54^{NS}	58.52±2.56^{NS}	62.71±4.44^{NS}	67.63±5.37^{bc}
T3 12 ppt 34ºC	54.42±0.82^{NS}	55.46±5.52^{NS}	62.37±2.13^{NS}	62.21±2.00^{ab}
T4 6 ppt 29ºC	46.95±0.93^{NS}	56.50±3.41^{NS}	61.75±1.82^{NS}	66.68±6.31^{bc}
T5 18 ppt 29ºC	52.96±9.06^{NS}	58.78±1.11^{NS}	59.88±2.99^{NS}	68.78±1.10^{bc}
T6 transportation condition	55.98±0.60^{NS}	57.11±4.068^{NS}	62.77±2.35^{NS}	73.61±1.25^{c}

Initial of MBV infection in experimental shrimp is 27.75±0.86%.
Mean values in the same column sharing the same superscript are not significantly different (P>0.05).

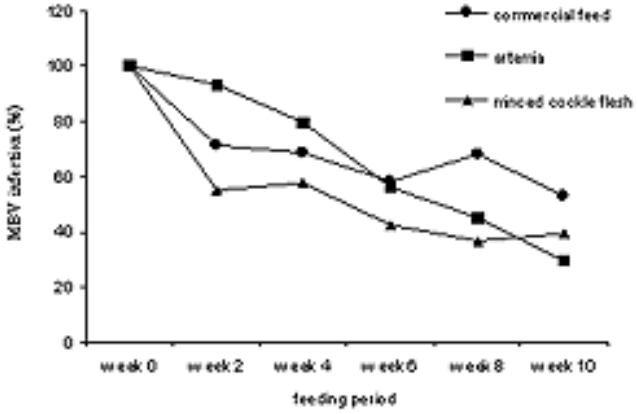

Figure 9. Percent of MBV infection in experimental shrimp feeding different feed for 10 weeks period, diagnosis by histological technique.

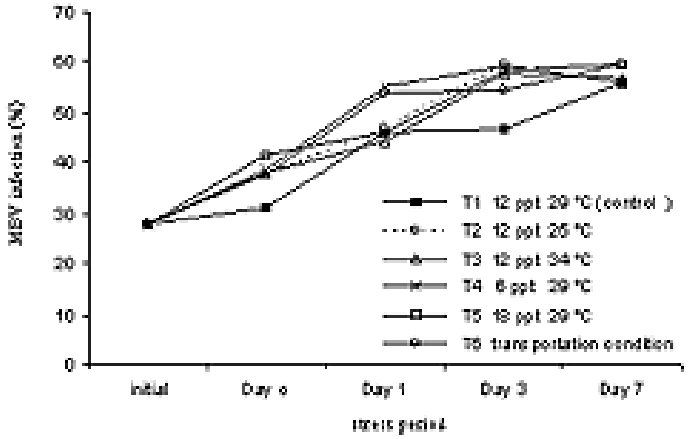

Figure 10. Percent of MBV infection in black tiger shrimp after being to different stress condition for 12 hours.

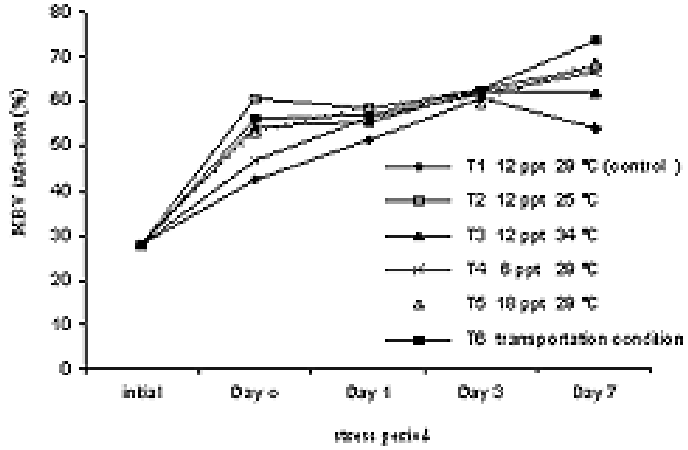

Figure 11. Percent of MBV infection in black tiger shrimp after being to different stress condition for 24 hours.

พบการติดเชื้อร่วมของไวรัสเอ็มบีวีและเอชพีวีในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน (Figure 8)

การทดลองที่ 3 ผลของอาหารชนิดต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ

การศึกษาให้กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีเริ่มต้นเฉลี่ย 100% ได้รับอาหารต่างชนิดกัน 2 สัปดาห์ พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับหอยแครงบดมีปริมาณการติดเชื้อในประชากรลดลงมากที่สุดเฉลี่ย 55.21±9.95% รองลงมาได้แก่ กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปและอาร์ทีเมียที่มีปริมาณการติดเชื้อเฉลี่ย 71.17±10.48 และ 93.44±9.15% หลังกุ้งได้รับอาหารนาน 4 สัปดาห์ พบการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อในประชากรโดยมีค่าเฉลี่ย 68.80±12.54, 79.54±5.63 และ 57.76±14.50% ในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูป อาร์ทีเมีย และหอยแครงบด ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลองพบกุ้งที่ได้รับหอยแครงบดติดเชื้อน้อยที่สุดเฉลี่ย 42.50±9.74% ส่วนผลการตรวจสอบในสัปดาห์ที่ 8 และ 10 พบเปอร์เซ็นต์การ

ติดเชื้อในลูกกุ้งที่ได้รับอาร์ทีเมียและหอยแครงบดเฉลี่ย 45.06±11.97 และ 36.73±12.21 ในสัปดาห์ที่ 8 และ 29.47±7.98 และ 39.09±12.08% ในสัปดาห์ที่ 10 ซึ่งมีค่าต่ำกว่ากุ้งที่อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีการติดเชื้อเฉลี่ย 68.19±12.69% ในสัปดาห์ที่ 8 และ 52.81±11.91% ในสัปดาห์ที่ 10 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (Table 4, Figure 9)

การทดลองที่ 4 ผลของความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกุ้งที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเฉลี่ยเริ่มต้น 27.75 ±0.86% เมื่อได้รับความเครียดที่สภาวะต่างๆ นาน 12 ชั่วโมง พบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อหลังย้ายลงเลี้ยงในสภาวะปกติ 0 และ 1 วัน ในแต่ละชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่พบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในแต่ละชุดการทดลองเพิ่มขึ้นแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในวันที่ 3 โดยชุดการทดลองที่ 1 ติดเชื้อน้อยที่สุด 46.64± 1.68% ตามด้วยชุดการทดลองที่ 6, 3, 5, 4 และ 2 ที่มีค่าเฉลี่ย 54.37± 3.91, 57.77±6.44, 58.30±6.14, 59.28 ±3.70 และ 59.50±0.70% ตามลำดับ แต่หลังการย้ายลงเลี้ยงในสภาวะปกตินาน 7 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในลูกกังทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (Table 5, Figure 10)

สำหรับกุ้งที่ได้รับความเครียดในสภาวะต่างกันนาน 24 ชั่วโมง พบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในตัวอย่างที่เก็บในวันที่ 0, 1 และ 3 วัน ของแต่ละชุดการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ขณะที่เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในแต่ละชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) หลังนำมาเลี้ยงในสภาวะปกติครบ 7 วัน โดยพบกุ้งชุดการทดลองที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อน้อยที่สุด 54.14±1.35 % ตามด้วยชุดการทดลองที่ 3, 4, 2 และ 5 ที่มีค่าเฉลี่ย 62.21±2.00, 66.68±6.31, 67.33±5.37 และ 68.78±1.10% ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ 6 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมากที่สุด 73.61±1.25% (Table 6, Figure 11)

สำหรับค่าออกซิเจนละลายน้ำในชุดการทดลองที่ 6 ที่อยู่ในสภาวะการจำลองการขนส่งหลังจากทดสอบความเครียดที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.12 และ 1.63 มก./ลิตร

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวาในโรงเพาะฟัก

จากการทดลองที่ 1 ที่ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกุ้งด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา และพบว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในลูกกุ้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวา 1 สอดคล้องกับรายงานของ Ramasamy และคณะ (1995) ที่สำรวจการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำวัยอ่อนจนถึงระยะโพสต์ลาวาจากธรรมชาติของประเทศฟิลิปปินส์และตาฮิติ พบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งระยะโพสต์ลาวา 5-40 แสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำในระยะวัยอ่อนตั้งแต่ระยะนอเพลียสถึงไมซิส มักมีการติดเชื้อน้อยและความรุนแรงต่ำ ซึ่งอาจทำให้การตรวจวินิจฉัยพบได้ยาก หรือไม่พบการติดเชื้อเลย จนกระทั่งเมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวา จะพบกุ้งที่ติดเชื้อและมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกุ้งที่เลี้ยงในโรงเพาะฟัก อาจจะเกิดจากการที่พ่อแม่พันธุ์ปล่อยออกคลูชั่นบอดีออกมาภายนอก แล้วมีการปนเปื้อน หรือติดอยู่บนเปลือกไข่จนไปสู่ถังอนุบาล หลังเข้าสู่ระยะซูเอียกุ้งเริ่มกินอาหาร ออกคลูชั่นบอดีที่มีขนาดเล็กอาจจะถูกกินเข้าไป เมื่อไวรัสเพิ่มจำนวนและสร้างออกคลูชั่นบอดีมากขึ้นในเซลล์ตับและตับอ่อน ก็จะปล่อยอนุภาคไวรัสหรือออกคลูชั่นบอดีผ่านทางเดินอาหารและออกสู่ภายนอกตัวกุ้ง จึงทำให้มีการถ่ายทอดเชื้อจากตัวหนึ่งไปยังตัวหนึ่งจนมีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว เหมือนกับรายงานที่เกิดกับแบคคูโลไวรัสในตัวอ่อนแมลง (Faulkner, 1981) ไวรัสบีเอ็มเอ็น (BMN) ในกุ้งคุรูม่า (Momoyama and Sano, 1989) รวมทั้งการติดเชื้อไวรัส *Cherax giardiavirus*-like virus (CGV) ในเครย์ฟิช *(Cherax quadricarinatus)* ที่พบเครย์ฟิชติดเชื้อดังกล่าวเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะ 3 ซึ่งเป็นระยะที่เริ่มให้อาหาร และการติดเชื้อจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หลังจากนั้น (Edgerton and Owens, 1997)

ส่วนการพบเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในระยะนอเพลียสจากการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ แต่ไม่พบติดเชื้อในระยะซูเอีย

จนถึงโพสต์ลาวาในบางตัวอย่าง อาจเป็นผลเนื่องจากการปนเปื้อนของออกคลูชั่นบอดีหรืออนุภาคไวรัสที่ติดมาจากพ่อแม่พันธุ์ หรือการปนเปื้อนจากอุปกรณ์ เช่น ถังเพาะฟักจากการใช้งานในครั้งก่อนๆ ซึ่งแม้ว่าจะมีปริมาณไม่มาก แต่สามารถที่จะตรวจพบได้โดยใช้วิธีที่มีความไวสูง เช่น เทคนิคพีซีอาร์ ในขณะที่การตรวจสอบด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยากลับไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางสภาพของเนื้อเยื่อตับ ซึ่งในกรณีของการทดลองนี้เชื้ออาจปนเปื้อนในปริมาณไม่มาก และโดยปกติผู้ประกอบการมักใช้ฟอร์-มาลีน ไอโอโดฟอร์ รวมทั้งคลอรีนฆ่าเชื้อและทำความสะอาดอุปกรณ์ต่างๆ เชื้อที่ติดมาในตัวอย่างเดียวกันจึงถูกทำลายไป จึงไม่พบการติดเชื้อในระยะต่อๆ มา ซึ่ง Chen และคณะ (1992) กล่าวว่าการนำนอเพลียสหรือไข่กุ้งที่เพิ่งฟักแช่ในฟอร์มาลีนที่มีความเข้มข้น 200-300 ส่วนในล้านส่วน หรือไอโอโดฟอร์ที่ความเข้มข้น 20-30 ส่วนในล้านส่วน เป็นเวลาสั้นๆ แล้วเลี้ยงในน้ำทะเลที่สะอาด จะช่วยยืดเวลาการติดเชื้อ หรือช่วยไม่ให้ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีได้ ดังนั้นการฆ่าเชื้อที่อาจปนเปื้อนมาจากภายนอกรวมไปถึงการจัดการที่ดีในโรงเพาะฟัก จะเป็นวิธีที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในโรงเพาะฟักได้ นอกจากนี้ถ้ามีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติก่อนนำมาใช้ในโรงเพาะฟักร่วมกับการจัดการลูกพันธุ์ดังวิธีที่กล่าวมาข้างต้น ก็จะทำให้ป้องกันการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีได้ดียิ่งขึ้น เช่นเดียวกับที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสบีเอ็มเอ็น (BMN) ในกุ้งคุรูม่าได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Momoyama and Sano, 1989)

2. การเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น (juvenile) ที่เลี้ยงในบ่อดิน

จากผลการทดลองพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีของกุ้งกุลาดำลดลง แต่พบการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงกุ้งในบ่อดินนานขึ้น มีความสอดคล้องกับรายงานของ Ramasamy และคณะ (1995) ที่ทำการสำรวจกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 20-37 พบว่าเมื่อกุ้งอายุมากขึ้น เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีจะลดลง แต่การติดเชื้อไวรัสเอชพีวีจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น ขณะที่ Leblanc และ Overstreet (1990) พบว่าเมื่อให้กุ้งขาวแปซิฟิก (*Penaeus vannamei*) ระยะต่างกันได้รับเชื้อไวรัสบีพีโดยผ่านอาร์ทีเมียที่มีเชื้อ พบว่ากุ้งอายุต่างกันจะมีระยะการติดเชื้อแต่ยังไม่แสดงอาการของโรค (patent period) ต่างกัน โดยกุ้งระยะวัยอ่อนอาจมีระยะเวลาดังกล่าว 1 ถึง 2 วัน แต่จะใช้เวลานานขึ้นเป็น 5 และ 7-8 วัน ในกุ้งระยะโพสต์ลาวา 5 และ 1 เดือน ส่วนในกุ้งที่มีอายุมากกว่า 6 เดือน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสบีพี แสดงให้เห็นว่าความต้านทานโรคของกุ้งที่อายุมากขึ้นจะสัมพันธ์กับระยะการติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งจะมีระยะเวลานานมากขึ้น และบางครั้งก็ไม่มีการติดเชื้อเกิดขึ้น การที่กุ้งซึ่งมีอายุมากขึ้นติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีลดลง อาจเป็นเพราะกุ้งมีความต้านทานต่อโรคมากขึ้น หรือกุ้งอาจมีการยอมรับเชื้อแต่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพก็เป็นได้ ซึ่ง Lightner และคณะ (1987) กล่าวว่าการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำจะไม่เกิดขึ้นถ้าได้รับการดูแลจัดการที่เหมาะสมตั้งแต่ในโรงเพาะฟัก รวมทั้งส่งผลให้กุ้งมีอัตรารอดและการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นทั้งระยะอนุบาลและการเลี้ยงในบ่อดิน

3. ศึกษาผลของอาหารชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างกันของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในกุ้งที่ได้รับอาหารต่างกัน โดยพบว่ากุ้งชุดที่ได้รับอาหารสดทั้งอาร์ทีเมียและหอยแครงบดมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อที่มีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยชุดที่ได้รับอาร์ทีเมียมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อน้อยที่สุดในสัปดาห์ที่ 10 จากผลดังกล่าวคาดว่าอาหารสดมีคุณค่าอาหารที่ดีและเหมาะสม ทำให้กุ้งมีสุขภาพดี สามารถที่จะต้านทานต่อการติดเชื้อได้มากกว่ากุ้งชุดอื่นๆ ซึ่ง Vogt และคณะ (1986) กล่าวว่ากุ้งที่มีภาวะทุพโภชนาการจะติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี แต่หลังจากที่ให้กุ้งกินอาหารที่สมบูรณ์เพียง 4 วัน กลับไม่พบอนุภาคไวรัสเอ็มบีวีภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ จึงเชื่อว่าเมื่อกุ้งได้รับโภชนาการที่ดีจะช่วยต้านทานการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยต่างๆ กล่าวว่าอาร์ทีเมียมีชีวิตระยะโตเต็มวัยเป็นหนึ่งในอาหารที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงลูกปลาและครัสตาเชียนวัยอ่อน (Millikin *et al*., 1980; Lellis, 1992; Soundarapandian *et al*., 1998)

แม้ยังไม่มีรายงานที่กล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อในตัวสัตว์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางภูมิคุ้มกันเมื่อได้รับอาหารต่างๆ กัน อย่างไรก็ตามเป็นไปได้ว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาร์ทีเมียและหอยแครงบด อาจกินและใช้ประโยชน์จากอาหารได้มากกว่ากุ้งชุดที่ได้รับอาหารสำเร็จรูป ทำให้สุขภาพกุ้งดีขึ้นด้วย จึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อลดลง โดย Kolkovski และคณะ (1997) พบว่าอาหารมีชีวิตและอาหารสดจะมีความน่ากินมากกว่าอาหารสำเร็จรูป โดยเฉพาะอาร์ทีเมียจะมีกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) บางตัว เช่น ไกลซีน (glycine) อะลานีน (alanine) อาร์จีนีน (arginine) และเบตาอีน (betaine) ซึ่งมีผลกระตุ้นให้ปลา gilthead seabream กินอาหารได้มากขึ้น ในขณะที่ Wickins (1972) พบว่าการอนุบาลลูกกุ้ง *Palaemon serratus* วัยอ่อนด้วยอาร์ทีเมียทำให้กุ้งมีพัฒนาการจากระยะวัยอ่อนถึงระยะโพสต์ลาวาอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ นอกจากนี้ในอาหารสดยังมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เกิดจากการสลายตัวของโปรตีนในอาหารสด (autolysis) ทำให้อาหารสามารถย่อยและดูดซึมได้เร็วกว่าอาหารสำเร็จรูป นอกจากนี้น่าจะเป็นผลมาจากการกินอาหารของกุ้งที่ขึ้นอยู่กับความสามารถในการย่อยของอาหารชนิดต่างๆ หรือความว่างของกระเพาะด้วย โดยอาหารที่มีลักษณะนุ่มสามารถย่อยได้เร็วกว่าอาหารที่แข็ง มีรายงานว่ากุ้งกุลาดำสามารถย่อยอาหารในกระเพาะได้ 53% ภายใน 1 ชั่วโมง (Marte, 1980) ในขณะที่กุ้ง *P. setiferus* สามารถย่อยโปรตีนจากหอยนางรมได้หมดภายใน 2-3 ชั่วโมง (McTigue and Feller, 1989) อาหารที่ย่อยได้ดีกว่าจะถูกย่อยหมดก่อนจึงทำให้กระเพาะอาหารว่างเร็วขึ้นพร้อมที่จะกินอาหารได้มากกว่า ดังนั้นการควบคุมปัจจัยทางด้านอาหารให้มีความเหมาะสมกับความต้องการของกุ้งจะช่วยให้กุ้งมีความต้านทานต่อการติดเชื้อมากขึ้น

4. ศึกษาผลของความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ

จากผลการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของเชื้อในประชากรกุ้งกุลาดำหลังการทดสอบความเครียดที่สภาวะต่างๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเลี้ยงในสภาวะปกตินาน 3 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับสภาวะเครียดมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเฉลี่ยมากกว่าชุดควบคุม ซึ่งชี้ให้เห็นว่าความเครียดมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ แต่หลังจากทดสอบความเครียดแล้วนำกุ้งกลับมาเลี้ยงต่อในสภาวะปกติ 7 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อจากทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะลูกกุ้งสามารถปรับตัวและกำจัดเชื้อออกจากตัวได้ โดย Samocha และคณะ (1998) กล่าวว่าอายุของกุ้งเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อความสามารถในการต้านทานต่อความเครียด โดยพบว่าลูกกุ้งขาวแปซิฟิกระยะโพสต์ลาวา 7 มีความสามารถในการต้านทานต่อความเครียดได้มากกว่ากุ้งวัยอ่อน ในขณะที่ Saoud และคณะ (2003) พบว่ากุ้งชนิดเดียวกันระยะโพสต์ลาวา 15 และ 20 มีความสามารถในการทนทานต่อสภาวะความเค็มต่ำได้ดีกว่าลูกกุ้งระยะโพสต์ลาวา 10 และเนื่องจากลูกกุ้งที่ศึกษาในครั้งนี้เป็นระยะโพสต์ลาวา 13 จึงเป็นไปได้ที่ลูกกุ้งจะมีความสามารถต้านทานต่อความเครียดได้ดี ทำให้ไม่พบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกุ้งอย่างชัดเจน

ส่วนการทดสอบความเครียดที่สภาวะต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเฉลี่ยในชุดการทดลองโดยเฉพาะชุดที่จำลองสภาวะการขนส่งมากกว่าชุดควบคุมนั้น อาจเป็นเพราะกุ้งที่อยู่ในสภาวะที่มีความเครียดจากความหนาแน่นสูง (1000 ตัว/ลิตร) ประกอบกับค่าออกซิเจนละลายน้ำต่ำ (1.63 มก./ลิตร) เป็นเวลานานจึงทำให้การติดเชื้อเพิ่มขึ้น ซึ่ง กิจการ และคณะ (2543) พบว่ากุ้งกุลาดำมีปริมาณเม็ดเลือดรวม การทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส และเปอร์เซ็นต์การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดลดลง เมื่ออยู่ในสภาวะออกซิเจนละลายน้ำต่ำ (0.9-1.2 มก./ลิตร) หรืออุณหภูมิต่ำ (25ºC) ซึ่งปัจจัยดังกล่าวน่าจะทำให้กุ้งมีโอกาสติดเชื้อได้มากขึ้น สอดคล้องกับ Liao และคณะ (1988) ที่รายงานว่าความหนาแน่น การให้อากาศ อุณหภูมิน้ำ ความเค็ม คุณภาพน้ำ รวมทั้งของเสียที่สัตว์ปล่อยออกมาเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลให้เกิดความเครียดในการขนส่งกุ้งครุ่มา และ Kautsky และคณะ (2000) พบว่าการเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้างของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ออกซิเจน ความเค็ม และอุณหภูมิ จะเพิ่มความเครียดให้กับกุ้ง ทำให้กุ้งมีการยอมรับต่อเชื้อและเกิดโรคได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตามความสามารถในการ

ต้านทานต่อสภาวะความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงความเค็มขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของกุ้งด้วย เช่น Bray และคณะ (1994) พบว่ากุ้งขาวแปซิฟิกสายพันธุ์จากเอกวาดอร์มีความสามารถในการทนทานต่อสภาวะความเค็มต่ำได้ดีกว่าสายพันธุ์จากเม็กซิโก ในขณะที่กุ้งกุลาดำและกุ้งกุลาลายสายพันธุ์ที่เลี้ยงในตะวันออกกลางสามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่มีความเค็มสูง ดังนั้นการควบคุมสภาวะต่างๆ ในระหว่างการเลี้ยง หรือการขนส่งลูกกุ้งระยะที่มีความแข็งแรง รวมทั้งการควบคุมปัจจัยแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้เหมาะสม จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้ประกอบการจะต้องคำนึงถึง เพราะปัจจัยดังกล่าวจะช่วยลดโอกาสการติดเชื้อในกุ้งลงได้ทางหนึ่ง

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำในครั้งนี้ทำให้ทราบว่ากุ้งกุลาดำจะมีการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีโดยจะเริ่มติดเชื้อเมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวา 1 ซึ่งเป็นระยะที่เริ่มกินอาหาร และการติดเชื้อจะมีความรุนแรงมากขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวา 5 และ 10 แต่ทั้งนี้การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีจะเริ่มลดลงหลังนำกุ้งไปเลี้ยงในบ่อดิน ซึ่งเป็นระบบการเลี้ยงที่มีกุ้งหนาแน่นน้อยกว่าบ่ออนุบาล และน่าจะทำให้กุ้งมีความต้านทานต่อโรคไวรัสเอ็มบีวีมากขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่าการคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในตัวกุ้งกุลาดำยังขึ้นกับปัจจัยแวดล้อมต่างๆ เช่น ชนิดของอาหารที่กุ้งได้รับ โดยพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสดคืออาร์ทีเมียและหอยแครงบดจะมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกลุ่มประชากรน้อยกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูป และพบลูกกุ้งที่ได้รับความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความเค็มในช่วงกว้าง รวมทั้งการลดลงของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการขนส่ง จะมีการยอมรับต่อเชื้อไวรัสเอ็มบีวีได้มากขึ้น โดยพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในกลุ่มประชากรของกุ้งชุดที่ได้รับการทดสอบความเครียดสูงกว่ากุ้งชุดควบคุม ดังนั้นระบบการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติที่ปลอดเชื้อก่อนนำมาใช้ในโรงเพาะฟัก การดูแลปัจจัยในการผลิตลูกพันธุ์ เช่น การควบคุมความสะอาดของโรงเพาะฟัก การฆ่าเชื้ออุปกรณ์ น้ำที่ใช้ และพาหะที่อยู่ในน้ำทะเลก่อนนำมาใช้ การตรวจวินิจฉัยโรคเพื่อคัดเลือกลูกกุ้งที่ติดเชื้อน้อย หรือปลอดเชื้อ รวมทั้งการควบคุมปัจจัยแวดล้อมต่างๆ ในระบบการเลี้ยงทั้งบ่ออนุบาลและบ่อดินให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม รวมทั้งใช้วิธีการขนส่งที่สามารถรักษาระดับของออกซิเจนไม่ให้ลดลงมากเกินไป จะเป็นแนวทางที่สามารถลดการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในระดับประชากร และการคงอยู่ของเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, และนเรศ ซ่วนยุก. 2543. ผลของอุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ และความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22(ฉบับพิเศษ): 605-613.

Bancroft, J.D. 1967. Histochemical Techniques. London: Butterworths.

Belcher, C.R. and Yong, P.R. 1998. Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* postlarvae. J. of Virol. Met. 74: 21-29.

Bray, W.A., Lawrence, A.L. and Leung-Trujillo, J.R. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. Aquacult. 122: 133-146.

Chang, P.S. and Chen, S.N. 1994. Effect of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) on survival and growth of larval *Penaeus monodon* Fabricius. Aquacult. 24: 311-317.

Chen, S.N., Chang, P.S., Kou, G.H. and Lightner, D.V. 1989. Studies on virogenesis and cytopathology of *Penaeus monodon* Baculovirus (MBV) in the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and the red tail prawn (*Penaeus penicillatus*). Fish Pathol. 24: 89-100.

Chen, S.N., Chang, P.S. and Kou, G.H. 1992. Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. **In**: Diseases of Cultured Peneaid Shrimp in Asia and the United States. pp.177-184. Fulks, W. and Main, K.L. (eds.). Oceanic Institute Hawaii.

Edgerton, B.F. and Owens, L. 1997. Age at first infection of *Cherax quadricarinatus* by *Cherax quadricarinatus* bacilliform virus and *Cherax giardiavirus*-like virus, and production of putative virus free crayfish. Aquacult. 152: 1-12.

Faulkner, P. 1981. Baculovirus. **In:** Pathogenesis of Invertebrate Diseases. pp. 3-37. Davidson , E.W. (ed.). Allanheld, Osmum, N.J.

Kautsky, N., Ronnback, P. and Tedengren, M. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquacult. 191: 145-161.

Kolkovski, S., Koven, W. and Tandler, A. 1997. The mode of action of artemia in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Aquacult. 155: 193-203.

Leblanc, B.D. and Overstreet, R.M. 1990. Prevalence of *Baculovirus penaei* in experimentally infected white shrimp (*Penaeus vannamei*) relative to age. Aquacult. 87: 237-242.

Lellis, W.A. 1992. A standard reference diet for crustacean nutrition research: 6. Response of postlarval stages of the Carribbean king crab *Mithrax sponosissimus* and the spiny lobster *Panulirus argus*. World Aquacult. Soc. 23: 1-7.

Liao, I.C., Kumeno, F., Iida, Z. and Kobayashi, T. 1988. The application of artificial plankton B.P. in *Penaeus monodon* larval production. 19th Annu. Meet. World Aquacult. Soc. (In abstract)

Lightner, D.V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquacult. Soc., Baton Rouge, Louisiana, USA.

Lightner, D.V., Hedrick, R.P., Fryer, J.L., Chen, S.N., Liao, I.C. and Kou, G.H. 1987. A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. Fish Pathol. 22: 127-140.

Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1981. A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. Invertebr. Pathol. 38: 299-302.

Lightner, D.V., Redman, R.M. and Bell, T.A. 1983. Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. Aquacult. 32: 209-233.

Lin, C.K. and Nash, G.L. (compilers) 1996. Asian News Collected Volume, 1989-1995. Bangkok, Thailand. Asian Shrimp Culture Council.

Marte, C.L. 1980. The food and feeding habit of *Penaeus monodon* collected from Makato river, Aklan, Philippines. Crustaceans 38: 225-236.

McTigue, T.A. and Feller, R.J. 1989. Feeding of juvenile white shrimp *Penaeus setiferus*: periodic or continuous?. Mar. Ecol. Progress Series. 52: 227-233.

Millikin, M.R., Biddle, G.N., Siewicki, T.C., Forner, A.R. and Fair, P.H. 1980. Effect of various level of dietary protein on survival, molting frequency and growth of juvenile blue crabs (*Calinectes sapidus*). Aquacult. 19: 149-161.

Momoyama, K. and Sano, T. 1989. Developmental stages of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* Bate, susceptibility to baculoviral mid-gut gland necrosis (BMN) virus. Fish Dis. 12: 585-589.

Ramasamy, P., Brennan, G.P. and Jayakumar, R. 1995. A record and prevalence of *Monodon baculovirus* from postlarval *Penaeus monodon* in Madras, India. Aquacult. 130: 129-135.

Samocha, T.M., Guajardo, H., Lawrence, A.L., Castille, F.L., Speed, M., McKee, D.A. and Page, K.I. 1998. A simple stress test for *Penaeus vannamei* postlarvae. Aquacult. 165: 233-242.

Saoud, I.P., David, D.A. and Rouse, D.B. 2003. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. Aquacult. 217: 373-383.

Soundarapandian, P., Kannupandi, T. and Samuel, M. J. 1998. Effects of feeds on digestive enzymes of juveniles *Macrobrachium malcolmsonii*. Idian J. of Exp. Mar. Biol. 36: 720-723. (In abstract)

Vogt, G., Quinitio, E.T. and Pascual, F.P. 1986. *Leucaena leucocephala* leaves in formulated feed for *Penaeus monodon*: a concrete example of histology in nutrition research. Aquacult. 59: 209-234.

Wickins, J.F. 1972. The food value of brine shrimp, *Artemia salina* L., to larvae of the prawn, *Palaemon serratus* Pennant. Exp. Mar. Biol. and Ecol. 10: 151-170.