ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)
ปริญญา

วิทยาศาสตร์การประมง — **สาขา**

ชีววิทยาประมง — **ภาควิชา**

เรื่อง ผลของอุณหภูมิต่อความรุนแรงของไวรัสดวงขาว (White Spot Syndrome Virus) ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

The Effects of Temperature on the Virulence of White Spot Syndrome Virus in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

นามผู้วิจัย นายสุธี วงศ์มณีประทีป

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....
(รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา ....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, M.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....
(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ .... **เดือน** .... **พ.ศ.** ....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของอุณหภูมิต่อความรุนแรงของไวรัสดวงขาว (White Spot Syndrome Virus) ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

The Effects of Temperature on the Virulence of White Spot Syndrome Virus in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

โดย

นายสุธี วงศ์มณีประทีป

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุธี วงศ์มณีประทีป 2553: ผลของอุณหภูมิต่อความรุนแรงของไวรัสดวงขาว (White Spot Syndrome Virus) ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D. 202 หน้า

การวิจัยเพื่อประเมินผลของอุณหภูมิของน้ำต่อความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสดวงขาว (white spot syndrome virus; WSSV) ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) โดยให้กุ้งขนาด 5-6 กรัม ได้รับเชื้อจากการกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV จากการฉีดเชื้อ WSSV เข้าทางกล้ามเนื้อและเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ส่วนในลูกกุ้งระยะโพสลาร์วา 15 (PL_{15}) จะทำให้ติดเชื้อโดยเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV สุ่มกุ้งเพื่อยืนยันการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR วิธี immunochromatographic test strip การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay ในการทดลองที่ 1 ศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำ 24-25, 28-29 และ 32-33 °C ต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวขนาด 5-6 กรัม และลูกกุ้งระยะ PL_{15} จากวิธีการที่กล่าวมาแล้ว ผลการศึกษาที่ 24-25 และ 28-29 °C เชื้อ WSSV ทำให้กุ้งทั้งสองขนาดตายหมดภายใน 7 วัน ส่วนที่ 32-33 °C ไม่มีกุ้งป่วยและตาย ในการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำ 32-33 °C ต่อความรุนแรงของการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวทั้งสองขนาด หลังจากกุ้งขาวขนาด 5-6 กรัม ได้รับเชื้อ WSSV แล้วแบ่งเป็น 5 กลุ่ม โดยเลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 28-29 °C เป็นเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 °C ส่วนกลุ่มควบคุมจะเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 °C จนสิ้นสุดการทดลอง พบว่า มีเพียงกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 28-29 °C นาน 0 และ 12 ชั่วโมง ก่อนที่จะเพิ่มอุณหภูมิเป็น 32-33 °C ไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น ส่วนกุ้งขาวขนาด 5-6 กรัม และลูกกุ้งระยะ PL_{15} ที่ได้รับเชื้อ WSSV จากการกินกุ้งที่ติดเชื้อและเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV แล้วเลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 32-33 °C เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน และกุ้งที่ฉีดเชื้อ WSSV แล้วเลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 32-33 °C เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 และ 14 วัน ก่อนที่จะลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 °C และกลุ่มควบคุมที่อุณหภูมิอยู่ที่ 32-33 °C จนสิ้นสุดการทดลอง พบว่า กุ้งในกลุ่มที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิ 32-33 °C เป็นเวลา 7 วัน หลังจากกินกุ้งที่ติดเชื้อและเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 °C และกุ้งในกลุ่มที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิ 32-33 °C เป็นเวลา 14 วัน หลังจากฉีดเชื้อ WSSV ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 °C ไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น สำหรับการทดลองที่ 3 ศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำ 32-33 °C ต่อการทำให้เชื้อ WSSV หมดไปในกุ้งขาวขนาด 5-6 กรัม ที่ได้รับเชื้อ WSSV แล้วแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 28-29 และ 32-33 °C โดยสุ่มกุ้งแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14 และ 21 หลังจากได้รับเชื้อ WSSV ยืนยันการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้ว ผลการศึกษาตรวจไม่พบการติดเชื้อ WSSV ในวันที่ 7 จากวิธีให้กินกุ้งที่ติดเชื้อ วันที่ 14 จากวิธีฉีดเชื้อและวันที่ 7 จากการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ ในการทดลองที่ 4 ศึกษาผลของการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่แตกต่างกันต่อความรุนแรงของการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวขนาด 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 °C หลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร 10, 20 และ 30 % ที่มีปริมาณ WSSV $1x10^4$, $2x10^4$ และ $3x10^4$ copies/ml ตามลำดับ สังเกตอาการป่วยและอัตราการตาย พบว่าที่ 24-25 และ 28-29 °C ที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 10 % มีอัตราการตายสะสม 80.0-83.3 % ส่วนการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 20 และ 30 % มีอัตราการตายสะสม 100 % ภายใน 7 วัน ในขณะที่กุ้งเลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 32-33 °C ไม่มีกุ้งป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น ในการทดลองที่ 5 ศึกษาการคงอยู่ในภาวะที่ก่อให้เกิดโรคของเชื้อ WSSV ในน้ำอุณหภูมิ 28-29 และ 32-33 °C โดยการปล่อยกุ้งขาวลงเลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณ WSSV $1x10^5$ copies/ml ที่พักทิ้งไว้เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน พบว่า ที่ 28-29 °C WSSV สามารถคงอยู่และทำให้เกิดโรคได้นาน 5 วัน ส่วนที่ 32-33 °C อยู่ได้นาน 3 วัน การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าที่อุณหภูมิของน้ำ 32-33 °C สามารถป้องกันและลดอัตราการตายในกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV ในระยะแรก ๆ ได้ การเพิ่มอุณหภูมิของน้ำในการอนุบาลลูกกุ้งให้อยู่ที่ 32-33 °C เป็นเวลาต่อเนื่องกันอย่างน้อย 7 วัน ก่อนนำลูกกุ้งลงเลี้ยงในบ่อจะสามารถป้องกันการเกิดโรคดวงขาวได้

____________________ ____________________ ____ / ____ / ____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sutee Wongmaneeprateep 2010: The Effects of Temperature on the Virulence of White Spot Syndrome Virus in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Doctor of Philosophy (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Chalor Limsuwan, Ph.D. 202 pages.

This study evaluated the effects of water temperature on the virulence of white spot syndrome virus (WSSV) infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles (5-6 g) and postlarvae (PL_{15}) under standardized conditions. Infection by WSSV was achieved using three methods, *per os* (oral) administration, intramuscular injection and immersion challenge. Moribund and surviving shrimp were examined for WSSV infection by nested-PCR, immunochromatographic test strip, histopathology, immunohistochemistry and bioassay methods. In the first experiment, the effects of water temperature (24-25, 28-29 and 32-33 °C) on WSSV infections in PL_{15} and juvenile shrimp were investigated. Shrimp were kept continuously at 24-25, 28-29 and 32-33 °C after WSSV challenge. Both PL_{15} and juvenile shrimp kept continuously at 24-25 and 28-29 °C had 100 % cumulative mortalities within 7 days after challenge. In contrast, shrimp kept continuously at 32-33 °C showed no clinical sign and mortality. In the second experiment, the effects of high water temperature (32-33 °C) on the severity and virulence of WSSV infections in PL_{15} and juvenile shrimp were investigated. Juvenile shrimp were kept continuously at 28-29 °C for 0, 12, 24 and 48 h after WSSV challenge and switched to 32-33 °C while control group shrimp were constantly maintained at 28-29 °C after WSSV challenge until the end of the experiment. Shrimp kept continuously at 28-29 °C for 0 and 12 h after WSSV challenge and then increased temperature to 32-33 °C showed no gross sign and mortality. PL_{15} and juvenile shrimp were maintained at 32-33 °C for 0, 1, 3, 5 and 7 days after WSSV challenge with *per os* and immersion methods, and at 32-33 °C for 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 14 days after WSSV-injection challenge method before switched to 28-29 °C while control group shrimp were constantly maintained at 32-33 °C after WSSV challenge throughout the experiment. Shrimp were kept continuously at 32-33 °C for 7 days after WSSV challenge with *per os* and immersion methods before switched to 28-29 °C, and 14 days after WSSV-injection challenge method before switched to 28-29 °C showed no clinical sign and mortality. For the third experiment, the effects of high water temperature (32-33 °C) on clearance of WSSV in juvenile shrimp were carried out. Shrimp were divided into two groups. Group 1, WSSV-infected shrimp constantly maintained at 28-29 °C and Group 2, at 32-33 °C. Shrimp in each group were sampled for WSSV infection at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 and 14 days after challenge by nested-PCR assay, immunohistochemistry and histopathology methods. The results showed that shrimp constantly maintained at 32-33 °C after WSSV challenge with *per os*, injection and immersion methods gave WSSV-negative at day 7, 14 and 7 after challenge, respectively. In the fourth experiment, the effects of different percentage water exchange rates on the virulence of WSSV infection in juvenile shrimp were conducted at 24-25, 28-29 and 32-33 °C. After exchanging water at 10, 20 and 30 % contained $1x10^4$, $2x10^4$ and $3x10^4$ WSSV copies/ml respectively, shrimp were observed for morbidity and mortality. At 10 % water exchange rate at 24-25 and 28-29 °C cumulative mortalities reached 80.0-83.3 %, while at 20 and 30 % water exchange rates cumulative mortalities reached 100 % within 7 days. In contrast, shrimp at 32-33 °C showed no morbidity and mortality. In the fifth experiment, the viability of WSSV in water temperature of 28-29 and 32-33 °C were studied. Juvenile shrimp were placed into aquaria after resting water containing WSSV ($1x10^5$ copies/ml) at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days. The results revealed that WSSV could survive and cause disease for 5 days at 28-29 °C, while only 3 days at 32-33 °C. In conclusion, this study clearly indicated that water temperature of 32-33 °C is an effective prevention and reduce mortality in early stages of WSSV infection. Elevation of water temperature to 32-33 °C during larval rearing for at least 7 days before stocking PL in the grow-out pond could prevent white spot disease.

____________________ ____________________ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชลอ ลิ้มสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษา แนะนำและช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยอย่างดียิ่ง รวมถึงการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิติ ชูเชิด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ในการปฏิบัติงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ดร. เต็มดวง สมศิริ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมงและ ดร. พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ในการปฏิบัติงานวิจัยและเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการเนื้อเยื่อวิทยา ไวรัสวิทยาและแบคทีเรียวิทยาของสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง สำหรับน้ำใจอันมีค่ายิ่ง อีกทั้งความช่วยเหลือต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับทั้งทางตรงและทางอ้อม ขอขอบคุณน้องปิยนุช พรมภมร และ น้องคณิตดา ทองขาว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับคำแนะนำและช่วยเหลือ ด้วยน้ำใจอันมีค่ายิ่ง

ขอขอบพระคุณคุณย่า คุณพ่อ คุณแม่ พี่ชายและน้องชาย รวมทั้งพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ทุกคนในศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณปัทมา วิริยพัฒนทรัพย์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ชี้แนะและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอน้อมนำประโยชน์ทั้งหลายอันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่กุ้งทุกตัวที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

สุธี วงศ์มณีประทีป

พฤษภาคม 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	40
ผลและวิจารณ์	60
สรุปและข้อเสนอแนะ	152
สรุป	152
ข้อเสนอแนะ	154
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	155
ภาคผนวก	189
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	202

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งกลุ่ม penaeid 9

2 การระบาดของ WSSV ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งในทวีปเอเชียและทวีปอเมริกา 18

3 สัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียนหลายชนิดที่สามารถติดเชื้อ WSSV 26

4 ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน หลังจากได้รับเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR ชุดตรวจ immunochromatographic test strip และการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) 66

5 ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ติดเชื้อ WSSV ที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ ก่อนเพิ่มอุณหภูมิเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) วิธี immunohistochemistry (IHC) และ bioassay 114

6 ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV ที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ ก่อนลดอุณหภูมิเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) วิธี immunohistochemistry (IHC) และ bioassay 125

7 ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่กินกุ้งติดเชื้อ WSSV แล้วเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) และวิธี immunohistochemistry 136

8 ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ฉีดด้วยเชื้อ WSSV แล้วเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) และวิธี immunohistochemistry 137

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่		หน้า
9	ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่อุณหภูมิ 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) และวิธี immunohistochemistry	138
10	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำที่ใช้เลี้ยงและกลุ่มควบคุม	143
11	ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน หลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ในปริมาณต่าง ๆ และกลุ่มควบคุม ด้วยวิธี nested-PCR ชุดตรวจ immunochromatographic test strip และการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology)	144
12	อัตราการตายและผลการตรวจเชื้อ WSSV ของกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำพักไว้เวลาต่าง ๆ ที่มีอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) และ bioassay	149

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ความสัมพันธ์ระหว่างเจ้าบ้าน (host) เชื้อโรค (pathogen) และสิ่งแวดล้อม (environment) ในการก่อให้เกิดโรค (ส่วนที่แรเงา)	8
2	กลไกการจำลองตัวเองและการรวมตัวกันของอนุภาค WSSV ภายในนิวเคลียส	23
3	กุ้งขาวแวนนาไมที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งในพื้นที่จังหวัดจันทบุรี	56
4	กุ้งขาวที่ป่วยมีลำตัวสีแดงอย่างชัดเจน (กุ้ง 3 ตัว ด้านล่าง) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งปกติ (กุ้ง 3 ตัว ด้านบน)	56
5	ลูกกุ้งขาวระยะโพสลาร์วา 10 ที่ปลอดเชื้อ WSSV จากโรงเพาะฟักเอกชน	57
6	การลำเลียงกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ปลอดเชื้อ WSSV จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชน	57
7	ตู้กระจกขนาด 30x75x40 เซนติเมตร ซึ่งแต่ละตู้บรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำ โดยใช้ heater และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา	58
8	การฉีดสารละลาย WSSV เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อระหว่างปล้องที่ 3-4 ของลำตัวกุ้ง	59
9	กุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ฉีดด้วยน้ำยา Davidson’s fixative เพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ	59
10	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV	67
11	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากฉีดเชื้อ WSSV	68
12	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV	69
13	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 15 ที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV	70
14	กุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV เริ่มแสดงอาการป่วย (ตัวแรก) (1) ซึ่งส่วนใหญ่จะมีลำตัวสีชมพูจนถึงแดง (2)	71
15	กุ้งขาวที่แสดงอาการป่วยจะไม่กินอาหาร (กุ้ง 2 ตัว ด้านล่าง) (1) ทำให้เห็นลำไส้ว่างเปล่าและเซื่องซึม (2)	73

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	กุ้งป่วยบางตัวมีเปลือกนิ่ม (1) หรือมีตับและตับอ่อนขนาดใหญ่ขึ้นและมีสีเหลือง (2)	75
17	กุ้งที่ติดเชื้อ WSSV มีจุดขาวหรือดวงขาวบริเวณเปลือกคลุมหัว (1) และตามส่วนต่าง ๆ ของลำตัว (2)	77
18	จุดขาวหรือดวงขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-2.0 มิลลิเมตร สามารถเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อดึงเปลือกคลุมหัวแล้วลอกเนื้อเยื่อบาง ๆ ออก จากนั้นส่องดูผ่านแสง	79
19	กล้ามเนื้อบริเวณส่วนท้ายของลำตัวมีลักษณะขาวขุ่นหรือกล้ามเนื้อตายเกิดขึ้นในกุ้งป่วยบางตัว	81
20	กุ้งป่วยจะเริ่มทยอยตายและตายหมด ภายใน 7 วัน หลังจากได้รับเชื้อ WSSV	83
21	เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือกของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบ inclusion body ลักษณะ basophilic inclusion (IC) โดยเซลล์ที่ติดเชื้อจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้น (hypertrophied nuclei) (H&E)	85
22	บริเวณเหงือกของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบการเกิด Cowdry type A inclusion (CI) basophilic inclusion (IC) pyknosis (P) และ karyorrhexis ของนิวเคลียส (K) เป็นจำนวนมาก (H&E, bar = 50 µm)	87
23	พยาธิสภาพของเหงือกของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบ inclusion body ลักษณะ Cowdry type A (CI) ติดสีชมพูของ eosin อยู่บริเวณกึ่งกลางเซลล์ (centronuclear) ซึ่งเป็นระยะแรกของการติดเชื้อ โดยเซลล์ที่ติดเชื้อจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้น มองเห็นมีโครมาตินล้อมรอบและสิ้นสุดด้วยเกิด basophilic inclusion (IC)	89
24	พยาธิสภาพของเยื่อบุผนังกระเพาะอาหารของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบ inclusion body ลักษณะ basophilic inclusion (IC) จำนวนมาก (H&E, bar = 100 µm)	91
25	พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบ inclusion body ลักษณะ basophilic inclusion (IC) (H&E, bar = 100 µm)	91
26	บริเวณ antennal gland ของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบการเกิด inclusion body (IC) (H&E, bar = 100 µm)	93

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
27	อวัยวะสร้างเม็ดเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบ inclusion body ลักษณะ Cowdry type A inclusion (CI) และ basophilic inclusion (IC) โดยเซลล์ที่ติดเชื้อจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้นและล้อมรอบด้วยโครมาติน (H&E, bar = 50 μm)	93
28	อวัยวะต่อมน้ำเหลืองของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV พบการเกิด inclusion body (IC) pyknosis (P) และ karyorrhexis ของนิวเคลียส (K) เป็นจำนวนมาก (H&E, bar = 50 μm)	95
29	พยาธิสภาพของอวัยวะต่อมน้ำเหลืองของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV พบการเกิด lymphoid organ spheroids (LOS) (H&E, bar = 50 μm)	95
30	อนุภาค WSSV (ลูกศรสีแดง) ในนิวเคลียสของเซลล์เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือกของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ในระยะสุดท้ายของการเกิด Cowdry type A inclusion โดยโครมาตินที่อัดตัวกันแน่นใกล้ผนังนิวเคลียส (marginated chromatin) (ลูกศรสีเหลือง) และเยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มแตกสลาย (ลูกศรสีดำ) ในส่วนไซโทพลาสซึมจะพบไมโทคอนเดรียเริ่มเสื่อมสภาพ (M); transparent zone (ดอกจัน) (bar = 1 μm)	97
31	marginated chromatin สลายไปเยื่อหุ้มนิวเคลียสจะแตกออก transparent zone จะรวมเข้า กับไซโทพลาสซึม (ลูกศรชี้) ซึ่งออร์แกเนลล์ส่วนใหญ่จะแตกสลายหรือกลายเป็นเนื้อเยื่อบาง ๆ (bar = 1 μm)	99
32	กลุ่มของ vesicle ที่อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ WSSV (ลูกศรสีเหลือง) ซึ่ง vesicle จะพัฒนาไปเป็น envelope (ลูกศรสีดำ) และ vesicle ที่เชื่อมต่อกัน (ลูกศรสีแดง) ซึ่งเป็นระยะแรก ๆ ของการพัฒนาของเชื้อ WSSV (bar = 200 nm)	99
33	capsid ที่ว่างเปล่าจะอยู่เดี่ยว ๆ หรือล้อมรอบด้วยส่วนที่คล้าย envelope แต่ปลายด้านหนึ่งจะเปิดออก (ลูกศรชี้) (bar = 100 nm)	101
34	capsid ที่กำลังพัฒนา (ลูกศรสีเหลือง) ยาวและเรียวเล็กกว่าอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (ลูกศรสีแดง) (bar = 100 nm)	101
35	ในบางครั้งพบ nucleocapsid ของเชื้อ WSSV ที่ไม่มี envelope (ลูกศรสีดำ) และ 2 nucleocapsids อยู่ใน 1 envelope (ลูกศรสีเหลือง) (bar = 100 nm)	103

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
36	nucleocapsid (N) ที่สมบูรณ์ถูกหุ้มด้วย envelope (ลูกศรชี้) ซึ่งมี 3 ชั้น (trilaminar envelope) ประกอบด้วยชั้นที่ทึบแสง 2 ชั้น ที่แยกกับชั้นที่โปร่งแสง 1 ชั้น (bar = 100 nm)	105
37	อนุภาค WSSV ที่สมบูรณ์มีรูปร่างเป็นรูปไข่ (ลูกศรชี้) และมี nucleocapsid รูปท่อนอัดตัวแน่นอยู่ใน envelope (bar = 200 nm)	105
38	ในระยะสุดท้ายของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือกที่ติดเชื้อ WSSV (1) ผนังนิวเคลียสถูกทำลายและออร์แกเนลล์ต่าง ๆ ในไซโทพลาสซึมจะแตกสลาย และ (2) เกิดเป็นช่องว่างขึ้น (ลูกศรสีดำ) อนุภาค WSSV ที่สมบูรณ์จะถูกปลดปล่อยจากเซลล์ที่แตกสลาย (ลูกศรสีเหลือง) (bar = 1 µm)	107
39	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (28°C 0h-32°C), 12 (28°C 12h-32°C), 24 (28°C 24h-32°C) และ 48 ชั่วโมง (28°C 48h-32°C) ก่อนปรับเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (28°C-28°C)	115
40	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ฉีดเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (28°C 0h-32°C), 12 (28°C 12h-32°C) และ 24 ชั่วโมง (28°C 24h-32°C) ก่อนปรับเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และ กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (28°C-28°C)	116
41	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (28°C 0h-32°C), 12 (28°C 12h-32°C), 24 (28°C 24h-32°C) และ 48 ชั่วโมง (28°C 48h-32°C) ก่อนเพิ่มปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (28°C-28°C)	117

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

42 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ WSSV ในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนปรับเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส พบ hypertrophied nuclei และ inclusion bodies (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (2) เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร (3) เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (4) เหงือก (5) อวัยวะต่อมน้ำเหลืองและ (6) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (H&E, bar = 50 μm) 118

43 การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry พบเซลล์ที่ติดเชื้อ WSSV ติดสีน้ำตาลเข้ม (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (2) เหงือก (3) เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหารและ (4) เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ WSSV ในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนปรับเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส (bar = 100 μm) 119

44 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (32°C 0d-28°C), 1 (32°C 1d-28°C), 3 (32°C 3d-28°C), 5 (32°C 5d-28°C) และ 7 วัน (32°C 7d-28°C) ก่อนปรับลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (32°C-32°C) 127

45 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ฉีดเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (32°C 0d-28°C), 1 (32°C 1d-28°C), 3 (32°C 3d-28°C), 5 (32°C 5d-28°C), 7 (32°C 7d-28°C), 9 (32°C 9d-28°C), 11 (32°C 11d-28°C)และ 14 วัน (32°C 14d-28°C) ก่อนปรับลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (32°C-32°C) 128

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
46	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSVและควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (32°C 0d-28°C), 1 (32°C 1d-28°C), 3 (32°C 3d-28°C), 5 (32°C 5d-28°C) และ 7 วัน (32°C 7d-28°C) ก่อนปรับลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (32°C-32°C)	129
47	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 15 ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (32°C 0d-28°C), 1 (32°C 1d-28°C), 3 (32°C 3d-28°C), 5 (32°C 5d-28°C) และ 7 วัน (32°C 7d-28°C) ก่อนปรับลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุม อุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (32°C-32°C)	130
48	พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน ก่อนปรับลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส พบ hypertrophied nuclei และ inclusion bodies (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (2) เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร (3) เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (4) เหงือก (5) อวัยวะต่อมน้ำเหลืองและ (6) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (H&E, bar = 50 μm)	131
49	การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry พบเซลล์ที่ติดเชื้อ WSSV ติดสีน้ำตาลเข้ม (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (2) เหงือก (3) เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหารและ (4) เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน ก่อนปรับลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส (bar = 100 μm)	132

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
50	พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ WSSV ในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส พบ inclusion bodies (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก และ (2) เหงือกเป็นจำนวนมาก	139
51	เซลล์ที่ติดเชื้อ WSSV เป็นจำนวนมาก (สีน้ำตาลเข้ม) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก และ (2) เหงือกของกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ WSSV ในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry	140
52	กุ้งขาวในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25 และ28-29 องศาเซลเซียส หลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำที่ใช้เลี้ยงแสดงอาการป่วย โดยมีลำตัวสีชมพูจนถึงแดง	145
53	ชุดตรวจ immunochromatographic test strip พบว่าให้ผลเป็นบวกต่อกุ้งขาวในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25 และ28-29 องศาเซลเซียส หลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร 10 (1), 20 (2) และ 30 (3) เปอร์เซ็นต์ ของน้ำที่ใช้เลี้ยง	145
54	พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25 และ28-29 องศาเซลเซียส หลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำที่ใช้เลี้ยง พบ inclusion bodies (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (2) เหงือก และ (3) เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร	146
55	กุ้งขาวเริ่มแสดงอาการป่วยมีลำตัวสีชมพูจนถึงแดงและไม่กินอาหาร	150
56	กุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV มีดวงขาวบริเวณเปลือกคลุมหัว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-2.0 มิลลิเมตร	150
57	พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส ที่มีเชื้อ WSSV ที่พักเป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน พบ hypertrophied nuclei และ inclusion bodies (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (2) เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร (3) เหงือก (4) antennal gland (H&E, bar = 100 μm) (5) อวัยวะต่อมน้ำเหลืองและ (6) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (H&E, bar = 50 μm)	151

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลของอุณหภูมิต่อความรุนแรงของไวรัสดวงขาว (White Spot Syndrome Virus) ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

The Effects of Temperature on the Virulence of White Spot Syndrome Virus in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

คำนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยทำรายได้ให้กับประเทศเป็นมูลค่าหลายหมื่นล้านบาทจนถึงแสนล้านบาทต่อปี โดยประเทศไทยยังสามารถรักษาตำแหน่งผู้นำด้านการผลิตและการส่งออกรายใหญ่ที่สุดของโลกอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535-2545 ติดต่อกันถึง 10 ปี อย่างไรก็ตาม ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 เป็นต้นมา การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ของประเทศไทยประสบปัญหากุ้งมีการเจริญเติบโตช้า (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) จนกระทั่งได้ทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ โดยอาการดังกล่าวได้ถูกเรียกว่ากลุ่มอาการกุ้งกุลาดำเจริญเติบโตช้า (Monodon slow growth syndrome; MSGS) (Chayaburakul *et al*., 2004; Flegel, 2006) ซึ่งในที่สุดปัญหานี้ได้กลายเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่เปลี่ยนจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำไปเป็นการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ทำให้โครงสร้างการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทยในปัจจุบันนี้มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเหลือเพียง 1-2 เปอร์เซ็นต์ นอกนั้นเป็นการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเนื่องจากเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีทำให้มีผลผลิตสูงเมื่อเทียบกับกุ้งกุลาดำที่ประสบปัญหาโตช้าได้ผลผลิตไม่แน่นอน (ชลอ และ พรเลิศ, 2547; Limsuwan, 2003) นอกจากนี้กุ้งขาวยังได้ผ่านการปรับปรุงคัดเลือกสายพันธุ์มาแล้วอย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลานานจนสามารถผลิตเป็นกุ้งที่ปลอดเชื้อ (specific pathogen free; SPF) ได้ อย่างไรก็ตามกุ้งขาวที่ปลอดเชื้อนั้นไม่ได้หมายความว่าในระหว่างการเลี้ยง กุ้งดังกล่าวจะไม่เป็นโรคในภายหลังเพราะไม่ใช่กุ้งต้านทานโรค (specific pathogen resistance; SPR) ดังนั้นการเลี้ยงกุ้งขาวต้องมีอัตราการปล่อยลูกกุ้งที่เหมาะสมกับสภาวะการเลี้ยงในพื้นที่นั้น ๆ และต้องมีการเลี้ยงและการจัดการที่ดี ซึ่งปัญหาสำคัญที่สุดในการเลี้ยงกุ้งขาว คือ ความเสียหายที่เกิดจากโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคไวรัสดวงขาว (white spot syndrome virus; WSSV) หรือที่เกษตรกรเรียกว่า โรคตัวแดงดวงขาว ดวงขาวหรือจุดขาวเป็นโรคที่ทำความเสียหายต่อกุ้งในกลุ่ม penaeid ทุกชนิดที่เพาะเลี้ยงในฟาร์ม ซึ่งเป็นโรคที่มีความรุนแรงและก่อให้เกิดความสูญเสียต่อผลผลิตกุ้งสูงที่สุดในทุกประเทศเมื่อเทียบกับความเสียหายที่เกิดขึ้นจาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โรคชนิดอื่น ๆ โดยในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของ WSSV ครั้งแรกเมื่อประมาณเดือนตุลาคม พ.ศ. 2537 ได้เกิดการระบาดอย่างรุนแรงในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและในช่วงปลายปี พ.ศ. 2539 ได้เกิดการแพร่ระบาดของโรคดวงขาวไปทั่วประเทศอย่างรวดเร็วทั้งในส่วนของภาคตะวันออก ภาคใต้ฝั่งตะวันออกและภาคใต้ฝั่งตะวันตก การระบาดของโรคก่อให้เกิดการสูญเสียต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศเป็นอย่างมาก (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) สำหรับแนวทางในการป้องกันและแก้ปัญหาการระบาดของโรคดวงขาวโดยทั่วไป เกษตรกรจะใช้วิธีการเดียวกับการป้องกันโรคหัวเหลือง คือ ใช้ระบบปิดหรือถ่ายน้ำน้อยและใช้สารเคมีในการฆ่าสัตว์พาหะที่นำเชื้อไวรัสในการเตรียมบ่อและเตรียมน้ำ การตรวจไวรัสในแม่กุ้งก่อนที่จะนำเข้าไปเพาะลูกกุ้งในโรงเพาะฟักตลอดจนลูกกุ้งที่จะปล่อยลงเลี้ยงต้องผ่านการตรวจเชื้อไวรัสที่สำคัญด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) รวมทั้งการเพิ่มระบบการป้องกันในการเลี้ยงที่เข้มงวดขึ้นหรือที่เรียกว่า ระบบปลอดเชื้อ (biosecurity system) คือ มีการล้อมรั้วด้วยพลาสติกหรือตาข่ายรอบบ่อเลี้ยงแต่ละบ่อเพื่อป้องกันปูจากภายนอกเข้าไปในบ่อเลี้ยงและการขึงเชือกป้องกันนกที่อาจจะนำกุ้งป่วยพื้นที่อื่นเข้าไปในฟาร์มเลี้ยง ซึ่งสามารถลดความรุนแรงในการระบาดของโรคดวงขาวได้ในระดับหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามในบางช่วงฤดูกาลเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำมาก เช่น ช่วงปลายปีจนถึงต้นปีทางภาคกลางและตะวันออกและฤดูมรสุมที่มีฝนตกติดต่อกันเป็นระยะเวลานานทางภาคใต้ทำให้อุณหภูมิของน้ำต่ำลง เกษตรกรมักพบปัญหากุ้งป่วยเป็นโรคดวงขาวถึงแม้ว่าจะมีระบบการป้องกันโรคภายในฟาร์มอย่างเต็มที่ก็ตาม ชลอ และ พรเลิศ (2547) รายงานว่าการระบาดของโรคมีความสัมพันธ์กับคุณภาพลูกกุ้ง ซึ่งขึ้นอยู่กับฤดูกาลเลี้ยงและการจัดการฟาร์มโดยฤดูกาลที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงและพบปัญหากุ้งติดเชื้อโรคดวงขาวน้อยที่สุด คือ ช่วงเดือนมีนาคมจนถึงเดือนกันยายน ส่วนช่วงฤดูกาลที่พบการระบาดของโรคมากที่สุด คือ ตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม ต่อเนื่องไปจนถึงเดือนมกราคมของปีถัดไป อย่างไรก็ตามตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2550 เป็นต้นมา ฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมหลายฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีมีการระบาดของโรคดวงขาว ซึ่งกุ้งที่ป่วยมีขนาดใหญ่ ลักษณะภายนอกของกุ้งที่ป่วยมีสีแดงส้มชัดเจนและมีอัตราการตายอย่างรวดเร็ว เกษตรกรจึงต้องจับกุ้งและปิดบ่อ แต่หลังจากนั้นกุ้งในบ่อข้างเคียงจะมีกุ้งป่วยแสดงลักษณะอาการเดียวกันเกิดขึ้น ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งประสบปัญหาขาดทุนในที่สุด เมื่อนำกุ้งป่วยเหล่านี้มาทำการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบว่ามีลักษณะการติดเชื้อ WSSV ถึงแม้ว่าไม่สามารถสังเกตเห็นจุดขาวบริเวณใต้เปลือกคลุมหัวได้ชัดเจนเหมือนกุ้งขาวที่เป็นโรคดวงขาวทั่วไป ต่อมาในช่วงต้นปี พ.ศ. 2551 โรคดวงขาวที่มีลักษณะอาการแบบเดียวกันนี้ได้แพร่กระจายไปยังจังหวัดต่าง ๆ ในภาคตะวันออก ภาคใต้ทั้งฝั่งตะวันออกและภาคใต้ฝั่งตะวันตก ทำให้ฟาร์มขนาดกลางและขนาดใหญ่ที่มีระบบการเลี้ยงเพื่อป้องกันโรคอย่างดีหรือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระบบปลอดเชื้อ ได้รับความเสียหายเป็นจำนวนมาก แม้ว่าเกษตรกรส่วนหนึ่งจะเริ่มเลี้ยงกุ้งหรือปล่อยลูกกุ้งในฤดูที่เหมาะสมในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงมีนาคม ซึ่งเป็นช่วงเวลาปกติที่ไม่ค่อยมีปัญหาโรคดวงขาวเพราะเป็นช่วงที่อุณหภูมิสูงแล้วก็ตาม แต่ในช่วงเวลานั้นพบว่ามีปัญหาฝนตกมากกว่าปกติและสภาวะอากาศที่เปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง สืบเนื่องมาจากปัญหาโลกร้อน ทำให้กุ้งเครียดมากกว่าปกติ โรคดวงขาวจึงมีการระบาดอย่างต่อเนื่อง

จากข้อมูลเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าปัจจัยสภาพแวดล้อมโดยเฉพาะอุณหภูมิของน้ำมีส่วนเกี่ยวข้องและส่งผลก่อให้เกิดการระบาดของโรคดวงขาว เนื่องจากกุ้งเป็นสัตว์เลือดเย็นจึงได้รับอิทธิพลโดยตรงเมื่ออุณหภูมิของน้ำเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้ง โดยที่ผ่านมามีรายงานการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิต่อการรอดตายของกุ้งจากการติดเชื้อ WSSV ในโรงเพาะฟักและในฟาร์มเลี้ยง รวมถึงในห้องปฏิบัติการ (Rodríguez *et al.*, 2003; Withyachumnarnkul *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2006) ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่มักเป็นการศึกษาในเชิงลึก เพื่อศึกษาว่าที่อุณหภูมิสูงนั้นส่งผลอย่างไรต่อกระบวนการจำลองตัวเองของเชื้อ WSSV (Granja *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2006) แต่ยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจังถึงผลของอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงต่อความรุนแรงและการระบาดของโรคดวงขาวในห้องปฏิบัติการสำหรับการปรับไปใช้จริงในระดับโรงเพาะฟักและฟาร์มเลี้ยงกุ้ง ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เพื่อหาผลของอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันและอุณหภูมิของน้ำที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงต่อการติดเชื้อ WSSV ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนถึงผลของการเปลี่ยนถ่ายน้ำและการคงอยู่ของเชื้อ WSSV ในน้ำและในตัวกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ เพื่อใช้ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นแนวทางป้องกันหรือลดความเสี่ยงจากการระบาดของโรคดวงขาวแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง นักวิชาการและผู้ที่สนใจ เพื่อทำให้ประเทศไทยสามารถรักษาความเป็นผู้นำในการส่งออกกุ้งและทำให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศมั่นคงและยั่งยืนตลอดไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

2. เพื่อศึกษาผลของการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำจาก 28-29 องศาเซลเซียส เป็น 32-33 องศาเซลเซียส ต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

3. เพื่อศึกษาผลของการลดอุณหภูมิของน้ำจาก 32-33 องศาเซลเซียส เป็น 28-29 องศาเซลเซียส ต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

4. เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส ต่อการทำให้เชื้อ WSSV หมดไปในกุ้งขาวแวนนาไม

5. เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำและปริมาณการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่มีปริมาณเชื้อ WSSV แตกต่างกันต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

6. เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันต่อการคงอยู่ในภาวะที่ก่อให้เกิดโรคของเชื้อ WSSV ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแปซิฟิกหรือที่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งเรียกกันว่ากุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ (Holthuis, 1980) มีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศเอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลอมเบีย บราซิล เป็นต้น (Rosenberry, 1993; FAO, 1994) ในทวีปเอเชียมีการนำเข้ากุ้งชนิดนี้เข้ามาเลี้ยงครั้งแรกที่ประเทศไต้หวันในปี พ.ศ. 2539 สำหรับประเทศไทยเกษตรกรเริ่มนำกุ้งขาวเข้ามาเลี้ยงในปี พ.ศ. 2540 แต่เป็นการลักลอบนำเข้าจากประเทศไต้หวัน เนื่องจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 เป็นต้นมาประสบปัญหากุ้งโตช้าและให้ผลผลิตต่ำ จนกระทั่งมีความพยายามจากทางภาคเอกชนเพื่อขออนุญาตนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวปลอดเชื้อ (SPF) จากต่างประเทศเข้ามาเพื่อเพิ่มผลผลิตทดแทนกุ้งกุลาดำที่กำลังมีปัญหาผลผลิตตกต่ำและเพื่อเป็นการป้องกันการลักลอบนำเข้าลูกพันธุ์กุ้งหรือพ่อแม่พันธุ์กุ้งเพราะการกระทำดังกล่าวอาจนำเชื้อไวรัสต่าง ๆ จากต่างประเทศเข้ามา ดังนั้นกรมประมงจึงได้อนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวปลอดเชื้อเข้ามาในประเทศ ตั้งแต่วันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2545 ถึงวันที่ 28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2546 พบว่าการทดลองเลี้ยงกุ้งขาวของเกษตรกรให้ผลค่อนข้างดีทำให้เกษตรกรจำนวนมากเปลี่ยนมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้นและทำให้มีการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้เพิ่มขึ้นในทุกพื้นที่ (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

ปัจจุบันระบบการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยเป็นแบบพัฒนา (intensive culture) โดยมีการปล่อยกุ้งในอัตราความหนาแน่นสูง มีการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป มีการใช้เครื่องให้อากาศ มีการจัดการและควบคุมคุณสมบัติของน้ำในบ่อเลี้ยงและเริ่มมีการพัฒนาการเลี้ยงให้สอดคล้องกับระบบมาตรฐานต่าง ๆ ที่เข้ามาเกี่ยวข้องเพื่อง่ายต่อการจัดการฟาร์มและทำให้การส่งออกของกุ้งมีมาตรฐานและคุณภาพที่ดีตามความต้องการของตลาดต่างประเทศ โดยทั่วไปการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาสามารถแบ่งตามระบบการเปลี่ยนถ่ายน้ำได้ 2 ระบบ คือ

1. ระบบปิดหรือระบบปิดถ่ายน้ำน้อย

ฟาร์มส่วนมากในกลุ่มประเทศเอเชียจะเป็นแบบฟาร์มขนาดเล็ก ซึ่งไม่มีพื้นที่มากพอที่จะสร้างบ่อพักน้ำและบ่อบำบัดเหมือนในระบบหมุนเวียนเพื่อเป็นการลดการใช้น้ำจาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภายนอกระบบนี้จะเติมน้ำทะเลที่สะอาด ผ่านการบำบัดด้วยสารเคมีเพื่อกำจัดสัตว์ที่ไม่ต้องการและกลุ่มสัตว์จำพวกกุ้ง ปู ที่อาจจะเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส จากนั้นจึงปล่อยกุ้งลงเลี้ยง ถึงแม้ว่าระบบนี้จะไม่ต้องการการถ่ายน้ำ แต่จะต้องรักษาระดับน้ำในบ่อโดยการเติมน้ำเข้าไปเพื่อทดแทนน้ำที่ระเหยหรือรั่วซึมออกด้วยน้ำเค็มหรือน้ำจืด ระบบนี้สามารถใช้ได้กับทุกพื้นที่แม้แต่ในพื้นที่เลี้ยงที่ไม่มีน้ำเค็มเข้าถึง ข้อด้อยของระบบนี้ คือ ต้องปล่อยกุ้งจำนวนที่เหมาะสมและต้องมีคุณสมบัติของน้ำที่ดีประกอบกับการจัดการควบคุมการให้อาหารและการบำบัดของเสียที่ดีด้วย อย่างไรก็ตามผลผลิตที่ได้จะไม่สูงมากเพราะมีข้อจำกัดต้องควบคุมปริมาณกุ้งและอาหารให้เหมาะสมตลอดระยะเวลาในการเลี้ยง (ชลอ, 2543)

2. ระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียน

เนื่องจากความเสื่อมโทรมลงของสภาพสิ่งแวดล้อมและปัญหาเรื่องโรคระบาดจากไวรัสหัวเหลืองและดวงขาว ฟาร์มทั่วไปจึงมีการเปลี่ยนแปลงวิธีการเลี้ยงกุ้งไปสู่ระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียนโดยใช้น้ำจากนอกฟาร์มให้น้อยที่สุด อย่างไรก็ตามฟาร์มก็จะต้องแบ่งพื้นที่ประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อที่ทั้งหมดเพื่อทำเป็นบ่อเก็บน้ำ บ่อตกตะกอน บ่อบำบัดและคลองน้ำทิ้งเพื่อให้ระบบทำงาน น้ำทะเลหรือน้ำจากแม่น้ำลำคลองที่สะอาดจะถูกสูบเข้าบ่อและเก็บไว้ในระบบก่อนที่จะทำการเลี้ยงและในระหว่างการเลี้ยง น้ำจากบ่อเลี้ยงจะถูกถ่ายลงสู่บ่อตกตะกอนและจะบำบัดด้วยสารเคมีหรือด้วยกลไกทางชีวภาพตามความเหมาะสมและความชำนาญของแต่ละฟาร์มแล้วจะสูบไปเก็บในบ่อพักน้ำเพื่อนำไปใช้ในบ่อเลี้ยงอีกครั้ง (ชลอ, 2543)

ส่วนรูปแบบการเลี้ยงกุ้งขาวในประเทศไทยสามารถแบ่งตามความเค็มของน้ำได้เป็น 2 แบบ ตาม ชลอ และ พรเลิศ (2547) คือ การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มต่ำ เป็นการเลี้ยงในเขตพื้นที่น้ำจืด เช่น พื้นที่ทางภาคกลาง ใช้น้ำความเค็มต่ำมากจนเกือบจะเป็นระดับที่ถือว่าเป็นน้ำจืด โดยใช้น้ำเค็มจากนาเกลือที่มีความเค็ม 100-200 ส่วนในพันส่วน (พีพีที) มาเติมในน้ำจืดเพื่อให้ได้ความเค็มประมาณ 3-4 พีพีที แล้วทำการเลี้ยงในระบบปิด มีการถ่ายน้ำน้อย ส่วนใหญ่จะกั้นคอกก่อนโดยใช้ผ้าพลาสติกพื้นที่ประมาณ 15 ตารางเมตร ความลึกประมาณ 80 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำจากนาเกลือเข้าไปในคอกจนได้ความเค็มประมาณ 8-10 พีพีที หลังจากนั้นจะใช้ลูกกุ้งระยะโพสลาร์วา 10-12 ที่ปรับความเค็มจากโรงเพาะฟักมาแล้วมาปล่อยในคอก อนุบาลลูกกุ้งในคอกประมาณ 3-4 วัน จึงเปิดคอกออกเนื่องจากกุ้งขาวเป็นกุ้งที่กินอาหารเก่งและว่ายน้ำตลอดเวลาอาจจะมีการกินกันเองเพราะฉะนั้นจึงไม่นิยมอนุบาลนานเกินไป ส่วนอีกวิธีหนึ่งเกษตรกรจะเตรียมน้ำความเค็ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

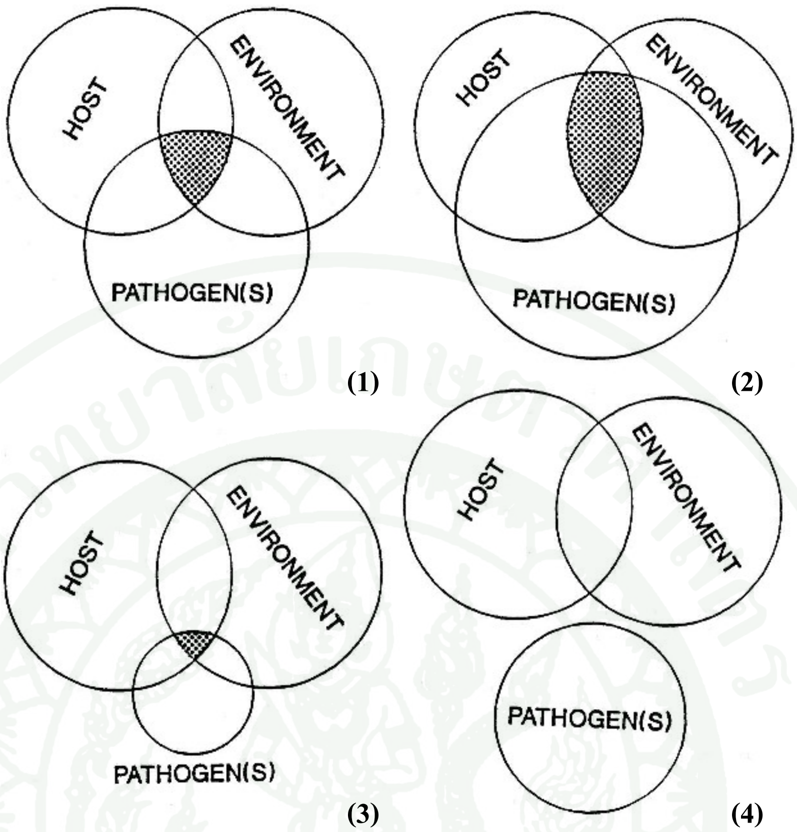
ประมาณ 3-5 พีพีที ทั้งบ่อ แล้วให้ทางโรงเพาะฟักปรับความเค็มของลูกกุ้งให้ใกล้เคียงกับความเค็มในบ่อที่จะปล่อยที่สุดแล้วนำลูกกุ้งมาปล่อยโดยตรงโดยที่ไม่มีการกั้นคอก การปล่อยลูกกุ้งโดยตรงในบ่อจะให้อัตรารอดตายสูงกว่า ถ้าปล่อยลูกกุ้ง 100,000 ตัว จะมีผลผลิตประมาณ 1,000 กิโลกรัม หรือมากกว่า 1,000 กิโลกรัม เล็กน้อย ได้กุ้งขนาด 60-80 ตัวต่อกิโลกรัม ภายในระยะเวลาการเลี้ยง 3 เดือน

การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มปกติ คือ น้ำที่มีความเค็ม 10 พีพีที ขึ้นไปในพื้นที่ริมชายฝั่งทะเลโดยเฉพาะการเลี้ยงทางภาคใต้ ส่วนใหญ่จะมีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นมากกว่า 120,000 ตัวต่อไร่ ผลผลิตประมาณ 2,000 กิโลกรัมต่อไร่ อัตราการรอดตายประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เพราะฉะนั้นกระแสการผลิตของกุ้งขาวที่ออกมามากในช่วงกลางปี พ.ศ. 2546 โดยเฉพาะการเลี้ยงทางภาคใต้โดยใช้น้ำความเค็มปกติทำให้หลายจังหวัดทางภาคใต้ซึ่งไม่เคยเลี้ยงกุ้งขาวมาก่อนหันมาเลี้ยงกุ้งขาวมากขึ้นมีผลผลิตสูงประมาณ 3,000-4,000 กิโลกรัมต่อไร่ โดยมีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นมากกว่า 150,000 ตัวต่อไร่ การเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มปกติจะได้ผลดีกว่าน้ำความเค็มต่ำเนื่องจากมีการถ่ายน้ำในปริมาณที่มากในช่วงท้าย ๆ ของการเลี้ยง

2. โรคกุ้ง

โรคเป็นผลสุดท้ายที่เกิดขึ้นจากอิทธิพลที่ซับซ้อนระหว่างเจ้าบ้าน (host) เชื้อโรค (pathogen) และสิ่งแวดล้อม (environment) (Lightner and Redman, 1998) Snieszko (1973) ได้ใช้วงกลมสามวงเพื่ออธิบายแนวคิดนี้ (ภาพที่ 1) ซึ่งโรคจะเกิดขึ้นต่อเมื่อเจ้าบ้านและเชื้อโรคอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะแก่การเกิดโรค (1) และการระบาดของโรคอย่างรุนแรงเกิดเมื่อเชื้อโรคมีความรุนแรงขึ้น สิ่งแวดล้อมที่เลวลงหรือเจ้าบ้านอ่อนแอ (2) แต่ถ้าสิ่งแวดล้อมเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเจ้าบ้าน เชื้อโรคจะมีความรุนแรงน้อยลงทำให้ไม่มีการระบาดของโรค (3) เช่นเดียวกันเมื่อเจ้าบ้านและสิ่งแวดล้อมเหมาะสำหรับการเกิดโรค แต่ไม่มีเชื้อโรค การเกิดโรคจะไม่เกิดขึ้น ซึ่งจะเกิดขึ้นในกรณีที่เจ้าบ้านปลอดเชื้อ (SPF) (4)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างเจ้าบ้าน (host) เชื้อโรค (pathogen) และสิ่งแวดล้อม (environment) ในการก่อให้เกิดโรค (ส่วนที่แรเงา)

ที่มา: Lightner and Redman (1998) ดัดแปลงจาก Snieszko (1973)

โรคที่เกิดในกุ้งกลุ่ม penaeid สามารถแบ่งเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ ได้แก่ เชื้อไวรัส แบคทีเรีย รา และปรสิต และโรคที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในทางที่ไม่ดี เช่น คุณสมบัติของน้ำที่ไม่เหมาะสม ในน้ำมีสารพิษ เป็นต้น อย่างไรก็ตามโรคที่เกิดจากการติดเชื้อนั้นเป็นปัญหาสำคัญที่สร้างความเสียหายอย่างมากในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการตายเป็นจำนวนมาก การเจริญเติบโตที่ช้าลงหรือความผิดปกติของกุ้ง ปัจจุบันพบว่ามีไวรัสที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรคในกุ้งกลุ่ม penaeid มากกว่า 20 ชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งกลุ่ม penaeid

วงศ์	ไวรัส
	ไวรัส DNA
Parvoviridae	Hepatopancreatic parvovirus (HPV)
	Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)
	Lymphoidal parvo-like virus (LPV)
	Spawner-isolated mortality virus (SMV)
Baculoviridae	Baculoviral midgut gland necrosis virus (BMNV)
	Baculovirus penaei virus (BP type)
	Monodon baculovirus (MBV)
	Type C baculovirus of *Penaeus monodon*
	Hemocyte infecting non-occluded baculo-like virus
Iridovidae	Shrimp iridovirus (IRIDO)
Nimaviridae	White spot syndrome virus (WSSV)
	ไวรัส RNA
Picornaviridae	Taura syndrome virus (TSV)
Roniviridae	Yellow head virus (YHV)
	Gill associated virus (GAV)
	Lymphoid organ virus (LOV)
Reoviridae	Reo-like virus (REO) type II and IV
Rhabdoviridae	Rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)
Togaviridae	Lymphoid organ vacuolization virus (LOVV)
Totiviridae	Infectious myonecrosis virus (IMNV)
Bunyaviridae	Mourilyan virus (MOV)
unclassified	Monodon slow growth syndrome (MSGS)

ที่มา: Rahman (2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยโรคไวรัสที่แพร่ระบาดและสร้างความเสียหายเป็นจำนวนมากให้กับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกลุ่ม penaeid ได้แก่ โรคที่ทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้าที่มีสาเหตุเกิดจากไวรัสเอชพีวี (Hepatopancreatic Parvovirus; HPV) ไวรัสเอ็มบีวี (Monodon Baculovirus; MBV) และ Monodon Slow Growth Agent (MSGA) โรคตัวพิการ (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis; IHHN) โรคทอร่า (Taura Syndrome; TS) โรคหัวเหลือง (Yellow-head Disease; YHD) โรคกล้ามเนื้อขุ่นขาวหรือโรคกล้ามเนื้อตาย (Infectious Myonecrosis; IMN) และโรคดวงขาว (White Spot Disease; WSD) ซึ่งทางองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (The Office International des Epizooties; OIE) ที่มีหน้าที่ประสานความร่วมมือในการควบคุมโรคระบาดที่สำคัญในสัตว์ได้กำหนดให้โรคตัวพิการ โรคทอร่า โรคหัวเหลือง โรคกล้ามเนื้อตายและโรคดวงขาว เป็นโรคที่ต้องใช้มาตราการเฝ้าระวังโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE, 2009) ซึ่งอธิบายแต่ละโรคพอสังเขปได้ดังนี้

โรคตัวพิการมีสาเหตุจากเชื้อ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) เป็นไวรัส DNA สายเดี่ยว (ssDNA) รูปร่างหลายเหลี่ยม (icosahedral) ไม่มีผนังหุ้ม (non-enveloped virus) มีขนาดเล็กมีเส้นผ่านศูนย์กลางเพียง 22-23 นาโนเมตร อยู่ในวงศ์ *Parvoviridae* (Mari *et al*., 1993) ไวรัสชนิดนี้ทำให้เกิดโรคแคระแกร็น (runt-deformity syndrome; RDS) ก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง กุ้งที่ติดเชื้อจะมีกรีบิดเบี้ยวหรือคดงอ หนวดคู่ที่ 2 พับไปมา เปลือกขรุขระหรือผิดรูปร่างมากกว่าที่จะทำให้กุ้งตาย กุ้งโตเต็มวัยที่ติดเชื้ออาจไม่แสดงอาการของโรคแต่สามารถส่งผ่านเชื้อไวรัสไปยังกุ้งตัวอื่น ๆ ได้ โดยผ่านทั้งทางน้ำที่ใช้เลี้ยงและการกินกุ้งที่ติดเชื้อ และสามารถติดต่อผ่านทางพ่อแม่พันธุ์กุ้งไปสู่ลูกได้ (Bell and Lightner, 1984; Brock and Main, 1994) พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่เป็นโรคจะพบ inclusion body ลักษณะ Cowdry type A ย้อมติดสีชมพูของ eosin ในนิวเคลียสที่มีขนาดใหญ่ขึ้นของเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากชั้น ectoderm และ mesoderm (Bell and Lightner, 1984)

โรคทอร่าสร้างความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวในประเทศไทยเป็นจำนวนมาก โรคนี้มีสาเหตุจากเชื้อ Taura syndrome virus ซึ่งเป็นไวรัส RNA สายเดี่ยว (ssRNA) รูปร่างหลายเหลี่ยม ไม่มีผนังหุ้ม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 32 นาโนเมตร อยู่ในวงศ์ *Picornaviridae* (Bonami *et al*., 1997) ลักษณะทั่วไปของโรคสามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะเฉียบพลัน (acute) ระยะคาบเกี่ยว (transition) และระยะเรื้อรัง (chronic) ซึ่งจะมีเพียงระยะเฉียบพลันและระยะคาบเกี่ยวเท่านั้นที่กุ้งป่วยแสดงอาการของโรค (Lightner, 1996) โดยอาการภายนอกที่สังเกตเห็นได้จากของกุ้งขาวที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใกล้ตายในระยะเฉียบพลันนั้นจะมีลำตัวสีแดงซีด แพนหางและขาว่ายน้ำมีสีแดง กุ้งอาจจะมีเปลือกนิ่ม ไม่มีอาหารในทางเดินอาหารและส่วนใหญ่จะตายระหว่างการลอกคราบ ส่วนระยะคาบเกี่ยวของโรคจะพบเมลานินที่มีรูปร่างไม่แน่นอนกระจายอยู่ที่เปลือกกุ้ง ในระยะนี้อาจพบกุ้งที่มีอาการเปลือกนิ่มหรือตัวแดงแต่กินอาหารเป็นปกติ (Hasson *et al.*,1995; Lightner, 1996) หลังจากนั้นกุ้งที่ป่วยในระยะคาบเกี่ยวจะลอกคราบแล้วเข้าสู่ระยะเรื้อรังซึ่งในระยะนี้ไวรัสอาจจะยังคงอยู่ในส่วนของอวัยวะต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) ตลอดชีวิตของกุ้ง พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ TSV พบการติดเชื้อในเซลล์ของเนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดจากชั้น ectoderm และ mesoderm ซึ่งเนื้อเยื่อ cuticular epithelium จะเป็นส่วนที่มีการติดเชื้อรุนแรงที่สุด โดยในระยะเฉียบพลันจะพบการตายบริเวณ cuticular epithelium เซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้น subcuticle และเส้นใยของกล้ามเนื้อลาย ไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อจะติดสีย้อม eosin และเกิด pyknosis หรือ karyorrhexis ของนิวเคลียส นอกจากนั้นสามารถพบเศษของไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่ตายเป็นจำนวนมากซึ่งมีรูปร่างเป็นก้อนกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-20 ไมโครเมตร ติดสี eosin หรือ hematoxylin อ่อน ๆ โดยส่วนของเซลล์ที่ตายเหล่านี้จะพบในระยะเฉียบพลันของการติดเชื้อเป็นลักษณะจำเพาะที่เรียกว่า peppered หรือ buckshot-riddled ไม่พบการเกิด hemocytic infiltration คือ เซลล์เม็ดเลือดเข้ามาอยู่ในบริเวณนั้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นการตอบสนองแบบอักเสบของเนื้อเยื่อ (Lightner, 1996) ในระยะคาบเกี่ยวจะพบความผิดปกติในชั้น cuticle น้อยลง แต่จะเกิด hemocytic infiltration และการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดในบริเวณนั้นแทนซึ่งจะก่อให้เกิดเมลานินและจุดดำซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของระยะคาบเกี่ยวและในระยะเรื้อรังจะพบการเกิด lymphoid organ spheroid (LOS) ซึ่งเป็นการรวมกลุ่มของเซลล์ในลักษณะที่เป็นก้อนกลมบริเวณ intertubular space ของอวัยวะต่อมน้ำเหลือง (Hasson *et al.,* 1999a)

โรคหัวเหลืองมีรายงานการระบาดครั้งแรกในประเทศไทยในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาในพื้นที่เลี้ยงภาคกลางบริเวณสามสมุทร คือ สมุทรสาคร สมุทรสงครามและสมุทรปราการ (ชลอ, 2534; Limsuwan, 1991) ต่อมาโรคนี้ได้มีการระบาดในกุ้งที่เพาะเลี้ยงในทวีปเอเชีย (Boonyaratpalin *et al*., 1993; Chantanachookin *et al*., 1993; Mohan *et al*., 1998; Walker *et al*., 2001) นอกจากนั้นยังมีรายงานจากกุ้งที่เลี้ยงในแถบอเมริกา (Lightner *et al*., 1997a) ซึ่งในระหว่างปี พ.ศ. 2535-2536 การแพร่ระบาดของเชื้อ yellow head virus (YHV) ได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยมากกว่า 40 ล้านเหรียญสหรัฐ (Flegel *et al.,* 1997)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

YHV เป็นไวรัส RNA สายเดี่ยว (ssRNA) (Wongteerasupaya *et al.*, 1995) มีผนังหุ้ม (enveloped virus) รูปร่างเป็นท่อน มีความยาว 150-200 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค 40-50 นาโนเมตร (Chantanachookin *et al.*, 1993) อยู่ในสกุล *Okavirus* วงศ์ *Roniviridae* อันดับ *Nidovirales* พบว่ามีอย่างน้อย 4 สายพันธุ์ (Cowley *et al.*, 1999,2000; Walker *et al.*, 2001; Mayo, 2002; Sittidilokratna *et al.*, 2002; Fauquet *et al.*, 2004)

ลักษณะเฉพาะของกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรคหัวเหลือง คือ บริเวณส่วนหัวมีสีเหลือง เนื่องจากตับและตับอ่อน (hepatopancreas) มีสีเหลืองและมีขนาดใหญ่กว่าปกติ เหงือกซีดหรือมีสีเหลือง (Limsuwan, 1991; Boonyaratpalin *et al.*, 1993; Chantanachookin *et al.*, 1993) ส่วนใหญ่กุ้งที่เป็นโรคมีขนาด 5 -15 กรัม และมีอายุระหว่าง 20-35 วัน และ 50-70 วัน ก่อนที่กุ้งจะตาย กุ้งจะกินอาหารมากกว่าปกติ ติดต่อกันเป็นเวลาหลายวัน จากนั้นจะมีกุ้งบางตัวเกาะตามริมขอบบ่อและตาย หลังจากนั้นจะมีกุ้งจำนวนมากตายอย่างรวดเร็วทั่วพื้นบ่อซึ่งจะตายหมดบ่อภายใน 2-5 วัน จากรายงานของ พรเทพ (2537) พบว่ากุ้งกุลาดำบางส่วนที่เป็นโรคอาจไม่ได้แสดงอาการหัวเหลือง แต่พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อมีลักษณะเหมือนกับตัวอย่างกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลือง ส่วนการศึกษากุ้งขาวที่ติดเชื้อ YHV ของปิยนุช (2550) พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำที่ติดเชื้อ YHV จะมีการตอบสนองและการเคลื่อนไหวช้าลง ลำตัวของกุ้งมีสีซีด ส่วนหัวมีสีเหลืองเนื่องจากบริเวณตับและตับอ่อนมีสีซีดเหลือง ต่างจากกุ้งปกติที่จะมีตับและตับอ่อนสีน้ำตาลและเมื่อตรวจยืนยันผลด้วยชุดทดสอบ immunochromatographic test strip YHV/GAV พบว่าให้ผลเป็นบวกในขณะที่กุ้งบางส่วนที่ส่วนหัวมีสีปกติให้ผลเป็นลบ

พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งป่วยพบความผิดปกติในเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากชั้น ectoderm และ mesoderm ได้แก่ เหงือก เส้นประสาท ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ ลำไส้ส่วนกลาง ตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อโคนขาและก้านตา ซึ่งในเหงือกและต่อมน้ำเหลืองจะมีความเด่นชัดมากกว่าอวัยวะอื่น ๆ โดยจะเกิด basophilic cytoplasmic inclusion ติดสีน้ำเงินจากการย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) พยาธิสภาพของต่อมน้ำเหลืองพบการเกิด spheroid (Lu *et al.,* 1994) นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่มีการตายของเซลล์จำนวนมากและเมื่อดูดเลือดกุ้งมาทำ blood smear จะพบการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดที่ตายในระยะต่าง ๆ เช่น การเกิด pyknosis และ karyorrhexis ของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือด (Nash *et al.*, 1995)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โรคกล้ามเนื้อขุ่นขาวหรือโรคกล้ามเนื้อตายมีสาเหตุจาก infectious myonecrosis virus (IMNV) โดยมีรายงานการระบาดครั้งแรกในปี ค.ศ. 2002 ในกุ้งขาวแวนนาไมระยะวัยรุ่น (juvenile) ที่เลี้ยงในบ่อดิน ทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2002 (Lightner *et al*., 2004a, 2004b) โรค IMN ได้สร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศบราซิลเป็นถึงมูลค่า 440 ล้านเหรียญสหรัฐ (Madrid, 2005) ต่อมาในปี ค.ศ. 2006 ได้พบการระบาดของโรค IMN ในประเทศอินโดเนียเซีย (Senapin *et al*., 2007) สำหรับประเทศไทยยังไม่มีรายงานการระบาดของโรคนี้ IMNV เป็นไวรัส RNA สายคู่ (dsRNA) อยู่ในวงศ์ *Totiviridae* รูปร่างหลายเหลี่ยม ไม่มีผนังหุ้ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร (Poulos *et al*., 2006) ลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV คือ กล้ามเนื้ออักเสบมีสีขาวขุ่น โดยเฉพาะบริเวณปลายหางและแพนหาง เริ่มจากปล้องสุดท้ายของลำตัว ซึ่งจะค่อย ๆ เพิ่มเข้ามาส่วนกลางของลำตัว (Lightner *et al*., 2004a, 2004b) การเกิดโรค IMN จะเป็นไปอย่างช้า ๆ เป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง โดยมีกุ้งป่วยตายในอัตราที่ต่ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยง แต่อัตราการตายสะสมของกุ้งจะสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Nunes *et al*., 2004) พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV พบการตายของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อที่ลักษณะทั่วไปของเซลล์ยังคงอยู่ แต่ภายในมีการเปลี่ยนแปลง เช่น เกิด pyknosis ของนิวเคลียสและการเกิด spheroid ในต่อมน้ำเหลือง

โรคดวงขาวมีสาเหตุจาก white spot syndrome virus (WSSV) หรือ white spot virus (WSV) ซึ่งเป็นไวรัส DNA สายคู่ (dsDNA) ในสกุล *Whispovirus* วงศ์ *Nimaviridae* (Mayo, 2002) สำหรับประเทศไทยเริ่มมีการระบาดของโรคดวงขาวในกุ้งกุลาดำในช่วงปลายปี พ.ศ. 2537 บริเวณภาคตะวันออก ภาคใต้ฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน ก่อให้เกิดการสูญเสียอย่างมาก โดยความรุนแรงและความสูญเสียเทียบเท่ากับโรคหัวเหลืองที่เคยระบาดในกุ้งกุลาดำ (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) สำหรับรายละเอียดจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

ในส่วนของแบคทีเรียนั้นสามารถเป็นได้ทั้งสาเหตุโดยตรงและฉวยโอกาสในการเกิดโรคในกุ้ง ซึ่งแบคทีเรียอาจเป็นสาเหตุของการตาย บาดแผลตามลำตัว การตายของเซลล์ กล้ามเนื้อขุ่นเหงือกมีสีผิดปกติ โตช้า เปลือกนิ่ม เซื่องซึม ขี้ขาวและการกินอาหารลดลง ในกุ้งโรคที่สำคัญที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ vibriosis, filamentous bacterial disease, necrotizing hepatopancreatitis (NHP), mycobacteriosis และ chitinolytic bacteria shell disease (Lightner, 1996; Guzmán and Valle, 2000; Horowitz and Horowitz, 2001; Nunan *et al*., 2005; Goarant *et al*., 2006; Jayasree *et al*., 2006) โรค vibriosis มีสาเหตุเกิดจาก *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V.*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

damsela, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. penaeicida*, *V. vulnificus*, *V. nereis*, *V. tubiashi*, *V. fluvialis*, *V. splendidus* และ *V. nigripulchritudo* ซึ่งส่วนใหญ่ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมากโดยเฉพาะในโรงเพาะฟัก เมื่อเกิดการระบาดลูกกุ้งมักจะติดเชื้อเกือบทั้งหมด (Brock and Main, 1994; Hu and Tao, 2000) สำหรับการเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทย การติดเชื้อ *Vibrio* ส่วนใหญ่เกิดจาก *V. harveyi* ซึ่งทำให้เกิดโรคเรืองแสงแก่ลูกกุ้งในโรงเพาะฟักซึ่งมีอัตราการตายสูงมากและในระยะต่อมาแบคทีเรียชนิดนี้ทำให้กุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยงเสียหายเป็นจำนวนมากด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะในน้ำที่มีความเค็มสูง (ชลอ, 2543)

โรค gill diseases หรือ filamentous bacterial disease มีสาเหตุเกิดจากแบคทีเรียเส้นสาย *Leucothrix mucor*, *Thiothrix* sp., *Flavobacterium* sp., *Cytophaga* sp., *Flexibacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. (Lewis *et al*., 1982; Lightner, 1983, 1985, 1988; Brock and Lightner, 1990; Brock and Main, 1994; Guzmán and Valle, 2000) แบคทีเรียเหล่านี้พบกระจายอยู่ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. mucor* เป็นชนิดที่พบมากที่สุด โดยพบได้ทั่วไปในน้ำทะเลและเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นชนิดหนึ่งของสัตว์ทะเล เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมต่อการเติบโตจะเกิดการแพร่ระบาดและก่อให้เกิดโรคในกุ้งทะล ส่วนกุ้งที่อยู่ในโรงเพาะฟักและในบ่อมีโอกาสเป็นโรคนี้ได้เช่นเดียวกันหากมีการเลี้ยงกุ้งหนาแน่นและมีอาหารเหลือตกค้างในปริมาณมาก (Lightner, 1993; Guzmán and Valle, 2000) ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวจะเข้าไปเกาะตามลำตัวและเหงือกทำให้เหงือกมีสีน้ำตาลหรือดำ (Lightner, 1977) ทำให้บริเวณซี่เหงือก (gill lamellae) ถูกทำลายระบบการหายใจติดขัดแต่กุ้งยังคงมีชีวิตอยู่ได้ตามปกติแต่หากอยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำ กุ้งจะตายอย่างรวดเร็ว ในลูกกุ้งแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวจะเข้าไปเกาะตามรยางค์ว่ายน้ำ ตาและปาก ทำให้ลูกกุ้งเคลื่อนไหวไม่สะดวก เซื่องซึม สีของเหงือกเปลี่ยนไป ไม่สามารถกินอาหารได้และตายในที่สุด หากกุ้งมีการติดเชื้ออย่างรุนแรงจะทำให้เหงือกและบริเวณอื่น ๆ ที่ติดเชื้อเกิดการตายของเนื้อเยื่อและปรากฏเป็นรอยแผล (Amrane and Prigent, 1998)

โรค necrotizing hepatopancreatitis (NHP) มีสาเหตุเกิดจากแบคทีเรียขนาดเล็ก ติดสีแกรมลบ มีรูปร่างไม่แน่นอนและพบอยู่ภายในเซลล์เท่านั้น (obligate intracellular pathogen) จัดอยู่ในสกุล alpha Proteobacteria (Lightner *et al*., 1992; Frelier *et al*., 1993; Loy *et al*., 1996) มีรูปร่างแตกต่างกัน 2 แบบ คือ มีรูปร่างเป็นท่อน คล้ายริกเก็ตเซีย ไม่มีแส้ (flagella) ขนาด 0.3x9.0 ไมโครเมตร และมีรูปร่างเป็นเกลียว ขนาด 0.2x2.6-2.9 ไมโครเมตร มีแส้ 8 เส้น อยู่ทางส่วนปลายของฐานและมีแส้ 1 หรือ 2 เส้น อยู่ทางส่วนปลายของเกลียว (Lightner *et al*., 1992) Frelier *et al*.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(1992) รายงานว่า แบคทีเรียที่มีรูปร่างแบบท่อนนั้นมีจำนวนและบทบาทในการทำให้เกิดโรคมากกว่าแบคทีเรียที่มีรูปร่างแบบเกลียว ลักษณะอาการของโรคมีอยู่หลายอาการ เช่น เซื่องซึม ไม่กินอาหาร การเจริญเติบโตลดลง เปลือกและลำตัวนิ่ม เหงือกมีสีเข้มจนถึงดำ พบปรสิตเกาะตามลำตัว รยางค์กร่อนและมีบาดแผลตามลำตัว ตับและตับอ่อนฝ่อ บริเวณตรงกลางของตับและตับอ่อนมีสีขาวนวลหรือซีด ในกุ้งที่มีการติดเชื้อรุนแรงบางตัวมีตับและตับอ่อนซีดมีสีดำและเหลวและบวมน้ำเนื่องจากมีการเกิด melanization ของท่อตับและตับอ่อน (Sindermann, 1990; Lightner and Redman, 1994; Lightner, 1996) ส่วนลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบว่าเซลล์เยื่อบุของตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อ NHP จะมีขนาดเล็กลงและภายในไซโทพลาสซึมมีกลุ่มของแบคทีเรียติดสีน้ำเงิน (basophilic mass of bacteria) โดยเซลล์จะมีรูปร่างเป็นลูกบาศก์มากกว่าเป็นทรงกระบอก การสะสมไขมันใน R-cell น้อยและไม่พบช่องว่างใน B-cell (Lightner, 1996) จากนั้นเซลล์เริ่มมีการตาย ร่วมกับการตอบสนองแบบการอักเสบ (inflammation) โดยเกิดลักษณะ granuloma ขึ้นจำนวนมากในตับและตับอ่อน (Lightner, 1993)

โรค mycobacteriosis (shrimp tuberuculosis) เกิดจากแบคทีเรีย *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium fortuitum* และ *Mycobacterium* sp. เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาส กุ้งที่ติดเชื้อจะสร้างเมลานินเป็นจำนวนมากบริเวณเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ เช่น กล้ามเนื้อ รังไข่ หัวใจ และเหงือก เป็นต้น หรืออาจทำให้เกิดรอยแผลนูนขึ้นมาบริเวณเปลือก พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณ mandibular organ จะพบการรวมกลุ่มของเม็ดเลือด เรียงเป็นชั้นล้อมรอบแบคทีเรียและเซลล์ที่ตาย (Lightner, 1996)

Benekea spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. และ *Spirillum* spp. เป็นสาเหตุของโรค chitinolytic bacterial shell disease หรือ black spot disease กุ้งที่เป็นโรคจุดดำจะพบความผิดปกติที่ผิวเปลือกกุ้ง โดยจะมีรอยสีดำหรือสีน้ำตาลตามลำตัวกุ้งซึ่งเกิดจากกระบวนการสร้างเม็ดสีของกุ้ง (Brock and Main, 1994) การติดเชื้อจะเริ่มจากการที่กุ้งได้รับบาดแผลเพียงเล็กน้อย เช่น จากการถูกขีดข่วนหรือเกิดการระคายเคืองเนื่องจากสารเคมีหรือสารพิษต่าง ๆ จากนั้นแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวจะเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผล ทำให้เปลือกกร่อน เนื้อเยื่อถูกทำลายเกิดรอยแผลที่ใหญ่ขึ้นและเป็นแผลเน่าเปื่อยตามลำตัว (ulceration) เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างเอนไซม์ lipase, protease และ chitinase ได้ ซึ่งสามารถย่อยเปลือกและเนื้อเยื่อกุ้ง (Sindermann, 1990; Lightner, 1993)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนั้นโรคและอาการผิดปกติที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรานั้นก็สามารถสร้างความเสียหายให้กับลูกกุ้งในโรงเพาะฟักอย่างมาก ได้แก่ โรค larval mycosis ที่มีสาเหตุเกิดจาก *Lagenidium* spp., *L. callinectes*, *Sirolpidium* spp., *Haliphthoros milfordensis, Phythium* spp. และ *Leptolegnia marina* ส่วนโรค fusariosis หรือ fungus disease หรือ black gill disease มีสาเหตุเกิดจาก *Fusarium solani*, *F. moniliformae* และ *F. incarnatum* สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งทุกระยะ (Lightner, 1996; Alday and Flegel, 1999; Khoa *et al*., 2004) อาการโดยทั่วไปมักเกิดกระบวนการสร้างเมลานินบริเวณลำตัว ปลายรยางค์และเหงือก นอกจากนี้อาจมีอาการเนื้อตายของปลายหนวด แพนหางและบริเวณผิวทางด้านหลังของปล้องที่ 3-4 ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดการตายได้ถ้ามีการติดเชื้ออย่างรุนแรง (Brock and Main, 1994)

โรคที่มีสาเหตุมาจากปรสิต ได้แก่ microsporidian disease หรือ cotton shrimp disease สาเหตุเกิดจากปรสิตกลุ่ม microsporidian ได้แก่ *Ameson* (*Nosema*) sp., *Agmasoma* (*Thelohania*) sp., *Pleistophora* sp.และ *Microsporidium* sp. โดยจะแพร่กระจายไปตามเนื้อเยื่อ เช่น กล้ามเนื้อ หัวใจ อวัยวะสืบพันธุ์ เหงือก ตับและตับอ่อนและเส้นประสาท เป็นต้น ลักษณะอาการที่ปรากฏคือกล้ามเนื้อขุ่นขาวเหมือนสีน้ำนม ส่วน hepatopancreatic haplosporidiosis มีสาเหตุเกิดจากปรสิตในกลุ่ม haplosporidian โดยพบว่ามีการติดเชื้อในบริเวณตับและตับอ่อน แต่ไม่แสดงอาการผิดปกติ พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนจะพบการอักเสบและการตายของเซลล์ในบริเวณส่วนของท่อตับและตับอ่อน และ Protozoa fouling เกิดจากการที่มีโปรโตซัว ได้แก่ *Zoothamnium*, *Epistylis*, *Vorticella*, *Anophrys*, *Acineta* sp., *Lagenophrys* และ *Ephelota* เกาะตามส่วนต่าง ๆ ตามลำตัวของกุ้ง รยางค์และเหงือก ซึ่งมักก่อให้เกิดความรำคาญกับตัวกุ้ง โดยกุ้งที่เป็นโรคนี้จะมีการกินอาหารและมีพฤติกรรมปกติจนกว่าจะถึงช่วงที่มีการลอกคราบ หากมีการลอกคราบเกิดขึ้นกุ้งอาจจะตายได้ เนื่องจากโปรโตซัวจะเข้าไปขัดขวางการแลกเปลี่ยนก๊าซบริเวณเหงือกและการลอกคราบ ถ้าอาการรุนแรงจะพบว่ามีลักษณะเหมือนขนเป็นกลุ่ม (fuzzy) เกาะรอบตัวและรยางค์ (Lightner, 1996; Alday and Flegel, 1999; Gopalakrishnan and Parida, 2005)

3. ไวรัสดวงขาว (white spot syndrome virus)

ในปี ค.ศ. 1992 ฟาร์มเลี้ยงกุ้งที่อยู่ทางตอนเหนือของประเทศไต้หวันได้ประสบกับปัญหาการเกิดโรคระบาดจากเชื้อไวรัสชนิดใหม่ขึ้น ทำให้กุ้งที่เลี้ยงตายเป็นจำนวนมาก (Chou *et al*., 1995) ต่อมาในช่วงปลายปี ค.ศ. 1993 เชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ถูกรายงานเป็นครั้งแรกหลังจากเกิดการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระบาดในประเทศญี่ปุ่น (Inouye *et al*., 1994) และภายในระยะเวลา 2-3 ปี ต่อมาไวรัสชนิดนี้ก็ได้แพร่กระจายไปยังฟาร์มเลี้ยงกุ้งในหลายประเทศ (Flegel, 1997) ซึ่งในตอนแรกเข้าใจกันว่าเกิดจากเชื้อไวรัสที่แตกต่างกันและกุ้งในประเทศต่าง ๆ ป่วยเป็นโรคขึ้นเกือบจะพร้อมกัน ทำให้แต่ละประเทศได้ตั้งชื่อโรคนี้แตกต่างกันออกไป ได้แก่ hypodermal and haematopoietic necrosis baculovirus (HHNBV) (Durand *et al*., 1996), third *Penaeus monodon* non-occluded baculovirus (PmNOB III) (Wang *et al*., 1995; Karunasagar *et al*., 1997), rodshaped nuclear virus of *Marsupenaeus japonicus* (RV-PJ) (Inouye *et al*., 1994, 1996), penaeid rod-shaped DNA virus (Venegas *et al*., 2000), systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (Wongteerasupaya *et al*., 1995; Sahul Hameed *et al*., 1998) และ white spot baculovirus (Chou *et al*., 1995; Lightner, 1996) ในเวลาต่อมา พบว่าโรคเหล่านี้เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดเดียวกัน ซึ่งในท้ายที่สุดทาง International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) ได้ตั้งชื่อว่า white spot syndrome virus (WSSV) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคดวงขาวหรือโรคจุดขาว (white spot disease; WSD) ที่ระบาดและทำความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลทั่วโลก (ตารางที่ 2) โดยในอดีตได้จัดไวรัสชนิดนี้ให้อยู่ในสกุล *Non-occluded Baculovirus* วงศ์ย่อย *Nudibaculovirinae* และวงศ์ *Baculoviridae* แต่จากการวิเคราะห์ลำดับของ DNA (van Hulten *et al*., 2001a; Yang *et al*., 2001) พบว่า มีลักษณะความใกล้เคียงกับไวรัสในกลุ่ม baculovirus อยู่ในระดับต่ำ (Wang *et al*., 2000) จึงได้มีการศึกษาเพิ่มเติมทางด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) โครงสร้างและองค์ประกอบต่าง ๆ ของจีโนม (genomic structure and composition) และการศึกษาเกี่ยวกับวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) จนกระทั่งในท้ายที่สุดได้จัดให้ไวรัสชนิดนี้อยู่ในสกุลใหม่ คือสกุล *Whispovirus* ในวงศ์ *Nimaviridae* (Mayo, 2002) ซึ่งชื่อวงศ์นั้นตั้งตามลักษณะรูปร่างของไวรัสเนื่องจากปลายของด้านใดด้านหนึ่งของอนุภาคไวรัสมีสายยาวลักษณะคล้ายหาง (Wongteerasupaya *et al*., 1995; Durand *et al*., 1997)

WSSV เป็นไวรัส DNA สายคู่เชื่อมต่อกันเป็นวง (dsDNA) มีรูปร่างเป็นแท่ง (bacilliform) เป็น non-occluded enveloped virus (Chou *et al*., 1995; Wang *et al*., 1995; Wongteerasupaya *et al*., 1995) อนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์มีความยาว 210-380 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 70-167 นาโนเมตร (Chang *et al*., 1996; Flegel and Alday-Sanz, 1998; Park and Lee, 1998; Rejendran *et al*., 1999) ที่ปลายของด้านใดด้านหนึ่งของอนุภาคไวรัสมีสายยาวลักษณะคล้ายหาง (Wongteerasupaya *et al*., 1995; Durand *et al*., 1997) ซึ่งภายในอนุภาคประกอบด้วยนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) รูปท่อนอัดตัวกันแน่นล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้ม 3 ชั้น (trilaminar envelope) นิวคลีโอแคปซิดที่ปราศจาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เยื่อหุ้มมีความยาว 180-420 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 54-85 นาโนเมตร (Kasornchandra *et al*., 1998; Sahul Hameed *et al*., 1998; Rajendran *et al*., 1999)

WSSV สามารถถูกทำลายด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี โดยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หรือ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที การใช้สภาพที่มีความเป็นกรดสูง ได้แก่ ที่พีเอช 1 เป็นเวลา 10 นาที และพีเอช 3 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนการใช้สภาพที่มีความเป็นด่างสูง ได้แก่ ที่พีเอช 12 เป็นเวลา 10 นาที (อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส) การใช้รังสี UV ที่ $9x10^5$ μWs/cm^2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การใช้โอโซน 0.5 μg/ml การใช้ sodium hypochlorite ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม การใช้ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 75 พีพีเอ็ม การใช้ povidone iodine ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม (Chang *et al*., 1998a)

ตารางที่ 2 การระบาดของ WSSV ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งในทวีปเอเชียและทวีปอเมริกา

ปีแรกที่ระบาด	ประเทศ	อ้างอิง
1992	ไต้หวัน	Chou *et al.* (1995)
1993	จีน ญี่ปุ่นและเกาหลีใต้	Zhan *et al*. (1998); Inouye *et al.* (1994); Park *et al.* (1998)
1994	ไทย อินเดียและบังคลาเทศ	Lo *et al.* (1996a); Karunasagar *et al.* (1997); Mazid and Banu (2002)
1995	สหรัฐอเมริกา	Lightner (1996); Wang *et al.* (1999a)
1996	อินโดนีเซีย มาเลเซียและศรีลังกา	Durand *et al.* (1996); Kasornchandra *et al*. (1998); Rajan *et al*. (2000)
1997	เวียดนาม	Bondad-Reantaso *et al*. (2001)
1998	เปรู	Rosenberry (2001)
1999	ฟิลิปปินส์ เอกวาดอร์ โคลอมเบีย ปานามา ฮอนดูรัส นิคาราก้ว กัวเตมาลาและเบลิส	Magbanua *et al*. (2000); Bondad-Reantaso *et al*. (2001); Hossain *et al*. (2001); Wu *et al.* (2001)
1999-2000	เม็กซิโก	Bondad-Reantaso *et al*. (2001)
2002	ฝรั่งเศสและอิหร่าน	Dieu *et al.* (2004); Marks (2005)
2005	บราซิล	APHIS-USDA (2005)

ที่มา: Escobedo-Bonilla *et al*. (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาลำดับในจีโนมของ WSSV พบว่า จีโนมของ WSSV ที่แยกเชื้อได้จากประเทศไทย (WSSV-TH) มีขนาด 292,967 base pairs (bp) (AF369029) (van Hulten *et al.*, 2001a) ส่วนเชื้อ WSSV ที่แยกเชื้อได้จากประเทศไต้หวัน (WSSV-TW) มีขนาด 307,287 bp (AF440570) (Chen *et al.*, 2002) และ WSSV ที่แยกเชื้อได้จากประเทศจีน (WSSV-CN) มีขนาด 305,107 bp (AF332093) (Yang *et al.*, 2001) อนุภาค WSSV ประกอบด้วยโปรตีนมากกว่า 40 ชนิด ซึ่งตั้งชื่อตามน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของแถบโปรตีนที่ปรากฏใน SDS-PAGE หรือจำนวนของกรดอะมิโนซึ่งแบ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ได้เป็นโครงสร้าง ได้แก่ VP9 ที่น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการถอดรหัสพันธุกรรม (Liu *et al.* 2006) WSV021 ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Zhu *et al.* 2007) และ WSV477 ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการจำลองตัวเองของไวรัส (Han *et al.* 2007) ส่วนโปรตีนโครงสร้างได้แก่โปรตีนโครงสร้างที่พบใน envelope 25 ชนิด ได้แก่ VP12, VP19, VP22, VP24, VP28, VP31, VP36B, VP38A, VP39, VP41, VP41A, VP41B, VP51B, VP52A, VP52B, VP53, VP53A, VP68, VP110, VP124, VP150, VP187, VP281, VP292 และ VP466 (van Hulten *et al.*, 2000; van Hulten *et al.*, 2001b; Huang *et al.*, 2002a; Huang *et al.*, 2002b; van Hulten *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006a; Li *et al.*, 2006b; Li *et al.*, 2006c; Tsai *et al.*, 2006; Xie and Yang, 2006; Xie *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006) โปรตีนโครงสร้างที่พบในนิวคลีโอแคปซิด 6 ชนิด ได้แก่ VP15, VP35, VP51C, VP60B, VP388 และ VP664 (van Hulten *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2005; Witteveldt *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2006) โปรตีนโครงสร้างที่พบใน tegument (โครงสร้างที่อยู่ระหว่าง envelope กับนิวคลีโอแคปซิด) 3 ชนิด ได้แก่ VP36A, VP39A และ VP95 (Tsai *et al.*, 2006) และโปรตีนโครงสร้างที่ยังไม่ทราบหน้าที่ โดยพบว่า VP15 มีหน้าที่ DNA binding protein (Witteveldt *et al.*, 2005) และจากการศึกษาโปรตีนที่ envelope VP24, VP28, VP31, VP36B, VP68, VP76, VP281 และ VP466 พบว่าเกี่ยวข้องกับระยะแรกของการจำลองตัวเองของ WSSV (van Hulten *et al.*, 2001b; Huang *et al.*, 2005; Li, *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006a; Li *et al.*, 2006b; Xie and Yang, 2006) นอกจากนั้น VP28 ยังมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการยึดติดและการผ่านเข้าไปในเซลล์ของเจ้าบ้านและการติดเชื้อในระบบร่างกาย (van Hulten *et al.*, 2001b; Wu *et al.*, 2005) และจากการศึกษาของ Musthaq *et al.* (2006) พบว่า ไพรเมอร์ (primer) ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีนของ VP28 หรือแอนติบอดีที่ผลิตให้จำเพาะกับ VP28 (Poulos *et al.*, 2001) มีประสิทธิภาพในการตรวจหาการติดเชื้อ WSSV ที่แยกเชื้อมาจากแหล่งที่แตกต่างกันได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โรคดวงขาวเป็นโรคที่มีความรุนแรงมาก กุ้งที่ติดเชื้อ WSSV จะมีการตายอย่างรวดเร็ว อัตราการตายสะสมสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 3-10 วันหลังจากกุ้งเริ่มแสดงอาการของโรค (Lightner, 1996) การระบาดของโรคส่วนใหญ่มักจะเกิดขึ้นในช่วง 60 วันแรกของการเลี้ยง (Chanratcakool and Limsuwan, 1998; Withyachumnarnkul,1999) และจากทดลองชักนำให้เกิดการติดเชื้อโดยการแช่และการให้กินเชื้อ WSSV ในกุ้งระยะต่าง ๆ พบว่า กุ้งระยะต่ำกว่าโพสลาร์วา 10 มีอัตราการตายต่ำ แต่เมื่อนำลูกกุ้งเหล่านี้ไปตรวจด้วยวิธี PCR พบว่าให้ผลเป็นบวก อย่างไรก็ตาม กุ้งตั้งแต่ระยะโพสลาร์วา 11 เป็นต้นไปที่ได้รับเชื้อ WSSV มีอัตราการตายสูงและเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR พบว่าให้ผลเป็นบวก (Yoganandhan *et al.*, 2003) อาการของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV จะมีจุดขาวหรือดวงขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-2.0 มิลลิเมตร ฝังอยู่ที่เปลือก โดยเฉพาะบริเวณเปลือกคลุมหัว (Wang *et al.*, 1995; Lightner, 1996) จุดขาวหรือดวงขาวจะสังเกตเห็นได้ง่าย โดยการดึงเปลือกคลุมหัวออกแล้วลอกเนื้อเยื่อบาง ๆ ออก จากนั้นส่องเปลือกกุ้งผ่านแสงจะสามารถสังเกตเห็นจุดหรือดวงขาวได้อย่างชัดเจน โดย ปิยนุช (2550) อธิบายลักษณะอาการภายนอกของกุ้งขาวขนาดเล็กที่ติดเชื้อ WSSV พบว่าไม่สามารถสังเกตเห็นจุดหรือดวงขาวได้ ถ้าไม่ดึงเปลือกคลุมหัวให้หลุดออกมา ในกรณีที่กุ้งขาวมีขนาดความยาวมากกว่า 5 เซนติเมตร จะเริ่มสังเกตเห็นจุดหรือดวงขาวบ้าง แต่จะไม่ชัดเจน นอกจากดึงเปลือกส่วนที่คลุมหัวให้หลุดออกมาเช่นกัน ส่วนกุ้งขาวที่มีขนาดใหญ่จะสามารถสังเกตเห็นจุดหรือดวงขาวชัดเจน สำหรับลักษณะของดวงขาวนี้จะไม่แตกต่างจากที่พบในกุ้งกุลาดำ อย่างไรก็ตามการสังเกตจุดขาวที่พบบริเวณเปลือกกุ้งนั้นไม่ใช่วิธีการวินิจฉัยโรคดวงขาวที่แม่นยำ เนื่องจากจุดขาวบนเปลือกอาจจะเกิดได้หลายสาเหตุ โดย ชลอ (2543) อธิบายลักษณะที่คล้ายกับดวงขาวมีหลายรูปแบบแตกต่างกันไป ได้แก่ กุ้งที่พบในบ่อมีจุดขาวในบริเวณส่วนหัวและลำตัวปล้องท้าย ๆ เช่นเดียวกับกุ้งที่เป็นโรคที่เกิดจาก WSSV กุ้งที่มีจุดขาวยังคงกินอาหารตามปกติ ไม่มีกุ้งป่วยเกาะตามขอบบ่อ ลักษณะเช่นนี้ถ้านำกุ้งที่มีจุดขาวไปตรวจด้วยวิธี PCR จะให้ผลเป็นลบ การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อจะไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อ ซึ่งบ่อที่พบกุ้งในลักษณะเช่นนี้ส่วนใหญ่ค่าพีเอชของน้ำค่อนข้างจะสูงติดต่อกันเป็นเวลานาน คือ ค่าพีเอชของน้ำตอนเช้ามักจะสูงกว่า 8.3 จนเกิดตะกรันบนเปลือกกุ้ง วิธีการแก้ไขสามารถทำโดยการลดพีเอชของน้ำ เช่น การใช้ฟอร์มาลินในปริมาณ 5-7 ลิตรต่อไร่ต่อวัน ในระดับน้ำลึกประมาณ 1.0-1.2 เมตร ในเวลากลางวันติดต่อกันไปจนกว่าค่าพีเอชในตอนเช้าจะลดลงต่ำกว่า 8.0 แต่ต้องไม่ต่ำกว่า 7.5 เพื่อกระตุ้นให้กุ้งลอกคราบ หลังจากกุ้งลอกคราบแล้วจุดขาวเหล่านั้นจะหลุดลอกออกมาพร้อมกับคราบเก่า กุ้งทั้งหมดก็จะเป็นปกติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในอีกกรณีหนึ่ง คือ กุ้งที่เกาะตามขอบบ่อมีลำตัวสกปรกเกือบทุกตัวมีเหงือกดำและมีกุ้งบางส่วนตาย บริเวณส่วนหัวและลำตัวปล้องท้าย ๆ มีดวงขาว แต่กุ้งในบ่อยังกินอาหารเป็นปกติหรือลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ถ้านำกุ้งที่มีจุดขาวตามขอบบ่อเหล่านี้ไปตรวจด้วยวิธี PCR ผลจะเป็นลบและจากการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไม่พบลักษณะการติดเชื้อ WSSV แต่จะพบการติดเชื้อแบคทีเรียเล็กน้อยกระจายทั่วไปทั้งบริเวณใต้ส่วนเปลือก หัวใจ ตับและตับอ่อนและส่วนอื่น ๆ การแก้ปัญหาขั้นแรกเก็บกุ้งตัวสกปรกหรือกำลังจะตายตามขอบบ่อออกให้หมด อาจจะใช้เวลา 2-3 วัน ส่วนมากมักจะพบในช่วงที่กุ้งส่วนใหญ่ในบ่อเพิ่งลอกคราบ หลังจากนั้นแก้ปัญหาสภาพต่าง ๆ ในบ่อให้ดีขึ้น เช่น ในกรณีที่น้ำมีตะกอนมาก ควรเปลี่ยนถ่ายน้ำทำให้สีน้ำและปริมาณแพลงก์ตอนเหมาะสมมากขึ้น กุ้งที่เหลือในบ่อก็จะกลับเป็นปกติ เลี้ยงต่อไปจนได้ขนาดจับขายและในกรณีสุดท้าย คือ กุ้งในบ่อบางตัวมีจุดขาวบริเวณส่วนหัวและลำตัวปล้องท้าย ๆ ส่วนมากเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่และอายุมากพอที่จะจับขายได้แล้ว กุ้งที่มีจุดขาวเหล่านี้ไม่พบเกาะตามขอบบ่อ แต่จะพบในขณะที่สุ่มกุ้งโดยการใช้แห อาจจะมีเพียงไม่กี่ตัวเท่านั้น กุ้งเหล่านี้มีสภาพแข็งแรงสมบูรณ์ใกล้เคียงกับกุ้งปกติในบ่อทั่วไป กุ้งในบ่อยังคงกินอาหารเป็นปกติ เมื่อนำไปตรวจด้วยวิธี PCR จะให้ผลเป็นลบและการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไม่พบความผิดปกติใด ๆ ในทุกอวัยวะ ซึ่งหลังจากกุ้งเหล่านี้ลอกคราบแล้ว เปลือกใหม่จะไม่มีจุดขาวแต่จะพบจุดขาวติดกับคราบเก่าได้ในบ่อหรือบริเวณรอบ ๆ แนวเลนกลางบ่อ

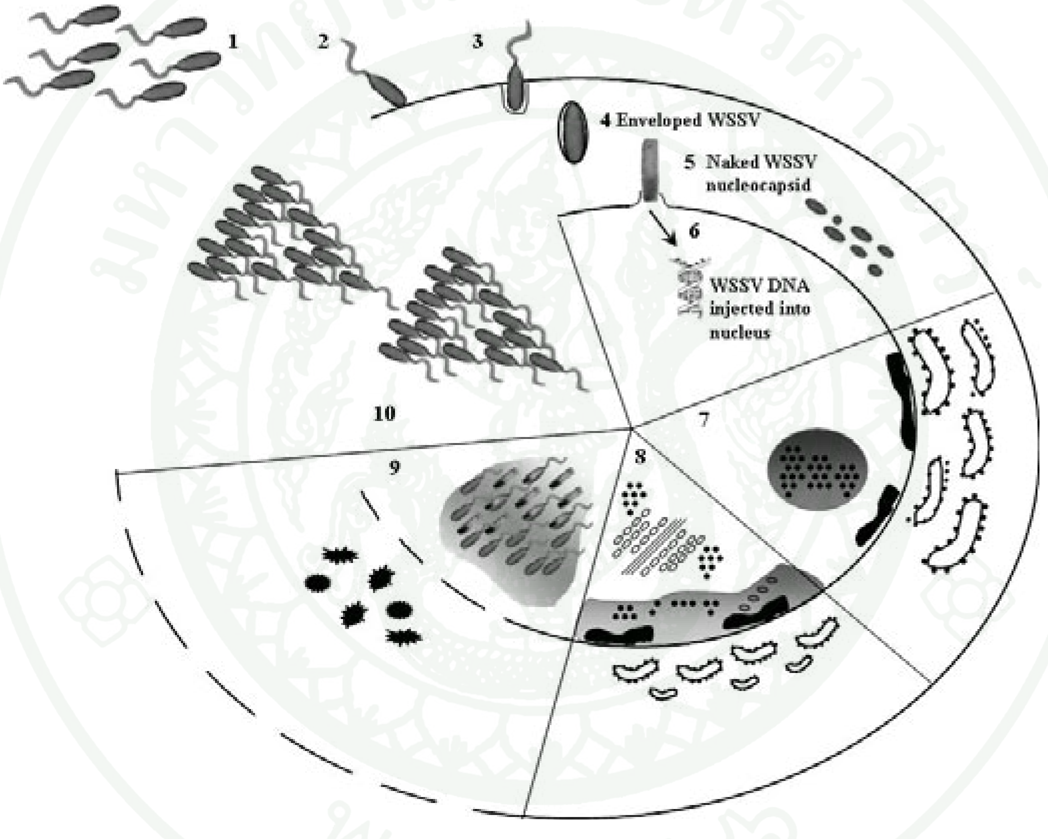
ในบางครั้งพบกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV มีลำตัวสีชมพูจนถึงแดง (Chou *et al*., 1995; Nadala *et al*., 1998; Lightner *et al*., 1998; Bondad-Reantaso *et al*., 2001) ส่วนอาการอื่น ๆ ที่พบในกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV เช่น ว่ายอยู่บริเวณผิวน้ำหรือเกยขอบบ่อ เซื่องซึม กินอาหารลดลงและบางครั้งพบกุ้งลอกคราบไม่ออกหรือเปลือกไม่แข็ง (Chou *et al*., 1995; Durand *et al*., 1996; Lo *et al*., 1996b; Flegel, 1997) Sudha *et al.* (1998) ได้ศึกษาการระบาดของโรคดวงขาวในกุ้งกลุ่ม penaeid และได้จำแนกโรคดวงขาวเป็น 3 แบบ ตามลักษณะอาการที่ปรากฏภายนอก ดังนี้ แบบที่ 1 (acute ถึง subacute) กุ้งที่ติดเชื้อ WSSV จะมีจุดขาวหรือดวงขาวบนเปลือกคลุมหัว อัตราการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 7-10 วัน และพบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อปานกลางจนถึงรุนแรง แบบที่ 2 (peracute) กุ้งที่ติดเชื้อ WSSV มีลำตัวสีแดง มีการอัตราการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 2-3 วัน และพบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อระดับที่รุนแรงมาก ส่วนแบบที่ 3 (chronic) กุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ไม่มีจุดขาวหรือดวงขาวและสีของลำตัวปกติ เกิดการตายอยู่ระหว่าง 15-28 วัน แต่พบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อน้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จะเห็นได้ว่าอาการของโรคดวงขาวและอาการคล้ายโรคดวงขาวนั้นมีอยู่หลายอาการ ดังนั้นการวินิจฉัยขั้นต้นจะต้องมีข้อมูลทางด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อประกอบด้วย โดยลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV นั้นค่อนข้างจะมีความจำเพาะซึ่งสามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการวินิจฉัยโรคได้ โดยเนื้อเยื่อเป้าหมายของเชื้อ WSSV คือ เนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดมาจาก ectoderm และ mesoderm ซึ่งประกอบด้วย เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เหงือก เนื้อเยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร เนื้อเยื่อบุทางเดินอาหารส่วนต้นและส่วนปลาย antennal gland อวัยวะต่อมน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ หัวใจ อวัยวะสืบพันธุ์ เม็ดเลือด อวัยวะสร้างเม็ดเลือด เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ก้านตาและเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (Wongteerasupaya *et al*., 1995; Chang *et al*., 1996; Durand *et al*., 1996; Lo *et al*., 1997; Chang *et al*., 1998b; Kou *et al*., 1998; Rajendran *et al*., 1999; Wang *et al*., 1999b) โดยเซลล์ที่ติดเชื้อ WSSV จะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้น (hypertrophied nuclei) และมี basophilic central inclusion ล้อมรอบด้วยโครมาติน (Durand *et al*., 1997; Wang *et al*., 2000) โดยจะเริ่มต้นด้วยการเกิด eosinophilic inclusion (Cowdry type A inclusion) แต่จะสิ้นสุดด้วยการเกิด basophilic inclusion บริเวณนิวเคลียส ไม่พบการอักเสบต่อเชื้อไวรัสทั้ง ๆ ที่มีเนื้อเยื่อถูกทำลาย (Flegel *et al*., 1997) ซึ่งจากการวิเคราะห์หาปริมาณ WSSV ตามอวัยวะต่าง ๆ พบว่า เนื้อเยื่อเป้าหมายหลักของการจำลองตัวของเชื้อ WSSV อยู่ที่เหงือก เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือกตามลำตัว เนื้อเยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร อวัยวะสร้างเม็ดเลือด อวัยวะต่อมน้ำเหลืองและ antennal gland (Tan *et al*., 2001; Durand and Lightner, 2002; Escobedo-Bonilla *et al*., 2007) การจำลองตัวเองและการรวมตัวกันของอนุภาค WSSV เกิดขึ้นภายในนิวเคลียสแสดงไว้ในภาพที่ 1 เริ่มจาก (1) อนุภาค WSSV เข้าไปในร่างกายกุ้งและ (2) ยึดติดกับเซลล์ที่ยอมรับเชื้อโดยการใช้โปรตีนส่วนเปลือกของไวรัส หลังจากนั้น (3) อนุภาค WSSV เข้าสู่เซลล์ (4) เปลือกของอนุภาค WSSV ละลายไปกับ endosome เหลือแต่ส่วนของ nucleocapsid ที่ไม่มีเปลือกหุ้มหลังจากนั้นจะเข้าไปในนิวเคลียสวิธีเดียวกันกับไวรัสกลุ่ม baculovirus (Lua and Reid, 2000) คือ (5) nucleocapsid ของ WSSV ที่ไม่มีเปลือกหุ้มจะยึดติดกับผนังของนิวเคลียสและปล่อยจีโนมเข้าไปยังนิวเคลียส หลังจากนั้น (6) การจำลองจีโนมของ WSSV จะเริ่มเกิดขึ้นในนิวเคลียส ส่วนในไซโทพลาสซึมจะพบไมโทคอนเดรียเริ่มเสื่อมสภาพ (Wang *et al*., 1999a) ต่อมา (7) ในนิวเคลียสจะเกิด virogenic stroma มีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ รวมกันอยู่แต่ไม่แน่น ส่วนโครมาตินจะรวมตัวกันแน่นอยู่ใกล้ผนังนิวเคลียสในขณะเดียวกันกับ rough endoplasmic reticulum จะมีขนาดใหญ่ขึ้น จากนั้น (8) โครมาตินจะอัดตัวกันแน่นจนมีรูปร่างเหมือนวงแหวน ในส่วนของ virogenic stroma จะเริ่มสร้าง vesicle ซึ่งจะกลายเป็นเปลือกของไวรัสในภายหลัง โดยอาจจะพบ vesicle ในบริเวณโครมาตินที่มีรูปร่างเหมือนวงแหวนด้วยเช่นเดียวกันกับที่พบในไวรัสกลุ่ม baculovirus (Lua and Reid, 2000) และสามารถสังเกตเห็น viral nucleosome

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่เป็นโครงสร้างแบบเส้นใยใน virogenic stroma ซึ่งโครงสร้างนี้จะบรรจุโปรตีนหลายชนิดเพื่อสร้าง nucleocapsid (9) อนุภาค WSSV ใหม่ซึ่งเกิดการรวมตัวกันระหว่างส่วนของเปลือกที่ว่างเปล่ากับ nucleocapsid ซึ่งจะเกิดขึ้นภายในนิวเคลียสที่มีลักษณะเป็น inclusion ส่วนออร์แกเนลล์ต่าง ๆ ในไซโทพลาสซึมจะแตกสลายและผนังนิวเคลียสถูกทำลาย (Wang *et al.*, 1999a) (10) อนุภาค WSSV ที่สมบูรณ์จะถูกปลดปล่อยจากเซลล์ที่แตกสลายและเริ่มวัฏจักรใหม่ในเซลล์อื่น ๆ ที่ยอมรับเชื้อต่อไป



ภาพที่ 2 กลไกการจำลองตัวเองและการรวมตัวกันของอนุภาค WSSV ภายในนิวเคลียส

ที่มา: Escobedo-Bonilla *et al.* (2008)

การติดเชื้อ WSSV ในกุ้งเกิดขึ้นได้หลายสาเหตุ เช่น เกิดจากการถ่ายทอดเชื้อ WSSV ในระบบการเลี้ยงโดยการผ่านทางน้ำและการกินกุ้งที่ติดเชื้อ ซึ่งจะเกิดการระบาดอย่างรวดเร็ว (Chang *et al.*, 1996) แต่สาเหตุสำคัญของการติดเชื้อ WSSV ในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง คือ การติดเชื้อจากพ่อแม่พันธุ์และลูกกุ้งระยะโพสลาร์วา (Lo *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 1999; Withyachumnarnkul, 1999;

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Withyachumnarnkul *et al.*, 2003) มีรายงานที่พบว่า พ่อแม่พันธุ์กุ้งสามารถส่งผ่านเชื้อไวรัสไปลูกกุ้งได้ โดยมีการติดเชื้อ WSSV ใน gonad, follicle cell และ oogonia (Kou *et al*., 1997; Mohan *et al*., 1997) อย่างไรก็ตาม Lo *et al.* (1997) พบว่า มีเชื้อ WSSV อยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ (reproductive organs) ของกุ้งแต่จะพบอยู่ตามบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ล้อมรอบหลอดสร้างตัวอสุจิ (seminiferous tubules) เท่านั้น ไม่พบใน germ cell ที่อยู่ในเนื้อเยื่อของ spermatophore ส่วนในรังไข่นั้นพบ WSSV ใน follicle cell, oogonia และเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีนิวเคลียสที่ขยายใหญ่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่าเซลล์ปกติ 2-3 เท่า ซึ่งจะเห็นได้ว่าเซลล์ที่ติดเชื้อ WSSV ส่วนใหญ่จะอยู่ที่บริเวณ epidermis เท่านั้นและไม่พบไข่ที่เจริญสมบูรณ์ (mature egg) ติดเชื้อ WSSV เลย อาจจะเป็นไปได้ว่าเซลล์ไข่ที่ติดเชื้อ WSSV จะถูกทำลายจนกระทั่งไม่สามารถเจริญเป็นไข่ที่สมบูรณ์ได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการถ่ายทอดเชื้อ WSSV จากพ่อแม่พันธุ์ไปยังลูกกุ้งนั้นเกิดขึ้นหลังจากการวางไข่ โดยไข่หรือลูกกุ้งวัยอ่อน อาจเกิดการปนเปื้อนกับอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายนอก นอกจากนั้นเชื้อ WSSV ในน้ำจากบ่อเลี้ยงที่มีการระบาดของโรคสามารถคงอยู่ในภาวะที่ก่อให้เกิดโรคได้ประมาณ 4-7 วัน (Flegel, 1997) และจากการทดลอง co-habitation พบว่าเชื้อ WSSV สามารถถูกถ่ายทอดโดยผ่านน้ำจากพาหะที่ติดเชื้อไปยังกุ้งปกติได้ภายใน 24 ชั่วโมง การถ่ายทอดเชื้อ WSSV อาจจะเกิดจากการกระทำของมนุษย์ นก หรือการอพยพของสัตว์ต่าง ๆ เช่น แมลงและปลา เป็นต้น ผลิตภัณฑ์อาหารแช่เยือกแข็งที่มีเชื้อไวรัสปนเปื้อน ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงที่มีกุ้งติดเชื้อไวรัสและเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีการปนเปื้อน (Lightner *et al*., 1997b; Kanchanaphum *et al*., 1998; Supamattaya *et al*., 1998; Sahul Hameed *et al*., 2002)

สาเหตุโน้มนำที่อาจจะทำให้เกิดการระบาดโรคดวงขาวพอจะสรุปได้ดังนี้

ช่วงเวลาในระหว่างการเตรียมบ่อไม่เหมาะสม เนื่องจากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่จะจับกุ้งในช่วงปลายฤดูฝนในระหว่างช่วงเดือนสิงหาคมถึงตุลาคมและต้องรีบปล่อยกุ้งลงเลี้ยงในรอบต่อไปเพื่อหลีกเลี่ยงช่วงอุณหภูมิต่ำในเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม ทำให้การเตรียมบ่อทำได้อย่างไม่สมบูรณ์เนื่องจากฝนที่ตกติดต่อกันไม่สามารถตากบ่อให้แห้งได้ ส่งผลให้การบำบัดของเสียที่พื้นบ่อไม่ดีมีของเสียสะสมอยู่มาก (พรเลิศ, 2539) และในกรณีที่มีการจับกุ้งได้ผลผลิตมากในรอบการเลี้ยงที่ผ่านมาทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งค่อนข้างมั่นใจว่าคงไม่เกิดปัญหาอะไรขึ้นจึงรีบปล่อยกุ้งลงเลี้ยงโดยไม่มีการเตรียมบ่อและเตรียมน้ำที่ดี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปล่อยกุ้งในอัตราความหนาแน่นมากเกินไป ซึ่งสาเหตุเกิดขึ้นจากกุ้งที่เลี้ยงในรอบการเลี้ยงที่ผ่านมามีอัตราการรอดตายต่ำ เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งบางส่วนจึงมีการปล่อยกุ้งในอัตราความหนาแน่นมากขึ้นกว่าเดิมในรอบการเลี้ยงถัดไปหรือเกษตรกรบางรายต้องการผลผลิตมากกว่าเดิมจึงปล่อยกุ้งในอัตราความหนาแน่นที่สูงขึ้น นอกจากนั้นในบางช่วงของปีเกษตรกรไม่สามารถคัดเลือกลูกกุ้งที่มีขนาดเหมาะสมปล่อยลงเลี้ยงได้ จึงจำเป็นต้องใช้ลูกกุ้งที่มีขนาดเล็ก การปล่อยลูกกุ้งขนาดเล็กลงบ่อเลี้ยงนั้น ส่วนใหญ่จะมีอัตราการรอดตายต่ำ เกษตรกรจึงปล่อยกุ้งมากขึ้นเพื่อชดเชยส่วนที่อาจจะตาย โดยการเลี้ยงกุ้งที่ปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นทำให้คุณสมบัติของน้ำในบ่อเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่เลวลงเนื่องจากปริมาณอาหารที่ให้จะมากตามไปด้วย ดังนั้นของเสียที่ขับถ่ายจากกุ้งและอาหารที่เหลือในบ่อจะสะสมมากขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยง คุณสมบัติของน้ำที่ลดลงจะมีผลทำให้กุ้งอ่อนแอและเกิดโรคได้ง่าย (ชลอ, 2543)

ระบบการเลี้ยงและฤดูกาล การเปลี่ยนแปลงจากการเลี้ยงกุ้งแบบปกติหรือระบบเปิดซึ่งมีการถ่ายน้ำ การระบายของเสียจากบ่ออยู่เสมอ ๆ มาเป็นการเลี้ยงกุ้งระบบปิดถ่ายน้ำน้อยนั้น เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการสะสมของเสียในบ่อมากขึ้น (ชลอ, 2543) ส่งผลทำให้กุ้งอ่อนแอและติดโรคง่ายและการเตรียมบ่อในการเลี้ยงกุ้งรอบแรกของปี พบว่า เกษตรกรจะเตรียมบ่อได้ดีมากเนื่องจากเป็นช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายนและเกษตรกรเริ่มปล่อยกุ้งในเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายนซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งและมีปัญหาน้อยมาก แต่หลังจากที่เกษตรกรจับกุ้งแล้วปล่อยกุ้งรอบใหม่ ของเสียที่ตกค้างอยู่จากการเตรียมบ่อที่ไม่ดี เมื่อเข้าฤดูหนาวช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงมกราคม กุ้งจะกินอาหารน้อยลงและเกษตรกรส่วนใหญ่จะควบคุมปริมาณการให้อาหารได้ไม่ดี จึงมีอาหารเหลือมากขึ้นเกิดการเน่าเสีย จึงเป็นเหตุให้ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์เพิ่มมากขึ้น จนทำให้กุ้งอ่อนแอและติดโรคในที่สุด (พรเลิศ, 2539) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ชลอ และ พรเลิศ (2547) รายงานไว้ว่า ช่วงที่พบการระบาดของโรคดวงขาวมากที่สุด คือ ตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงธันวาคม ต่อเนื่องจนถึงเดือนมกราคมของปีถัดไป

WSSV สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งกลุ่ม penaeid หลายชนิด ทั้งที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติและในบ่อเลี้ยง นอกจากนั้นจากการศึกษาที่ผ่านมายังพบว่าสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียนหลายชนิดสามารถติดเชื้อชนิดนี้ได้เช่นกัน ซึ่งได้แก่ กุ้งน้ำจืด กุ้งในกลุ่ม lobster กุ้งในกลุ่ม crayfish และปูที่อาศัยในน้ำเค็มและน้ำกร่อย รวมไปถึงสัตว์ที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่มครัสเตเซียน เช่น สัตว์ในกลุ่ม Chaetognata, Rotifera, polychaete worm และตัวอ่อนแมลงที่อยู่ในน้ำบางชนิด (ตารางที่ 3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 สัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียนหลายชนิดที่สามารถติดเชื้อ WSSV

กลุ่ม	ชนิด	การติดเชื้อ		วิธีการตรวจ
		ธรรมชาติ	ทดลอง	
กุ้งกลุ่ม	*Farfantepenaeus aztecus*		X	Histopathology
penaeid	*F. duorarum*		X	Histopathology
	Fenneropenaeus chinensis	X	X	Histopathology, ISH, PCR
	F. indicus	X	X	Histopathology, PCR, TEM
	F. merguiensis	X	X	Histopathology, PCR, IIF
	Litopenaeus setiferus		X	Histopathology
	L. stylirostris	X	X	Histopathology
	L. vannamei	X	X	Histopathology, ISH, TEM
	Marsupenaeus japonicus	X	X	Histopathology, PCR, TEM
	Metapenaeus dobsonii	X	X	Histopathology, PCR, TEM
	M. ensis	X	X	ISH, PCR
	M. monoceros		X	PCR
	Penaeus monodon	X	X	Histopathology, ISH, PCR
	P. penicillatus	X		ISH, PCR
	P. semisulcatus	X	X	ISH, PCR
	Parapenaeopsis stylifera	X		PCR
	Solenocera indica	X		PCR
	Trachypenaeus curvirostris	X	X	ISH, PCR
กุ้งน้ำจืด	*Alpheus* sp.		X	PCR
	Callianassa sp.		X	PCR
	Exopalaemon orientalis		X	ISH, PCR
	Palaemon sp.	X		ISH, PCR
	P. adspersus		X	TEM, ISH, PCR, dot-blot
	Macrobrachium idella		X	Histopathology, WB

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

กลุ่ม	ชนิด	การติดเชื้อ		วิธีการตรวจ
		ธรรมชาติ	ทดลอง	
กุ้งน้ำจืด	*Macrobrachium lamerrae*		X	Histopathology, WB
	M. rosenbergii	X	X	Histopathology, ISH, PCR
Lobster	*Panulirus homarus*		X	Histopathology
	P. longipes	X	X	ISH, PCR
	P. ornatus	X	X	Histopathology, ISH, PCR
	P. penicillatus		X	ISH, PCR
	P. polyphagus	X	X	Histopathology
	P. versicolor	X	X	ISH, PCR
	Scyllarus arctus		X	TEM, ISH, PCR, Dot-blot
Crayfish	*Astacus astacus*		X	PCR
	A. leptodactylus		X	TEM, ISH, PCR, Dot-blot
	Cherax destructor		X	Histopathology, Dot-blot
	C. quadricarinatus		X	Histopathology, ISH, TEM
	Pacifastacus leniusculus		X	Histopathology, ISH
	Procambarus clarkii		X	ISH, PCR
	Orconectes limosus		X	TEM, ISH, PCR, Dot-blot
ปู	*Atergatis integerrimus*		X	PCR
	Calappa philarigus	X	X	Histopathology, ISH, PCR
	Callinectes lophos		X	ISH, PCR
	Cancer pagurus		X	TEM, ISH, PCR, Dot-blot
	Carcinus maenas		X	TEM, ISH, PCR, Dot-blot
	Charybdis annulata	X	X	Histopathology, PCR
	C. cruciata		X	PCR
	C. feriatus	X	X	Histopathology, ISH, PCR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

กลุ่ม	ชนิด	การติดเชื้อ		วิธีการตรวจ
		ธรรมชาติ	ทดลอง	
ปู	*Charybdis granulata*		X	ISH
	C. lucifera	X	X	Histopathology, PCR
	Charybdis natatus	X	X	Histopathology, ISH PCR
	Demania splendida		X	PCR
	Doclea hybrida		X	Histopathology, PCR
	Gelasimus marionis nitidus	X		PCR
	Grapsus albolineatus		X	Histopathology, PCR
	Halimede ochtodes		X	Histopathology, PCR
	Helice tridens	X		PCR
	Liagore rubronaculata		X	Histopathology, PCR
	Liocarcinus depurator		X	TEM, ISH, PCR, Dot-blot
	L. puber		X	TEM, ISH, PCR, Dot-blot
	Lithodes maja		X	Histopathology, PCR
	Macrophthalmus sulcatus	X		PCR
	Matuta miersi		X	Histopathology, PCR
	M. planipes	X		PCR
	Menippe rumphii		X	PCR
	Metapograpsus sp.		X	Histopathology
	Metapograpsus messor	X		PCR
	Paradorippe granulata		X	Histopathology, PCR
	Paratelphusa hydrodomous		X	Histopathology, PCR
	P. pulvinata		X	Histopathology, PCR
	Parthenope prensor		X	Histopathology, PCR
	Phylira syndactyla		X	Histopathology, PCR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

กลุ่ม	ชนิด	การติดเชื้อ		วิธีการตรวจ
		ธรรมชาติ	ทดลอง	
ปู	*Podophthalmus vigil*		X	Histopathology, PCR
	Portunus pelagicus	X	X	Histopathology, ISH, TEM
	P. sanguinolentus	X	X	Histopathology, ISH, PCR
	Sesarma sp.		X	Histopathology, ISH, PCR
	Sesarma oceanica	X		PCR
	Scylla serrata	X	X	Histopathology, ISH, PCR
	S. tranquebaricca		X	Histopathology
	Thalamite danae		X	Histopathology, PCR
	Uca pugilator		X	Histopathology, ISH
อื่น ๆ	Sergestoidea, *Acetes* sp.	X	X	Histopathology, ISH, PCR
	Cirripedia *Balanus* sp.	X	X	PCR
	Branchiopoda *Cladocera*	X		PCR
	Branchiopoda *Artemia* sp.	X		PCR
	Stomatopoda, *Squilla mantis*	X		PCR
	Copepoda	X		PCR
	Chaetognata	X		PCR
	Rotifera	X		PCR
	Polychaeta, *Marphysa* sp.	X		PCR
	Coleoptera Ephydridae	X		PCR

หมายเหตุ polymerase chain reaction (PCR), *in situ* hybridization (ISH), transmission electron microscopy (TEM), indirect immunofluorescence (IIF)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่มา: Lo *et al*. (1996b); Lu *et al*. (1997); Chang *et al*. (1998b); Kanchanaphum *et al*. (1998); Kou *et al*. (1998); Lightner *et al*. (1998); Supamattaya *et al*. (1998); Wang *et al*. (1998a), (1998b); Zhan *et al*. (1998); Lo *et al*. (1999); Rajendran *et al*. (1999); Rajan *et al*. (2000); Sahul-Hameed *et al*. (2000), (2001), (2003); Shi *et al*. (2000); Corbel *et al*. (2001); Hossain *et al*. (2001); Huang *et al*. (2001); Jiravanichpaisal *et al*. (2001), (2004); Edgerton (2004); Yan *et al*. (2004) ; Ramírez-Douriet *et al*. (2005); Vijayan *et al*. (2005)

การวินิจฉัยโรคดวงขาวโดยการใช้อาการที่ปรากฏภายนอกและวิธีทางพยาธิวิทยานั้นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ นอกจากนี้การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในระยะแรกยังทำได้ยากเนื่องจากมีจำนวนไวรัสน้อยและอาการของโรคที่ปรากฏอาจมาจากสาเหตุอื่น ๆ ตามที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น ซึ่งอาจทำให้ผลการวินิจฉัยผิดพลาดได้ การวินิจฉัยโรคนอกจากจะใช้ทั้งสองวิธีนี้แล้วยังสามารถใช้วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาและวิธีการทางโมเลกุลที่สามารถตรวจพบเชื้อ WSSV ในกุ้งกลุ่ม penaeid ได้ตั้งแต่ระยะโพสลาร์วาที่ไม่แสดงอาการของโรค (Lo *et al*., 1998; Withyachumnarnkul, 1999)

วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นการนำกระบวนการทางภูมิคุ้มกันมาใช้สำหรับตรวจการติดเชื้อWSSV โดยการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody; MAb) หรือโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody; PAb) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ WSSV MAb และ PAb ผลิตขึ้นจาก VP28 หรือ rVP28 ของ WSSV ซึ่งมีหลายวิธีที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาสำหรับการตรวจเชื้อ WSSV ได้แก่ immunofluorescence, immunohistochemistry (Poulos *et al*., 2001; Anil *et al*., 2002; Escobedo-Bonilla *et al*., 2005; 2007), immunoblot assay (Anil *et al*., 2002; You *et al*., 2002; Makesh *et al*., 2006), immunochromatographic test strip (Sithigorngul *et al*., 2006), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Liu *et al*., 2002) และ western blotting (Nadala *et al*., 1997; Yoganandhan *et al*., 2004) วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาสามารถใช้เป็นวิธีในการตรวจยืนยันการติดเชื้อและสามารถตรวจหาการติดเชื้อในเซลล์ได้ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ ประสิทธิภาพการใช้งานไม่ดี เนื่องจากแอนติบอดีที่ผลิตได้อาจทำปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนของกุ้งได้

วิธีการทางโมเลกุลมีหลายวิธีการ ประกอบด้วย เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) เทคนิค *in situ* hybridization และ เทคนิค dot blot hybridization วิธี PCR เป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส โดยการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อส่วนหนึ่งของลำดับจีโนมของเชื้อ WSSV จึงมีความไวสูงและสามารถตรวจพบการติดไวรัสตั้งแต่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในระยะแรกที่มีจำนวนไวรัสน้อยมากซึ่งมีอยู่หลายวิธี ประกอบด้วย one step PCR (Lightner 1996; Lo *et al*., 1996a), semi nested PCR (Kiatpathomchai *et al*., 2001), two step PCR (Hsu *et al*., 1999; Tapay *et al*., 1999; Hossain *et al*., 2004), quantitative competitive PCR (Tang and Lightner, 2000) และ real time PCR (Durand and Lightner, 2002) โดยวิธี one step PCR ใช้ตรวจกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ที่มีระดับความเข้มข้นของสารพันธุกรรมสูงซึ่งปกติจะพบในกุ้งที่แสดงอาการภายนอกของโรคแล้ว (Otta *et al*., 1999; Jian *et al*., 2005) ส่วน two step PCR เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ซึ่งสามารถตรวจหาการติดเชื้อ WSSV ในระดับต่ำได้ในพ่อแม่พันธุ์กุ้ง ลูกกุ้งระยะนอเพลียส ลูกกุ้งระยะโพสลาร์วาและกุ้งระยะ juvenile (Lo *et al*., 1996a, 1997; Hsu *et al*., 1999) และ quantitative PCR สามารถตรวจหาปริมาณไวรัสได้ อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยโรคดวงขาวด้วยวิธี PCR นั้นอาจเกิดการผิดพลาดได้หลายสาเหตุ ทำให้เกิดผลบวกเทียมหรือผลลบเทียมได้ (Claydon *et al.* ,2004; Shekhar *et al*., 2006; Sritunyalucksana *et al*., 2006) นอกจากนั้น Jian *et al.* (2005) ได้พัฒนาวิธีการใหม่ โดยใช้ชื่อว่า *in situ* PCR วิธีนี้สามารถตรวจหาไวรัสในระยะแรกของการติดเชื้อในเนื้อเยื่อที่มีปริมาณน้อยได้และวิธี loop mediated isothermal amplification (LAMP) ที่มีความไวสูงกว่าวิธี PCR อื่น ๆ โดยสามารถตรวจพบไวรัสที่มีปริมาณเพียง 1 เฟมโตกรัม (fg) (Kono *et al*., 2004)

ส่วนวิธี *in situ* hybridization เป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในเซลล์ของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อผ่านการ hybridization ด้วย DNA probe (Chang *et al*., 1996; Wongteerasupaya *et al*., 1996) และ dot blot hybridization เป็นวิธีการตรวจหา fragment ของสารพันธุกรรมของไวรัสโดยการ hybridization ด้วย DNA probe (Dupuy *et al*., 2004; Shekhar *et al*., 2006) แต่ทั้งสองวิธีนี้มีความไวน้อยกว่าวิธี PCR

4. สภาพแวดล้อมที่สำคัญในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

สภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยเฉพาะคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของน้ำ เช่น ความโปร่งแสง อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช) ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเค็ม การนำไฟฟ้า ความเป็นด่างรวม ความกระด้าง แอมโมเนียรวม และไนไตรท์ เป็นต้น (Brock and Main, 1994) ถ้าคุณสมบัติของน้ำดีมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง กุ้งก็จะเจริญเติบโตเร็ว แต่ถ้าคุณสมบัติของน้ำไม่ดีก็จะเกิดปัญหากุ้งที่เลี้ยงจะอ่อนแอ ติดเชื้อโรคง่ายและตายในที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความโปร่งแสงของน้ำเป็นดัชนีที่บ่งบอกถึงปริมาณแพลงก์ตอนพืชและตะกอนแขวนลอยในบ่อเลี้ยงกุ้ง ความขุ่นของน้ำที่เกิดจากแพลงก์ตอนโดยปกติจะมีประโยชน์ เนื่องจากเป็นอาหารธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์สำหรับกุ้ง ส่วนความขุ่นที่เกิดจากตะกอนดินจะไปทับถมกันที่พื้นบ่อรวมไปถึงสารแขวนลอยที่เป็นสารอินทรีย์อาจทำให้เกิดการเน่าเสียที่บริเวณดังกล่าว ก่อให้เกิดปัญหาการขาดออกซิเจนได้ นอกจากนั้นความโปร่งแสงยังช่วยป้องกันการเกิดสาหร่ายตามพื้นบ่อหรือขี้แดด (benthic algae) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อน้ำใสหรือมีความโปร่งแสงมาก โดยปัญหาจากขี้แดดเกิดขึ้น เมื่อขี้แดดจมลงสู่พื้นบ่อและตายลงจะทำให้พื้นบ่อเน่าเสียเกิดแอมโมเนียและสารเมแทบอไลท์อื่น ๆ ที่เป็นอันตรายต่อกุ้งได้ (ชลอ, 2534; Boyd, 1989) โดยความโปร่งแสงที่เหมาะสมในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวควรอยู่ในช่วง 25-50 เซนติเมตร (Brock and Main, 1994)

อุณหภูมิของน้ำเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการแพร่พันธุ์ของพืชและสัตว์ซึ่งตามแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยมีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 23-32 องศาเซลเซียส (ศิริเพ็ญ, 2543) การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤดูกาล สภาพภูมิประเทศ กระแสลม ความลึก สภาพแวดล้อม ความเข้มแสง ค่าการนำไฟฟ้าและการละลายของออกซิเจนในน้ำ (Boyd, 1990) โดยถ้าปริมาณความเข้มแสงมากก็จะทำให้อุณหภูมิที่ผิวน้ำสูงขึ้น (เปี่ยมศักดิ์, 2525) ส่วนค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity) ถ้าอุณหภูมิสูงจะทำให้ค่าการนำไฟฟ้าสูงขึ้นเพราะเมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงขึ้นจะทำให้การแตกตัวเป็นอิออนของเกลือมากขึ้น (สุธี, 2543) อุณหภูมิของน้ำมีผลต่อการกินอาหารและการเจริญเติบโตของกุ้ง ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งขาวอยู่ระหว่าง 26-33 องศาเซลเซียส (Wickins and Lee, 2002)

การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในบ่อเลี้ยงกุ้งจะถูกควบคุมโดยปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์และปริมาณอิออนที่มีอยู่ในน้ำ ซึ่งในช่วงกลางวันแพลงก์ตอนพืชจะใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากไบคาร์บอเนตเพื่อการสังเคราะห์แสงทำให้ค่าพีเอชสูงขึ้น ถ้าแพลงก์ตอนพืชมีปริมาณมากจะทำให้ค่าพีเอชสูงในตอนบ่าย ส่วนในเวลากลางคืนคาร์บอนไดออกไซด์จะเพิ่มมากขึ้นจากกระบวนการหายใจโดยแพลงก์ตอนพืชและสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในบ่อรวมทั้งกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ จึงทำให้พีเอชต่ำในตอนเช้ามืด (ชลอ, 2543) จะเห็นได้ว่าปริมาณแพลงก์ตอนในน้ำก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชด้วย คือ ถ้ามีปริมาณแพลงก์ตอนมากจะทำให้เกิดความแตกต่างของค่าพีเอชต่ำสุดและสูงสุดในรอบวันมาก ซึ่งจะมีผลกระทบต่อปริมาณของสารพิษหรือสารเมแทบอไลท์ที่เป็นพิษในบ่อเลี้ยงกุ้ง เช่น แอมโมเนีย ไนไตรท์และไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นต้น สำหรับระดับพีเอชมีผลต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำรวมทั้งกุ้ง คือ ถ้าพีเอชน้อยกว่า 4 กุ้งจะตาย ค่าพีเอช ระหว่าง 4-6 มีการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เจริญเติบโตช้า ค่าพีเอช ระหว่าง 6-9 เป็นระดับที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ค่าพีเอช ระหว่าง 9-11 การเจริญเติบโตช้าและพีเอชมากกว่า 11 กุ้งจะตาย (Boyd, 1987) ค่าพีเอชยังมีบทบาทสำคัญในการควบคุมสารเมแทบอไลท์อื่น ๆ ที่เป็นอันตรายให้มีการแตกตัวเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ คือ ถ้าค่าพีเอชมีระดับสูงขึ้นจะทำให้ความเป็นพิษของแอมโมเนียเพิ่มมากขึ้น แต่ถ้าค่าพีเอชมีระดับลดลงจะทำให้เปอร์เซ็นต์ของไฮโดรเจนซัลไฟด์เพิ่มมากขึ้น (Tucker and Boyd, 1985) ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งควรอยู่ระหว่าง 7.5-8.5 และความแตกต่างของพีเอชในรอบวันไม่ควรมากกว่า 0.5 (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

ออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดเนื่องจากจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในกระบวนการต่าง ๆ ภายในร่างกายเพื่อการเจริญเติบโต ความสามารถในการละลายน้ำของออกซิเจนมีจำกัดและขึ้นกับความดันของบรรยากาศ อุณหภูมิของน้ำ ปริมาณเกลือแร่ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในน้ำ (Boyd, 1982) โดยในบ่อเลี้ยงกุ้งการละลายของออกซิเจนในน้ำส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องให้อากาศ เนื่องจากในเวลากลางคืนปริมาณออกซิเจนจะลดลงจนถึงเวลาเช้ามืด จึงมีความจำเป็นในการเปิดเครื่องให้อากาศเพื่อช่วยในการเพิ่มออกซิเจนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมและช่วยทำให้อัตราการรอดตายเพิ่มมากขึ้นด้วย (Madenjian, 1990) แต่แหล่งที่สามารถผลิตออกซิเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งมากที่สุด คือ กระบวนการสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนพืชในตอนกลางวัน (Boyd, 1987) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีผลต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโตและสุขภาพกุ้ง ถ้าปริมาณออกซิเจนต่ำเกินไปอาจมีผลทำให้กุ้งตายได้ ปริมาณออกซิเจนในน้ำควรอยู่ระหว่าง 4 มิลลิกรัมต่อลิตรถึงจุดอิ่มตัว ชลอ และ พรเลิศ (2547) ได้สรุปปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่มีผลต่อกุ้งไว้ ดังนี้ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งเจริญเติบโตดี สารอินทรีย์สลายตัวได้เร็ว ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งเจริญเติบโตช้าลง การสะสมของสารอินทรีย์เพิ่มขึ้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำน้อยกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งกินอาหารน้อยลง การเจริญเติบโตช้า โอกาสป่วยเพิ่มขึ้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำน้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะขึ้นมาอยู่บริเวณผิวน้ำ กุ้งที่อ่อนแอจะลอกคราบแล้วตายและปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะตาย การแก้ปัญหาเรื่องการขาดออกซิเจนในบ่อกุ้งที่มีกุ้งอยู่อย่างหนาแน่นและกุ้งมีขนาดใหญ่จะต้องมีเครื่องให้อากาศและการเปลี่ยนถ่ายน้ำอย่างเพียงพอ

ความเค็ม คือ ความเข้มข้นของอิออนทั้งหมดที่ละลายอยู่ในน้ำแสดงในรูปมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) แต่นิยมใช้ในรูปส่วนในพันส่วน (พีพีที) (Boyd, 1987) กุ้งขาวแวนนาไมสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มในช่วงกว้าง (Castile *et al*., 1981) และสามารถอาศัยอยู่ได้ในน้ำที่มีความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เค็มตั้งแต่ 0.5-40 พีพีที (Smith and Lawrence, 1990; Bray *et al*., 1994; Samocha *et al.,* 2001) Ponce-Palafox *et al.* (1997) ได้อธิบายไว้ว่า สำหรับกุ้งขาวแวนนาไมระยะ juvenile ที่เลี้ยงในความเค็มสูงกว่า 20 พีพีที จะมีอัตราการรอดตายที่ดี นอกจากนี้ความเค็มและอุณหภูมิยังมีผลกับอัตราการรอดตายของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียนด้วย (Lester and Pante, 1991) ลูกกุ้งขาวระยะโพสลาร์วาจะเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็มประมาณ 20 พีพีที และเมื่อลดความเค็มลงเหลือ 5 พีพีที หรือเพิ่มความเค็มให้สูงถึง 45 พีพีที การเจริญเติบโตจะลดลง แต่จากการศึกษาพบว่ากุ้งขาวจะเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็ม 33 พีพีที ซึ่งใกล้เคียงกับความเค็มของน้ำทะเล สอดคล้องกับที่ ชลอ และ พรเลิศ (2547) รายงานว่าการเลี้ยงกุ้งขาวด้วยความเค็มปกติจะให้ผลดีกว่าน้ำความเค็มต่ำ

การนำไฟฟ้า (ค่าการนำไฟฟ้า) เป็นการวัดความสามารถของน้ำที่ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่าน ซึ่งคุณสมบัติข้อนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของอิออนที่อยู่ในน้ำ โดยพบว่าสารประกอบอนินทรีย์ เช่น กรดอนินทรีย์ เบสและเกลือ เป็นตัวนำไฟฟ้าได้ดี ตรงข้ามกับสารอินทรีย์ซึ่งไม่แตกตัวในน้ำ ดังนั้นจึงไม่นำไฟฟ้า ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำไม่ได้บอกให้ทราบถึงชนิดของสารในน้ำแต่บอกเพียงว่ามีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสารในน้ำเท่านั้น (กรรณิการ์, 2522) นอกจากนั้นค่าการนำไฟฟ้าของน้ำจะแปรผันตามความอุณหภูมิและพีเอชของน้ำด้วย คือ น้ำที่มีค่าพีเอชสูงกว่า 9 หรือต่ำกว่า 5 จะมีผลต่อการนำไฟฟ้ามากและถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นสารต่าง ๆ จะแตกตัวได้ดี ทำให้ค่าการนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้น สมเจตน์ และคณะ (2529) รายงานว่า ค่าการนำไฟฟ้าที่น้อยกว่า 1 มิลลิซิเมนส์ต่อเซนติเมตร (mS/cm) หรือมิลลิโมห์ต่อเซนติเมตร (mmhos/cm) จะไม่มีความเค็ม ส่วนค่าการนำไฟฟ้าที่อยู่ในช่วง 2-4 มิลลิซิเมนส์ต่อเซนติเมตร จะมีความเค็มต่ำ ค่าการนำไฟฟ้าที่อยู่ในช่วง 5-8 มิลลิซิเมนส์ต่อเซนติเมตร จะมีความเค็มปานกลางและค่าการนำไฟฟ้ามากกว่า 9 มิลลิซิเมนส์ต่อเซนติเมตร จะมีความเค็มสูง จากการที่การนำไฟฟ้ามีความสัมพันธ์กับปริมาณอิออนชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำทะเล ทำให้สามารถนำค่าการนำไฟฟ้านี้มาใช้ในการศึกษาหาขอบเขตการแพร่กระจายความเค็มจากบ่อเลี้ยงกุ้งสู่บริเวณข้างเคียงได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้ประโยชน์จากค่าการนำไฟฟ้ามาเป็นพารามิเตอร์ตรวจสอบการปนเปื้อนของน้ำจากบ่อกุ้งสู่แหล่งน้ำใต้ดินที่อยู่บริเวณใกล้เคียงได้ (ประวิทย์ และ พิภพ, 2539)

ความเป็นด่างของน้ำ หมายถึง ความสามารถหรือคุณสมบัติของน้ำที่จะรับเอาไฮโดรเจนอิออน (H^+) นั่นคือในแหล่งน้ำจะประกอบด้วยคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) และไฮดรอกไซด์ (OH^-) เป็นส่วนใหญ่ แต่อาจจะมีพวกบอเรต (borates) ซิลิเกต (silicates) ฟอสเฟต (phosphate) และสารอินทรีย์ต่าง ๆ อยู่บ้าง แต่เป็นจำนวนน้อย สารประกอบเหล่านี้จะทำให้น้ำมีค่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พีเอชสูงกว่า 7 โดยที่พีเอชของน้ำนั้นจะเป็นตัวกำหนดสารประกอบที่ละลายอยู่ในน้ำ เมื่อน้ำที่มีพีเอช 7.0-8.3 จะมีไบคาร์บอเนตมาก น้ำที่มีพีเอชตั้งแต่ 8.3 ขึ้นไปจะเริ่มมีคาร์บอเนต น้ำที่มีพีเอช 9.5-10.5 จะมีคาร์บอเนตมากและน้ำที่มีพีเอช 11 จะมีไฮดรอกไซด์มาก ค่าความเป็นด่างเพียงตัวเดียวไม่ถือว่าเป็นสารมลพิษ แต่มีผลเกี่ยวเนื่องกับคุณสมบัติด้านอื่น ๆ เช่น พีเอช ความเป็นกรดและความกระด้าง เป็นต้น (Brawn *et al*., 1983) ดังนั้นความเป็นด่างของน้ำจึงเป็นค่าแสดงถึงความสามารถของน้ำที่จะป้องกันไม่ให้พีเอชเปลี่ยนแปลง (buffer capacity) (Wedemeyer *et al*., 1976) หากปรากฏว่าแหล่งน้ำนั้นมีค่าความเป็นด่างต่ำก็แสดงว่ามี buffer capacity น้อย พีเอชของน้ำแหล่งนั้นจะเปลี่ยนแปลงได้รวดเร็ว ซึ่งเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ ค่าความเป็นด่างในแหล่งน้ำธรรมชาติจะแตกต่างกันออกไป โดยมีค่าตั้งแต่ 25 จนถึง 400-500 มิลลิกรัมต่อลิตร (Boyd, 1982; 1990) ค่าความเป็นด่างมีความสำคัญอย่างมากในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลทุกชนิด ซึ่งมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโต ซึ่งค่าความเป็นด่างที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งควรอยู่ระหว่าง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

ความกระด้างของน้ำส่วนใหญ่มักเกิดจากตะกอนของแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) และแมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) ซึ่งจะวัดออกมาเป็นปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ปริมาณความกระด้างรวม หมายถึง ผลรวมของความกระด้างอันเนื่องมาจากผลรวมความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียม (ศิริเพ็ญ, 2543) ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติโดยทั่วไปจะมีค่าความกระด้างน้อยกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ความกระด้างมีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นด่างและพีเอช นอกจากนี้ความกระด้างของน้ำยังช่วยลดความเป็นพิษได้เช่นกัน โดยเฉพาะพวกโลหะหนัก ดังนั้นน้ำกระด้างปานกลางหรือสูงจึงมีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของกุ้ง

แอมโมเนียในบ่อเลี้ยงกุ้งเกิดจากสิ่งขับถ่ายและจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรีย เนื่องจากการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาซึ่งมีการให้อาหารในปริมาณมากและมีโปรตีนสูง ทำให้มีของเสียและเศษอาหารสะสมอยู่ในบ่อตามระยะเวลาการเลี้ยงส่งผลให้เกิดแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารประกอบของไนโตรเจนถูกปล่อยออกมาจากกระบวนการ ammonification พบในรูปของแอมโมเนียมที่แตกตัวเป็นอิออน (ionize ammonia; NH^+_4) ซึ่งไม่เป็นพิษและแอมโมเนียที่ไม่แตกตัวเป็นอิออน (un-ionize ammonia; NH_3) ซึ่งเป็นพิษ การวัดแอมโมเนียโดยทั่วไปจึงเป็นการวัดแอมโมเนียทั้งสองรูปนี้ ค่าที่วัดได้จะเรียกว่าค่าแอมโมเนียรวม (total ammonia nitrogen; TAN) ทั้งสองรูปนั้นจะเปลี่ยนรูปกลับไปกลับมา การที่จะอยู่รูปใดนั้นขึ้นอยู่กับค่าพีเอชและอุณหภูมิ แต่จะพบว่าค่าพีเอชจะส่งผลต่อการแตกตัวเป็นแอมโมเนียที่ไม่แตกตัวเป็นอิออนมากกว่าอุณหภูมิ (Boyd, 1989) คือ เมื่อพีเอช

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สูงขึ้นจะมีผลทำให้แอมโมเนียที่ไม่แตกตัวเป็นอิออนมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อมีแอมโมเนียในน้ำสูงขึ้น จะทำให้กุ้งขับถ่ายแอมโมเนียได้น้อยลง ก่อให้เกิดการสะสมแอมโมเนียในเลือดและเนื้อเยื่อ ทำให้ค่าพีเอชของเลือดเพิ่มขึ้นและมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ แอมโมเนียจะทำให้การใช้ออกซิเจนของเนื้อเยื่อสูงขึ้น โดยจะเข้าทำลายเหงือกและความสามารถในการขนส่งออกซิเจน กุ้งจะอ่อนแอและติดเชื้อโรคได้ง่าย แต่ถ้าพีเอชต่ำลงจะมีผลทำให้แอมโมเนียที่แตกตัวเป็นอิออนมีปริมาณเพิ่มขึ้น ความเป็นพิษของแอมโมเนียก็จะลดลง ส่งผลให้ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำลดลง ส่วนอุณหภูมิเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความเป็นพิษของแอมโมเนียจะสูงตามไปด้วย (Boyd, 1982) ระดับแอมโมเนียที่ทำให้กุ้งโตช้าอยู่ระหว่าง 0.1-0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ถ้าอยู่ในช่วง 0.4-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้กุ้งตาย โดยทั่วไประดับแอมโมเนียที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งควรมีค่าน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

ไนไตรท์เป็นสารประกอบไนโตรเจนรูปหนึ่งเกิดจากสารอินทรีย์จมตัวลงและทับถมที่พื้นบ่อถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระหว่างอนุภาคตะกอนดินให้เป็นธาตุอาหารแก่แพลงก์ตอนพืช ซึ่งกระบวนการย่อยสลายจำเป็นต้องอาศัยปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอ โดยเริ่มจากกระบวนการ amminization ซึ่งเป็นกระบวนการที่สารประกอบโปรตีนจะสลายตัว โดยถูกจุลินทรีย์ย่อยสลายเป็นสารประกอบไนโตรเจนพวก amino compound ต่าง ๆ และในที่สุดจะได้เป็นอามีน (amine) และกรดอะมิโน (amino acid) จากนั้นกระบวนการ ammonification จะเกิดต่อจากกระบวนการ amminization โดยสารประกอบพวกอามีนหรือกรดอะมิโนจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย แอลกอฮอล์และพลังงาน ต่อมาการแปรสภาพแอมโมเนียจะเกิดขึ้นโดย enzymatic oxidation ซึ่งเป็นกิจกรรมของ nitrifying bacteria ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน ในกระบวนการ nitrification มีอยู่ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก คือ แอมโมเนียที่ไม่แตกตัวเป็นอิออนหรือแอมโมเนียที่แตกตัวเป็นอิออนจะถูกออกซิไดซ์เป็นไนไตรท์ โดยแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ได้แก่ *Nitrosomonas* และ *Nitrosococcus* ส่วนขั้นตอนถัดมา คือ ไนไตรท์จะถูกออกซิไดซ์เป็นไนเตรท โดยแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Nitrobacter* แต่ไนไตรท์ในบ่ออาจเกิดจากการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์โดยแบคทีเรียบางชนิดในบริเวณตะกอนดินก้นบ่อหรือในน้ำที่ไม่มีออกซิเจน จึงทำให้กระบวนการ nitrification เกิดไม่สมบูรณ์ส่งผลให้เกิดการสะสมไนไตรท์ในน้ำขึ้นได้ (ชลอ และ พรเลิศ, 2547; Boyd, 1982) โดยทั่วไปจะพบไนไตรท์ในบ่อเลี้ยงปริมาณเพียงเล็กน้อยไม่เป็นอันตรายต่อการเลี้ยงกุ้งแต่บางครั้งในช่วงที่มีการตายของแพลงก์ตอนพืชพร้อม ๆ กันเป็นจำนวนมากหรือมีของเสียในบ่อจำนวนมากจะพบว่ามีค่าไนไตรท์สูง โดยปริมาณไนไตรท์สูงประมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ (Boyd, 1990)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. อุณหภูมิของน้ำต่อการติดเชื้อ WSSV

เนื่องจากโรคที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสไม่มีวิธีการรักษา ดังนั้นการป้องกันจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุด ตั้งแต่การเตรียมบ่อที่ดี มีการใช้สารเคมี เช่น คลอรีนหรือไตรคลอร์ฟอนในการฆ่าพาหะของเชื้อ WSSV ในการเตรียมน้ำและการตรวจ WSSV ในพ่อแม่พันธุ์กุ้งก่อนที่จะนำเข้าไปใช้ในการเพาะลูกกุ้งในโรงเพาะฟักและการตรวจลูกกุ้งก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในบ่อด้วยวิธี PCR รวมทั้งการเพิ่มระบบป้องกันในการเลี้ยงที่เข้มงวดขึ้นหรือที่เรียกว่า ระบบปลอดเชื้อ (biosecurity system) คือ มีการล้อมรั้วด้วยพลาสติกหรือตาข่ายรอบบ่อเลี้ยงแต่ละบ่อเพื่อป้องกันปู ซึ่งอาจเป็นพาหะของเชื้อไวรัสเข้าไปในบ่อเลี้ยงและขึงเชือกป้องกันนกที่อาจจะนำกุ้งป่วยจากพื้นที่อื่นเข้าไปในฟาร์มเลี้ยงและการเลี้ยงใช้วิธีการเปลี่ยนถ่ายน้ำน้อย ซึ่งทำให้การระบาดของโรคดวงขาวลดความรุนแรงลงระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามในบางช่วงฤดูกาลมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำมาก เช่น ช่วงปลายปีจนถึงต้นปีและฤดูมรสุมที่มีฝนตกติดต่อกันนาน ๆ ทางภาคใต้ทำให้อุณหภูมิของน้ำลดต่ำลง พบว่าในฟาร์มเลี้ยงกุ้งหลายฟาร์มยังคงประสบปัญหาเกี่ยวกับการระบาดของโรคดวงขาวขึ้นในระหว่างการเลี้ยง ทั้ง ๆ ที่ลูกกุ้งได้ผ่านการตรวจสอบด้วยวิธี PCR และมีระบบการป้องกันโรคภายในฟาร์มอย่างเต็มที่แล้วก็ตาม โดยกุ้งเกิดการตายในขณะที่ยังไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำเลย ซึ่งการติดเชื้อ WSSV น่าจะมาจากการปนเปื้อนของลูกกุ้งจากโรงเพาะฟัก เนื่องจากลูกกุ้งที่อยู่ในโรงเพาะฟักซึ่งมีอุณหภูมิของน้ำที่สูง ทำให้ลูกกุ้งบางส่วนที่ติดเชื้อไม่แสดงอาการป่วยและตายในโรงเพาะฟัก รวมถึงตัวอย่างที่นำมาตรวจด้วยวิธี PCR มีจำนวนไม่มากพอที่จะเป็นตัวแทนที่ดีของลูกกุ้งทั้งหมด เมื่อนำลูกกุ้งเหล่านี้ลงเลี้ยงในบ่อที่มีอุณหภูมิของน้ำต่ำติดต่อกันนานหลายวันจะทำให้เกิดการพัฒนาของไวรัส จนกระทั่งกุ้งแสดงอาการของโรคและทยอยตายจนหมดบ่อ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิของน้ำสามารถส่งผลให้เกิดการระบาดของโรคดวงขาวได้ (Vidal *et al.*, 2001; Fegan and Clifford, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003; Granja *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2007a, 2007b) สอดคล้องกับข้อมูลของชลอ และ พรเลิศ (2547) ที่พบว่า การระบาดของโรคมีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกับคุณภาพลูกกุ้งซึ่งขึ้นอยู่กับฤดูกาลเลี้ยง ความเค็มและการจัดการฟาร์ม ในบ่อเลี้ยงกุ้งในพื้นที่ต่าง ๆ พบว่า ฤดูกาลการเลี้ยงที่เหมาะสมและพบปัญหากุ้งติดเชื้อ WSSV น้อยที่สุด คือ ช่วงเดือนมีนาคมจนถึงเดือนกันยายน ส่วนช่วงที่พบการระบาดของโรคมากที่สุด คือ ตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงธันวาคมต่อเนื่องไปจนถึงเดือนมกราคมของปีถัดไป ส่วนในด้านแหล่งที่เลี้ยง พบว่า ในเขตพื้นที่ที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำจะเกิดปัญหาโรคดวงขาวน้อยกว่าเขตพื้นที่ชายฝั่งทะเล และที่สำคัญ คือ การจัดการฟาร์มเลี้ยง เช่น การจัดการคุณสมบัติของน้ำและการจัดการพื้นบ่อ เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุณหภูมิของน้ำจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงกุ้ง ซึ่งอุณหภูมิของน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งมีการเปลี่ยนแปลงตลอดในรอบวันและฤดูกาล ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของอากาศ ความลึกของน้ำ รูปร่างของบ่อและการจัดการน้ำ ในประเทศไทยมีอุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 23-32 องศาเซลเซียส (ศิริเพ็ญ, 2543) แต่ในฤดูหนาวอุณหภูมิของน้ำอาจจะลงต่ำจนถึง 20 องศาเซลเซียส (สุธี, 2549) และอาจสูงถึง 33 องศาเซลเซียส ในฤดูร้อน (Thongrak *et al.*, 1997) เช่นเดียวกันกับในประเทศเขตอบอุ่นหลายประเทศมีอุณหภูมิของน้ำในบ่อเลี้ยงสูงถึง 33 องศาเซลเซียส หลายชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลาหลายเดือน เช่น บังคลาเทศ (Wahab *et al.*, 2003) จีน (Wang *et al.*, 2005) เวียดนาม (Alongi *et al.*, 1999) และเม็กซิโก (Ruiz-Fernández and Páez-Osuna, 2004) โดยอุณหภูมิของน้ำมีอิทธิพลโดยตรงต่ออัตราเมแทบอลิซึม (Allan *et al.*, 2006) การใช้ออกซิเจน (Tian *et al.*, 2004) อัตราการกินอาหาร (Hewitt and Duncan, 2001) อัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย (Wyban *et al.*, 1995; Ponce-Palafox *et al.*, 1997) การลอกคราบ (Vijayan and Diwan, 1995) การต้านทานสารเมแทบอไลท์ที่เป็นพิษ (Barajas *et al.*, 2006) และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Le Moullac and Haffner, 2000; Cheng *et al.*, 2005) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้งนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและระยะของกุ้ง ซึ่งอุณหภูมิของน้ำที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่มีน้ำหนักน้อยกว่า 5 กรัม คือ มากกว่า 30 องศาเซลเซียส และกุ้งที่มีน้ำหนักมากกว่า 5 กรัม อุณหภูมิของน้ำที่เหมาะสม คือ 27 องศาเซลเซียส (Wyban *et al.*, 1995) ส่วนอุณหภูมิของน้ำที่ทำให้เกิดการตายในกุ้ง อยู่ระหว่าง 34-36 องศาเซลเซียส (Dall *et al.*, 1992)

นอกจากนั้นอุณหภูมิยังมีผลต่อการติดเชื้อไวรัสในสัตว์เลือดเย็นหลายชนิด ได้แก่ ปลา แมลงและกุ้ง ตัวอย่างเช่น การติดเชื้อ koi herpesvirus (KHV) (Gilad *et al.*, 2003; Iida and Sano, 2005) largemouth bass virus (LMBV) (Grant *et al.*, 2003) และ nucleopolyhedrovirus (NPV) ของหนอนไหม *Bombyx mori* (Kobayashi *et al.*, 1981; Shikata *et al.*, 1998) Montgomery-Brock *et al.* (2002) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำที่สูงในการควบคุมการตายของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ TSV พบว่ากุ้งที่ฉีดเชื้อ TSV ที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดตาย 30 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งที่ฉีดเชื้อ TSV ที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดตาย 85 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนของเชื้อ TSV พบว่า TSV ไม่มีการเพิ่มจำนวนในกุ้งที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิสูงและยังพบว่าจำนวนไวรัสลดลงหลังจากฉีดเชื้อ (Montgomery-Brock *et al.*, 2004) และการศึกษาการจำลองตัวเองของเชื้อ IHHNV ในกุ้งขาวแวนนาไมเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิสูง พบว่า เชื้อ IHHNV ในกุ้งที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเพิ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จำนวนได้อย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับการเพิ่มจำนวนของเชื้อในกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส (Montgomery-Brock *et al*., 2007) ในส่วนของอุณหภูมิของน้ำต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งนั้นเพิ่งจะมีการศึกษาได้ไม่นานมานี้ โดยพบว่าในบางประเทศที่อยู่ในเขตอบอุ่น เช่น เอกวาดอร์และไทยมีการแพร่ระบาดของโรคดวงขาวในโรงเพาะฟักและบ่อเลี้ยงกุ้งลดลงในฤดูร้อน (Rodríguez *et al*., 2003; Withyachumnarnkul *et al*., 2003) หลังจากนั้นจึงได้เริ่มมีการศึกษาในกุ้งขาวที่ติด WSSV ที่เลี้ยงในอุณหภูมิน้ำสูง 32-33 องศาเซลเซียส กุ้ง *Marsupenaeus japonicus* และกุ้งกลุ่ม crayfish (*Astacus astacus* และ *Pacifastacus leniusculus*) ที่ติดเชื้อ WSSV ที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิต่ำ 12-15 องศาเซลเซียส พบว่ากุ้งเหล่านี้มีอัตราการตายที่ลดลงหรือมีการตายที่ช้าลง (Vidal *et al*., 2001; Guan *et al*., 2003; Jiravanichpaisal *et al*., 2004) ส่วนกุ้งกลุ่ม crayfish (*Procambarus clarkii*) ที่ติดเชื้อ WSSV ที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิต่ำประมาณ 10 องศาเซลเซียส ไม่มีการตายเกิดขึ้น (Du *et al*., 2008) ซึ่งกลไกที่อุณหภูมิของน้ำสูงหรือต่ำที่สามารถลดอัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ยังไม่มีรายงาน แต่อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำอาจจะมีผลต่อการจำลองตัวเองของ WSSV (Vidal *et al*., 2001; Du *et al*., 2006; Granja *et al*., 2003, 2006; Rahman *et al*., 2006) และการลดจำนวนลงของไวรัส (Granja *et al*., 2006; Jiravanichpaisal *et al*., 2006; Du *et al*., 2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อ WSSV

การศึกษาในครั้งนี้ใช้กุ้งขาวแวนนาไมที่มีอาการของโรคดวงขาว คือ มีจุดขาวบนเปลือกคลุมหัวหรือลำตัวมีสีแดง แต่ยังมีชีวิตอยู่จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งในพื้นที่จังหวัดจันทบุรี (ภาพที่ 3 และ 4) ลำเลียงมายังห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR และยืนยันผลการติดเชื้อด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ให้เป็นอาหารแก่กุ้งขาวที่ปลอดเชื้อ เมื่อกุ้งขาวที่กินกุ้งติดเชื้อแสดงลักษณะอาการของโรคหรือป่วยใกล้ตายจะถูกนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยแบ่งกุ้งที่ติดเชื้อส่วนหนึ่งไปทำการสกัดไวรัส สำหรับการเตรียมสารละลาย WSSV ซึ่งเตรียมจากเนื้อเยื่อใต้เปลือกบริเวณ cephalothorax รวมทั้งเหงือกและกล้ามเนื้อมาบดใน TN buffer (20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 7.4) ในอัตราส่วนเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV 1 กรัมต่อ TN buffer 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่งที่ความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารละลายส่วนใสมากรองผ่านเมมเบรนปลอดเชื้อที่มีขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ซึ่งจะผ่านได้เฉพาะไวรัสเท่านั้นเก็บสารละลายที่มี WSSV ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยก่อนการเก็บรักษา นำกุ้งที่ติดเชื้อและสารละลายที่มีเชื้อ WSSV ไปตรวจยืนยันเชื้อด้วยวิธี nested-PCR (IQ2000™ WSSV Detection and Prevention System, Farming IntelliGene Tech. Corp.) และปริมาณเชื้อด้วยวิธี real-time PCR (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche)

หลังจากตรวจปริมาณเชื้อด้วยวิธี real-time PCR พบว่า กุ้งที่ติดเชื้อ WSSV มีปริมาณไวรัสทั้งหมด $4x10^7$ copies ต่อมิลลิกรัม สำหรับใช้ในการศึกษาการติดเชื้อ WSSV โดยการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ ส่วนสารละลาย WSSV มีปริมาณไวรัสทั้งหมด $1x10^7$ copies ต่อไมโครลิตร สำหรับใช้ในการศึกษาการติดเชื้อ WSSV โดยการฉีดเชื้อเข้าทางกล้ามเนื้อและสารละลาย WSSV ที่เตรียมไว้สำหรับการศึกษาการติดเชื้อ WSSV โดยการเลี้ยงกุ้งปกติในน้ำที่มีเชื้อ มีปริมาณไวรัสทั้งหมด $1x10^8$ copies ต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. สัตว์ทดลอง

2.1 ลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา

นำลูกกุ้งขาวระยะโพสลาร์วา 10 (PL_{10}) จากโรงเพาะฟักเอกชน จังหวัดฉะเชิงเทรา (ภาพที่ 5) มายังห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หลังจากนั้นแบ่งลูกกุ้งลงเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร จำนวน 3 ถัง ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 300 ลิตร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา โดยถังแรกควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 24-25 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater (เนื่องจากช่วงเวลาที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วงฤดูหนาว คือ เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 อุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วงระหว่าง 22-24 องศาเซลเซียส) ถังที่ 2 ปรับอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส (ค่อย ๆ ปรับอุณหภูมิให้เพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 6 ชั่วโมงโดยใช้ heater) ส่วนถังสุดท้ายปรับอุณหภูมิของน้ำให้สูงขึ้นเป็น 32-33 องศาเซลเซียส (ค่อย ๆ ปรับอุณหภูมิให้เพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 6 ชั่วโมง โดยใช้ heater) ปรับสภาพในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 4 วัน ดังนั้นลูกกุ้งขาวในวันที่ศึกษานั้นจะอยู่ในระยะโพสลาร์วา 15 (PL_{15}) ซึ่งจะใช้ในหัวข้อผลของอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาว

ส่วนการศึกษาในหัวข้อผลของการลดอุณหภูมิของน้ำจาก 32-33 องศาเซลเซียส เป็น 28-29 องศาเซลเซียส ต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวนั้นจะนำลูกกุ้งขาวระยะ PL_{10} จากโรงเพาะฟักเอกชน จังหวัดฉะเชิงเทรา มายังห้องปฏิบัติการ หลังจากนั้นแบ่งลูกกุ้งลงเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร จำนวน 2 ถัง ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 300 ลิตรและมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา โดยถังแรกอุณหภูมิของน้ำเท่ากับอุณหภูมิห้อง คือ ประมาณ 28 องศาเซลเซียส (เนื่องจากช่วงเวลาที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วงฤดูร้อน คือ เดือนเมษายน พ.ศ. 2552 อุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วงระหว่าง 28-29 องศาเซลเซียส) ส่วนถังที่ 2 ปรับอุณหภูมิของน้ำให้สูงขึ้นเป็น 32-33 องศาเซลเซียส (ค่อย ๆ ปรับอุณหภูมิให้เพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 6 ชั่วโมงโดยใช้ heater) ปรับสภาพในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 4 วัน ดังนั้นลูกกุ้งขาวในวันที่ศึกษานั้นจะอยู่ในระยะ PL_{15} เช่นกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 กุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม

นำกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชน จังหวัดจันทบุรี (ภาพที่ 6) มาปรับสภาพในห้องปฏิบัติการในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 3,000 ลิตร จำนวน 1 ถัง ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 1,500 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 24-25 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater (เนื่องจากช่วงเวลาที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วงฤดูหนาว คือ เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 และเดือนมกราคม พ.ศ. 2552 อุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วงระหว่าง 22-24 องศาเซลเซียส และ 22-25 องศาเซลเซียส) และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา หลังจากนั้นจึงแบ่งกุ้งออกไปใส่ในถังไฟเบอร์กลาสอีก 2 ถัง โดยถังแรกปรับอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส ส่วนถังที่ 2 ปรับอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส (ทั้งสองถังนี้จะค่อย ๆ ปรับอุณหภูมิให้เพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 6 ชั่วโมงโดยใช้ heater) ทำการปรับสภาพเป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นนำไปใช้ในหัวข้อผลของอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวและผลของอุณหภูมิของน้ำและปริมาณการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่แตกต่างกันต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาว

ส่วนในหัวข้ออื่น ๆ จะนำกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชน จังหวัดจันทบุรี มาปรับสภาพในห้องปฏิบัติการในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 3,000 ลิตร จำนวน 1 ถัง ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 1,500 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง คือ ประมาณ 28 องศาเซลเซียส (ทำการศึกษาอยู่ในช่วงเดือนมีนาคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2551 และในช่วงเดือนมีนาคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2552 อุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วงระหว่าง 26-29 องศาเซลเซียส และ 27-29 องศาเซลเซียส) และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา หลังจากนั้นจึงแบ่งกุ้งออกไปใส่ในถังไฟเบอร์กลาสอีก 1 ถัง โดยปรับอุณหภูมิของน้ำให้สูงขึ้นเป็น 32-33 องศาเซลเซียส (ค่อย ๆ ปรับอุณหภูมิให้เพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 6 ชั่วโมงโดยใช้ heater) ทำการปรับสภาพเป็นเวลา 4 วัน

ก่อนทำการศึกษาสุ่มตัวอย่างลูกกุ้งขาวระยะโพสลาร์วาและกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม เพื่อตรวจว่ากุ้งทั้งสองระยะปราศจากเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

ในการศึกษานี้ ประกอบด้วย 4 การทดลอง ซึ่งทำการทดลองในช่วงฤดูหนาว คือ เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 โดยแบ่งเป็นการศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันต่อการติดเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม โดยการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV การฉีดเชื้อ WSSV เข้าทางกล้ามเนื้อกุ้งขาวปกติและการเลี้ยงกุ้งปกติในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ส่วนการทดลองสุดท้าย คือการศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันต่อการติดเชื้อ WSSV ในลูกกุ้งระยะ PL_{15} โดยการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV มีรายละเอียด ดังนี้

3.1 การให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV

นำกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในแต่ละอุณหภูมิมาปรับสภาพต่ออีก 4 วัน ในตู้กระจก (ขนาด 30x75x40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีทีปริมาตร 80 ลิตร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา (ภาพที่ 7) จำนวน 9 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 24-25 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater

กลุ่มการทดลองที่ 2 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater

กลุ่มการทดลองที่ 3 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater

ก่อนทำการศึกษาไม่ให้อาหารกุ้งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงให้กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $4x10^7$copies ต่อมิลลิกรัม ในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว 1 มื้อ ส่วนมื้อที่เหลือให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 มื้อ ในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน

3.2 การฉีดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวปกติ

นำกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในแต่ละอุณหภูมิมาปรับสภาพต่ออีก 4 วัน ในตู้กระจก (ขนาด 30x75x40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาตร 80 ลิตร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา จำนวน 9 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 24-25 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater

กลุ่มการทดลองที่ 2 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater

กลุ่มการทดลองที่ 3 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater

หลังจากนั้นนำสารละลาย WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $1x10^7$ copies ต่อไมโครลิตร มาเจือจาง ด้วยน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:100 ดังนั้นปริมาณสุดท้ายของเชื้อ WSSV ที่จะใช้ฉีดเข้าไปในตัวกุ้ง คือ $1x10^5$ copies ต่อไมโครลิตร โดยการฉีดสารละลาย WSSV เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อระหว่างปล้องที่ 3-4 ของลำตัว ในปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักของกุ้ง 1 กรัม (ภาพที่ 8)

3.3 การเลี้ยงกุ้งปกติในน้ำที่มีเชื้อ WSSV

นำกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในแต่ละอุณหภูมิมาปรับสภาพต่ออีก 4 วัน ในตู้กระจก (ขนาด 30x75x40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 80 ลิตร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา จำนวน 9 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 24-25 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater

กลุ่มการทดลองที่ 2 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่มการทดลองที่ 3 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater

หลังจากนั้นนำสารละลาย WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $1x10^8$ copies ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 80 มิลลิลิตรใส่ลงไปในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 80 ลิตร (อัตราส่วนสารละลาย WSSV 1 มิลลิลิตรต่อน้ำที่ใช้เลี้ยง 1 ลิตร) ดังนั้นในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งจะมีเชื้อ WSSV เท่ากับ $1x10^5$ copies ต่อมิลลิลิตร

3.4 การเลี้ยงลูกกุ้งระยะ PL_{15} ในน้ำที่มีเชื้อ WSSV

ในส่วนของการศึกษาในลูกกุ้งระยะ PL_{15} ศึกษาโดยนำลูกกุ้งขาวที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในแต่ละอุณหภูมิปล่อยลงในตู้กระจก (ขนาด 30x75x40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 60 ลิตร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา จำนวน 9 ตู้ ตู้ละ 100 ตัว โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 ประกอบด้วยลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 24-25 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater

กลุ่มการทดลองที่ 2 ประกอบด้วยลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater

กลุ่มการทดลองที่ 3 ประกอบด้วยลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater

หลังจากนั้นนำสารละลาย WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $1x10^8$ copies ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 60 มิลลิลิตรใส่ลงไปในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 60 ลิตร (อัตราส่วนสารละลาย WSSV 1 มิลลิลิตรต่อน้ำที่ใช้เลี้ยง 1 ลิตร) ดังนั้นในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งจะมีเชื้อ WSSV เท่ากับ $1x10^5$ copies ต่อมิลลิลิตร

ระหว่างการศึกษาจะสังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 6 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน และสุ่มกุ้งบางส่วนเพื่อศึกษาการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR และตรวจวินิจฉัยด้วยชุดทดสอบ immunochromatographic test strip ตามวิธี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของ Sithigorngul *et al.* (2006) และนำกุ้งขาวทั้งที่มีอาการป่วยและไม่มีอาการป่วยมาตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและนำกุ้งขาวที่มีอาการป่วยไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM)

4. การศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส ต่อความรุนแรงของการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

4.1 การศึกษาผลของการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำจาก 28-29 องศาเซลเซียส เป็น 32-33 องศาเซลเซียส ต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

นำกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่อุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส มาปรับสภาพต่ออีก 4 วัน ในตู้กระจก (ขนาด 30x75x40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 80 ลิตร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกทั้งหมด 15 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส ไม่ให้อาหารกุ้งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนที่จะให้กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV (ปริมาณไวรัส $4x10^7$ copies ต่อมิลลิกรัม) เป็นอาหารในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว 1 มื้อ หลังจากให้กินเป็นเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง จึงเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส โดยศึกษาช่วงเวลาละ 3 ตู้ และสำหรับกลุ่มควบคุมจะเลี้ยงกุ้งขาวที่กินกุ้งติดเชื้อ WSSV ในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง จำนวน 3 ตู้

ชุดการทดลองที่ 2 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 12 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารละลาย WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $1x10^7$ copies ต่อไมโครลิตร มาเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:100 (ปริมาณสุดท้ายของเชื้อ WSSV ที่จะใช้ฉีดเข้าไปในตัวกุ้ง คือ $1x10^5$ copies ต่อไมโครลิตร) ฉีดเข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อระหว่างปล้องที่ 3-4 ของลำตัวกุ้ง ในปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักของกุ้ง 1 กรัม หลังจากฉีดเชื้อเป็นเวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง จึงเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส โดยศึกษาช่วงเวลาละ 3 ตู้ และสำหรับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงกุ้งขาวที่ฉีดด้วยสารละลาย WSSV ในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง จำนวน 3 ตู้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดการทดลองที่ 3 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 15 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารละลาย WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $1x10^8$ copies ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 80 มิลลิลิตรใส่ลงไปในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 80 ลิตร ดังนั้นในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งจะมีเชื้อ WSSV เท่ากับ $1x10^5$ copies ต่อมิลลิลิตร หลังจากใส่เชื้อเป็นเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง จึงเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส โดยศึกษาช่วงเวลาละ 3 ตู้ และสำหรับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงกุ้งขาวในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง จำนวน 3 ตู้

ในทุกชุดการทดลองระหว่างการศึกษาจะสังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง คือ กุ้งป่วยมีอัตราการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ หรือจนกระทั่งไม่มีการตายเกิดขึ้นและสุ่มกุ้งบางส่วนเพื่อศึกษาการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR ตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP28 ของ WSSV เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องและแม่นยำขึ้นและวิธี bioassay โดยให้กุ้งปกติกินกุ้งตัวอย่างที่สุ่ม ถ้าในแต่ละกลุ่มทดลองมีกุ้งเหลือรอดจะลดอุณหภูมิของน้ำลงให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิเริ่มต้น เพื่อสังเกต บันทึกอัตราการตายของกุ้งและศึกษาการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วอีกครั้ง

4.2 การศึกษาผลของการลดอุณหภูมิของน้ำจาก 32-33 องศาเซลเซียส เป็น 28-29 องศาเซลเซียส ต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

ในการศึกษานี้ ประกอบด้วย 4 ชุดการทดลอง โดยแบ่งเป็นการศึกษาผลของการลดอุณหภูมิของน้ำต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม โดยการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV การฉีดเชื้อ WSSV เข้าทางกล้ามเนื้อกุ้งขาวปกติและการเลี้ยงกุ้งปกติในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ทั้ง 3 ชุดการทดลองใช้กุ้งขาวที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในอุณหภูมิที่จะทดลองมาปรับสภาพต่ออีก 4 วัน ในตู้กระจก (ขนาด 30x75x40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 80 ลิตร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา ส่วนการทดลองสุดท้าย คือ การศึกษาผลของการลดอุณหภูมิของน้ำต่อการติดเชื้อ WSSV ในลูกกุ้งขาวระยะ PL_{15} โดยการเลี้ยงลูกกุ้งระยะ PL_{15} ที่ผ่านการปรับอุณหภูมิที่ 32-33 องศาเซลเซียส ในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ในตู้กระจกที่ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 60 ลิตร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดการทดลองที่ 1 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 18 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater ไม่ให้อาหารกุ้งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV (ปริมาณไวรัส $4x10^7$ copies ต่อมิลลิกรัม) เป็นอาหารในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว 1 มื้อ หลังจากให้กินเป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน จึงลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส โดยศึกษาช่วงเวลาละ 3 ตู้ และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงกุ้งขาวที่กินกุ้งติดเชื้อ WSSV ในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง จำนวน 3 ตู้

ชุดการทดลองที่ 2 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน27 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารละลาย WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $1x10^7$ copies ต่อไมโครลิตร มาเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:100 (ปริมาณสุดท้ายของเชื้อ WSSV ที่จะใช้ฉีดเข้าไปในตัวกุ้ง คือ $1x10^5$ copies ต่อไมโครลิตร) ฉีดเข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อระหว่างปล้องที่ 3-4 ของลำตัวกุ้ง ในปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักของกุ้ง 1 กรัม หลังจากฉีดเชื้อเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 และ 14 วัน จึงลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส โดยศึกษาช่วงเวลาละ 3 ตู้ และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงกุ้งขาวที่ฉีดสารละลาย WSSV ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง จำนวน 3 ตู้

ชุดการทดลองที่ 3 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 18 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารละลาย WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $1x10^8$ copies ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 80 มิลลิลิตรใส่ลงไปในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 80 ลิตร ดังนั้นในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งจะมีเชื้อ WSSV เท่ากับ $1x10^5$ copies ต่อมิลลิลิตร หลังจากใส่เชื้อเป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน จึงลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส โดยศึกษาช่วงเวลาละ 3 ตู้ และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงกุ้งขาวในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง จำนวน 3 ตู้

ชุดการทดลองที่ 4 ประกอบด้วยลูกกุ้งขาวระยะ PL_{15} ที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 18 ตู้ ตู้ละ 100 ตัว ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารละลาย WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $1x10^8$ copies ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 60 มิลลิลิตรใส่ลงไปในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 60 ลิตร ดังนั้นในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งจะมีเชื้อ WSSV เท่ากับ $1x10^5$ copies ต่อมิลลิลิตร หลังจากใส่เชื้อเป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน จึงลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส โดยศึกษาช่วงเวลาละ 3 ตู้ และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงกุ้งขาวระยะ PL_{15} ในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง จำนวน 3 ตู้

ในทุกชุดการทดลองระหว่างการศึกษาจะสังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง คือ กุ้งป่วยมีอัตราการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ หรือจนกระทั่งไม่มีการตายเกิดขึ้นและสุ่มกุ้งบางส่วนเพื่อศึกษาการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR ตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP28 ของ WSSV เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องและแม่นยำขึ้นและวิธี bioassay โดยให้กุ้งปกติกินกุ้งตัวอย่างที่สุ่ม

5. การศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส ต่อการทำให้เชื้อ WSSV หมดไปในกุ้งขาวแวนนาไม

นำกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในอุณหภูมิที่จะทดลองมาปรับสภาพต่ออีก 4 วัน ในตู้กระจก (ขนาด 30x75x40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 80 ลิตร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา จำนวน 30 ตู้ ตู้ละ 15 ตัวโดยแบ่งเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

5.1 การให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV

กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจก จำนวน 4 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส ไม่ให้อาหารกุ้งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนที่จะกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV (ปริมาณไวรัส 4×10^7 copies ต่อมิลลิกรัม) เป็นอาหารในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว 1 มื้อ

กลุ่มการทดลองที่ 2 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจก จำนวน 6 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส ไม่ให้อาหารกุ้งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนที่จะกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV เหมือนกับกลุ่มการทดลองที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2 การฉีดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวปกติ

กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจก จำนวน 4 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารละลาย WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $1x10^7$ copies ต่อไมโครลิตร มาเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:100 (ปริมาณสุดท้ายของเชื้อ WSSV ที่จะใช้ฉีดเข้าไปในตัวกุ้ง คือ $1x10^5$ copies ต่อไมโครลิตร) ฉีดเข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อระหว่างปล้องที่ 3-4 ของลำตัวกุ้ง ในปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักของกุ้ง 1 กรัม

กลุ่มการทดลองที่ 2 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจก จำนวน 6 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะฉีดด้วยสารละลายไวรัสวิธีเดียวกันกับในกลุ่มการทดลองที่ 1

5.3 การเลี้ยงกุ้งปกติในน้ำที่มีเชื้อ WSSV

กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจก จำนวน 4 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำสารละลาย WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $1x10^8$ copies ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 80 มิลลิลิตรใส่ลงไปในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 80 ลิตร ดังนั้นในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งจะมีเชื้อ WSSV เท่ากับ $1x10^5$ copies ต่อมิลลิลิตร

กลุ่มการทดลองที่ 2 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจก จำนวน 6 ตู้ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเชื้อ WSSV ใส่ลงในน้ำตามวิธีเดียวกันกับในกลุ่มการทดลองที่ 1

ระหว่างที่ทำการศึกษาในการทดลองที่ 5.1, 5.2 และ 5.3 จะสุ่มกุ้งกลุ่มการทดลองละ 5 ตัว ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14 และ 21 หลังจากได้รับเชื้อ WSSV เพื่อศึกษาการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR และตรวจยืนยันผลด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP28 ของ WSSV ถ้าระหว่างที่ทำการศึกษาตรวจไม่พบการติดเชื้อ WSSV ในตัวอย่างกุ้งที่สุ่มจะลดอุณหภูมิของน้ำลงให้อยู่ที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

28-29 องศาเซลเซียส และสุ่มกุ้งมาศึกษาการติดเชื้อ WSSV อีกครั้งหนึ่ง ถ้าไม่มีกุ้งป่วยหรือตายและให้ผลเป็นลบเมื่อตรวจด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้ว แสดงว่าเชื้อ WSSV หมดไปจากตัวกุ้ง

6. การศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำและปริมาณการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่มีปริมาณเชื้อ WSSV แตกต่างกันต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

เริ่มทำการศึกษาในเดือนมกราคม พ.ศ. 2552 ซึ่งอยู่ในช่วงฤดูหนาว โดยเตรียมน้ำทะเลความเค็ม 25 พีพีที สำหรับใช้ในการเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 200 ลิตร ที่มีน้ำปริมาตร 160 ลิตร จำนวน 3 ถัง ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส ตามลำดับ หลังจากนั้นใส่เชื้อ WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $1x10^8$ copies ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 160 มิลลิลิตร ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 160 มิลลิลิตร (อัตราส่วนสารละลาย WSSV 1 มิลลิลิตรต่อน้ำที่ใช้เลี้ยง 1 ลิตร) ดังนั้นในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งจะมีเชื้อ WSSV เท่ากับ $1x10^5$ copies ต่อมิลลิลิตร

หลังจากนั้นนำกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในแต่ละอุณหภูมิมาปรับสภาพต่ออีก 4 วัน ในตู้กระจก (ขนาด 30x75x40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตรน้ำ 80 ลิตร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา จำนวน 36 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกทั้งหมด 12 ตู้ ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 24-25 องศาเซลเซียส โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ที่ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่มีอุณหภูมิ 24-25 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำที่ใช้เลี้ยงตามลำดับ (ดังนั้นในน้ำที่เปลี่ยนถ่ายน้ำแล้วจะมีปริมาณ WSSV $1x10^4$, $2x10^4$ และ $3x10^4$ copies ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ปริมาตรละ 3 ตู้ และกลุ่มควบคุมที่ใส่เชื้อ WSSV ปริมาณ 80 มิลลิลิตร ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 80 ลิตร (ดังนั้นในน้ำจะมีปริมาณ WSSV $1x10^5$ copies ต่อมิลลิลิตร) จำนวน 3 ตู้

ชุดการทดลองที่ 2 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกทั้งหมด 12 ตู้ ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ที่ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่มีอุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำที่ใช้เลี้ยงตามลำดับ ปริมาตรละ 3 ตู้ และกลุ่มควบคุมที่ใส่เชื้อ WSSV ปริมาณ 80 มิลลิลิตร ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 80 ลิตร จำนวน 3 ตู้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดการทดลองที่ 3 ประกอบด้วยกุ้งขาวที่เลี้ยงในตู้กระจกทั้งหมด 12 ตู้ ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ที่ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่มีอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำที่ใช้เลี้ยงตามลำดับ ปริมาตรละ 3 ตู้ และกลุ่มควบคุมที่ใส่เชื้อ WSSV ปริมาณ 80 มิลลิลิตร ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 80 ลิตร จำนวน 3 ตู้

ระหว่างการศึกษาจะสังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 12 ชั่วโมง ทำการศึกษาเป็นระยะเวลา 14 วัน และสุ่มกุ้งบางส่วนเพื่อศึกษาการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR และตรวจวินิจฉัยด้วยชุดทดสอบ immunochromatographic test strip ตามวิธีของ Sithigorngul *et al.* (2006) และนำกุ้งขาวทั้งที่มีอาการป่วยและไม่มีอาการป่วยมาตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

7. การศึกษาอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันต่อการคงอยู่ในภาวะที่ก่อให้เกิดโรคของเชื้อ WSSV ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

เตรียมตู้กระจก (ขนาด 30x75x40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำทะเลความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 80 ลิตร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา จำนวน 48 ตู้ หลังจากนั้นนำสารละลาย WSSV ที่มีปริมาณไวรัส $1x10^8$ copies ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 80 มิลลิลิตรใส่ลงไปในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 80 ลิตร ดังนั้นในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งจะมีเชื้อ WSSV เท่ากับ $1x10^5$ copies ต่อมิลลิลิตร โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 ประกอบด้วย ตู้กระจกที่เตรียมไว้ จำนวน 24 ตู้ ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater พักน้ำที่มีการเติมเชื้อ WSSV เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ช่วงเวลาละ 3 ตู้ เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดจะปิด heater และนำกุ้งขาวใส่ลงไปในน้ำที่พักไว้ตู้ละ 10 ตัว

กลุ่มการทดลองที่ 2 ประกอบด้วย ตู้กระจกที่เตรียมไว้ จำนวน 24 ตู้ ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater พักน้ำที่มีการเติมเชื้อ WSSV เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ช่วงเวลาละ 3 ตู้ เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดจะปิด heater และนำกุ้งขาวใส่ลงไปในน้ำที่พักไว้ตู้ละ 10 ตัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระหว่างการศึกษาจะสังเกตอาการผิดปกติของกุ้งและสุ่มกุ้งบางส่วนเพื่อศึกษาการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR ตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและวิธี bioassay โดยให้กุ้งปกติกินกุ้งตัวอย่างที่สุ่ม

8. การศึกษาลักษณะอาการภายนอก

ศึกษาลักษณะอาการ ความผิดปกติภายนอกของกุ้งขาวแวนนาไมที่ปรากฏ พร้อมทั้งถ่ายรูปและบันทึกข้อมูลตามวิธีการของ Lightner (1996)

9. การศึกษาการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

ศึกษาการติดเชื้อ WSSV โดยสุ่มลูกกุ้งขาวระยะ PL_{15} แช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ตัดส่วนเหงือกและรยางค์ใส่ลงในเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปวิเคราะห์การติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี nested-PCR (IQ2000™ WSSV Detection and Prevention System, Farming IntelliGene Tech. Corp.) และปริมาณไวรัสด้วยวิธี real-time PCR (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche)

10. การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV

นำลูกกุ้งขาวระยะ PL_{15} แช่ในสารละลายคงสภาพเดวิดสัน (Davidson's fixative) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้น้ำยามีปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อ ส่วนในกรณีที่เป็นกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม นำตัวอย่างมาฉีดด้วยน้ำยา Davidson's fixative เข้าไปในช่องปาก ส่วนหัวด้านหลังใต้เปลือก ตับและตับอ่อน ส่วนท้องบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ถึงขาเดินคู่สุดท้ายและลำตัวทั้งด้านท้องและด้านหลังให้ทั่ว ตัดเปลือกกุ้งตามแนวยาวตั้งแต่เปลือกช่วงท้องปล้องที่ 6 จนถึงส่วนหัว (ภาพที่ 9) หลังจากนั้นแช่ตัวอย่างในน้ำยา Davidson's fixative ปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดย้ายกุ้งตัวอย่างไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ตัดชิ้นเนื้อกุ้งบริเวณที่ต้องการศึกษาบรรจุใน embedding cassette แล้วนำไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration), clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processor ตามวิธีมาตรฐานของ Bell and Lightner (1988) จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟีน (embedding) ตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ให้มีความหนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร นำไปย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) และทำเป็นสไลด์ถาวร แล้วนำไปศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป (Lightner, 1996)

11. การศึกษาการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี immunohistochemistry

นำสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษามาละลายเอาพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffization) เติมน้ำเข้า (rehydration) และผ่านกระบวนการสำหรับการย้อม indirect peroxidase immunohistochemistry หยดโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP28 (Chaivisuthangkura *et al*., 2004) ของ WSSV ที่เป็นแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง หลังจากนั้นล้างแอนติบอดีตัวที่หนึ่งออกจากเนื้อเยื่อแล้วหยดแอนติบอดีที่สอง ได้แก่ goat anti mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) นำเนื้อเยื่อมาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 3, 3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 0.03 เปอร์เซ็นต์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จากนั้นย้อมด้วย eosin และทำเป็นสไลด์ถาวร แล้วนำไปศึกษาการติดเชื้อ WSSV ด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

12. การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscope หรือ TEM)

ดึงเปลือกคลุมหัวของกุ้งออกจากนั้นใช้ใบมีดตัดเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือกให้มีขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วนำไปแช่ในน้ำยา glutaraldehyde 3 เปอร์เซ็นต์ ใน phosphate buffer เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นย้ายตัวอย่างไป post-fix ด้วย osmium tetroxide 1 เปอร์เซ็นต์ ใน phosphate buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้ว dehydrated ในเอทิลแอลกอฮอล์ ตั้งแต่ 50-100 เปอร์เซ็นต์ และล้างต่อ 2 ครั้ง ด้วย propylene oxide 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นตัวอย่างไปผ่านกระบวนการฝังตัว (embed) ใน Epon-812 resin แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน epoxy resin 100 เปอร์เซ็นต์ นำตัวอย่าง plastic block มาตัดด้วยเครื่อง ultra microtome โดยใช้ใบมีดเพชร (diamond-knife) ขั้นแรกตัด semi-thin sections ความหนาประมาณ 1ไมโครเมตร ย้อมด้วย toluidine blue 1 เปอร์เซ็นต์ และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง เพื่อหาตำแหน่งที่ต้องการไปตัด ultrathin sections ย้อมด้วย uranyl acetate 2 เปอร์เซ็นต์ และสารละลาย lead citrate 0.3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จุลทรรศน์อิเลคตรอน ชนิดลำแสงส่องผ่านรุ่น JEOL, JEM 1210 electron microscope 100 kV ณ ห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. การศึกษาการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี bioassay

นำกุ้งขาวปลอดเชื้อน้ำหนักประมาณ 5-6 กรัม จำนวน 10 ตัว เลี้ยงในตู้กระจกที่ภายในบรรจุน้ำทะเล 25 พีพีที ปริมาตร 80 ลิตร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา หลังจากนั้นให้กินกุ้งตัวอย่างที่สุ่มมาเพื่อทดสอบการติดเชื้อ WSSV ในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว 1 มื้อ หลังจากนั้น 7 วัน ถ้าไม่มีกุ้งป่วยใกล้ตายหรือตายแสดงว่ากุ้งตัวอย่างที่สุ่มมาทดสอบไม่มีการติดเชื้อ WSSV

14. สถานที่ทำการวิจัย

14.1 ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

14.2 ห้องปฏิบัติการเนื้อเยื่อวิทยา ไวรัสวิทยาและแบคทีเรียวิทยา สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง กรุงเทพมหานคร

14.3 ห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

14.4 ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร

15. ระยะเวลาการวิจัย

ระหว่างเดือนธันวาคม 2550-มกราคม 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 3 กุ้งขาวแวนนาไมที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งในพื้นที่จังหวัดจันทบุรี

ภาพที่ 4 กุ้งขาวที่ป่วยมีลำตัวสีแดงอย่างชัดเจน (กุ้ง 3 ตัว ด้านล่าง) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งปกติ (กุ้ง 3 ตัว ด้านบน)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 5 ลูกกุ้งขาวระยะโพสลาร์วา 10 ที่ปลอดเชื้อ WSSV จากโรงเพาะฟักเอกชน

ภาพที่ 6 การลำเลียงกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ปลอดเชื้อ WSSV จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 7 ตู้กระจกขนาด 30x75x40 เซนติเมตร ซึ่งแต่ละตู้บรรจุน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 พีพีที ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำ โดยใช้ heater และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 8 การฉีดสารละลาย WSSV เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อระหว่างปล้องที่ 3-4 ของลำตัวกุ้ง

ภาพที่ 9 กุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ฉีดด้วยน้ำยา Davidson’s fixative เพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส ต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม โดยการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV สังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า กุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส หลังจากกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV จะแสดงอาการป่วยภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกุ้งเริ่มตายในชั่วโมงที่ 42 และทยอยตายจนกระทั่งอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 114 หลังจากกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV (ภาพที่ 10) เมื่อสุ่มกุ้งที่มีอาการป่วยไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR และชุดทดสอบ immunochromatographic test strip พบว่า ให้ผลเป็นบวก ส่วนการตรวจยืนยันด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ พบว่าเนื้อเยื่อของกุ้งตัวอย่างที่สุ่มติดเชื้อ WSSV (ตารางที่ 4) ส่วนกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น (ภาพที่ 10) กุ้งตัวอย่างที่สุ่มตรวจให้ผลเป็นลบเมื่อตรวจด้วยวิธี nested-PCR และชุดทดสอบ immunochromatographic test strip และไม่พบการติดเชื้อ WSSV จากการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งตัวอย่าง (ตารางที่ 4)

สำหรับกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ฉีดเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส พบว่า กุ้งที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส เริ่มแสดงอาการของโรคในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นกุ้งเริ่มตายในชั่วโมงที่ 30 จนกระทั่งการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 60 หลังจากฉีดเชื้อ WSSV (ภาพที่ 11) เมื่อสุ่มกุ้งที่มีอาการป่วยตรวจด้วยวิธี nested-PCR และชุดทดสอบ immunochromatographic test strip พบว่า ให้ผลเป็นบวกและมีการติดเชื้อ WSSV จากการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4) ในขณะที่กุ้งที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส ไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น (ภาพที่ 11) แต่กุ้งตัวอย่างที่สุ่มให้ผลเป็นบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี nested-PCR และชุดทดสอบ immunochromatographic test strip ส่วนการตรวจด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไม่พบลักษณะของการติดเชื้อ WSSV จากอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งตัวอย่าง (ตารางที่ 4)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนการทดลองที่เลี้ยงกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นใส่เชื้อ WSSV ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยง สังเกตอาการผิดปกติของกุ้งและบันทึกอัตราการตาย ทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า กุ้งที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส เริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 48 จากนั้นกุ้งเริ่มตายในชั่วโมงที่ 54 และ 66 และทยอยตายจนกระทั่งมีอัตราตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 144 และ 168 หลังจากเลี้ยงในน้ำที่มี WSSV (ภาพที่ 12) เมื่อสุ่มกุ้งที่มีอาการป่วยตรวจด้วยวิธี nested-PCR และชุดทดสอบ immunochromatographic test strip กุ้งตัวอย่างทั้งหมดให้ผลเป็นบวกและพบว่าพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งตัวอย่างติดเชื้อ WSSV (ตารางที่ 4) ส่วนกุ้งที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส ไม่มีอาการของโรคและไม่มีการตายเกิดขึ้น (ภาพที่ 12) เมื่อสุ่มกุ้งเหล่านี้ไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR และชุดทดสอบ immunochromatographic test strip จะให้ผลเป็นลบ เช่นเดียวกันกับการตรวจยืนยันผลด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4) และการทดลองในลูกกุ้งขาวระยะ PL_{15} ที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นใส่เชื้อ WSSV ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยง พบว่า ลูกกุ้งระยะ PL_{15} ที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส เริ่มทยอยตายในชั่วโมงที่ 84 และ 96 โดยลูกกุ้งที่ป่วยจะไม่แสดงอาการของโรคอาจจะเนื่องมาจากลูกกุ้งมีขนาดเล็กมากจึงสังเกตได้ยาก สอดคล้องกับการศึกษาของ Lo *et al*. (1998) และ Withyachumnarakul (1999) ที่พบว่าลูกกุ้งระยะโพสลาร์วาที่ติดเชื้อ WSSV จะไม่แสดงอาการของโรค หลังจากนั้นอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 132 และ 144 หลังจากเลี้ยงในน้ำที่มี WSSV (ภาพที่ 13) เมื่อสุ่มลูกกุ้งที่ใกล้ตายไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR และชุดทดสอบ immunochromatographic test strip พบว่าให้ผลเป็นบวก ส่วนการตรวจยืนยันผลด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อนั้นให้ผลเป็นบวกเช่นเดียวกัน คือ พบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อของกุ้งตัวอย่างที่สุ่มทั้งหมด (ตารางที่ 4) ในขณะที่ลูกกุ้งระยะ PL_{15} ที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากใส่เชื้อ WSSV ลงไปในน้ำ พบว่า ไม่มีลูกกุ้งตายตลอดระยะเวลา 7 วันที่ทำการศึกษา (ภาพที่ 13) และเมื่อสุ่มลูกกุ้งไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR และชุดทดสอบ immunochromatographic test strip พบว่า ให้ผลเป็นลบ ส่วนการตรวจด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไม่พบความผิดปกติในกุ้งตัวอย่างที่สุ่มตรวจ (ตารางที่ 4)

โดยลักษณะอาการของกุ้งป่วยที่สามารถสังเกตเห็นได้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ลำตัวมีสีชมพูจนถึงแดง ไม่กินอาหารและเซื่องซึม กุ้งป่วยบางตัวจะมีเปลือกนิ่มหรือมีตับและตับอ่อนขนาดใหญ่ขึ้นและมีสีเหลือง (Chou *et al*., 1995; Lo *et al*., 1996b; Lightner *et al*., 1998; Nadala *et al*., 1998; Sahul Hameed *et al*., 1998; Sudha *et al*, 1998; Wang *et al*., 1999a; Bondad-Reantaso *et al*., 2001;

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rodríguez *et al*., 2003; Rahman, 2007) และบางตัวมีจุดขาวหรือดวงขาวบริเวณเปลือกคลุมหัวและตามลำตัวปล้องที่ 5-6 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-2.0 มิลลิเมตร โดยสามารถเห็นจุดขาวหรือดวงขาวได้อย่างชัดเจน เมื่อดึงเปลือกคลุมหัวแล้วลอกเนื้อเยื่อบาง ๆ ออก จากนั้นส่องดูผ่านแสง (ชลอ, 2534; สุเทพ, 2546; ปิยนุช, 2550; Wang *et al*., 1995; Lightner, 1996; Lo *et al*., 1996a; Kasornchandra *et al*., 1998; Wu *et al*., 2001; Flegel, 2006) นอกจากนั้นยังสามารถสังเกตเห็นกล้ามเนื้อบริเวณส่วนท้ายของลำตัวมีลักษณะขาวขุ่นหรือกล้ามเนื้อตายเกิดขึ้นในกุ้งป่วยบางตัว (ภาพที่ 14-20) จะเห็นได้ว่ากุ้งที่ติดเชื้อ WSSV มีลักษณะอาการของโรคหลายแบบ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคจำเป็นต้องใช้วิธีอื่น ๆ เพื่อตรวจยืนยันการติดเชื้อ WSSV ด้วย หลังจากนั้นกุ้งป่วยเหล่านี้จะเริ่มทยอยตายและตายหมดภายใน 7 วัน หลังจากได้รับเชื้อ WSSV

การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

ในส่วนของการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อจะพบความผิดปกติในอวัยวะที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อชั้น ectoderm และ mesoderm ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบความผิดปกติบริเวณเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร เหงือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อวัยวะสร้างเม็ดเลือด antennal gland และอวัยวะต่อมน้ำเหลือง นอกจากนั้นในอวัยวะต่อมน้ำเหลืองจะพบการเกิด lymphoid organ spheroids (LOS) (ภาพที่ 21-29) โดยเซลล์ที่ติดเชื้อ WSSV จะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปกติ (hypertrophied nuclei) เนื่องจากไวรัสจะมีการสร้างตัวอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์และถูกล้อมรอบด้วยโครมาติน(marginated chromatin) (Flegel *et al*., 1997, 2006) เกิด eosinophilic inclusion (Cowdry type A inclusion) และในระยะต่อมาจะเกิด basophilic inclusion (ภาพที่ 21 และ 23) นอกจากนั้นยังพบการเกิด pyknosis และ karyorrhexis ของนิวเคลียสเป็นจำนวนมากในเนื้อเยื่อกุ้งตัวอย่างที่ติดเชื้อ WSSV อย่างรุนแรง (ภาพที่ 22 และ 28) โดยระยะของการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV จะมีลักษณะจำเพาะและเกี่ยวข้องโดยตรงกับการพัฒนาของเชื้อไวรัสภายในเซลล์ (Durand *et al*., 1997; Wang *et al*., 1999a; Tsai *et al*., 2006) สามารถอธิบายได้ ดังนี้

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน สามารถอธิบายการพัฒนาการของ WSSV ภายในเซลล์ได้ ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะที่ 1 เป็นระยะแรกของการติดเชื้อจะสามารถเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อมีนิวเคลียสขยายใหญ่ขึ้นเล็กน้อย nucleosome ของไวรัสจะปรากฏขึ้นก่อนมีการสร้างอนุภาคไวรัสซึ่งประกอบด้วยโปรตีนของไวรัสที่มีลักษณะเป็นเส้นใยเล็ก ๆ (fibrillar fragment) ส่วนในไซโทพลาสซึม endoplasmatic reticulum (ER) ที่มีไรโบโซมจำนวนมากจะมีขนาดใหญ่ขึ้น

ระยะที่ 2 ในนิวเคลียส fibrillar fragment จะเริ่มก่อตัวขึ้นอยู่ในเยื่อหุ้มบางที่มีลักษณะเป็นวงกลม (virogenic stroma) และในไม่ช้าจะเต็มไปด้วยโปรตีนที่สำคัญหลายชนิดสำหรับการสร้างอนุภาคไวรัส ซึ่งในระยะนี้จะเห็น Cowdry type A inclusion ปรากฏขึ้น พร้อม ๆ กับเกิด translucent zone ที่อยู่ระหว่าง virogenic stroma กับโครมาตินที่อัดตัวกันแน่นใกล้ผนังนิวเคลียส (marginated chromatin) ซึ่งมีลักษณะคล้ายวงแหวน โดยนิวเคลียสจะมีขนาดขยายใหญ่ขึ้นและมีลักษณะกลม ในส่วนไซโทพลาสซึมจะพบไมโทคอนเดรียเริ่มเสื่อมสภาพ ต่อมา marginated chromatin และเยื่อหุ้มนิวเคลียสจะเริ่มแตกสลาย (ภาพที่ 30)

ระยะที่ 3 ในนิวเคลียส nucleocapsid จะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ และเมื่อ marginated chromatin สลายไปเยื่อหุ้มนิวเคลียสจะแตกออก intranuclear transparent zone จะรวมเข้ากับไซโทพลาสซึม ซึ่งออร์แกเนลล์ส่วนใหญ่จะแตกสลายหรือกลายเป็นเนื้อเยื่อบาง ๆ (ภาพที่ 31) ดังนั้น central intranuclear inclusion ที่พบจะเล็กและมีสีเข้มกว่าเซลล์ในระยะที่ 2 เนื่องจากมีอนุภาคไวรัสอยู่เป็นจำนวนมาก และพบกลุ่มของ vesicle (ส่วนที่จะพัฒนาไปเป็น envelope) ที่เชื่อมต่อกันแสดงให้เห็นว่าเป็นระยะแรกของการพัฒนาของเชื้อ WSSV ซึ่ง vesicle เหล่านี้จะมีส่วนปลายที่ไม่สมมาตรกัน และมี capsid ที่ภายในว่างเปล่า (ภาพที่ 32) บางครั้ง capsid ที่ว่างเปล่าจะอยู่เดี่ยว ๆ หรือล้อมรอบด้วยส่วนที่คล้าย envelope แต่ปลายด้านหนึ่งจะเปิดออก ซึ่งมีความยาว 166-244 นาโนเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลาง 55-77 นาโนเมตร (ภาพที่ 33) capsid ที่กำลังพัฒนา (ความยาวประมาณ 277 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 44 นาโนเมตร) จะยาวและเรียวเล็กกว่าอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 34) ในบางครั้งการรวมตัวกันของ nucleocapsid กับ envelope อาจเกิดแยกจากกันอย่างสมบูรณ์และอาจจะพบ 2 nucleocapsids อยู่ใน 1 envelope (Zhan *et al*., 1998; Rodríguez *et al*., 2003) (ภาพที่ 35)

ระยะที่ 4 ในนิวเคลียส nucleocapsid ที่สมบูรณ์มีความยาวประมาณ 200-230 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 69-76 นาโนเมตร จะถูกหุ้มด้วย envelope ซึ่งมี 3 ชั้น (trilaminar envelope) หนา 8-9 นาโนเมตร ประกอบด้วยชั้นที่ทึบแสง 2 ชั้นที่แยกกับชั้นที่โปร่งแสง 1 ชั้น (ภาพที่ 36)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะที่ 5 เป็นระยะหลังของการเปลี่ยนแปลงของไวรัส อนุภาคไวรัสมีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือแท่งและที่ปลายด้านหนึ่งของอนุภาคไวรัสมีส่วนของรยางค์ที่ยื่นออกมาลักษณะคล้ายหาง (tail-like) มีแหล่งกำเนิดจาก envelope โดยส่วนที่คล้ายหางจะแยกจาก nucleocapsid อย่างชัดเจน หลังจากนั้น nucleocapsid จะเริ่มหดสั้นลงและหนาจนเห็นเป็นสีเข้มเพราะมี DNA-VP15 complex ของไวรัสห่อหุ้มอยู่

ระยะที่ 6 เป็นระยะสุดท้ายของการเปลี่ยนแปลงของไวรัส อนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์จะมีรูปร่างเป็นรูปไข่ซึ่งมีส่วนของรยางค์ที่ยื่นออกมาลักษณะคล้ายหางที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งและมี nucleocapsid รูปท่อนซึ่งอัดตัวแน่นอยู่ใน envelope ที่มีผิวเรียบ อนุภาคไวรัสมีความยาว 228-257 นาโนเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลาง 86-114 นาโนเมตร (ภาพที่ 37) ในระยะสุดท้ายนี้เซลล์ที่ติดเชื้อจะถูกทำลายอย่างรุนแรงจนแตกสลายและเกิดเป็นช่องว่างขึ้น (ภาพที่ 38)

ผลจากการทดลองทั้ง 4 การทดลอง แสดงให้เห็นว่า ที่อุณหภูมิของน้ำ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส เชื้อ WSSV มีความรุนแรงทำให้กุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม และลูกกุ้งระยะ PL_{15} ตายหมดภายใน 7 วัน ส่วนที่อุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส ไม่มีกุ้งป่วยและตายจากเชื้อ WSSV เลย สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าอัตราการตายของกุ้งขาวจะลดลงเมื่อเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส (Vidal *et al*., 2001; Granja *et al*., 2003, 2006; Rahman *et al*., 2006) ซึ่งไม่เพียงแต่อุณหภูมิที่สูงเท่านั้นที่จะสามารถใช้ป้องกันโรคดวงขาวได้ ยังมีการศึกษาอื่นที่เกี่ยวกับการใช้อุณหภูมิของน้ำที่ต่ำเพื่อป้องกันการเกิดโรคดวงขาวซึ่งเป็นการทดลองในกุ้ง *Masupeneaus japonicus* และกุ้งในกลุ่ม crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) โดยกุ้งทั้งสองชนิดนี้จะมีอัตราการตายลดลงเมื่อเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 16 องศาเซลเซียส (Guan *et al*., 2003; Jiravanichpaisal *et al*., 2004) ซึ่งผลของการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิของน้ำที่สูงกว่า 16 องศาเซลเซียส และต่ำกว่า 32 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมสำหรับการจำลองตัวเองของเชื้อ WSSV ในสัตว์ที่เป็นเจ้าบ้านที่ไวต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ เช่น กุ้ง ปู และ crayfish (Corbel *et al*., 2001; Guan *et al*., 2003; Jiravanichpaisal *et al*., 2004, 2006; Rahman *et al*., 2006) ส่งผลให้ในแต่ละการทดลองจากการศึกษาครั้งนี้จะพบว่ากุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม และลูกกุ้งระยะ PL_{15} ที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส หลังจากได้รับเชื้อ WSSV จึงมีอัตราการตายที่ใกล้เคียงกันและจากการศึกษานี้ยังพบว่าน้ำที่มีอุณหภูมิที่สูง (32-33 องศาเซลเซียส) สามารถป้องกันโรคดวงขาวและลดอัตราการตายในกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV สอดคล้องกับรายงานของ ชลอ และ พรเลิศ (2547) ที่พบว่าฤดูกาลการเลี้ยงกุ้งทะเลที่เหมาะสมและพบปัญหากุ้งติดเชื้อ WSSV

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้อยที่สุด คือ ช่วงระหว่างเดือนมีนาคมจนถึงกันยายน ซึ่งเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิของน้ำสูงเป็นเวลาหลายเดือนติดต่อกันซึ่งในบางประเทศ เช่น ประเทศเปรูและเอกวาดอร์ (ชลอ, 2553; Lightner *et al*., 2005) ได้ใช้ประโยชน์จากอุณหภูมิที่สูงนี้เพื่อป้องกันการระบาดของโรคดวงขาวในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวโดยใช้พลาสติกสีขาวปกคลุมบ่อเลี้ยงและปูพื้นบ่อด้วยพีอีสีดำหรือพลาสติกสีขาว ซึ่งอุณหภูมิในบ่อจะสูงถึง 33-34 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงไม่พบการระบาดของโรคดวงขาว แต่การเลี้ยงกุ้งที่อุณหภูมิที่สูงเกินไป คือ สูงเกิน 33 องศาเซลเซียส จะทำให้กุ้งตายได้ ส่งผลให้มีอัตราการรอดตายต่ำ (Dall *et al*., 1992) ซึ่งกลไกที่อุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส สามารถลดอัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ยังไม่มีรายงาน แต่อุณหภูมิที่สูงนั้นอาจจะมีผลต่อการจำลองตัวเองของ WSSV (Vidal *et al*., 2001; Granja *et al*., 2003; Rahman *et al*., 2006) และการลดจำนวนลงของไวรัส (Du *et al*., 2006; Granja *et al*., 2006)

ในส่วนของผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR ของการศึกษานี้เป็นที่น่าสังเกตว่ากุ้งขาวที่สุ่มจากกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อและการเลี้ยงกุ้งปกติในน้ำที่มีเชื้อ WSSV จะให้ผลเป็นลบ ในขณะที่กุ้งขาวที่สุ่มจากกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากฉีดเชื้อ WSSV ให้ผลเป็นบวก ซึ่งผลการตรวจเป็นเช่นนี้น่าจะเกิดขึ้นจากที่อุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส เชื้อ WSSV สามารถยึดติดกับเซลล์ของกุ้งแต่ไม่สามารถจำลองตัวเองได้และกุ้งพยายามที่จะกำจัดเชื้อ WSSV ออกจากร่างกาย ซึ่งจะต้องมีช่วงระยะเวลาหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดเชื้อออกจากร่างกาย

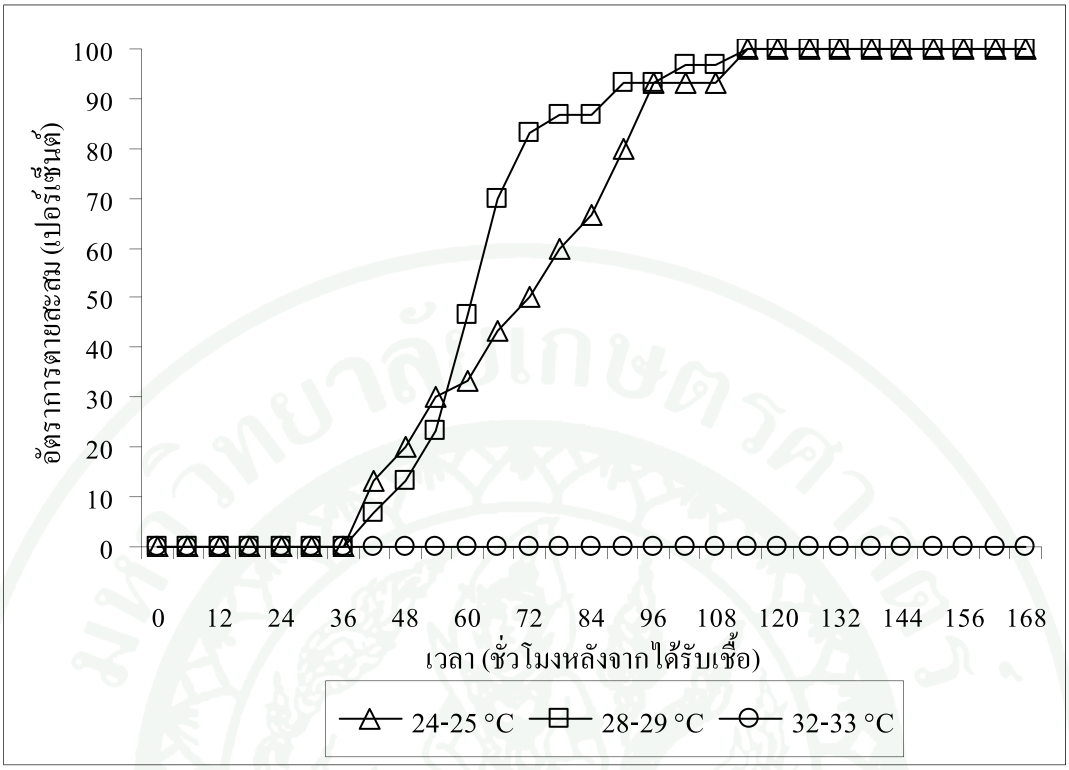
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน หลังจากได้รับเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR ชุดตรวจ immunochromatographic test strip และการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology)

อุณหภูมิน้ำ	วิธีรับเชื้อ WSSV	วิธีตรวจเชื้อ WSSV (ตัวอย่างที่ติดเชื้อ WSSV / ตัวอย่างทั้งหมด)		
		Nested-PCR	Immunochromato-graphic test strip	Histopathology
กุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม				
24-25°C	กิน	10/10	10/10	10/10
28-29°C	กิน	10/10	10/10	10/10
32-33°C	กิน	0/10	0/10	0/10
24-25°C	ฉีด	10/10	10/10	10/10
28-29°C	ฉีด	10/10	10/10	10/10
32-33°C	ฉีด	10/10	0/10	0/10
24-25°C	แช่	10/10	10/10	10/10
28-29°C	แช่	10/10	10/10	10/10
32-33°C	แช่	0/10	0/10	0/10
ลูกกุ้งขาวระยะ PL_{15}				
24-25°C	แช่	30/30*	30/30	30/30
28-29°C	แช่	30/30*	30/30	30/30
32-33°C	แช่	0/30*	0/30	0/30

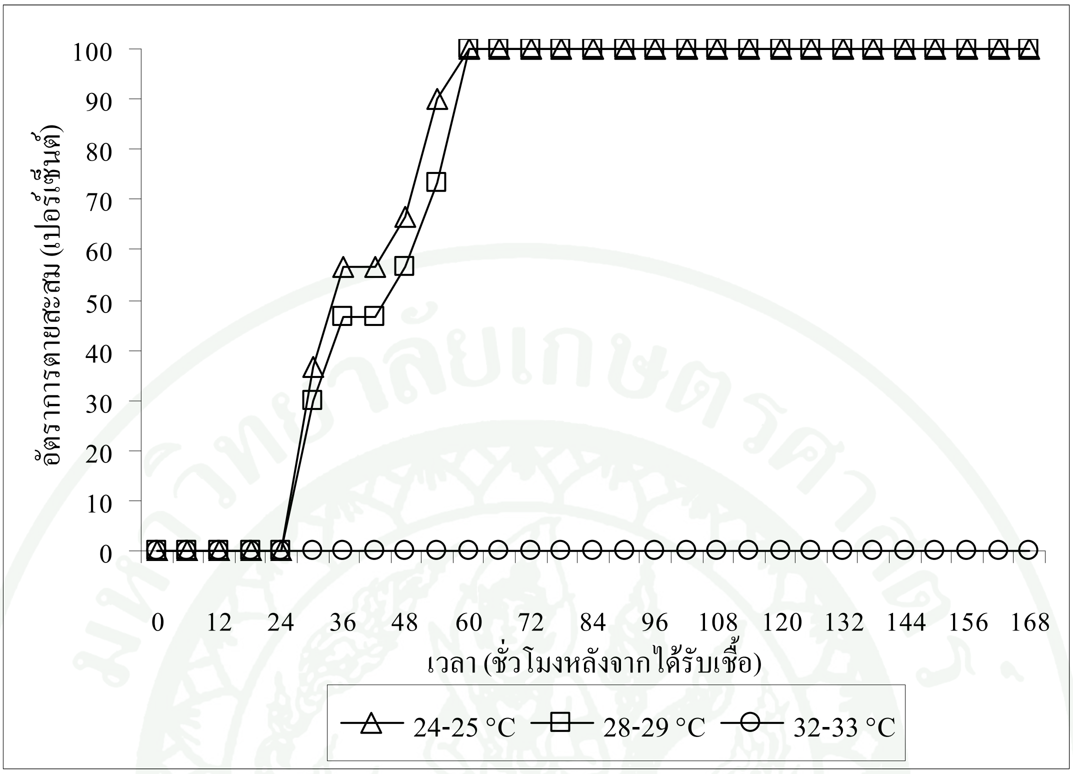
หมายเหตุ *ตัวอย่างลูกกุ้งขาวระยะ PL_{15} จำนวน 30 ตัว จะถูกบดรวมกันแล้วนำไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



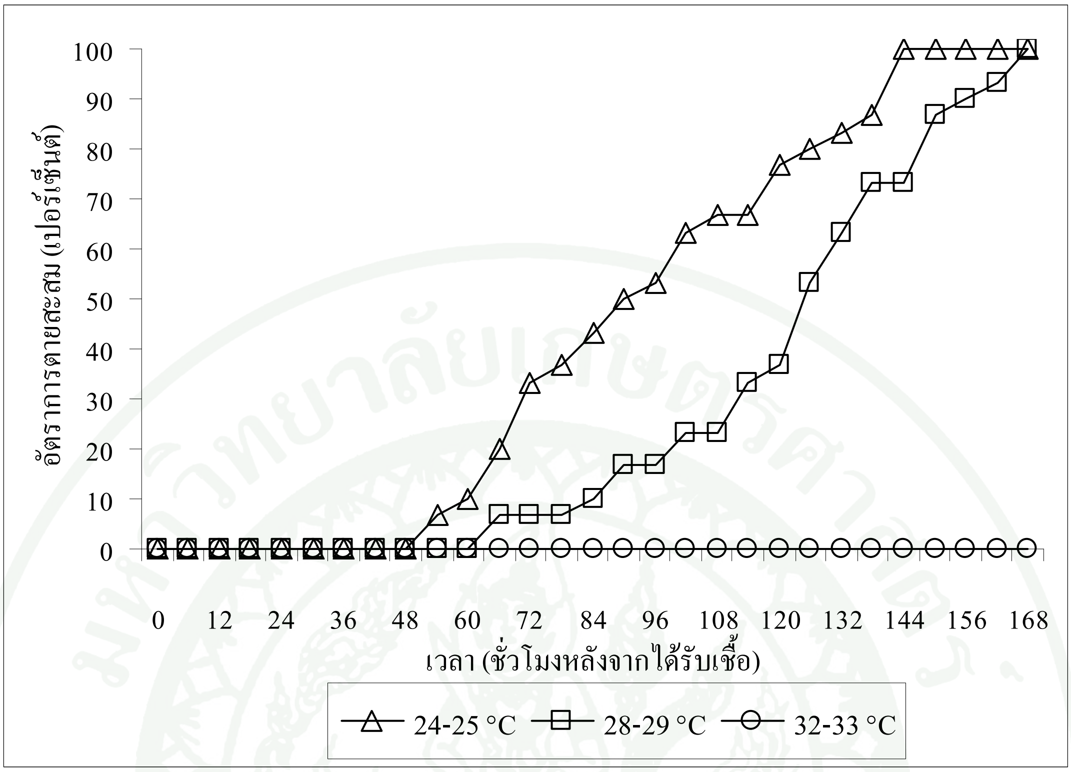
ภาพที่ 10 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



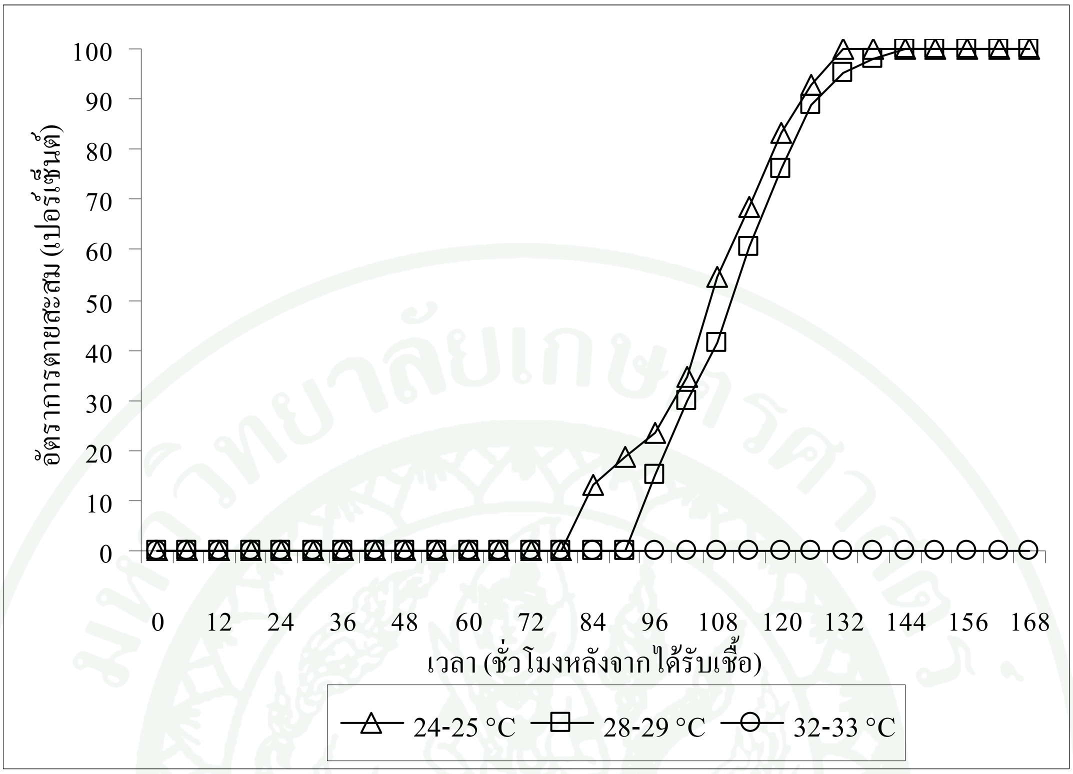
ภาพที่ 11 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากฉีดเชื้อ WSSV

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 15 ที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 14 กุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV เริ่มแสดงอาการป่วย (ตัวแรก) (1) ซึ่งส่วนใหญ่จะมีลำตัวสีชมพูจนถึงแดง (2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

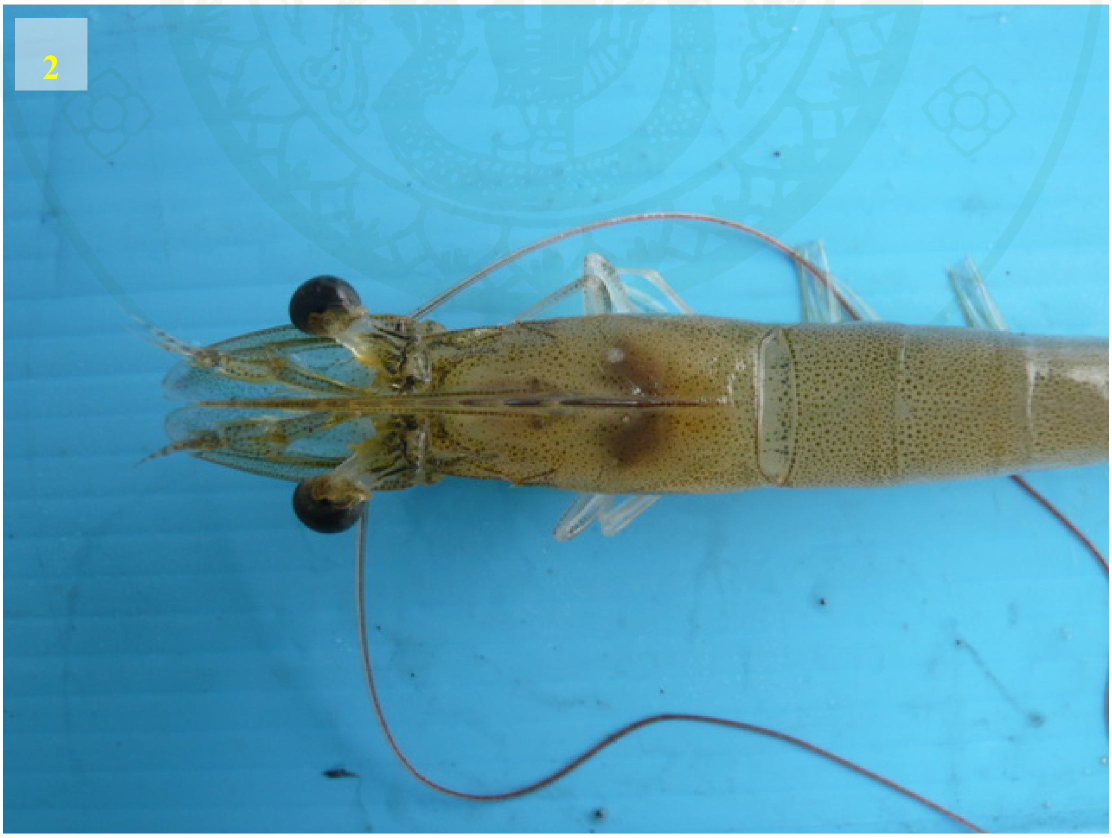
ภาพที่ 15 กุ้งขาวที่แสดงอาการป่วยจะไม่กินอาหาร (กุ้ง 2 ตัว ด้านล่าง) (1) ทำให้เห็นลำไส้ว่างเปล่า และเซื่องซึม (2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 16 กุ้งป่วยบางตัวมีเปลือกนิ่ม (1) หรือมีตับและตับอ่อนขนาดใหญ่ขึ้นและมีสีเหลือง (2)

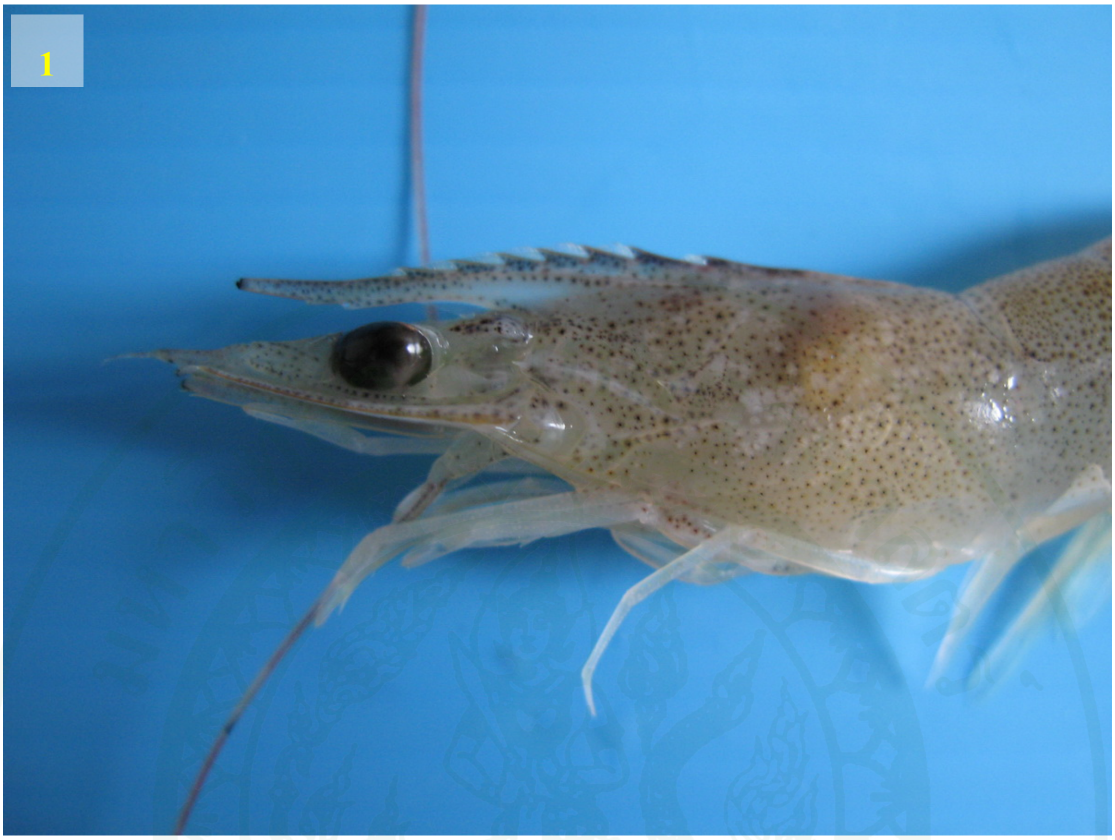
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 17 กุ้งที่ติดเชื้อ WSSV มีจุดขาวหรือดวงขาวบริเวณเปลือกคลุมหัว (1) และตามส่วนต่าง ๆ ของลำตัว (2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 18 จุดขาวหรือดวงขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-2.0 มิลลิเมตร สามารถเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อดึงเปลือกคลุมหัวแล้วลอกเนื้อเยื่อบาง ๆ ออก จากนั้นส่องดูผ่านแสง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 19 กล้ามเนื้อบริเวณส่วนท้ายของลำตัวมีลักษณะขาวขุ่นหรือกล้ามเนื้อตายเกิดขึ้นในกุ้งป่วยบางตัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

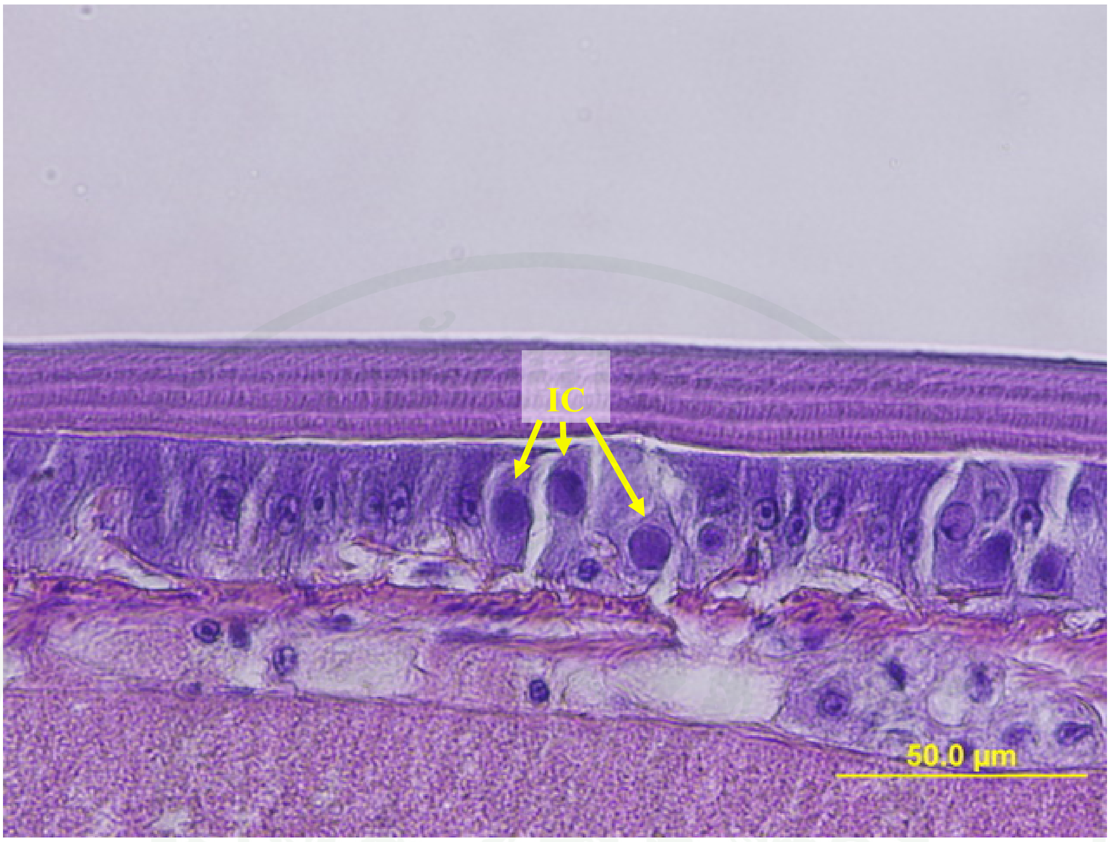
ภาพที่ 20 กุ้งป่วยจะเริ่มทยอยตายและตายหมด ภายใน 7 วัน หลังจากได้รับเชื้อ WSSV

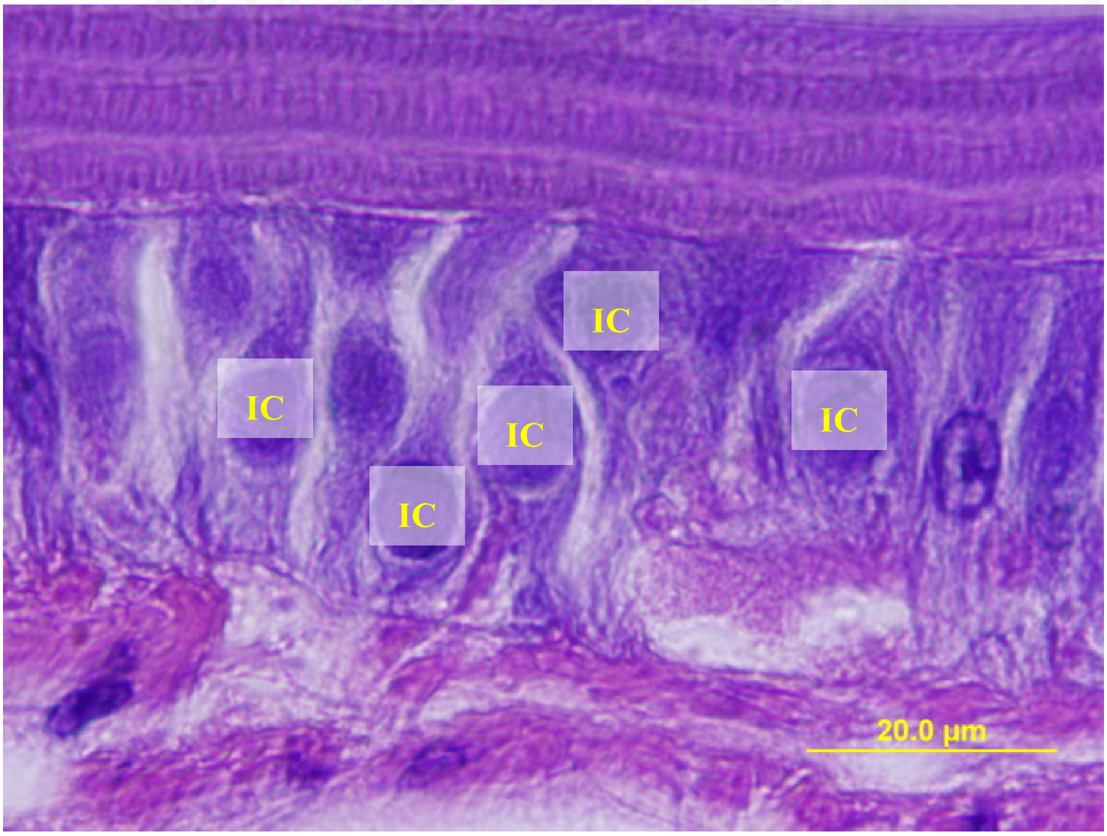
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 21 เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือกของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบ inclusion body ลักษณะ basophilic inclusion (IC) โดยเซลล์ที่ติดเชื้อจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้น (hypertrophied nuclei) (H&E)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

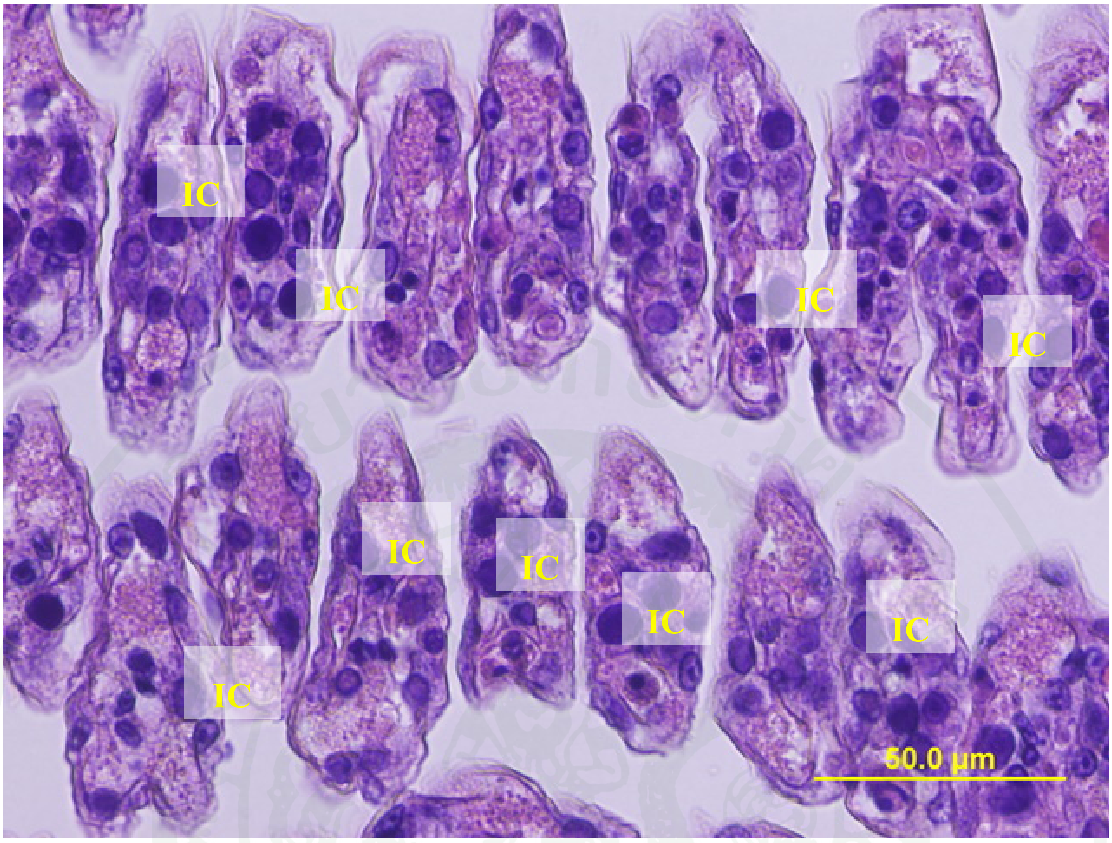


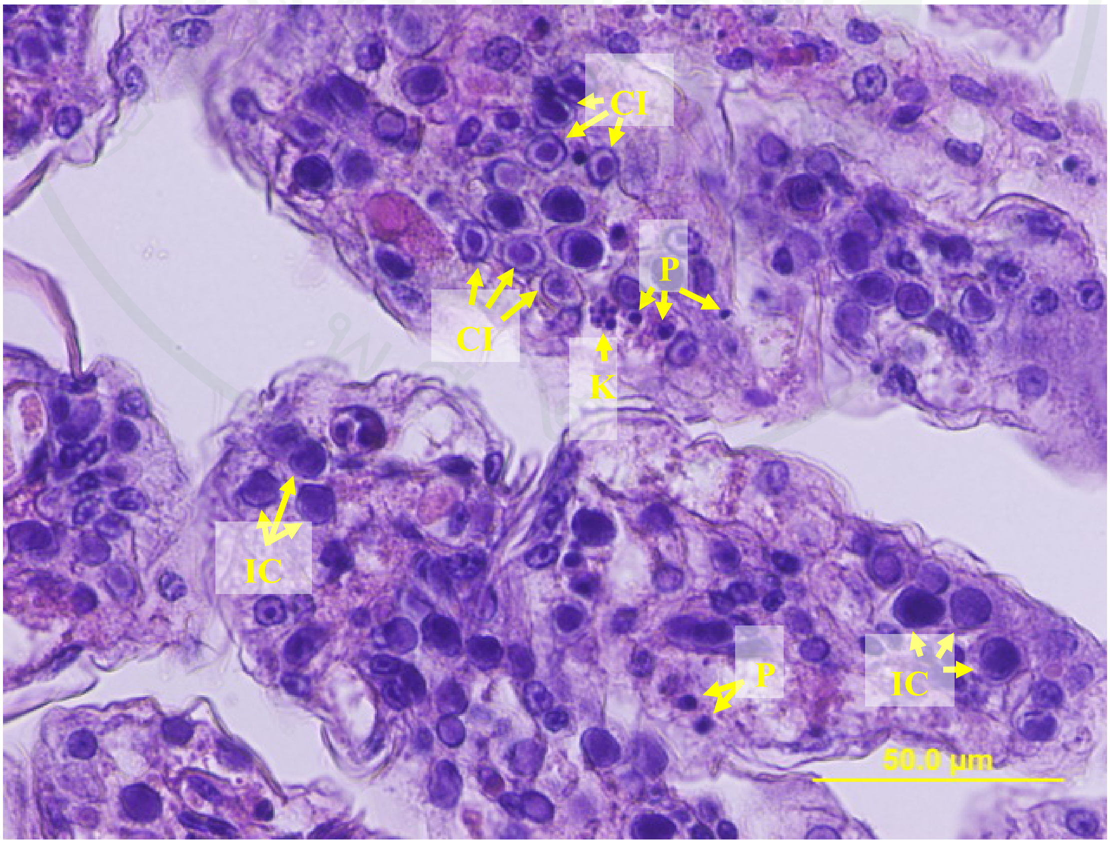


ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 22 บริเวณเหงือกของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบการเกิด Cowdry type A inclusion (CI) basophilic inclusion (IC) pyknosis (P) และ karyorrhexis ของนิวเคลียส (K) เป็นจำนวนมาก (H&E, bar = 50 µm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

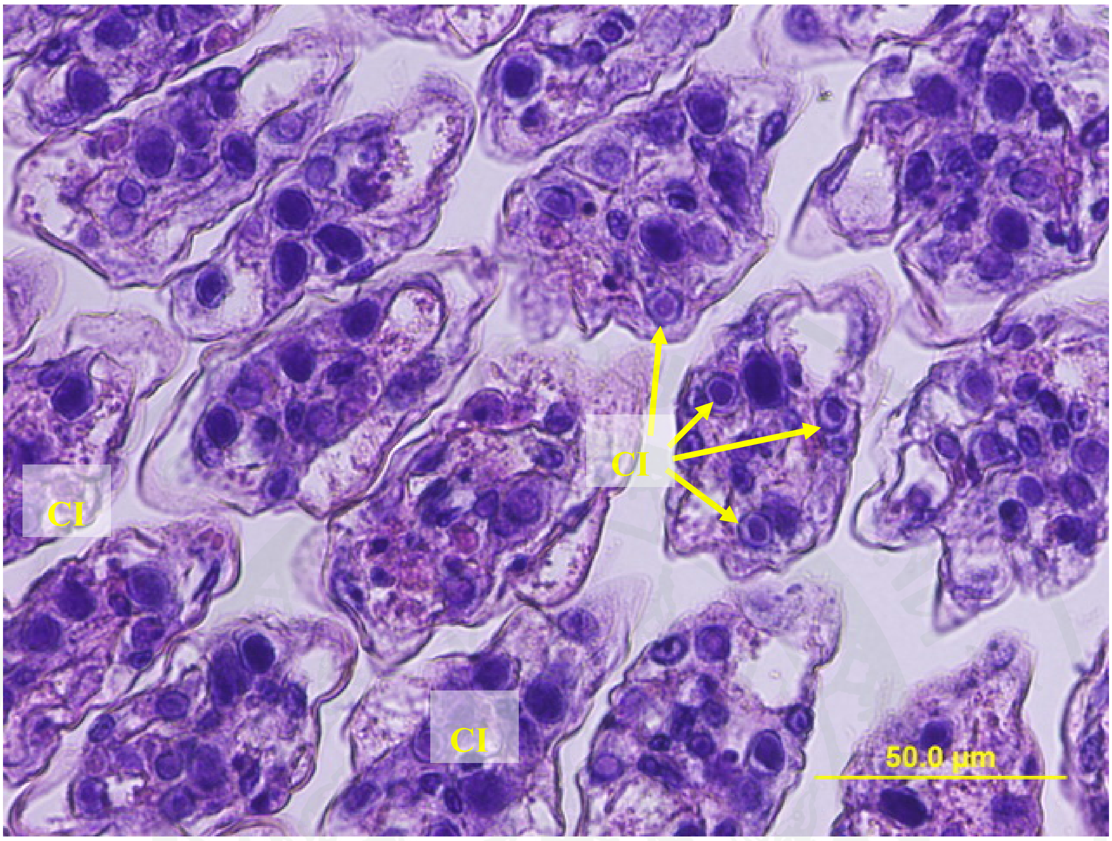


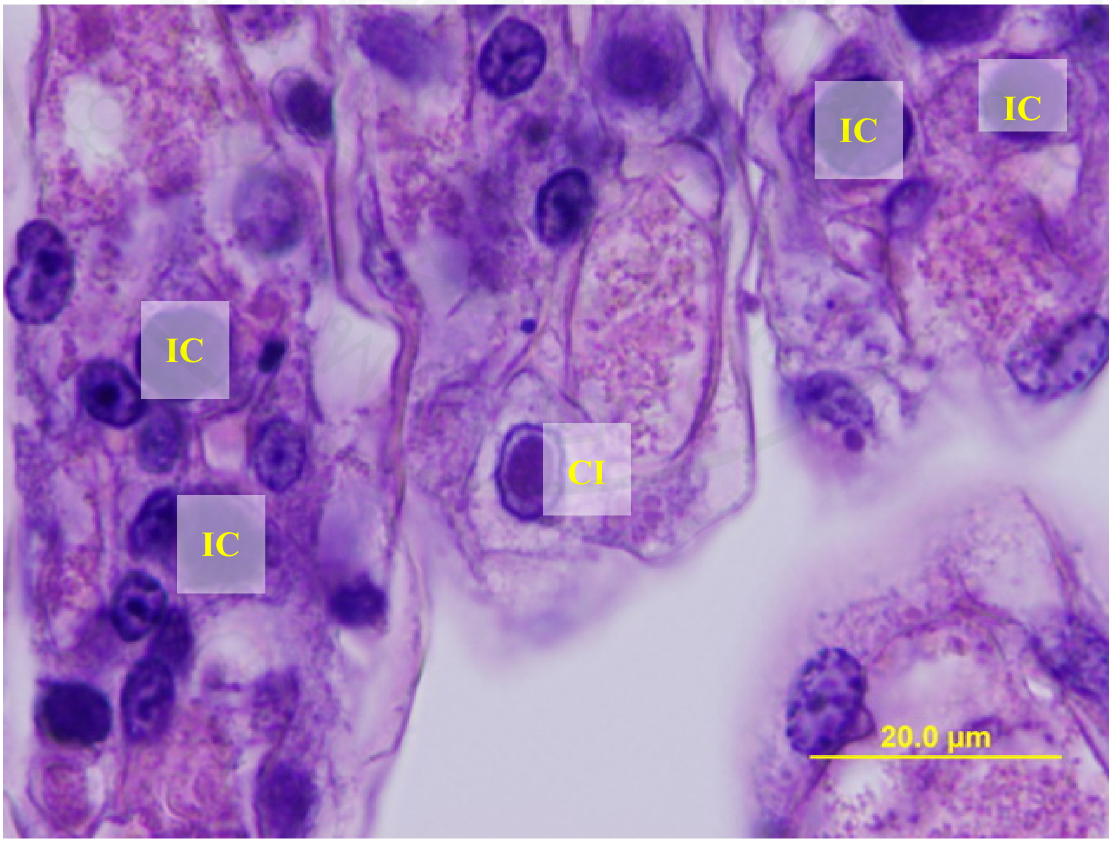


ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 23 พยาธิสภาพของเหงือกของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบ inclusion body ลักษณะ Cowdry type A (CI) ติดสีชมพูของ eosin อยู่บริเวณกึ่งกลางเซลล์ (centronuclear) ซึ่งเป็นระยะแรกของการติดเชื้อ โดยเซลล์ที่ติดเชื้อจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้น มองเห็นมีโครมาตินล้อมรอบ และสิ้นสุดด้วยเกิด basophilic inclusion (IC)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



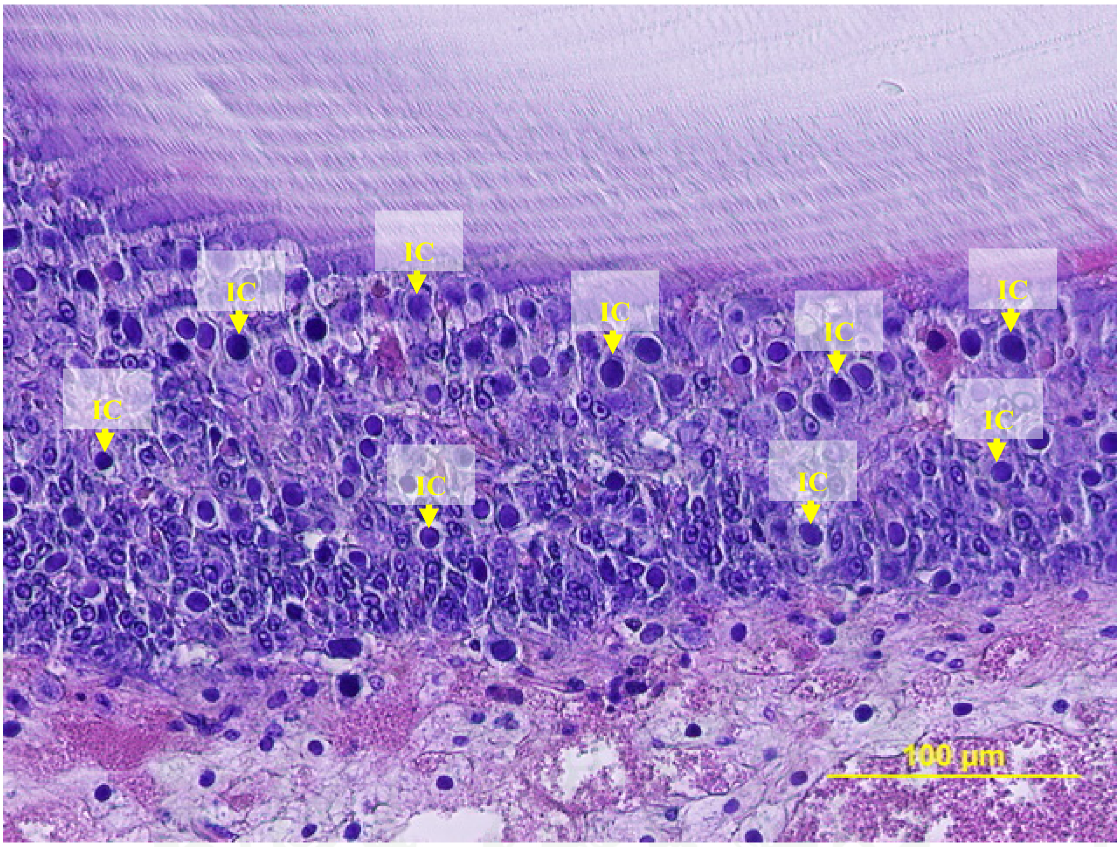


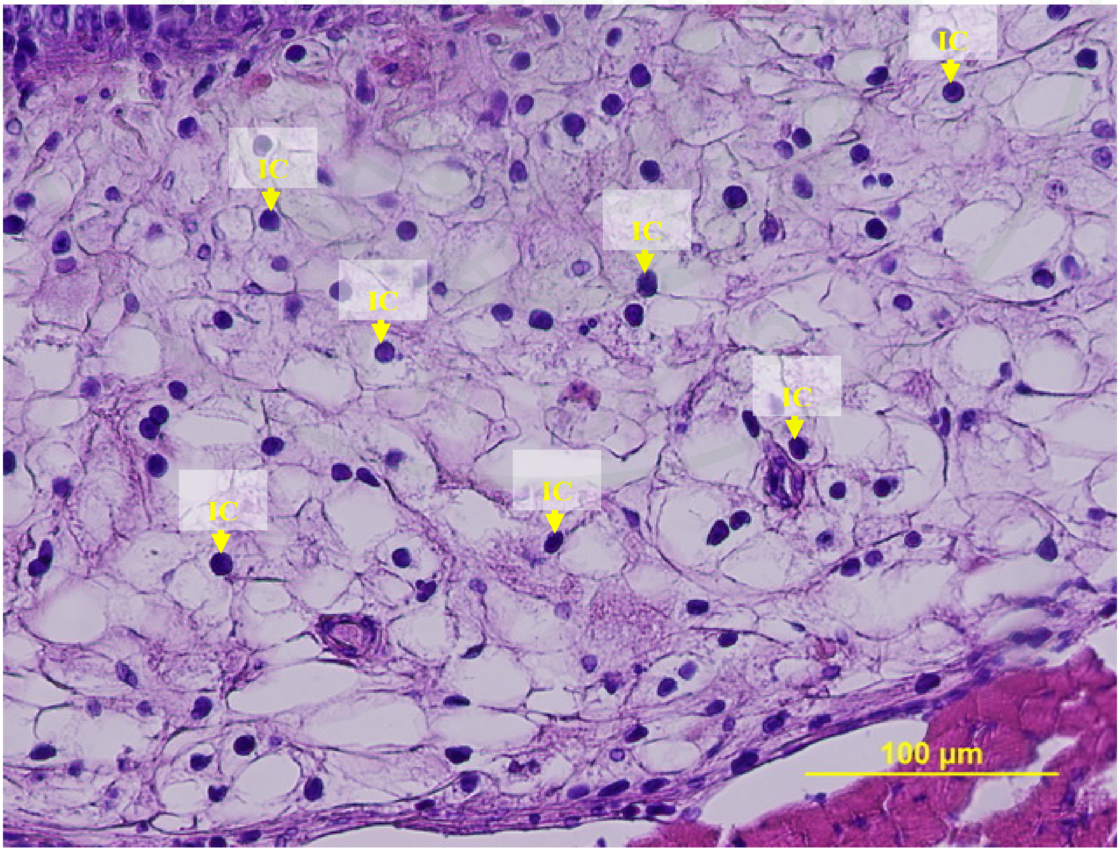
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 24 พยาธิสภาพของเยื่อบุผนังกระเพาะอาหารของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบ inclusion body ลักษณะ basophilic inclusion (IC) จำนวนมาก (H&E, bar = 100 µm)

ภาพที่ 25 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบ inclusion body ลักษณะ basophilic inclusion (IC) (H&E, bar = 100 µm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



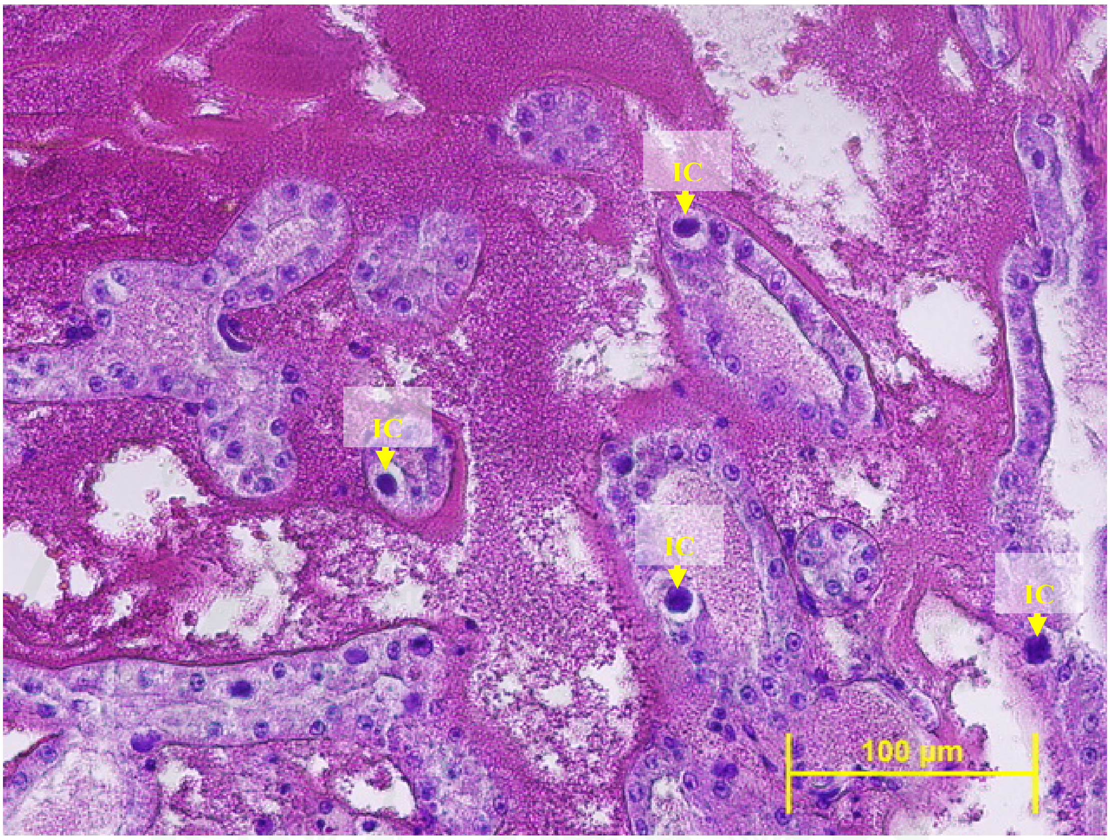


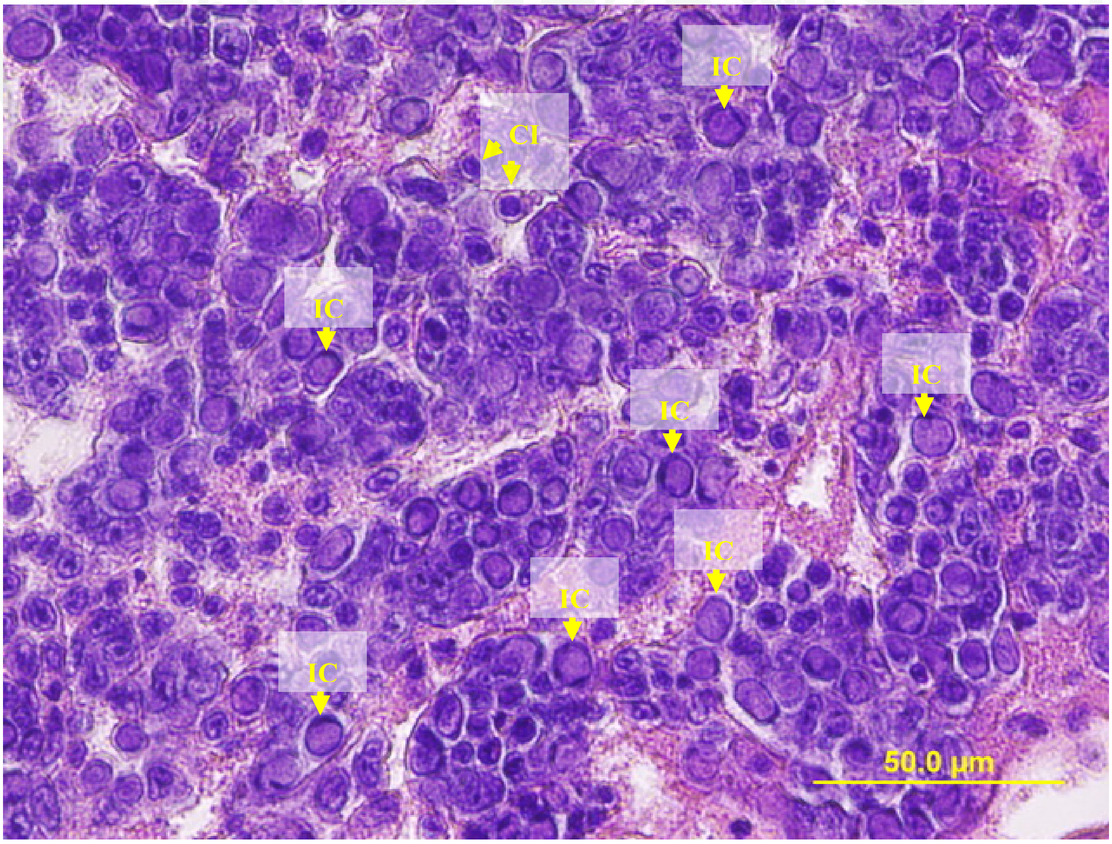
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 26 บริเวณ antennal gland ของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบการเกิด inclusion body (IC) (H&E, bar = 100 µm)

ภาพที่ 27 อวัยวะสร้างเม็ดเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบ inclusion body ลักษณะ Cowdry type A inclusion (CI) และ basophilic inclusion (IC) โดยเซลล์ที่ติดเชื้อจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้นและล้อมรอบด้วยโครมาติน (H&E, bar = 50 µm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



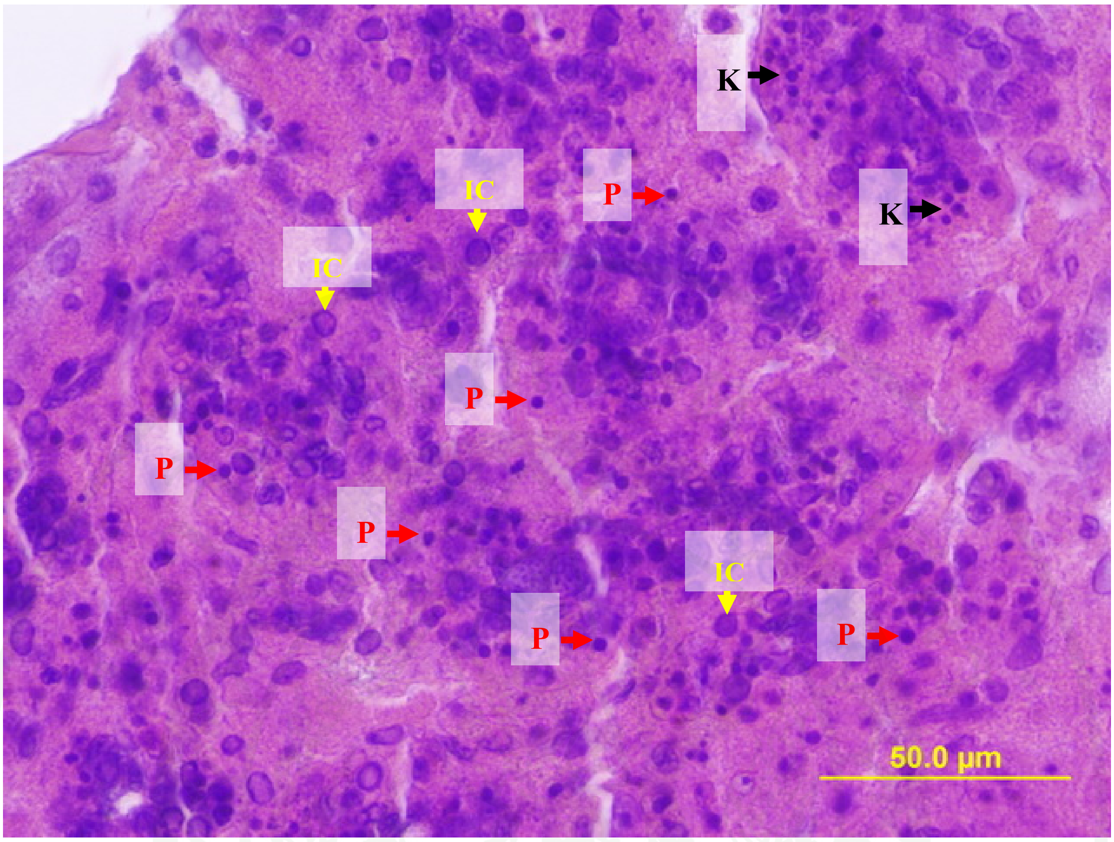


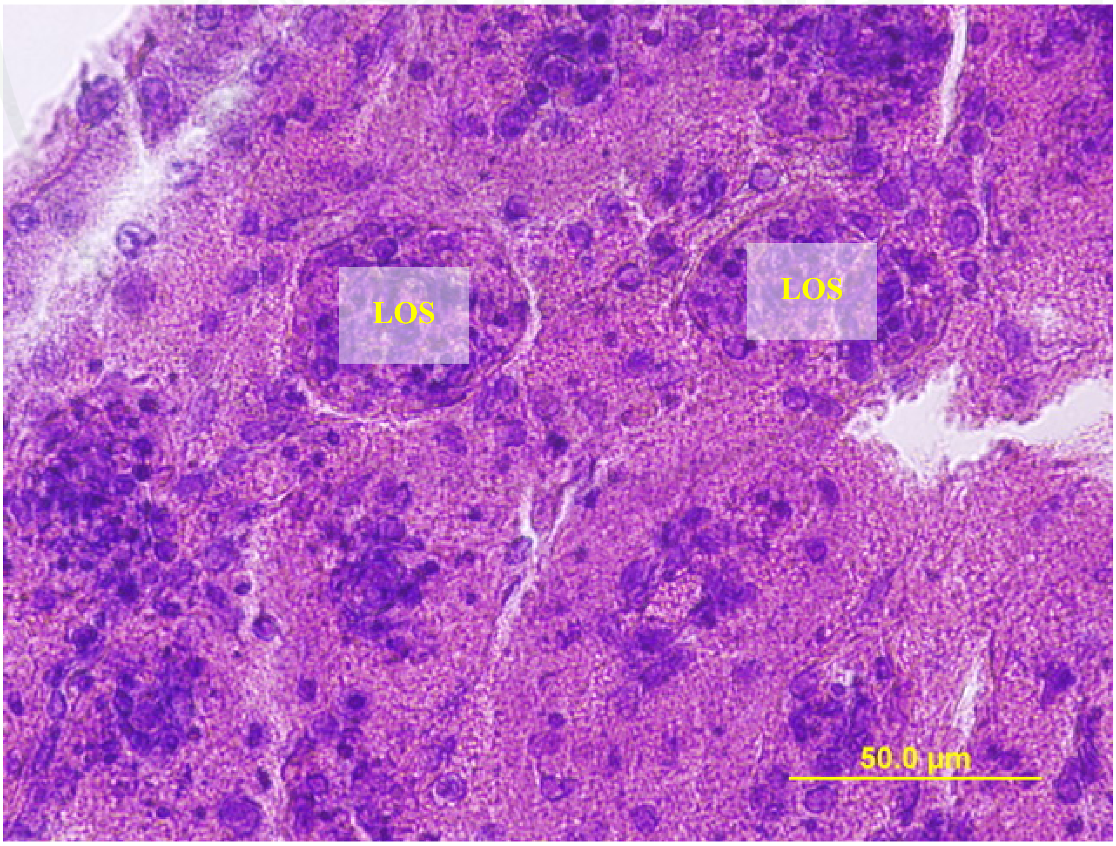
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 28 อวัยวะต่อมน้ำเหลืองของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV พบการเกิด inclusion body (IC) pyknosis (P) และ karyorrhexis ของนิวเคลียสเป็นจำนวนมาก (K) (H&E, bar = 50 µm)

ภาพที่ 29 พยาธิสภาพของอวัยวะต่อมน้ำเหลืองของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV พบการเกิด lymphoid organ spheroids (LOS) (H&E, bar = 50 µm)

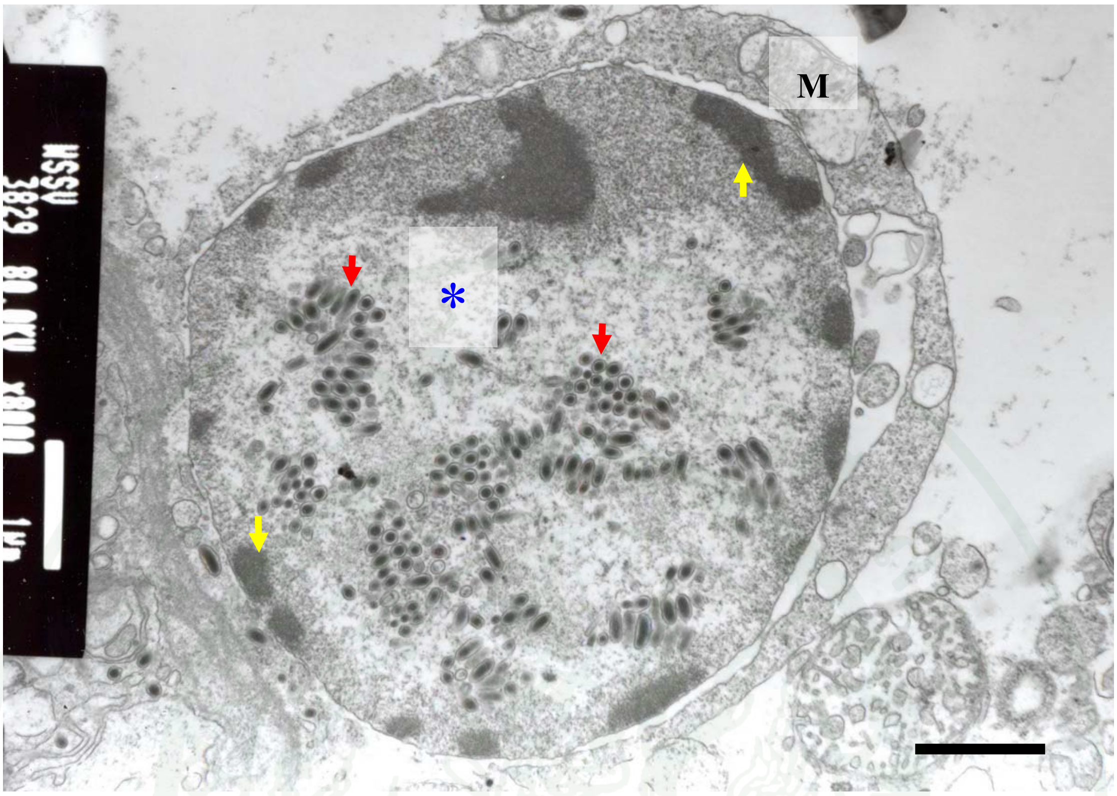
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

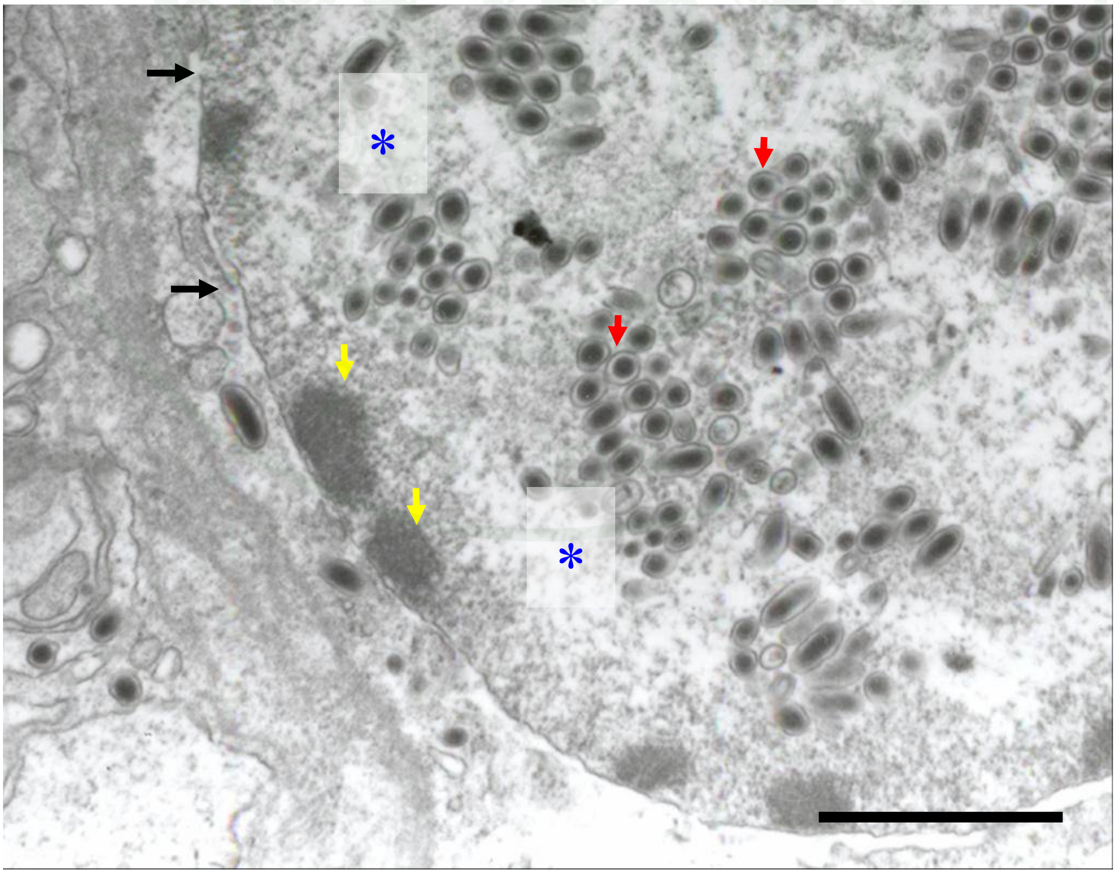

K
K
IC
IC
P
P
P
P
P
IC
P
50.0 µm


LOS
LOS
50.0 µm

ภาพที่ 30 อนุภาค WSSV (ลูกศรสีแดง) ในนิวเคลียสของเซลล์เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือกของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ในระยะสุดท้ายของการเกิด Cowdry type A inclusion โดยโครมาตินที่อัดตัวกันแน่นใกล้ผนังนิวเคลียส (marginated chromatin) (ลูกศรสีเหลือง) และเยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มแตกสลาย (ลูกศรสีดำ) ในส่วนไซโทพลาสซึมจะพบไมโทคอนเดรียเริ่มเสื่อมสภาพ (M); transparent zone (ดอกจัน) (bar = 1 µm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

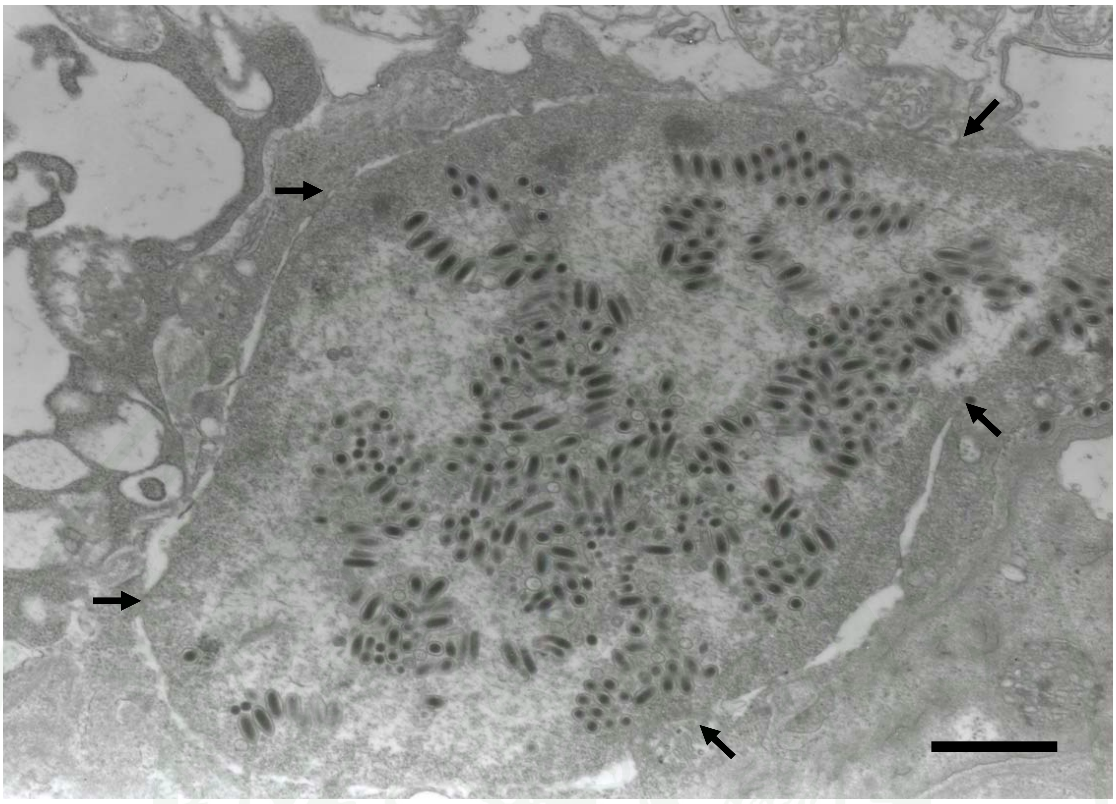

M

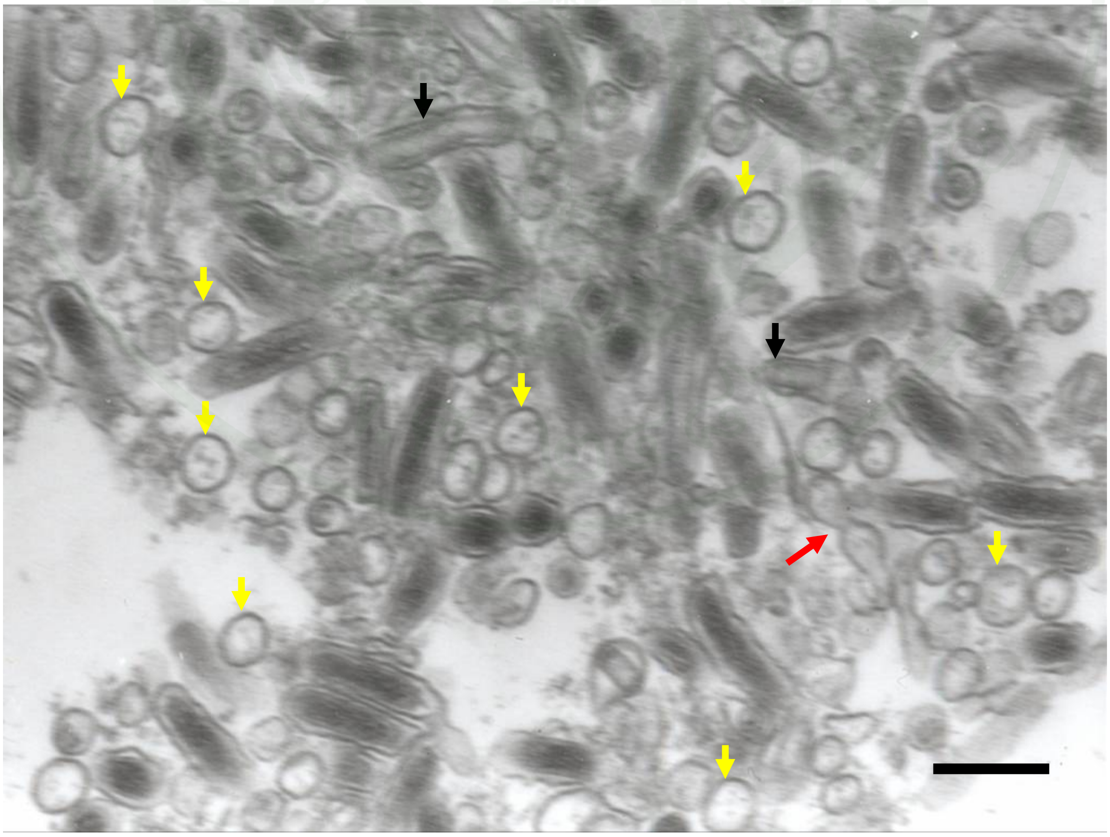


ภาพที่ 31 marginated chromatin สลายไปเยื่อหุ้มนิวเคลียสจะแตกออก transparent zone จะรวมเข้ากับไซโทพลาสซึม (ลูกศรชี้) ซึ่งออร์แกเนลล์ส่วนใหญ่จะแตกสลายหรือกลายเป็นเนื้อเยื่อบาง ๆ (bar = 1 µm)

ภาพที่ 32 กลุ่มของ vesicle ที่อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ WSSV (ลูกศรสีเหลือง) ซึ่ง vesicle จะพัฒนาไปเป็น envelope (ลูกศรสีดำ) และ vesicle ที่เชื่อมต่อกัน (ลูกศรสีแดง) ซึ่งเป็นระยะแรก ๆ ของการพัฒนาของเชื้อ WSSV (bar = 200 nm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



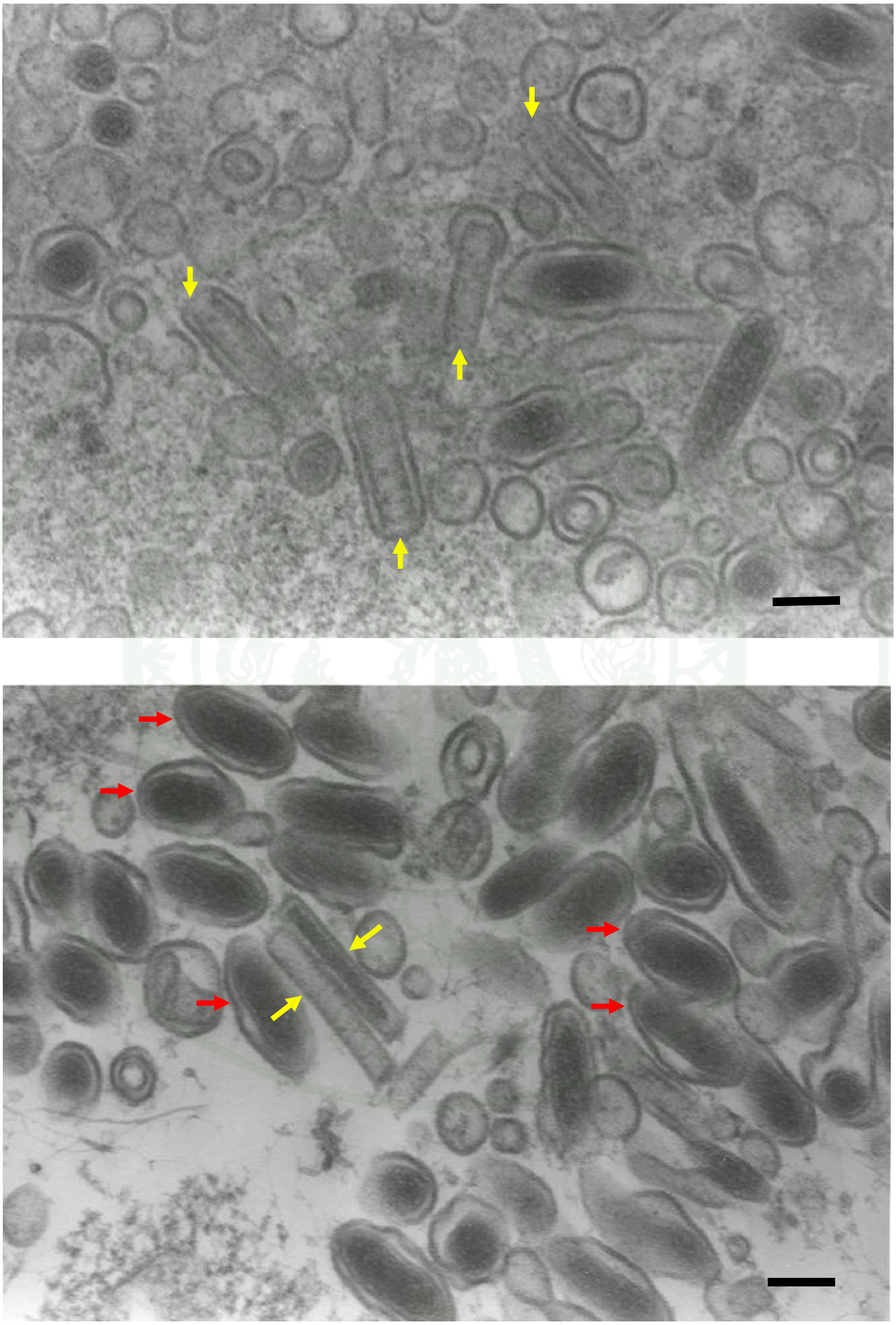


ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 33 capsid ที่ว่างเปล่าจะอยู่เดี่ยว ๆ หรือล้อมรอบด้วยส่วนที่คล้าย envelope แต่ปลายด้านหนึ่งจะเปิดออก (ลูกศรชี้) (bar = 100 nm)

ภาพที่ 34 capsid ที่กำลังพัฒนา (ลูกศรสีเหลือง) ยาวและเรียวเล็กกว่าอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (ลูกศรสีแดง) (bar = 100 nm)

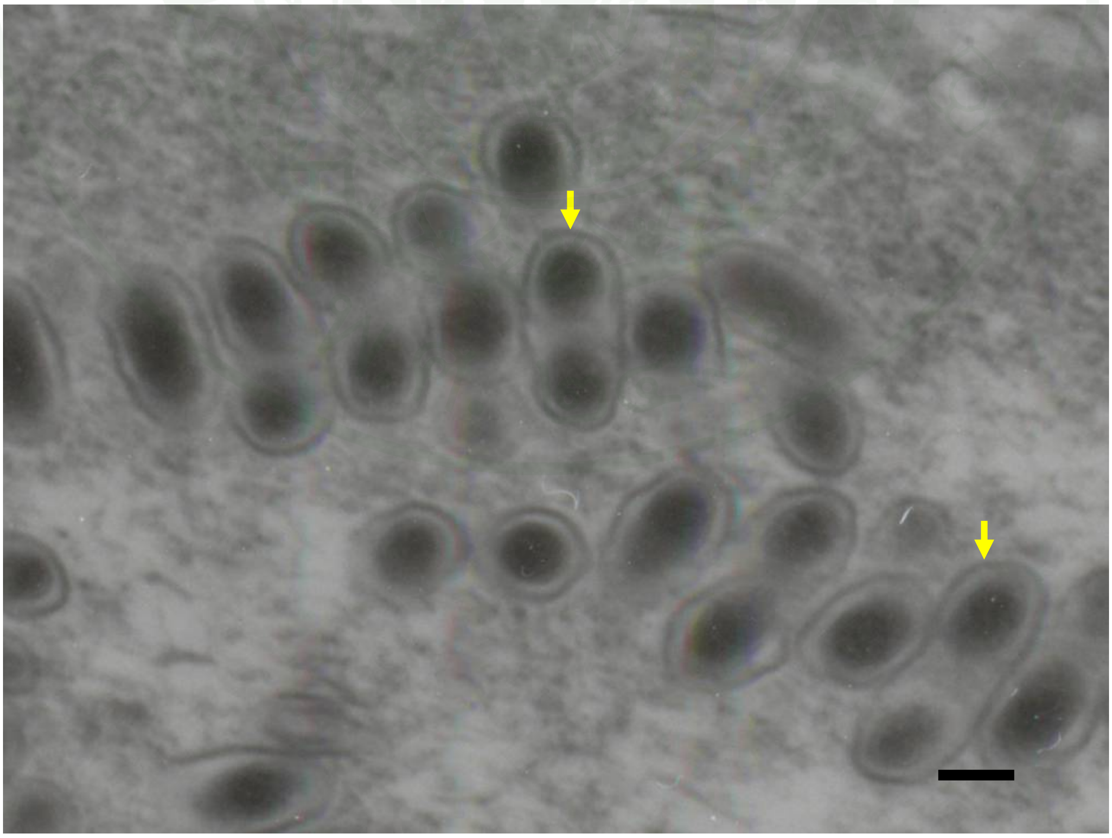
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 35 ในบางครั้งพบ nucleocapsid ของเชื้อ WSSV ที่ไม่มี envelope (ลูกศรสีดำ) และ 2 nucleocapsids อยู่ใน 1 envelope (ลูกศรสีเหลือง) (bar = 100 nm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

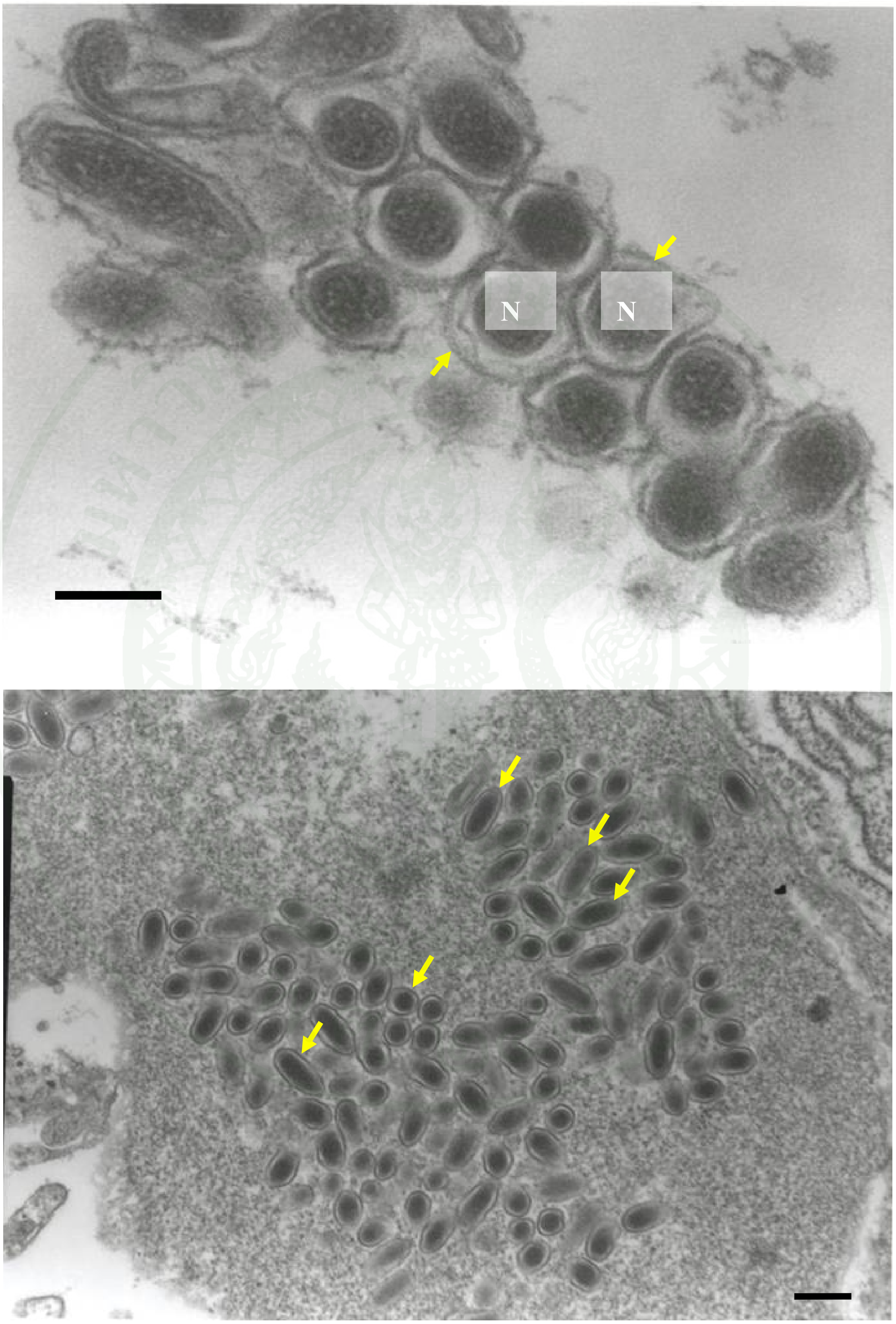


ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 36 nucleocapsid (N) ที่สมบูรณ์ถูกหุ้มด้วย envelope (ลูกศรชี้) ซึ่งมี 3 ชั้น (trilaminar envelope) ประกอบด้วยชั้นที่ทึบแสง 2 ชั้น ที่แยกกับชั้นที่โปร่งแสง 1 ชั้น (bar = 100 nm)

ภาพที่ 37 อนุภาค WSSV ที่สมบูรณ์มีรูปร่างเป็นรูปไข่ (ลูกศรชี้) และมี nucleocapsid รูปท่อนอัดตัวแน่นอยู่ใน envelope (bar = 200 nm)

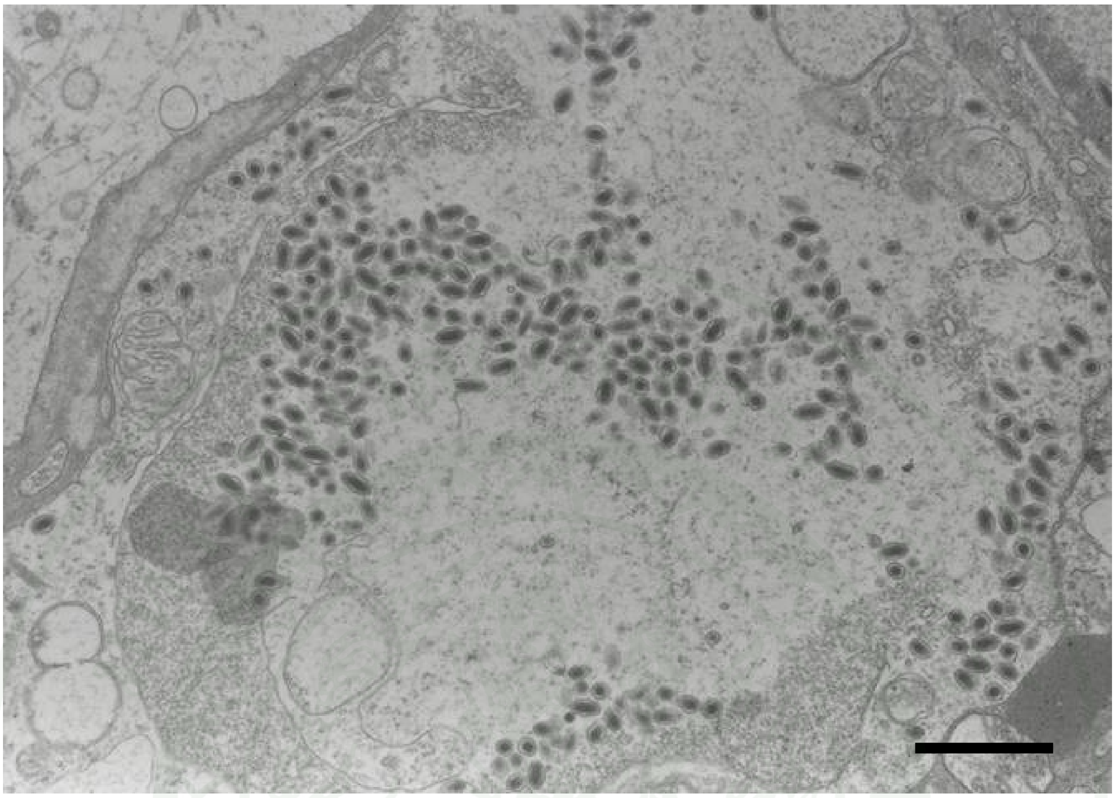
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

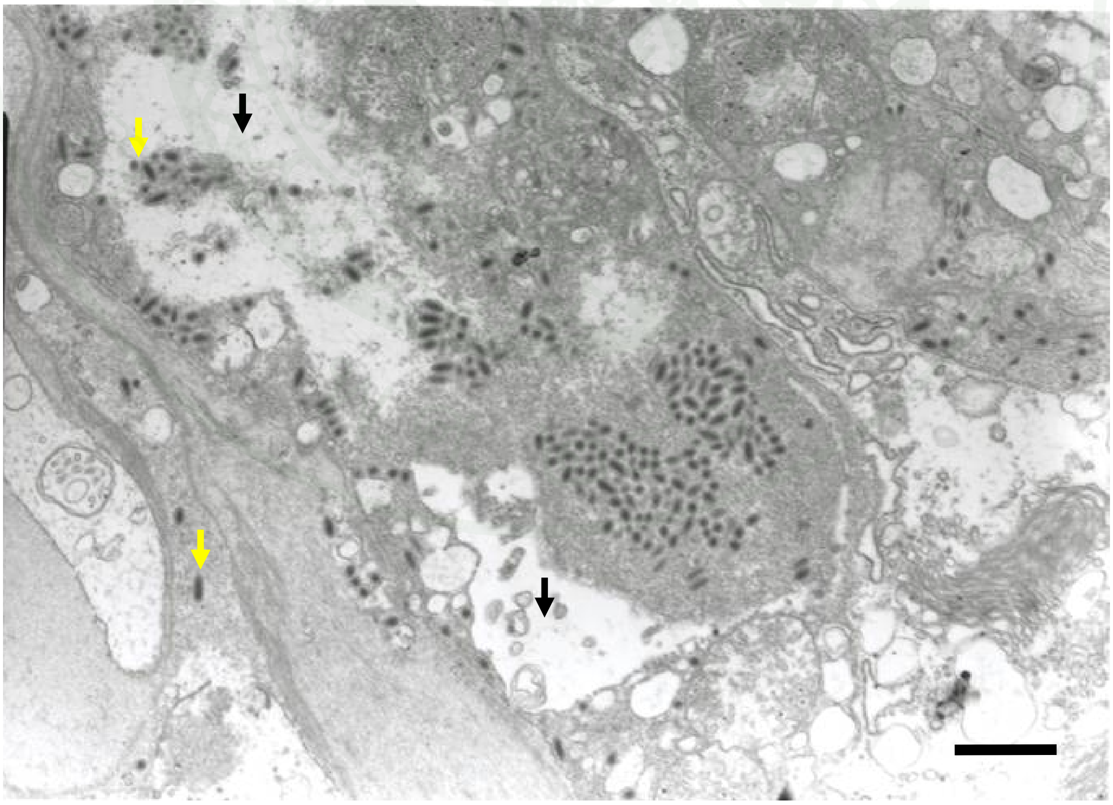


ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 38 ในระยะสุดท้ายของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือกที่ติดเชื้อ WSSV (1) ผนังนิวเคลียสถูกทำลายและออร์แกเนลล์ต่าง ๆ ในไซโทพลาสซึมจะแตกสลายและ (2) เกิดเป็นช่องว่างขึ้น (ลูกศรสีดำ) อนุภาค WSSV ที่สมบูรณ์จะถูกปลดปล่อยจากเซลล์ที่แตกสลาย (ลูกศรสีเหลือง) (bar = 1 μm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์





ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส ต่อความรุนแรงของการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

2.1 การศึกษาผลของการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำจาก 28-29 องศาเซลเซียส เป็น 32-33 องศาเซลเซียส ต่อการติดเชื้อ WSSVในกุ้งขาวแวนนาไม

ในการทดลองที่ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง โดยสังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 12 ชั่วโมง พบว่า กุ้งในกลุ่มที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV แล้วเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และกุ้งในกลุ่มควบคุมเริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 24 หลังจากกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV และสามารถสังเกตเห็นการตายในชั่วโมงที่ 36 โดยกุ้งทยอยตายจนกระทั่งอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 84, 84 และ 120 หลังจากกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ตามลำดับ (ภาพที่ 39) เมื่อสุ่มกุ้งที่ใกล้ตายไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay พบว่า ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อ WSSV ทั้งหมด (ตารางที่ 5) ในขณะที่กุ้งในกลุ่มที่กินกุ้งติดเชื้อ WSSV แล้วเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 12 ชั่วโมง ก่อนเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส ไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น (ภาพที่ 39) กุ้งตัวอย่างที่รอดชีวิตให้ผลเป็นบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี nested-PCR แต่เมื่อตรวจด้วยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและวิธี immunohistochemistry รวมทั้งการทดสอบโดยวิธี bioassay ให้ผลเป็นลบ คือ ไม่พบการติดเชื้อ WSSV ในเนื้อเยื่อกุ้งตัวอย่าง (ตารางที่ 5) หลังจากนั้นในวันที่ 6 ของการทดลองได้ปรับลดอุณหภูมิของน้ำทั้งสองกลุ่มนี้ให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส อีกครั้งหนึ่ง ปรากฏว่า กุ้งที่รอดชีวิตของทั้งสองกลุ่มนี้ เริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 24 และเริ่มมีการตายขึ้นในชั่วโมงที่ 36 หลังจากการปรับลดอุณหภูมิจนกระทั่งกุ้งทั้งหมดตายในวันที่ 5 หลังจากการปรับลดอุณหภูมิ กุ้งตัวอย่างที่ใกล้ตายให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อ WSSV เมื่อตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับการทดลองในกุ้งปกติที่ฉีดเชื้อ WSSV หลังจากนั้นแบ่งเป็นกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง ก่อนเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง สังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 12 ชั่วโมง พบว่า กุ้งในกลุ่มที่ฉีดเชื้อแล้วเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และกุ้งในกลุ่มควบคุม เริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 24 ส่วนการตายเกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 36 และทยอยตายจนกระทั่งอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 72 และ 60 หลังจากการฉีดเชื้อ (ภาพที่ 40) เมื่อสุ่มกุ้งที่ใกล้ตายไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay ปรากฏว่าให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อ WSSV (ตารางที่ 5) ในขณะที่กุ้งในกลุ่มที่ฉีดเชื้อแล้วเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 12 ชั่วโมง ก่อนเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส ไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น (ภาพที่ 40) เมื่อสุ่มกุ้งที่รอดชีวิตไปตรวจการติดเชื้อ WSSV พบว่า กุ้งตัวอย่างให้ผลเป็นบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี nested-PCR ส่วนการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay ให้ผลเป็นลบ คือ ไม่พบการติดเชื้อ WSSV ในเนื้อเยื่อกุ้งตัวอย่าง (ตารางที่ 5) หลังจากนั้นในวันที่ 4 ของการทดลองจึงทำการปรับลดอุณหภูมิของน้ำทั้งสองกลุ่มนี้ให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส พบว่า กุ้งที่รอดชีวิตของทั้งสองกลุ่มนี้ เริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 24 และเริ่มทยอยตายในชั่วโมงที่ 36 จนกระทั่งกุ้งทั้งหมดตายในชั่วโมงที่ 60 หลังจากการปรับลดอุณหภูมิ กุ้งที่ใกล้ตายให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อ WSSV เมื่อสุ่มตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay

ส่วนการทดลองที่เลี้ยงกุ้งปกติในน้ำที่มีเชื้อ WSSV โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง สังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 12 ชั่วโมง พบว่า กุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และกุ้งในกลุ่มควบคุม เริ่มแสดงอาการของโรคในชั่วโมงที่ 24, 36 และ 36 ตามลำดับ และการตายเริ่มเกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 36, 48 และ 48 ตามลำดับ หลังจากนั้นกุ้งทยอยตายจนอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 156, 120 และ 168 หลังจากเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ ตามลำดับ (ภาพที่ 41) เมื่อสุ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กุ้งที่ใกล้ตายไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay พบว่าให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อ WSSV (ตารางที่ 5) ส่วนกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 12 ชั่วโมง ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส ไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น (ภาพที่ 41) เมื่อสุ่มกุ้งที่รอดชีวิตของทั้งสองกลุ่มนี้ไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay พบว่า กุ้งตัวอย่างในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 ชั่วโมง ก่อนที่จะปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส ให้ผลเป็นลบกับทุกวิธีที่ใช้ตรวจ (ตารางที่ 5) ส่วนกุ้งตัวอย่างในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนที่จะปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส ให้ผลเป็นบวกต่อการตรวจด้วยวิธี nested-PCR แต่ให้ผลเป็นลบต่อการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay (ตารางที่ 5) หลังจากนั้นในวันที่ 8 ของการทดลองจึงปรับลดอุณหภูมิของน้ำทั้งสองกลุ่มนี้ให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส พบว่า กุ้งที่รอดชีวิตในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 ชั่วโมง ไม่มีอาการป่วย ไม่มีการตายเกิดขึ้นและให้ผลเป็นลบต่อเชื้อ WSSV เมื่อตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay ในขณะที่กุ้งที่รอดชีวิตในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 36 และเริ่มตายในชั่วโมงที่ 48 หลังจากการปรับลดอุณหภูมิจนกระทั่งกุ้งทั้งหมดตายในชั่วโมงที่ 156 หลังจากการปรับลดอุณหภูมิ เมื่อสุ่มกุ้งที่ใกล้ตายไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อ WSSV

โดยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งป่วยพบความผิดปกติบริเวณเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร เหงือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อวัยวะสร้างเม็ดเลือด antennal gland และอวัยวะต่อมน้ำเหลือง (ภาพที่ 42) ส่วนการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP28 ของเชื้อ WSSV พบการติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร เหงือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อวัยวะสร้างเม็ดเลือด antennal gland และอวัยวะต่อมน้ำเหลือง (ภาพที่ 43) เช่นเดียวกันกับการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าหลังจากกุ้งได้รับเชื้อ WSSV (โดยการให้กินกุ้งที่ติดเชื้อ การฉีดด้วยเชื้อและการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV) แล้วเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนปรับเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส สามารถทำให้เกิดผลลัพธ์ได้ 2 แบบ ที่ตรงกันข้ามกันขึ้นอยู่กับระยะของการติดเชื้อ คือ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของน้ำจาก 28-29 องศาเซลเซียส เป็น 32-33 องศาเซลเซียสในระยะแรกของการติดเชื้อ (ภายใน 12 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ WSSV) หรือก่อนที่กุ้งจะแสดงอาการป่วย จะสามารถหยุดการจำลองตัวเองของไวรัสได้ ส่งผลให้กุ้งที่ติดเชื้อในระยะนี้ไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น ส่วนการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำจาก 28-29 องศาเซลเซียส เป็น 32-33 องศาเซลเซียส ในระยะหลังการติดเชื้อ (มากกว่า 12 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับเชื้อ WSSV) หรือกุ้งเริ่มแสดงอาการป่วยจะเป็นการเร่งให้เกิดโรคและการตายให้เร็วขึ้น การเพิ่มอุณหภูมิของน้ำจาก 28-29 องศาเซลเซียส เป็น 32-33 องศาเซลเซียส ไม่สามารถลดอัตราการตายในกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป เนื่องจากหลังจากการติดเชื้อ WSSV 24 ชั่วโมง เชื้อไวรัสจะเริ่มเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดในร่างกายของกุ้ง (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2007) และทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ จนไม่สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้อีก ส่วนกลไกที่เร่งหรือทำให้เกิดการตายเร็วขึ้นของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจาก 28-29 องศาเซลเซียส เป็น 32-33 องศาเซลเซียส ในกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV อาจเกิดขึ้นจากกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ในน้ำอุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานจนไวรัสเริ่มทำอันตรายต่อระบบต่าง ๆ หลังจากเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น32-33 องศาเซลเซียส กุ้งจะมีเมแทบอลิซึมสูงขึ้น ซึ่งมีความต้องการออกซิเจนมากขึ้น (Allan *et al*., 2006; Tian *et al*., 2004) ในขณะที่อุณหภูมิของน้ำที่สูงขึ้นจะทำให้การละลายของออกซิเจนในน้ำจะลดลง ประกอบกับเนื้อเยื่อในส่วนเหงือกของกุ้งที่ติดเชื้อถูกทำลายโดยไวรัส ทำให้การแลกเปลี่ยนออกซิเจนมีประสิทธิภาพลดลง ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอและเป็นสาเหตุหนึ่งของการตายที่เร็วขึ้นของกุ้งในกลุ่มนี้ ซึ่งจากข้อมูลจึงพอสรุปได้ว่าการจำลองตัวเองของเชื้อ WSSV จะอยู่ในช่วงระหว่าง 12-24 ชั่วโมงหลังจากเข้าไปในตัวกุ้ง

นอกจากผลของการศึกษาที่พบว่าอุณหภูมิของน้ำที่ 32-33 องศาเซลเซียส สามารถป้องกันการเกิดโรคดวงขาวในกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV ได้ แต่ต้องเป็นระยะแรก ๆ ของการติดเชื้อ WSSV เท่านั้นแล้ว การศึกษานี้ยังพบว่าเมื่อปรับลดอุณหภูมิของน้ำลงเป็น 28-29 องศาเซลเซียส อีกครั้งหนึ่ง กุ้งทั้ง 3 ชุดการทดลองจะแสดงอาการของโรคและทยอยตายจนหมดภายใน 3-7 วัน หลังจากการปรับลดอุณหภูมิ ยกเว้นกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส แล้วปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส ทันทีจะไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น ผลการตรวจการติดเชื้อ WSSV ให้ผลเป็นลบกับทุกวิธีที่ใช้ตรวจแสดงให้เห็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ว่ากุ้งที่ติดเชื้อ WSSV สามารถกำจัดเชื้อออกจากร่างกายได้ เมื่อระยะเวลาผ่านไประยะเวลาหนึ่ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนของไวรัสที่ได้รับ แต่จากการทดลองนี้ยังไม่ทราบระยะเวลาที่แน่ชัดในการกำจัดเชื้อ WSSV ออกจากร่างกายของกุ้งเช่นเดียวกับหัวข้อที่ผ่านมา

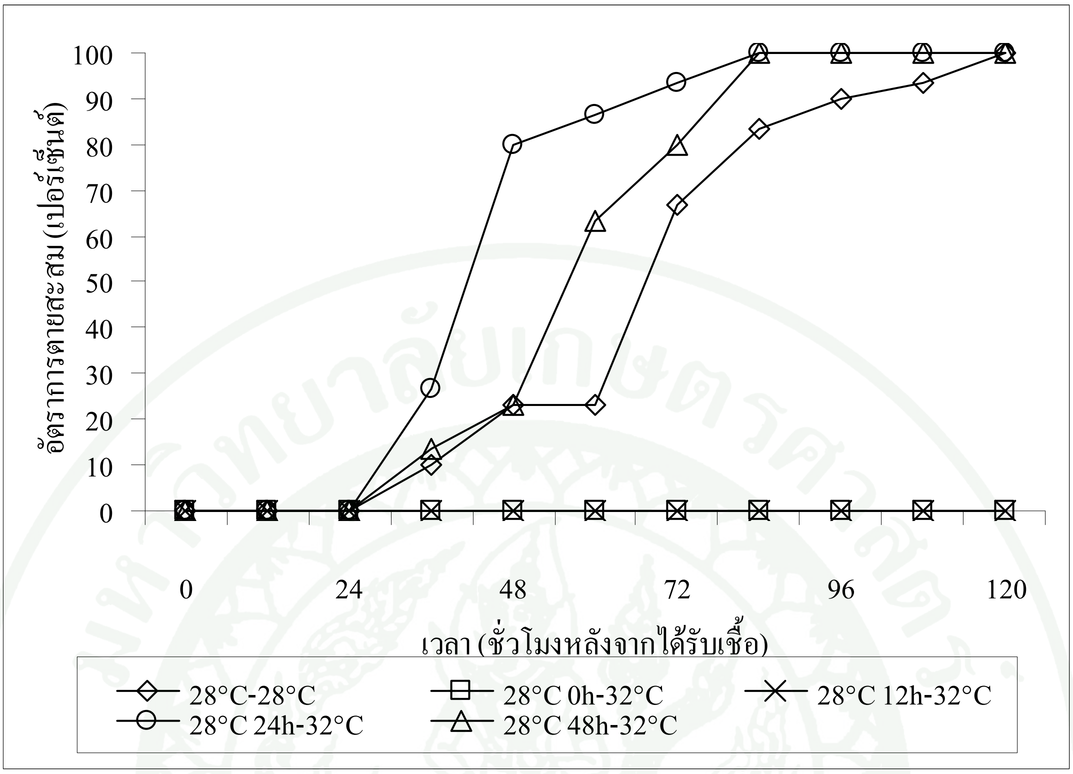
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ติดเชื้อ WSSV ที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ ก่อนเพิ่มอุณหภูมิเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) วิธี immunohistochemistry (IHC) และ bioassay

อุณหภูมิน้ำ	วิธีตรวจเชื้อ WSSV (ตัวอย่างที่ติดเชื้อ WSSV / ตัวอย่างทั้งหมด)			
	Nested-PCR	Histopathology	IHC	Bioassay
กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV				
28°C 0h-32°C	10/10	0/10	0/10	NM
28°C 12h-32°C	10/10	0/10	0/10	NM
28°C 24h-32°C	10/10	10/10	10/10	M
28°C 48h-32°C	10/10	10/10	10/10	M
28°C-28°C	10/10	10/10	10/10	M
กุ้งปกติฉีดเชื้อ WSSV				
28°C 0h-32°C	10/10	0/10	0/10	NM
28°C 12h-32°C	10/10	0/10	0/10	NM
28°C 24h-32°C	10/10	10/10	10/10	M
28°C-28°C	10/10	10/10	10/10	M
กุ้งปกติแช่เชื้อ WSSV				
28°C 0h-32°C	0/10	0/10	0/10	NM
28°C 12h-32°C	10/10	0/10	0/10	NM
28°C 24h-32°C	10/10	10/10	10/10	M
28°C 48h-32°C	10/10	10/10	10/10	M
28°C-28°C	10/10	10/10	10/10	M

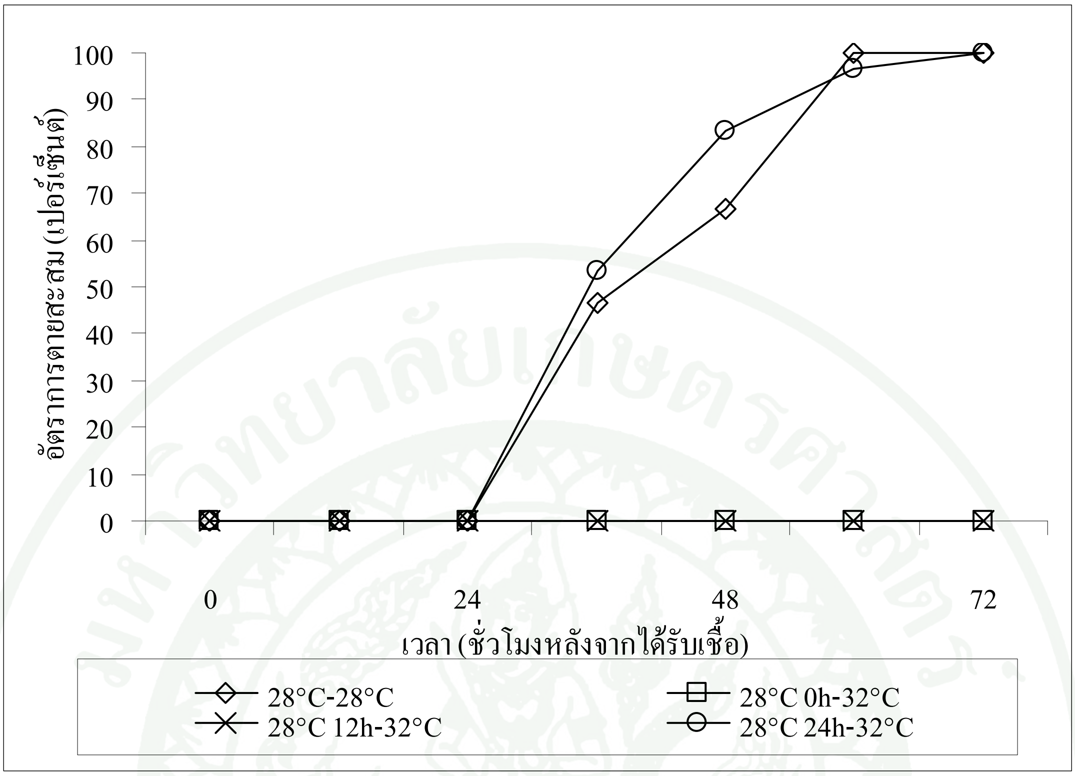
หมายเหตุ M หมายถึง mortality และ NM หมายถึง no mortality

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



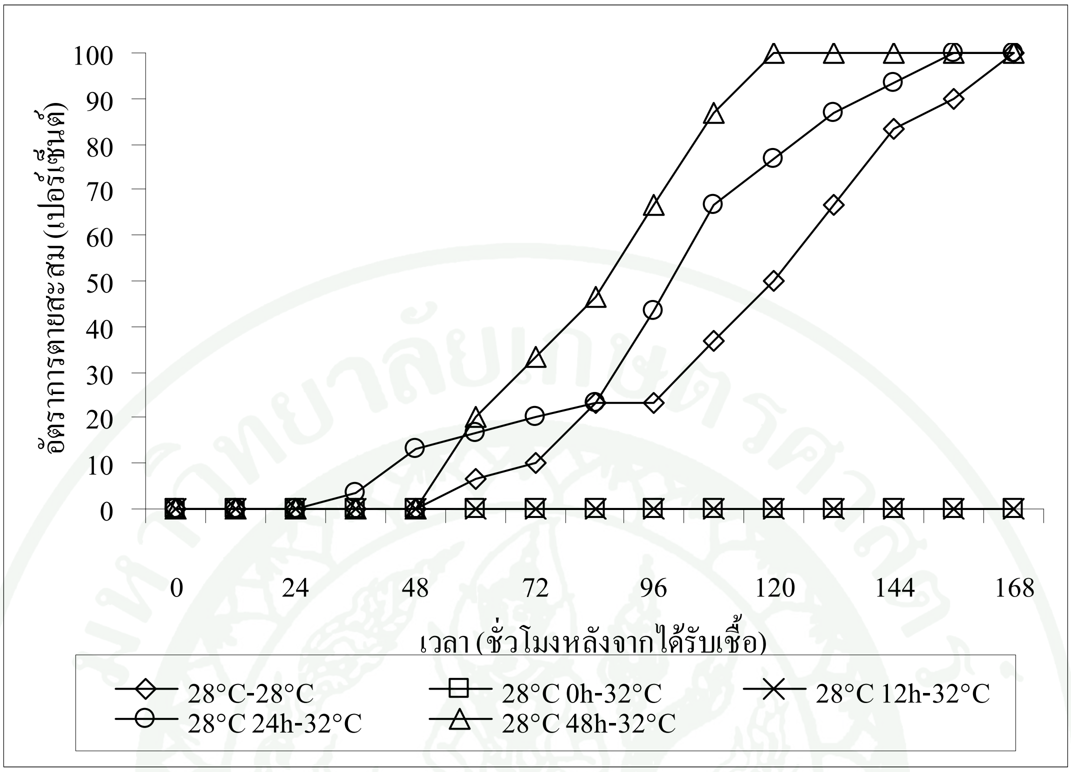
ภาพที่ 39 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (28°C 0h-32°C), 12 (28°C 12h-32°C), 24 (28°C 24h-32°C) และ 48 ชั่วโมง (28°C 48h-32°C) ก่อนปรับเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (28°C-28°C)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



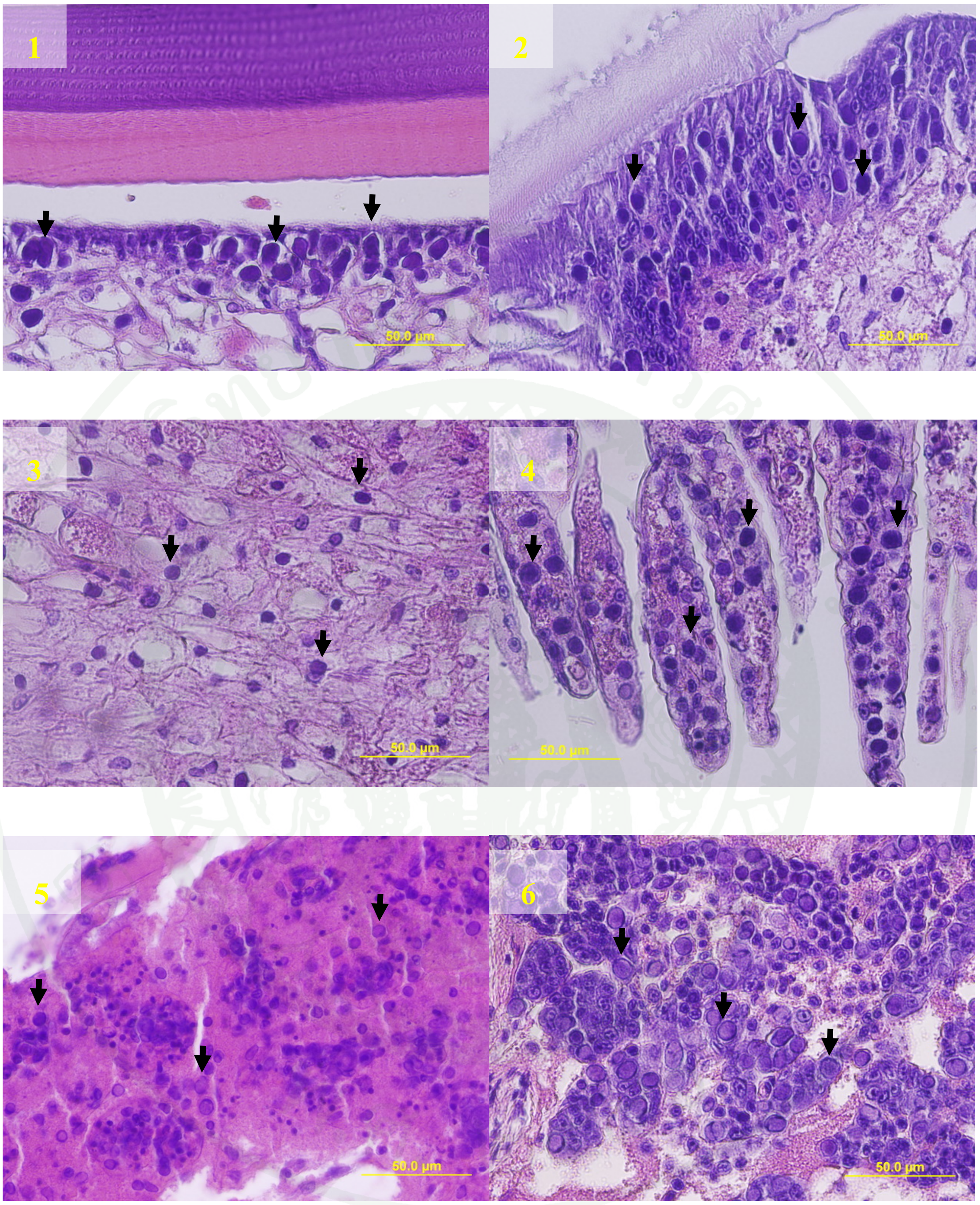
ภาพที่ 40 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ฉีดเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (28°C 0h-32°C), 12 (28°C 12h-32°C) และ 24 ชั่วโมง (28°C 24h-32°C) ก่อนปรับเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และ กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (28°C-28°C)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



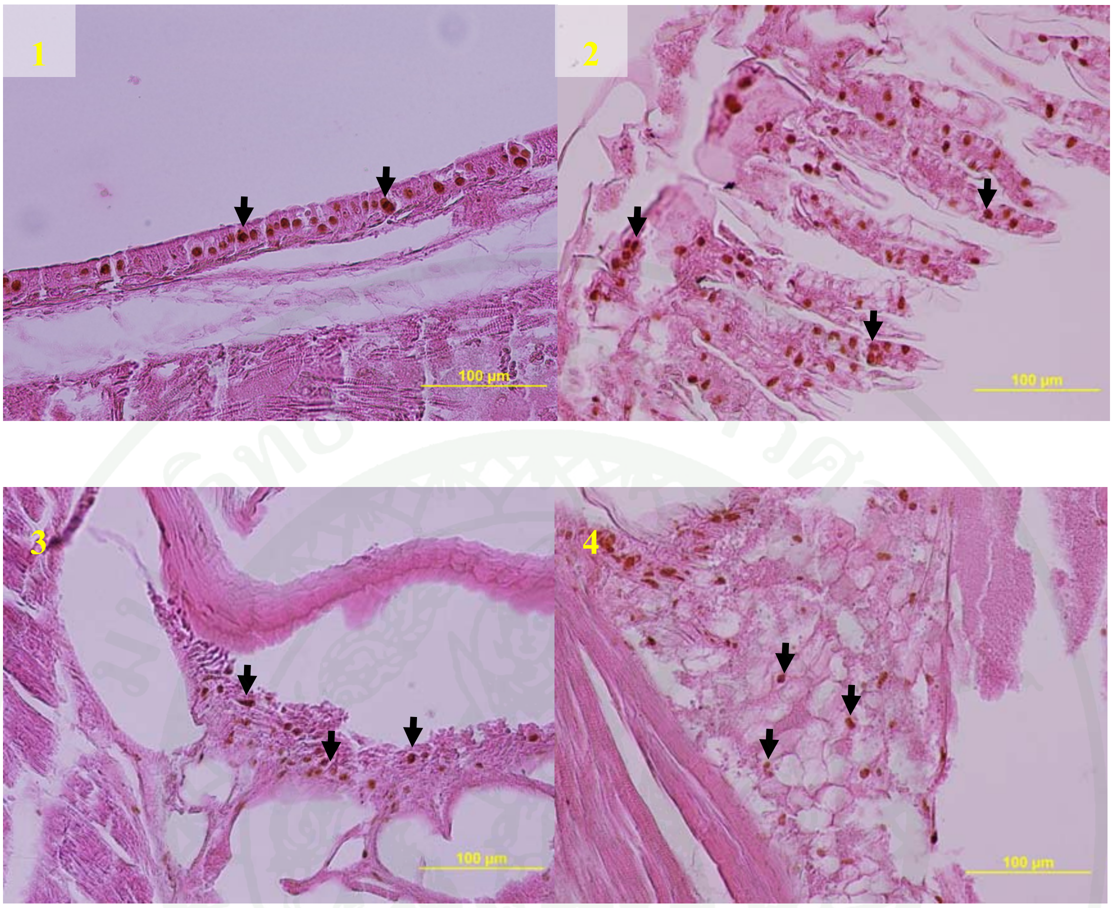
ภาพที่ 41 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (28°C 0h-32°C), 12 (28°C 12h-32°C), 24 (28°C 24h-32°C) และ 48 ชั่วโมง (28°C 48h-32°C) ก่อนเพิ่มปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (28°C-28°C)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 42 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ WSSV ในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนปรับเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส พบ hypertrophied nuclei และ inclusion bodies (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (2) เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร (3) เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (4) เหงือก (5) อวัยวะต่อมน้ำเหลืองและ (6) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (H&E, bar = 50 µm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 43 การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry พบเซลล์ที่ติดเชื้อ WSSV ติดสีน้ำตาลเข้ม (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (2) เหงือก (3) เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร และ (4) เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ WSSV ในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนปรับเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส (bar = 100 μm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การศึกษาผลของการลดอุณหภูมิของน้ำจาก 32-33 องศาเซลเซียส เป็น 28-29 องศาเซลเซียส ต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

ผลจากการทดลองที่ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ก่อนลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง สังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 16 วัน พบว่า กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อแล้วเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส เริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 24, 60, 132 และ 216 ตามลำดับ หลังจากนั้นเริ่มสังเกตเห็นการตายได้ในชั่วโมงที่ 36, 72, 144 และ 228 ตามลำดับ และทยอยตายจนอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 120, 156, 252 และ 372 หลังจากกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ตามลำดับ (ภาพที่ 44) เมื่อสุ่มกุ้งที่ใกล้ตายไปตรวจการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay พบว่าให้ผลเป็นบวก (ตารางที่ 6) ส่วนกุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อแล้วเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกุ้งในกลุ่มควบคุมไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น (ภาพที่ 44) เมื่อสุ่มกุ้งที่รอดชีวิตไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay พบว่าให้ผลเป็นลบ (ตารางที่ 6)

ในการทดลองการฉีดเชื้อ WSSV เข้าไปในตัวกุ้งปกติและเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 และ 14 วัน ก่อนลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง สังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 19 วัน พบว่า กุ้งที่ฉีดเชื้อแล้วเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส เริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 24, 48, 108, 180, 252, 324 และ 396 ตามลำดับ เริ่มสังเกตเห็นการตายในชั่วโมงที่ 36, 60, 120, 192, 264, 336 และ 408 และทยอยตายจนกระทั่งอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 60, 84, 144, 216, 288, 360 และ 444 หลังจากการฉีดเชื้อ ตามลำดับ (ภาพที่ 45) เมื่อสุ่มกุ้งที่ใกล้ตายไปตรวจการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay พบว่าให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อ WSSV (ตารางที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6) ในขณะที่กุ้งที่ฉีดเชื้อแล้วเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกุ้งในกลุ่มควบคุมไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น (ภาพที่ 45) เมื่อสุ่มกุ้งที่รอดชีวิตไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay พบว่าให้ผลเป็นลบต่อเชื้อ WSSV (ตารางที่ 6)

ส่วนการทดลองที่เลี้ยงกุ้งปกติในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ก่อนลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง สังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน พบว่า กุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส เริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 48, 72, 120 และ 168 ตามลำดับ และเริ่มตายในชั่วโมงที่ 60, 84, 144 และ 192 ตามลำดับ หลังจากนั้นกุ้งทยอยตายจนอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 168, 192, 252 และ 300 หลังจากเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ ตามลำดับ (ภาพที่ 46) เมื่อสุ่มกุ้งที่ใกล้ตายไปตรวจด้วย nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay พบว่า ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อ WSSV (ตารางที่ 6) ในขณะที่กุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกุ้งในกลุ่มควบคุมไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น (ภาพที่ 45) กุ้งที่รอดชีวิตให้ผลเป็นลบต่อเชื้อ WSSV เมื่อสุ่มตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay (ตารางที่ 6) และผลการทดลองในลูกกุ้งขาวระยะ PL_{15} ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ก่อนลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง สังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ลูกกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน ก่อนที่จะปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส เริ่มตายในชั่วโมงที่ 96, 108, 156 และ 216 ตามลำดับ หลังจากนั้นลูกกุ้งทยอยตายจนอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 144, 156, 216 และ 264 หลังจากเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ ตามลำดับ (ภาพที่ 47) เมื่อสุ่มลูกกุ้งที่ใกล้ตายไปตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

bioassay พบว่า ให้ผลเป็นบวก (ตารางที่ 6) ในขณะที่ลูกกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และลูกกุ้งในกลุ่มควบคุมไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น (ภาพที่ 47) ลูกกุ้งที่รอดตายให้ผลเป็นลบต่อการติดเชื้อ WSSV เมื่อสุ่มไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ วิธี immunohistochemistry และ bioassay (ตารางที่ 6)

ในส่วนของการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งป่วยพบความผิดปกติบริเวณเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร เหงือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อวัยวะสร้างเม็ดเลือด antennal gland และอวัยวะต่อมน้ำเหลือง (ภาพที่ 48) ส่วนการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP28 ของเชื้อ WSSV พบการติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร เหงือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อวัยวะสร้างเม็ดเลือด antennal gland และอวัยวะต่อมน้ำเหลือง (ภาพที่ 49) เช่นเดียวกันกับการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากุ้งในกลุ่มที่ควบคุมอุณหภูมิน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน หลังจากได้รับเชื้อ WSSV โดยการกินกุ้งที่ติดเชื้อและการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และกุ้งในกลุ่มที่ควบคุมอุณหภูมิน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน หลังจากได้รับเชื้อ WSSV โดยการฉีดเชื้อ ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส มีอาการป่วยและอัตราการตายที่ช้าลงสอดคล้องกับการศึกษาของ Vidal *et al.* (2001) และ Rahman *et al.* (2006) อย่างไรก็ตามหลังจากการปรับลดอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส กุ้งทั้งหมดของกลุ่มเหล่านี้จะตายภายใน 7 วัน มีเพียงกุ้งในกลุ่มที่ควบคุมอุณหภูมิน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากได้รับเชื้อ WSSV โดยการกินกุ้งที่ติดเชื้อและการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV แต่กุ้งที่ได้รับเชื้อ WSSV โดยการฉีดเชื้อ WSSV จะต้องควบคุมอุณหภูมิน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานถึง 14 วัน ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส จะไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้นเหมือนกับกุ้งในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลองและเมื่อสุ่มไปตรวจการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและวิธี bioassay พบว่า ให้ผลเป็นลบต่อการติดเชื้อ WSSV นอกจากนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP28 (ซึ่งเป็นโปรตีนของ envelope) ของ WSSV เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสนั้นให้ผลเป็นลบ แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่สูงสามารถยับยั้งการแสดงออกของ VP28 ในตัวกุ้งได้อย่างสมบูรณ์ คือ ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน VP28 ในเซลล์ของกุ้งที่ได้รับเชื้อ WSSV เช่นเดียวกันกับการรายงานของ Rahman *et al.* (2006) ที่รายงานว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุณหภูมิที่สูงอาจมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในระยะแรกของการจำลองตัวเองของไวรัส และการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ศึกษา temperature-sensitive (ts) mutant baculovirus นั้นแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงใน protein kinase-1 (Fan *et al*., 2006) หรือใน putative RNA polymerase (Shikata *et al*., 1998) มีผลทำให้ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนของไวรัสที่เกิดในระยะหลังของการจำลองตัวเอง เช่น โปรตีนของ envelope ในอุณหภูมิของน้ำที่สูง อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานว่าเอนไซม์ใดที่ถูกทำให้เสียหายโดยอุณหภูมิของน้ำที่สูงอาจจะเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการจำลองตัวของไวรัส เช่น DNA polymerase (van Hulten *et al*., 2001a; Yang *et al*., 2001; Chen *et al*., 2002) หรือ protein kinase (van Hulten and Vlak, 2001) นอกจากนั้นยังมีทฤษฎีอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิของน้ำที่สูงอาจจะเปลี่ยนการแสดงออกของยีน (Reyes *et al*., 2007) หรือสามารถชักนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ได้ (Granja *et al*., 2003)

จากการที่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวแวนนาไมจำนวนมากมักจะประสบปัญหาโรคดวงขาวเกิดขึ้นและทำความเสียหายมากในฤดูหนาวช่วงปลายปีจนถึงต้นปีในพื้นที่การเลี้ยงทางภาคกลางและภาคตะวันออกหรือฤดูมรสุมที่มีฝนตกติดต่อกันนาน ๆ ทางภาคใต้ทำให้อุณหภูมิของน้ำต่ำกว่าช่วงเวลาการเลี้ยงในช่วงอื่น ๆ โดยกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV นั้นเป็นกุ้งที่มีอายุเพียง 30 วัน ทั้ง ๆ ที่ก่อนการปล่อยลูกกุ้งได้มีการตรวจด้วยวิธี PCR แล้วว่าไม่พบเชื้อ WSSV และมีระบบการป้องกันโรคภายในฟาร์มอย่างเต็มที่แล้วก็ตาม ซึ่งตามปกติในระยะเวลา 60 วันหลังจากปล่อยลูกกุ้งไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ดังนั้นสาเหตุของการติดเชื้อน่าจะเกิดจากการที่ลูกกุ้งมีการปนเปื้อนของเชื้อ WSSV จากโรงเพาะฟักแต่เนื่องจากลูกกุ้งที่อยู่ในโรงเพาะฟักที่มีอุณหภูมิของน้ำสูง ทำให้ลูกกุ้งบางส่วนที่ติดเชื้อ ซึ่งอาจจะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยจึงไม่แสดงอาการป่วยและตายในโรงเพาะฟักรวมถึงตัวอย่างลูกกุ้งที่นำมาตรวจด้วยวิธี PCR มีจำนวนไม่มากพอที่จะเป็นตัวแทนที่ดีของลูกกุ้งทั้งหมดที่เกษตรกรนำไปเลี้ยงในแต่ละบ่อนั้น เมื่อเกษตรกรนำลูกกุ้งเหล่านี้ลงเลี้ยงในบ่อซึ่งมีอุณหภูมิของน้ำต่ำติดต่อกันนานหลายวัน ทำให้เกิดการพัฒนาของไวรัส จนกระทั่งกุ้งแสดงอาการของโรคและตายหมดบ่อ ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างมากในแต่ละปี การแก้ปัญหาในเรื่องของอุณหภูมิของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งเป็นเรื่องที่เป็นไปได้ยาก

จากการทดลองครั้งนี้ เมื่อต้องการนำไปใช้ในทางปฏิบัติเพื่อให้เกิดประโยชน์ได้อย่างเป็นรูปธรรมในการลดหรือป้องกันปัญหาจากโรคดวงขาว คือ ต้องกำจัดเชื้อไวรัสไม่ให้ปนเปื้อนไปยังลูกกุ้งได้ โดยในช่วงที่อนุบาลลูกกุ้งในโรงเพาะฟักควรจะควบคุมอุณหภูมิของน้ำในบ่ออนุบาลให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส ต่อเนื่องกันอย่างน้อย 7 วันสุดท้ายก่อนที่จะนำลูกกุ้งไปเลี้ยงในบ่อ ซึ่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลูกกุ้งบางส่วนที่มีการปนเปื้อนเชื้อ WSSV มาจากแม่พันธุ์กุ้ง เมื่ออนุบาลที่อุณหภูมิระดับนี้ ไวรัสจะถูกกำจัดออกไปและไม่สามารถทำอันตรายต่อลูกกุ้ง จากนั้นเมื่อนำลูกกุ้งไปเลี้ยงในระบบที่มีการป้องกันโรคอย่างดี โรคไวรัสนี้ก็ไม่น่าจะเกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงและจากผลการทดลองนี้คาดหวังว่าถ้าโรงเพาะฟักหาทางเพิ่มอุณหภูมิของน้ำในการอนุบาลลูกกุ้งให้อยู่ในระดับที่แนะนำนี้ในช่วง 7 วัน สุดท้ายก่อนจำหน่ายลูกกุ้งให้แก่เกษตรกร โอกาสที่จะลดปัญหาจากโรคดวงขาวในบ่อเลี้ยงก็จะสูงมาก การเลี้ยงกุ้งขาวจะประสบความสำเร็จมากขึ้น ซึ่งจะทำให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยสามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้อย่างมั่นคงและยั่งยืนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV ที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ ก่อนลดอุณหภูมิเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) วิธี immunohistochemistry (IHC) และ bioassay

อุณหภูมิน้ำ	วิธีตรวจเชื้อ WSSV (ตัวอย่างที่ติดเชื้อ WSSV / ตัวอย่างทั้งหมด)			
	Nested-PCR	Histopathology	IHC	Bioassay
กุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV				
32°C 0d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 1d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 3d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 5d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 7d-28°C	0/10	0/10	0/10	NM
32°C-32°C	0/10	0/10	0/10	NM
กุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ฉีดเชื้อ WSSV				
32°C 0d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 1d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 3d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 5d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 7d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 9d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 11d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 14d-28°C	0/10	0/10	0/10	NM
32°C-32°C	0/10	0/10	0/10	NM

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

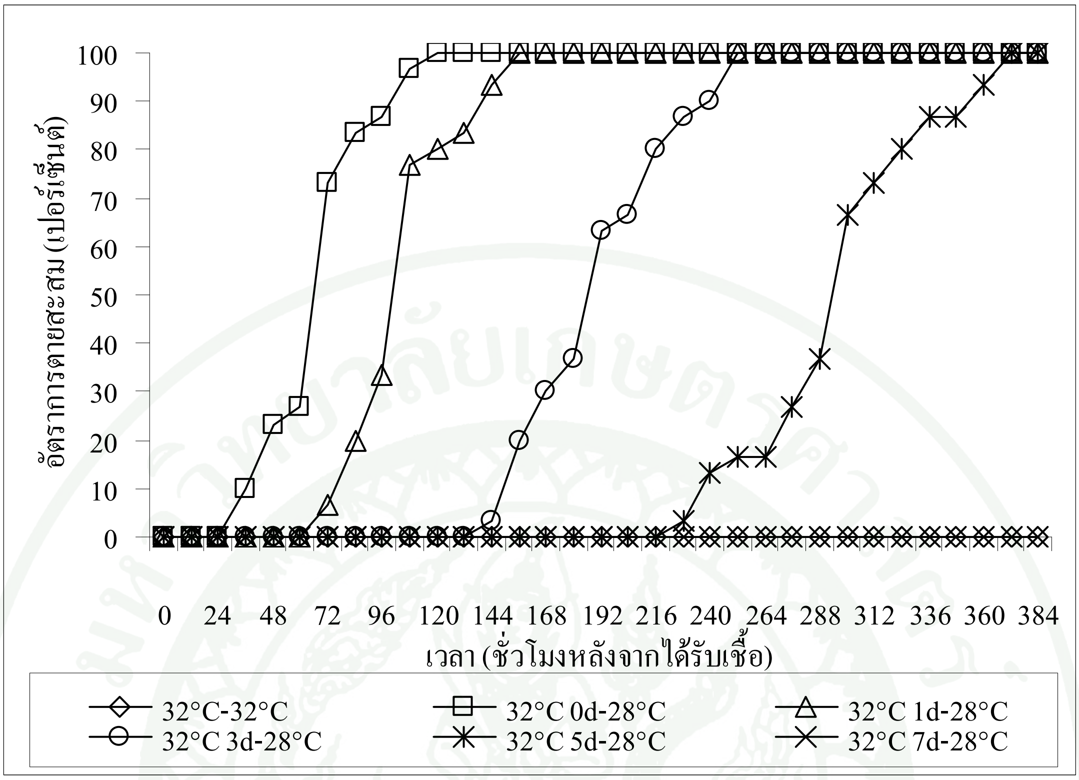
ตารางที่ 6 (ต่อ)

อุณหภูมิน้ำ	วิธีตรวจเชื้อ WSSV (ตัวอย่างที่ติดเชื้อ WSSV / ตัวอย่างทั้งหมด)			
	Nested-PCR	Histopathology	IHC	Bioassay
กุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม แช่เชื้อ WSSV				
32°C 0d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 1d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 3d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 5d-28°C	10/10	10/10	10/10	M
32°C 7d-28°C	0/10	0/10	0/10	NM
32°C-32°C	0/10	0/10	0/10	NM
ลูกกุ้งขาวระยะ PL_{15} แช่เชื้อ WSSV				
32°C 0d-28°C	30/30*	30/30	30/30	M
32°C 1d-28°C	30/30*	30/30	30/30	M
32°C 3d-28°C	30/30*	30/30	30/30	M
32°C 5d-28°C	30/30*	30/30	30/30	M
32°C 7d-28°C	0/30*	0/30	0/30	NM
32°C-32°C	0/30*	0/30	0/30	NM

หมายเหตุ M หมายถึง mortality และ NM หมายถึง no mortality

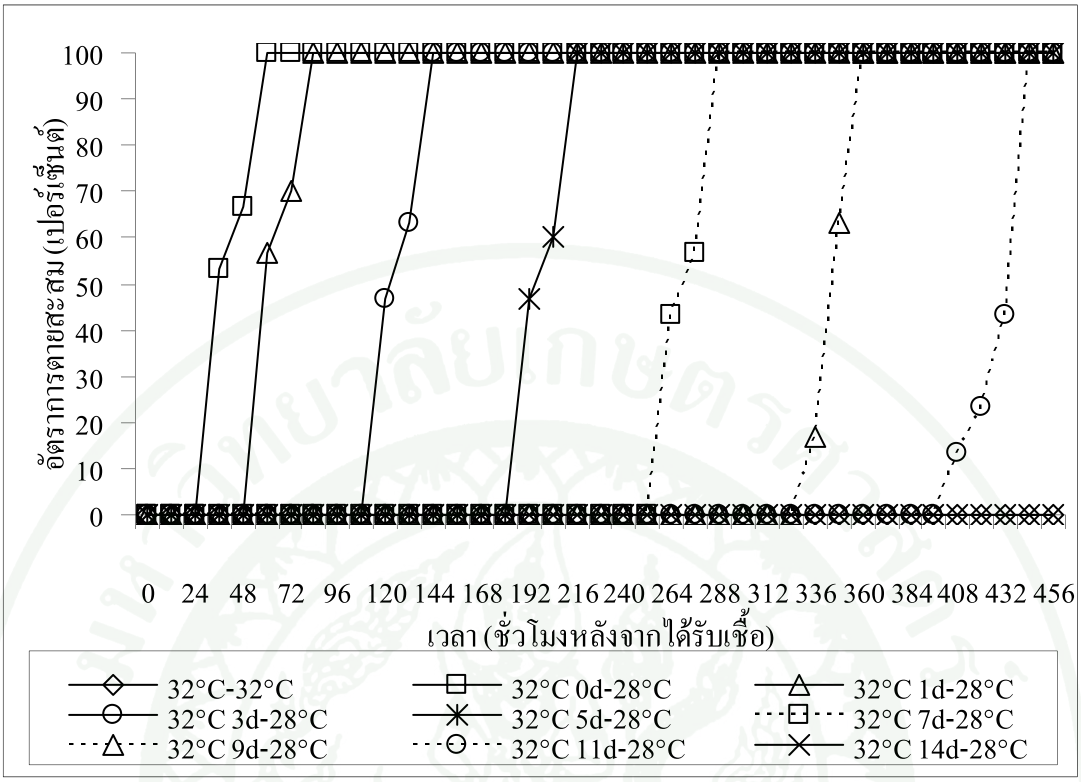
*ตัวอย่างลูกกุ้งขาวระยะ PL_{15} จำนวน 30 ตัว จะถูกบดรวมกันแล้วนำไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



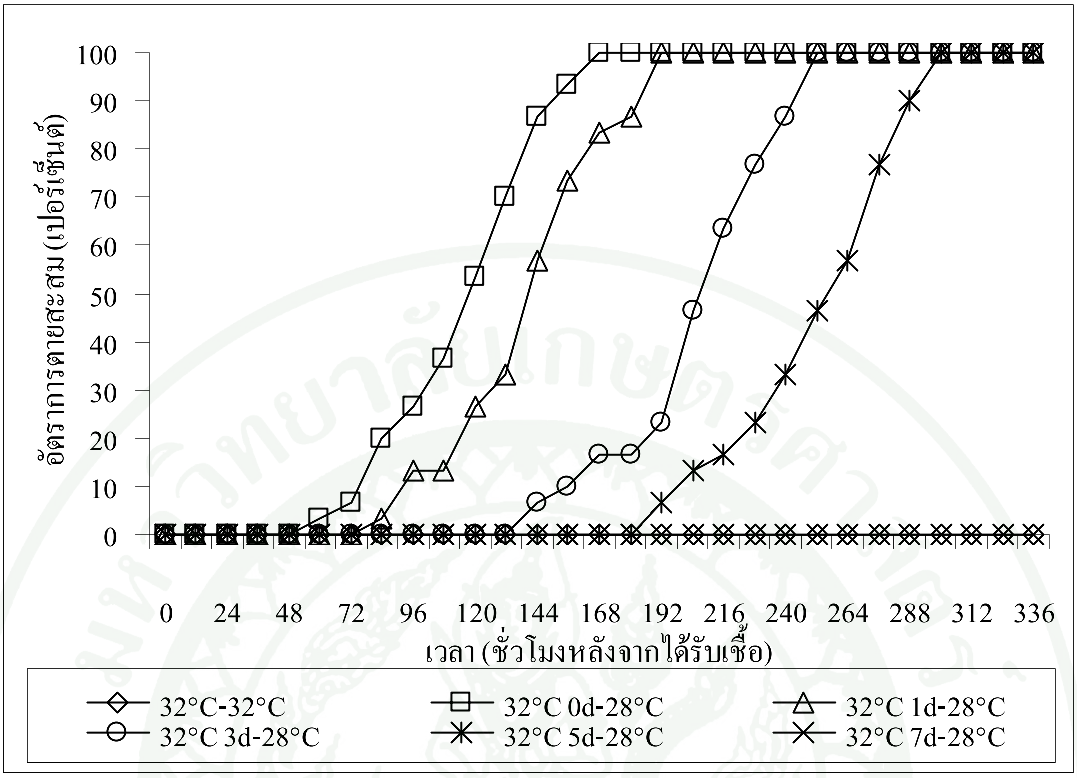
ภาพที่ 44 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (32°C 0d-28°C), 1 (32°C 1d-28°C), 3 (32°C 3d-28°C), 5 (32°C 5d-28°C) และ 7 วัน (32°C 7d-28°C) ก่อนปรับลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (32°C-32°C)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



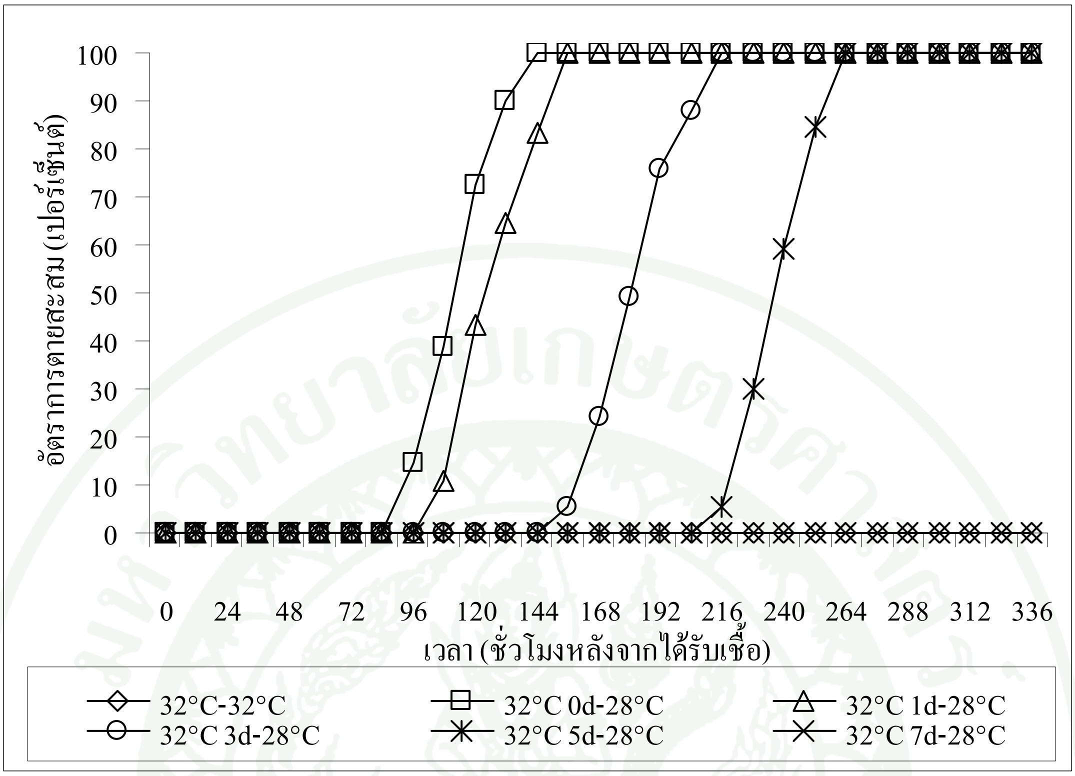
ภาพที่ 45 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ฉีดเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (32°C 0d-28°C), 1 (32°C 1d-28°C), 3 (32°C 3d-28°C), 5 (32°C 5d-28°C), 7 (32°C 7d-28°C), 9 (32°C 9d-28°C), 11 (32°C 11d-28°C) และ 14 วัน (32°C 14d-28°C) ก่อนปรับลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (32°C-32°C)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



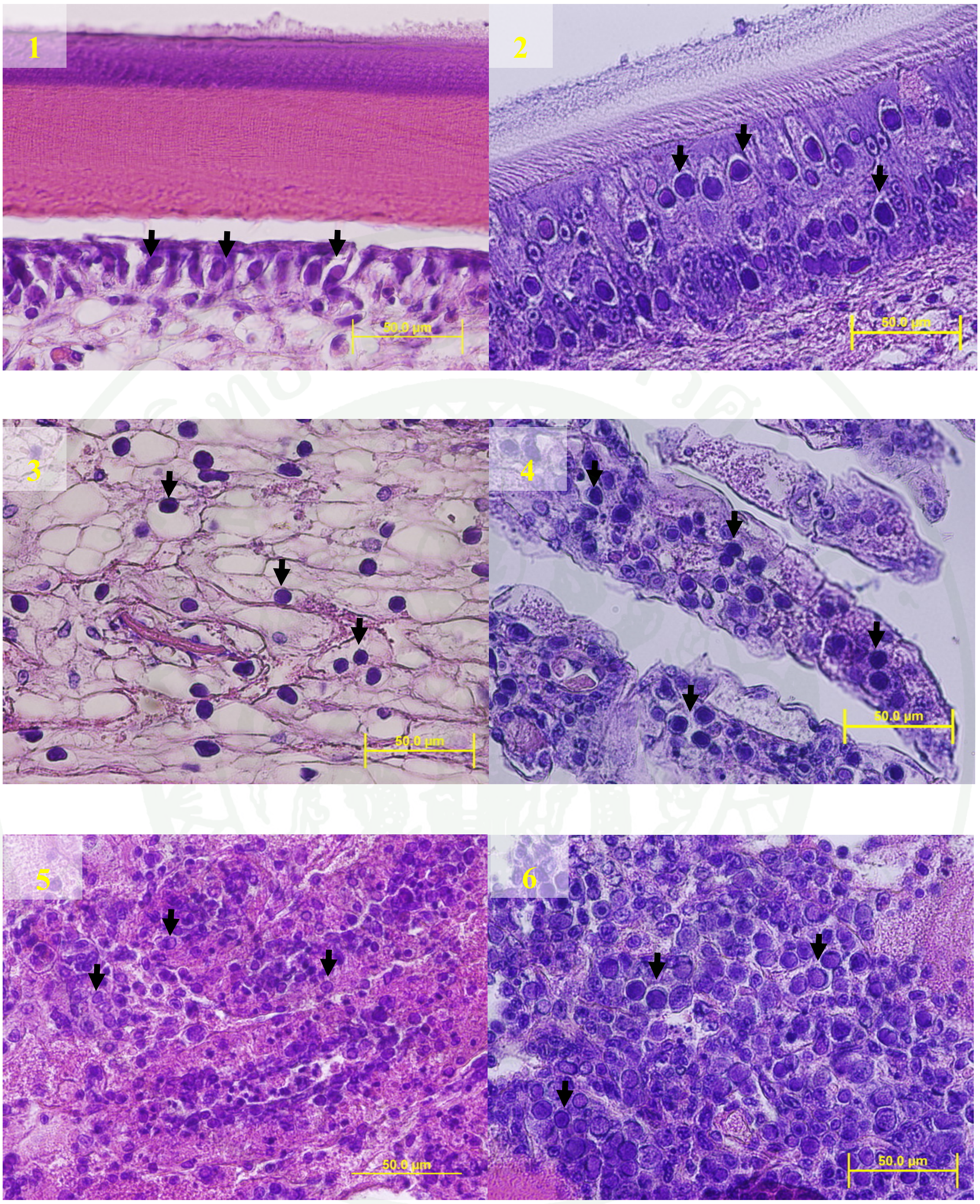
ภาพที่ 46 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (32°C 0d-28°C), 1 (32°C 1d-28°C), 3 (32°C 3d-28°C), 5 (32°C 5d-28°C) และ 7 วัน (32°C 7d-28°C) ก่อนปรับลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (32°C-32°C)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



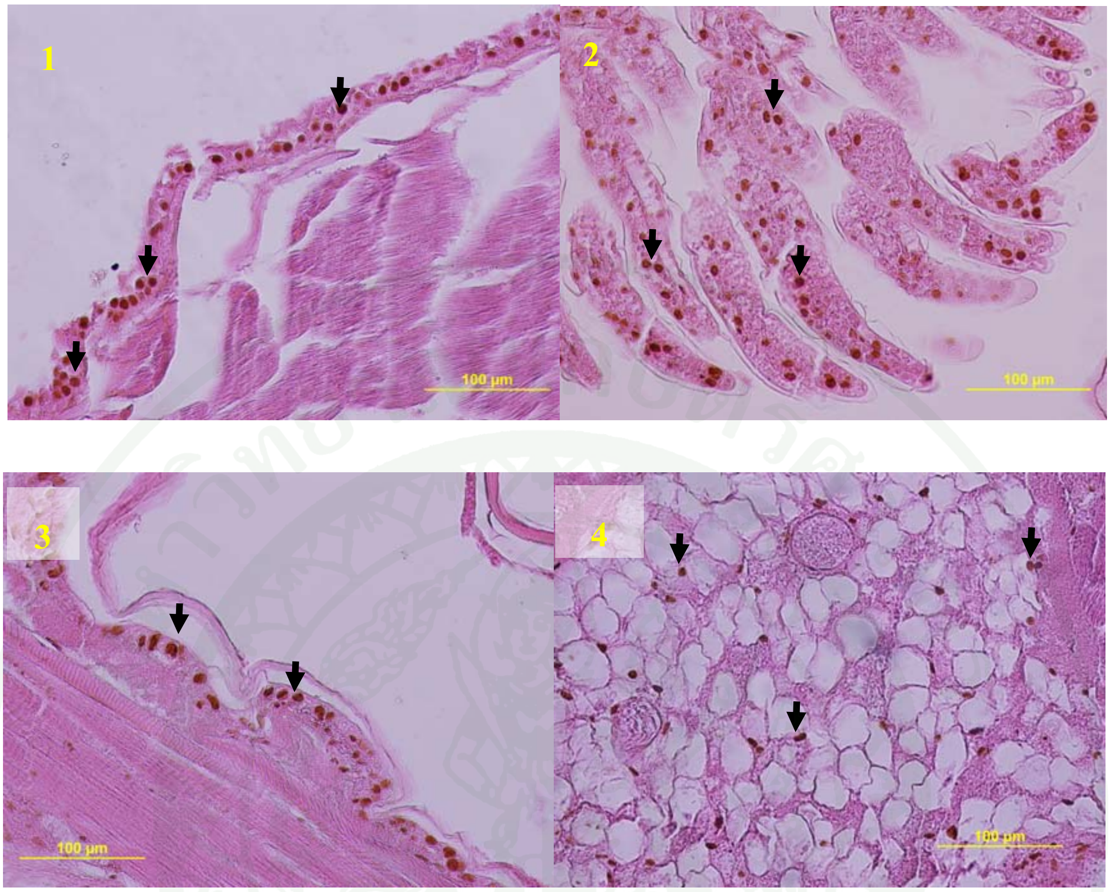
ภาพที่ 47 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 15 ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (32°C 0d-28°C), 1 (32°C 1d-28°C), 3 (32°C 3d-28°C), 5 (32°C 5d-28°C) และ 7 วัน (32°C 7d-28°C) ก่อนปรับลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง (32°C-32°C)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 48 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน ก่อนปรับลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส พบ hypertrophied nuclei และ inclusion bodies (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (2) เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร (3) เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (4) เหงือก (5) อวัยวะต่อมน้ำเหลืองและ (6) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (H&E, bar = 50 µm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 49 การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry พบเซลล์ที่ติดเชื้อ WSSV ติดสีน้ำตาลเข้ม (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (2) เหงือก (3) เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร และ (4) เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน ก่อนปรับลดอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส (bar = 100 µm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส ต่อการทำให้เชื้อ WSSV หมดไปในกุ้งขาวแวนนาไม

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส ต่อการทำให้เชื้อ WSSV หมดไปในกุ้งขาวที่ติดเชื้อ โดยการให้กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV การฉีดเชื้อ WSSV และการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV แล้วสุ่มกุ้งในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14 และ 21 หลังจากได้รับเชื้อ WSSV ศึกษาการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและวิธี immunohistochemistry ผลการศึกษาแสดงไว้ในตารางที่ 7-9 พบว่า กุ้งในกลุ่มควบคุม คือ ที่อุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส เริ่มแสดงอาการป่วยและเริ่มทยอยตายหมดภายใน 5, 3 และ 7 วัน ตามลำดับ กุ้งตัวอย่างที่สุ่มให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อ WSSV เมื่อตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและวิธี immunohistochemistry ในขณะที่กุ้งในกลุ่มที่อุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส ไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น แต่เมื่อนำกุ้งตัวอย่างในกลุ่มที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ในวันที่ 1 จนถึงวันที่ 6 กุ้งตัวอย่างในกลุ่มที่ฉีดเชื้อ WSSV ในวันที่ 1 จนถึงวันที่ 9 และวันที่ 11 และกุ้งตัวอย่างในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ในวันที่ 1 จนถึงวันที่ 6 ไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและวิธี immunohistochemistry พบว่า ให้ผลเป็นบวกเฉพาะวิธี nested-PCR เท่านั้น หลังจากนั้นพบว่า กุ้งตัวอย่างในกลุ่มที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ฉีดเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ตรวจไม่พบการติดเชื้อ WSSV ในวันที่ 7, 14 และ 7 หลังจากได้รับเชื้อ ตามลำดับ จากผลนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ WSSV ได้ถูกกำจัดออกจากตัวกุ้งหรืออาจจะมีไวรัสปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี nested-PCR อย่างไรก็ตามหลังจากที่ตรวจไม่พบเชื้อ WSSV แล้วได้ปรับลดอุณหภูมิลงให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส พบว่า กุ้งทั้งหมดไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น กุ้งตัวอย่างที่สุ่มให้ผลเป็นลบกับทุกวิธีที่ใช้ตรวจการติดเชื้อ WSSV จนกระทั่งในวันที่ 21 หลังจากได้รับเชื้อ กุ้งตัวอย่างที่สุ่มก็ยังให้ผลเป็นลบกับทุกวิธีที่ใช้ตรวจการติดเชื้อ WSSV

ในส่วนของการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งป่วยพบความผิดปกติในเซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อวัยวะสร้างเม็ดเลือด antennal gland และอวัยวะต่อมน้ำเหลือง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือกและเหงือกติดเชื้อ WSSV เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 50) ส่วนการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP28 ของเชื้อ WSSV พบการติดเชื้อในเซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อวัยวะสร้างเม็ดเลือด antennal gland และอวัยวะต่อมน้ำเหลือง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือกและ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เหงือกติดเชื้อ WSSV เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 51) เช่นเดียวกันกับการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV แล้วเลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส สามารถกำจัดเชื้อออกจากร่างกายได้ เมื่อระยะเวลาผ่านไประยะเวลาหนึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนของไวรัส โดยใช้ระยะเวลา 7 วัน ในวิธีให้กินกุ้งที่ติดเชื้อ ระยะเวลา 14 วัน ในวิธีฉีดเชื้อและระยะเวลา 7 วัน ในวิธีเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อและไม่พบการติดเชื้อ WSSV เมื่อตรวจด้วยวิธี nested-PCR แต่ก่อนหน้านั้นยังสามารถตรวจพบการติดเชื้อเมื่อตรวจด้วยวิธี nested-PCR ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV แล้วเลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส น่าจะมีกลไกที่สามารถกำจัดเชื้อ WSSV ออกจากร่างกายได้ แต่กลไกนี้ยังไม่มีรายงานเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในกุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobracium lanchesteri*) และกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ที่ติดเชื้อ WSSV โดยการฉีดเชื้อและสุ่มตัวอย่างกุ้งมาตรวจการติดเชื้อวันที่ 3, 10, 15 และ 30 หลังจากการฉีดเชื้อ ด้วยวิธี immunohistochemistry และวิธี PCR พบว่า กุ้งฝอยน้ำจืดและกุ้งก้ามกรามติดเชื้อ WSSV ในวันที่ 3 และ 10 แต่ในวันที่ 15 และ 30 ไม่พบการติดเชื้อ (ฝน, 2550) ซึ่งคล้ายกับการศึกษาการหมดไปของเชื้อ WSSV ในกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ WSSV โดยการฉีดและสุ่มตัวอย่างกุ้งมาตรวจการติดเชื้อวันที่ 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75 และ 100 หลังจากการฉีดเชื้อ ด้วยวิธี single step PCR, nested-PCR และ bioassay พบว่า ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ WSSV ในวันที่ 75 และ 100 หลังจากการฉีดเชื้อ (Sarathi *et al*., 2008) ซึ่งผลจากสองการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากุ้งฝอยน้ำจืดและกุ้งก้ามกรามอาจจะมีกลไกที่สามารถกำจัดเชื้อ WSSV ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้อุณหภูมิของน้ำที่สูงอาจจะมีผลต่อการจำลองตัวเองของ WSSV (Granja *et al*., 2003; Rahman *et al*., 2006; Vidal *et al*., 2001) และการลดจำนวนลงของไวรัส (Granja *et al*., 2006) แต่กลไกที่อุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส สามารถลดอัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ยังไม่มีรายงาน แต่มีงานวิจัยหลายงานที่แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่สูงอาจจะชักนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อการติดเชื้อไวรัส เช่น apoptosis ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่ใช้สำหรับกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (O'Brien, 1998) ซึ่งเป็นกลไกที่คล้ายกันกับที่พบในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อ WSSV คือ เมื่อมีอนุภาคไวรัสในไซโทพลาสซึมของเซลล์ใดก็จะเกิด pyknotic nuclei ของเซลล์นั้นขึ้น ทำให้ไม่มีนิวเคลียสสำหรับการจำลองตัวเองของไวรัส (Granja *et al*., 2003; Sahtout *et al*., 2001) และมีการศึกษาจำนวนมากที่ต้องการแสดงให้เห็นว่า apoptosis เป็นกลไกที่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสในกุ้งได้ อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษาที่พบว่าการเกิด apoptosis ในเซลล์ของอวัยวะต่อมน้ำเหลือง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถควบคุมการติดเชื้อ TSV ได้ (Hasson *et al*., 1999b) และการเกิด pyknosis และ karyorrhexis ในกุ้งที่รอดตายจากการติดเชื้อ WSSV (Wang *et al*., 1999a)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่กินกุ้งติดเชื้อ WSSV แล้วเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) และวิธี immunohistochemistry

กลุ่มการทดลอง	อุณหภูมิของน้ำ	วิธีการตรวจ	วันหลังจากได้รับเชื้อวิธีตรวจเชื้อ WSSV (ตัวอย่างที่ติดเชื้อ WSSV / ตัวอย่างทั้งหมด)										
			1	2	3	4	5	6	7	9	11	14	21
กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV													
1	28-29°C	Nested-PCR	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5						
		Histopathology	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5						
		Immunohistochemistry	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5						
2	32-33°C	Nested-PCR	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		Histopathology	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		Immunohistochemistry	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

หมายเหตุ หลังจากวันที่ 7 ของการทดลองทำการปรับลดอุณหภูมิของน้ำในกลุ่มที่ 2 ให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เนื่องจากตรวจไม่พบการติดเชื้อ WSSV

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ฉีดด้วยเชื้อ WSSV แล้วเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) และวิธี immunohistochemistry

กลุ่มการทดลอง	อุณหภูมิของน้ำ	วิธีการตรวจ	วันหลังจากได้รับเชื้อวิธีตรวจเชื้อ WSSV (ตัวอย่างที่ติดเชื้อ WSSV / ตัวอย่างทั้งหมด)										
			1	2	3	4	5	6	7	9	11	14	21
กุ้งปกติฉีดเชื้อ WSSV													
1	28-29°C	Nested-PCR	5/5	5/5	5/5								
		Histopathology	5/5	5/5	5/5								
		Immunohistochemistry	5/5	5/5	5/5								
2	32-33°C	Nested-PCR	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5
		Histopathology	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		Immunohistochemistry	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

หมายเหตุ หลังจากวันที่ 14 ของการทดลองทำการปรับลดอุณหภูมิของน้ำในกลุ่มที่ 2 ให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เนื่องจากตรวจไม่พบการติดเชื้อ WSSV

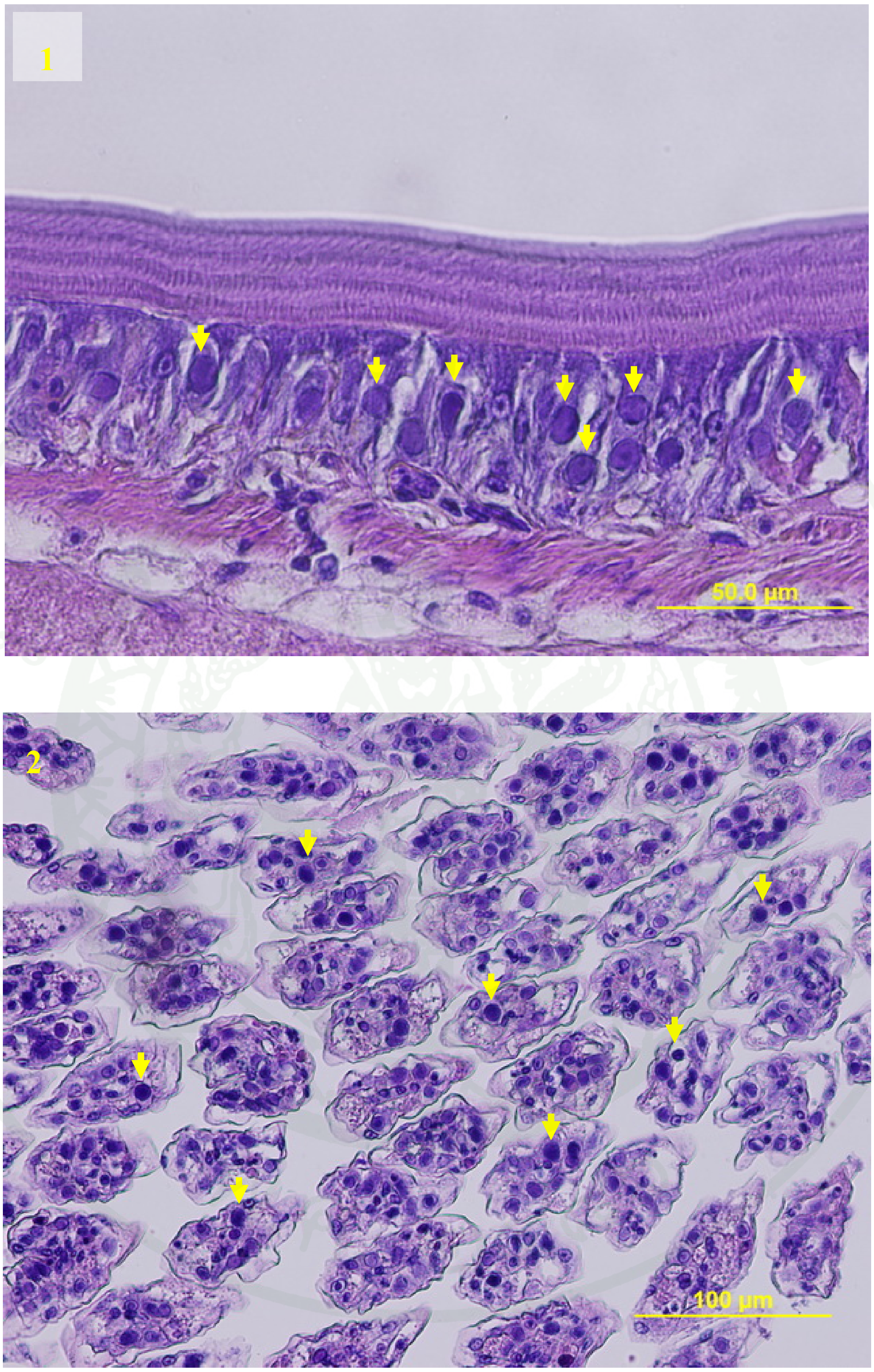
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่อุณหภูมิ 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) และวิธี immunohistochemistry

กลุ่มการทดลอง	อุณหภูมิของน้ำ	วิธีการตรวจ	วันหลังจากได้รับเชื้อวิธีตรวจเชื้อ WSSV (ตัวอย่างที่ติดเชื้อ WSSV / ตัวอย่างทั้งหมด)										
			1	2	3	4	5	6	7	9	11	14	21
กุ้งปกติแช่เชื้อ WSSV													
1	28-29°C	Nested-PCR	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5				
		Histopathology	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5				
		Immunohistochemistry	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5				
2	32-33°C	Nested-PCR	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		Histopathology	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		Immunohistochemistry	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

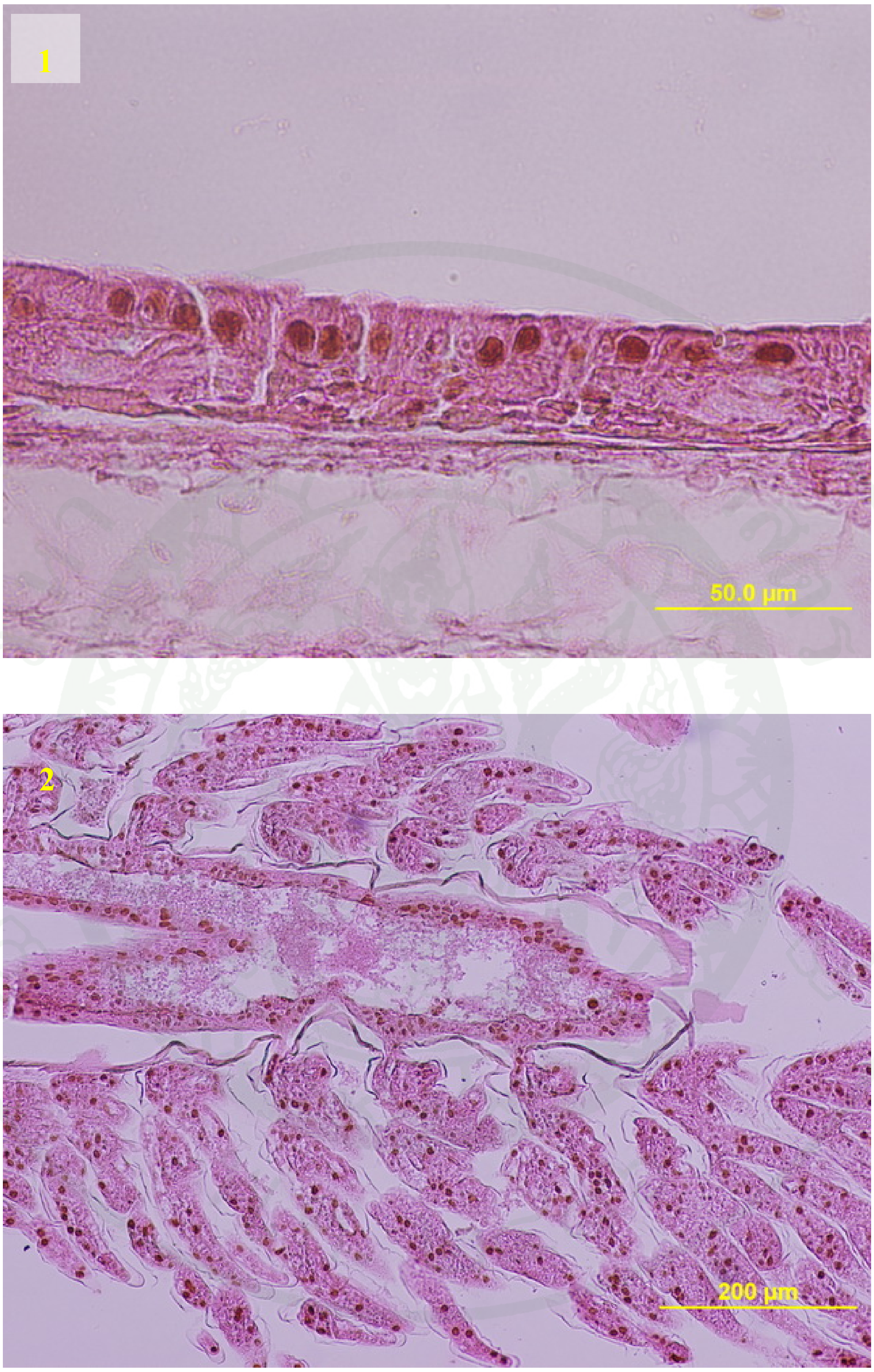
หมายเหตุ หลังจากวันที่ 7 ของการทดลองทำการปรับลดอุณหภูมิของน้ำในกลุ่มที่ 2 ให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เนื่องจากตรวจไม่พบการติดเชื้อ WSSV

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 50 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ WSSV ในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส พบ inclusion bodies (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก และ (2) เหงือกเป็นจำนวนมาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 51 เซลล์ที่ติดเชื้อ WSSV เป็นจำนวนมาก (สีน้ำตาลเข้ม) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือกและ (2) เหงือกของกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ WSSV ในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำและปริมาณการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่มีปริมาณเชื้อ WSSV แตกต่างกันต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม

อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส เปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำที่ใช้เลี้ยงและกลุ่มควบคุมที่ใส่เชื้อ WSSV ปริมาณ 80 มิลลิลิตร ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 80 ลิตร สังเกตอาการผิดปกติและบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน แสดงไว้ในตารางที่ 10 โดยกุ้งที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส ที่เปลี่ยนถ่ายน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ใช้เลี้ยง หลังจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ กุ้งจะเริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 36 (ภาพที่ 52) เริ่มมีกุ้งตายในชั่วโมงที่ 48 จนกระทั่งอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 156 หลังจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ส่วนกุ้งที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส ที่เปลี่ยนถ่ายน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ใช้เลี้ยง หลังจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำกุ้งเริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 52) หลังจากนั้นจึงเริ่มมีกุ้งตายในชั่วโมงที่ 60 และทยอยตายจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง พบว่า กุ้งมีอัตราการตายสะสม 80.0-83.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส ที่มีเชื้อ WSSV เริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 48 จากนั้นเริ่มมีการตายเกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 60 และทยอยตายจนหมดในชั่วโมงที่ 144 และ 168 เมื่อสุ่มกุ้งที่มีอาการป่วยจากทุกกลุ่มการทดลองไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR และชุดตรวจ immunochromatographic test strip พบว่าให้ผลเป็นบวก (ภาพที่ 53) ส่วนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อกุ้งตัวอย่างทั้งหมด (ตารางที่ 11 และ ภาพที่ 54) ในขณะที่กุ้งที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์และกุ้งในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่อุณหภูมิเดียวกันไม่มีกุ้งป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้นตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อสุ่มกุ้งตัวอย่างจากทุกกลุ่มไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR และชุดตรวจ immunochromatographic test strip พบว่าให้ผลเป็นลบเช่นเดียวกันกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่ไม่พบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อกุ้งตัวอย่างทั้งหมด (ตารางที่ 11)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส ไม่ว่าจะมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำมากหรือน้อยจะมีกุ้งตายจากเชื้อ WSSV ใกล้เคียงกัน ในขณะที่การเปลี่ยนถ่ายน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ใช้เลี้ยง มีอัตราการตายสะสม 80.0-83.3 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับกลุ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตายสะสมของกุ้งในแต่ละช่วงเวลาระหว่างกลุ่มที่เปลี่ยนถ่ายน้ำมาก (เปลี่ยนถ่ายน้ำ 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์) กับกุ้งในกลุ่มที่เปลี่ยนถ่ายน้ำน้อย (เปลี่ยนถ่ายน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์) พบว่า กุ้งในกลุ่มที่เปลี่ยนถ่ายน้ำมากจะเริ่มมีอาการป่วยและตายเร็วกว่ากลุ่มที่เปลี่ยนถ่ายน้ำน้อย แต่มีระยะเวลาอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ทั้ง ๆ ที่มีปริมาณไวรัสน้อยกว่ากลุ่มควบคุม จึงเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนถ่ายน้ำซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมอย่างหนึ่ง คือ การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต่าง ๆ ของน้ำไปจากเดิม อาจจะไปเร่งให้กุ้งต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงมากจนถึงระดับที่ทำให้ร่างกายอ่อนแอแสดงอาการป่วยเร็วและมีอัตราการตายที่สูงขึ้น สอดคล้องกับการรายงานของ Bondad-Reantaso *et al.* (2001) ว่าในระหว่างการเลี้ยงหากมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ พีเอช ความเค็ม ความกระด้าง หรือปริมาณออกซิเจนอย่างรวดเร็วสามารถกระตุ้นการเกิดโรคดวงขาวได้ ส่วนในการเปลี่ยนถ่ายน้ำ เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ใช้เลี้ยง ซึ่งถือว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมเพียงเล็กน้อย ประกอบกับปริมาณเชื้อ WSSV ที่เจือจางไปมาก ทำให้กุ้งบางส่วนในกลุ่มนี้ไม่แสดงอาการป่วยและยังมีชีวิตอยู่ อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าถ้าเชื้อ WSSV ยังมีชีวิตอยู่แม้จะมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำน้อยเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ โอกาสกุ้งจะป่วยติดเชื้อตายก็ยังมีสูง ดังนั้นต้องใช้การพักน้ำนานจนกว่าไวรัสจะตาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำที่ใช้เลี้ยงและกลุ่มควบคุม

อุณหภูมิของน้ำ	ปริมาตรน้ำที่เปลี่ยนถ่าย (เปอร์เซ็นต์)	เวลา (ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ)																
		12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	216	264	336
24-25°C	10	0	0	0	0	6.7	10.0	16.7	26.7	30.0	43.3	46.7	60.0	70.0	80.0	80.0	80.0	80.0
	20	0	0	0	3.3	13.3	16.7	20.0	36.7	53.3	66.7	83.3	90.0	100.0				
	30	0	0	0	6.7	13.3	20.0	23.3	33.3	60.0	66.7	80.0	93.3	100.0				
	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0	10.0	13.3	16.7	33.3	43.3	53.3	73.3	100.0					
28-29°C	10	0	0	0	0	3.3	10.0	13.3	23.3	23.3	43.3	46.7	56.7	66.7	83.3	83.3	83.3	83.3
	20	0	0	0	3.3	10.0	20.0	23.3	33.3	46.7	63.3	73.3	86.7	96.7	100.0			
	30	0	0	0	3.3	16.7	23.3	23.3	36.7	53.3	66.7	73.3	90.0	100.0				
	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0	6.7	10.0	10.0	16.6	23.3	36.6	63.3	73.3	86.7	100.0			
32-33°C	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 ผลตรวจการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน หลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ในปริมาณต่าง ๆ และกลุ่มควบคุม ด้วยวิธี nested-PCR ชุดตรวจ immunochromatographic test strip และการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology)

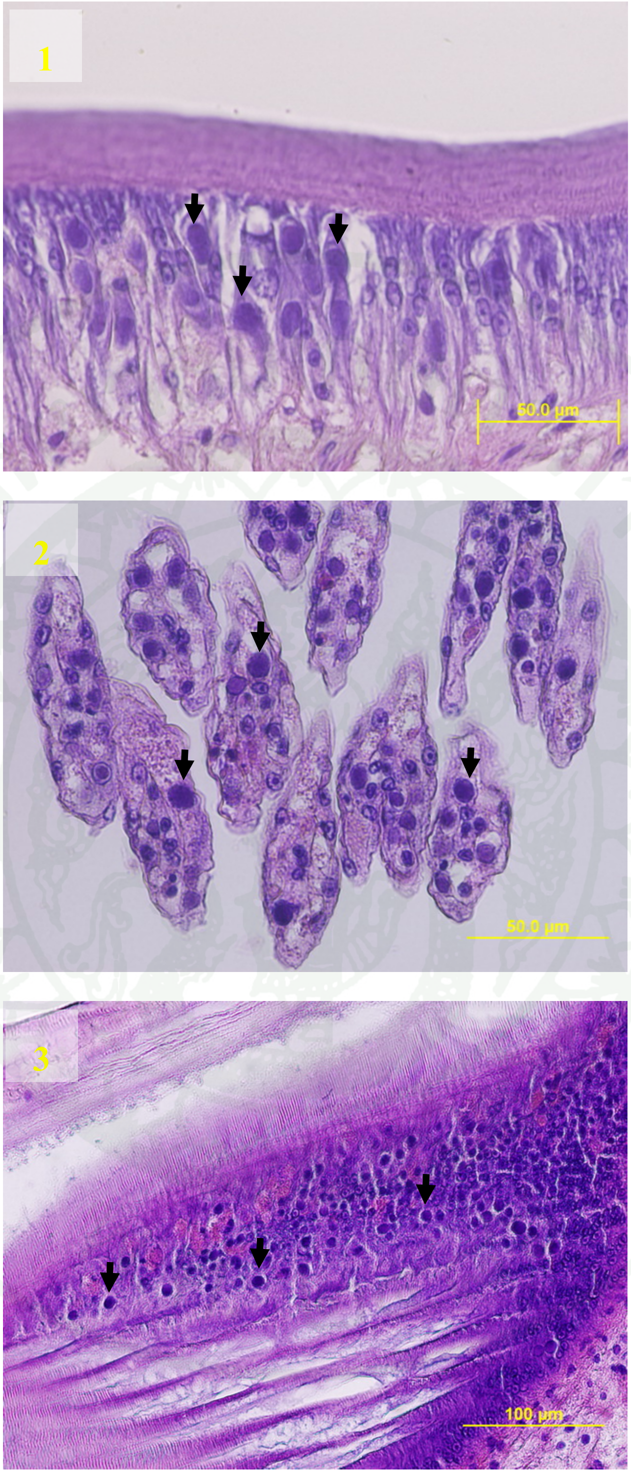
อุณหภูมิของน้ำ	ปริมาณน้ำที่เปลี่ยนถ่าย (เปอร์เซ็นต์)	วิธีตรวจเชื้อ WSSV (ตัวอย่างที่ติดเชื้อ WSSV / ตัวอย่างทั้งหมด)		
		Nested-PCR	Immunochromatographic test strip	Histopathology
24-25°C	10	10/10	10/10	10/10
	20	10/10	10/10	10/10
	30	10/10	10/10	10/10
	กลุ่มควบคุม	10/10	10/10	10/10
28-29°C	10	10/10	10/10	10/10
	20	10/10	10/10	10/10
	30	10/10	10/10	10/10
	กลุ่มควบคุม	10/10	10/10	10/10
32-33°C	10	0/10	0/10	0/10
	20	0/10	0/10	0/10
	30	0/10	0/10	0/10
	กลุ่มควบคุม	0/10	0/10	0/10

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 52 กุ้งขาวในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25 และ28-29 องศาเซลเซียส หลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำที่ใช้เลี้ยงแสดงอาการป่วย โดยมีลำตัวสีชมพูจนถึงแดง

ภาพที่ 53 ชุดตรวจ immunochromatographic test strip พบว่าให้ผลเป็นบวกต่อกุ้งขาวในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25 และ28-29 องศาเซลเซียส หลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร10 (1), 20 (2) และ 30 (3) เปอร์เซ็นต์ ของน้ำที่ใช้เลี้ยง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 54 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส หลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ใช้เลี้ยง พบ inclusion bodies (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (2) เหงือก และ (3) เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การศึกษาอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันต่อการคงอยู่ในภาวะที่ก่อให้เกิดโรคของเชื้อ WSSV ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

ผลของการพักน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่อุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดจะปิด heater และนำกุ้งขาวใส่ลงไปในน้ำที่พักไว้ แสดงไว้ในตารางที่ 12

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ผ่านการพักไว้ที่อุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน เริ่มแสดงอาการของโรคภายใน 2 วัน (ภาพที่ 55 และ 56) จากนั้นกุ้งเริ่มตายและทยอยตายหมดภายใน 7 วัน เมื่อสุ่มกุ้งที่มีอาการป่วยทุกกลุ่มการทดลองไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 57) และ bioassay พบว่าให้ผลเป็นบวก คือ พบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อกุ้งตัวอย่างทั้งหมด ในขณะที่กุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ผ่านการพักเป็นเวลาตั้งแต่ 5 วัน ขึ้นไป ไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น เมื่อสุ่มกุ้งที่รอดชีวิตไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและ bioassay พบว่าให้ผลเป็นลบต่อเชื้อ WSSV สำหรับกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ผ่านการพักที่อุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 2 วัน เริ่มแสดงอาการป่วยภายใน 2 วันและทยอยตายจนหมดภายใน 7-8 วัน เมื่อสุ่มกุ้งที่มีอาการป่วยไปตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและ bioassay พบว่าให้ผลเป็นบวก แต่กุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ผ่านการพักที่อุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลาตั้งแต่ 3 วันขึ้นไป ไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีการตาย กุ้งที่รอดชีวิตให้ผลเป็นลบต่อเชื้อ WSSV เมื่อสุ่มตรวจด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและ bioassay

จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในสภาวะห้องปฏิบัติการ เชื้อ WSSV สามารถคงอยู่ในน้ำอุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส ได้นาน 5 วัน สอดคล้องกับการรายงานของ Flegel (1997) ที่พบว่าในน้ำจากบ่อเลี้ยงที่มีการระบาดของโรค เชื้อ WSSV สามารถคงอยู่ในภาวะที่ก่อให้เกิดโรคได้ประมาณ 4-7 วัน ส่วนในน้ำที่มีอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส เชื้อ WSSV สามารถคงอยู่ได้นาน 3 วัน เนื่องจากในสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่สูงสามารถลดจำนวนของไวรัสได้ (Du *et al*., 2006; Granja *et al*., 2006) จึงอาจมีผลต่อการส่งผ่านของไวรัสภายในประชากรกุ้ง ซึ่งในฟาร์มเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่ในปัจจุบันเป็นแบบระบบปิดถ่ายน้ำน้อย คือ มีการเติมน้ำเข้าไปเพื่อทดแทนน้ำที่ระเหยหรือรั่วซึมและมีการถ่ายน้ำในช่วงท้าย ๆ ของการเลี้ยงเนื่องจากการเลี้ยงกุ้งขาวอย่างหนาแน่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาหารที่ให้ในแต่ละวันมีเป็นจำนวนมากส่งผลทำให้เกิดของเสียที่ขับถ่ายจากกุ้งและอาหารที่เหลือในบ่อจะสะสมมากขึ้น คุณสมบัติของน้ำเสื่อมโทรมมีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งที่เลี้ยง (ชลอ, 2543) ดังนั้นการถ่ายน้ำระบายเอาตะกอนสารอินทรีย์ต่าง ๆ ออกไปจากบ่อแล้วนำน้ำที่คุณสมบัติที่ดีกว่าและปลอดเชื้อไวรัสเข้ามาจะทำให้กุ้งโตดีขึ้น แต่น้ำที่จะเติมเข้าไปในบ่อนั้นมีความเสี่ยงที่จะมีเชื้อ WSSV ในฟาร์มขนาดใหญ่หรือฟาร์มที่มีระบบการป้องกันโรคที่ดีจะใช้สารเคมี เช่น คลอรีนผง (แคลเซียมไฮโปคลอไรท์) ในปริมาณ 50 กิโลกรัมต่อพื้นที่ 1 ไร่ ฆ่าเชื้อต่าง ๆ ในน้ำหรือใช้สารเคมีฆ่าพาหะจำพวกกุ้งและปูต่าง ๆ หลังจากนั้นพักน้ำไว้จนกระทั่งไม่มีคลอรีนหรือสารเคมีหลงเหลือแล้วจึงนำน้ำไปใช้ก็จะปลอดภัยจากโรคดวงขาว แต่มีฟาร์มเลี้ยงกุ้งอีกเป็นจำนวนมากที่ไม่มีการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อในน้ำเนื่องจากไม่ต้องการเสียค่าใช้จ่ายในส่วนนี้เพราะราคากุ้งในปัจจุบันนี้อยู่ในระดับที่ค่อนข้างต่ำ แต่หลายฟาร์มยังคงมีการพักน้ำก่อนนำไปใช้แต่ระยะเวลาที่พักน้ำยังไม่แน่ชัดว่านานเท่าไรจึงจะปลอดภัยจากไวรัสชนิดนี้เนื่องจากในสภาพการเลี้ยงกุ้งจริง ๆ ในทุกพื้นที่มักจะมีบางฟาร์มที่มีกุ้งป่วยเป็นโรคดวงขาวและต้องจับกุ้ง โดยน้ำที่ระบายออกจากบ่อมีเชื้อไวรัสในปริมาณมากไหลลงไปในแหล่งน้ำ แม่น้ำและออกสู่ทะเล ซึ่งเชื้อ WSSV จะเจือจางลงไประดับหนึ่ง แต่ถ้ามีกุ้งป่วยหลาย ๆ บ่อและต่อเนื่องเป็นเวลานานจะทำให้มีเชื้อไวรัสที่ยังมีชีวิตอยู่ในน้ำตลอดเวลาเพียงแต่จะมากหรือน้อยเท่าไรนั้นไม่สามารถที่จะประเมินได้ จากผลการทดลองนี้เมื่อนำไปดัดแปลงให้เหมาะสมสำหรับการใช้ในทางปฏิบัติเพื่อลดหรือป้องกันปัญหาจากโรคดวงขาวจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ คือ ในกรณีที่อุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส ควรพักน้ำก่อนนำไปใช้เปลี่ยนถ่ายอย่างน้อย 3 วัน ส่วนกรณีที่อุณหภูมิของน้ำ 28-29 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า ควรพักน้ำก่อนนำไปใช้อย่างน้อย 5 วัน แต่ในบ่อพักน้ำจะต้องไม่มีพาหะของโรคดวงขาว ซึ่งได้แก่ กุ้งหรือปูชนิดต่าง ๆ หรือในกรณีที่มีสัตว์ดังกล่าวเหล่านี้จะต้องไม่ได้สัมผัสหรือมีเชื้อไวรัสชนิดนี้ในลักษณะที่ยังมีชีวิตแต่สัตว์ที่เป็นเจ้าบ้านไม่แสดงอาการป่วย ถ้าเกษตรกรสามารถปฏิบัติได้ดังที่กล่าวมานี้การเติมน้ำเข้าไปในบ่อก็จะปลอดภัยจากโรคดวงขาว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

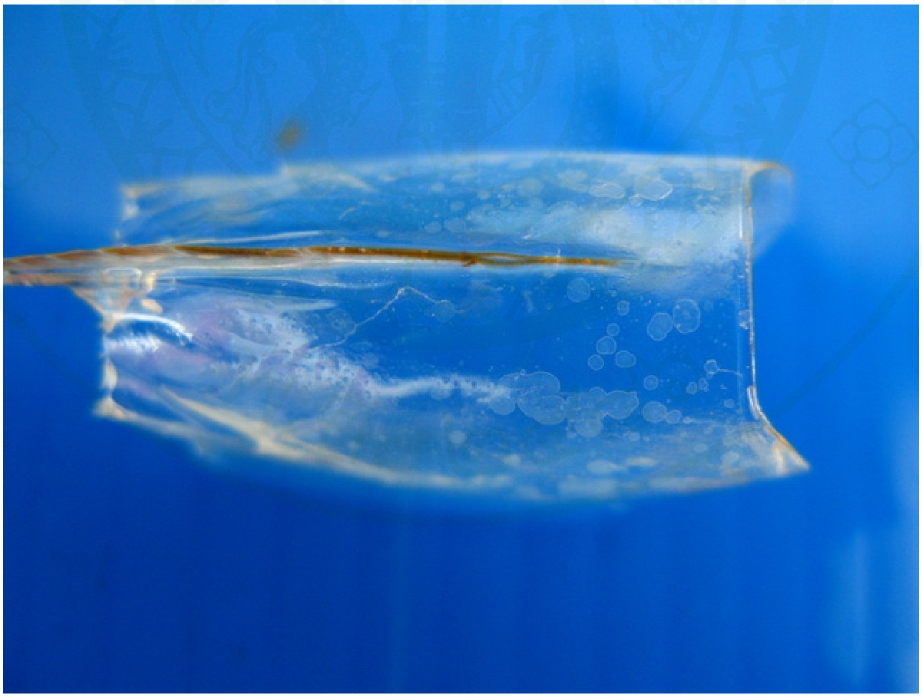
ตารางที่ 12 อัตราการตายและผลการตรวจเชื้อ WSSV ของกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำพักไว้เวลาต่าง ๆ ที่มีอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) และ bioassay

อุณหภูมิของน้ำ	จำนวนวันที่พักน้ำ (วัน)	อัตราการตายสะสม (เปอร์เซ็นต์)	วิธีตรวจเชื้อ WSSV (ตัวอย่างที่ติดเชื้อ WSSV / ตัวอย่างทั้งหมด)		
			Nested-PCR	Histopathology	Bioassay
28-29°C	0	100	10/10	10/10	M
	1	100	10/10	10/10	M
	2	100	10/10	10/10	M
	3	100	10/10	10/10	M
	4	100	10/10	10/10	M
	5	0	0/10	0/10	NM
	6	0	0/10	0/10	NM
	7	0	0/10	0/10	NM
32-33°C	0	100	10/10	10/10	M
	1	100	10/10	10/10	M
	2	100	10/10	10/10	M
	3	0	0/10	0/10	NM
	4	0	0/10	0/10	NM
	5	0	0/10	0/10	NM
	6	0	0/10	0/10	NM
	7	0	0/10	0/10	NM

หมายเหตุ M หมายถึง mortality และ NM หมายถึง no mortality

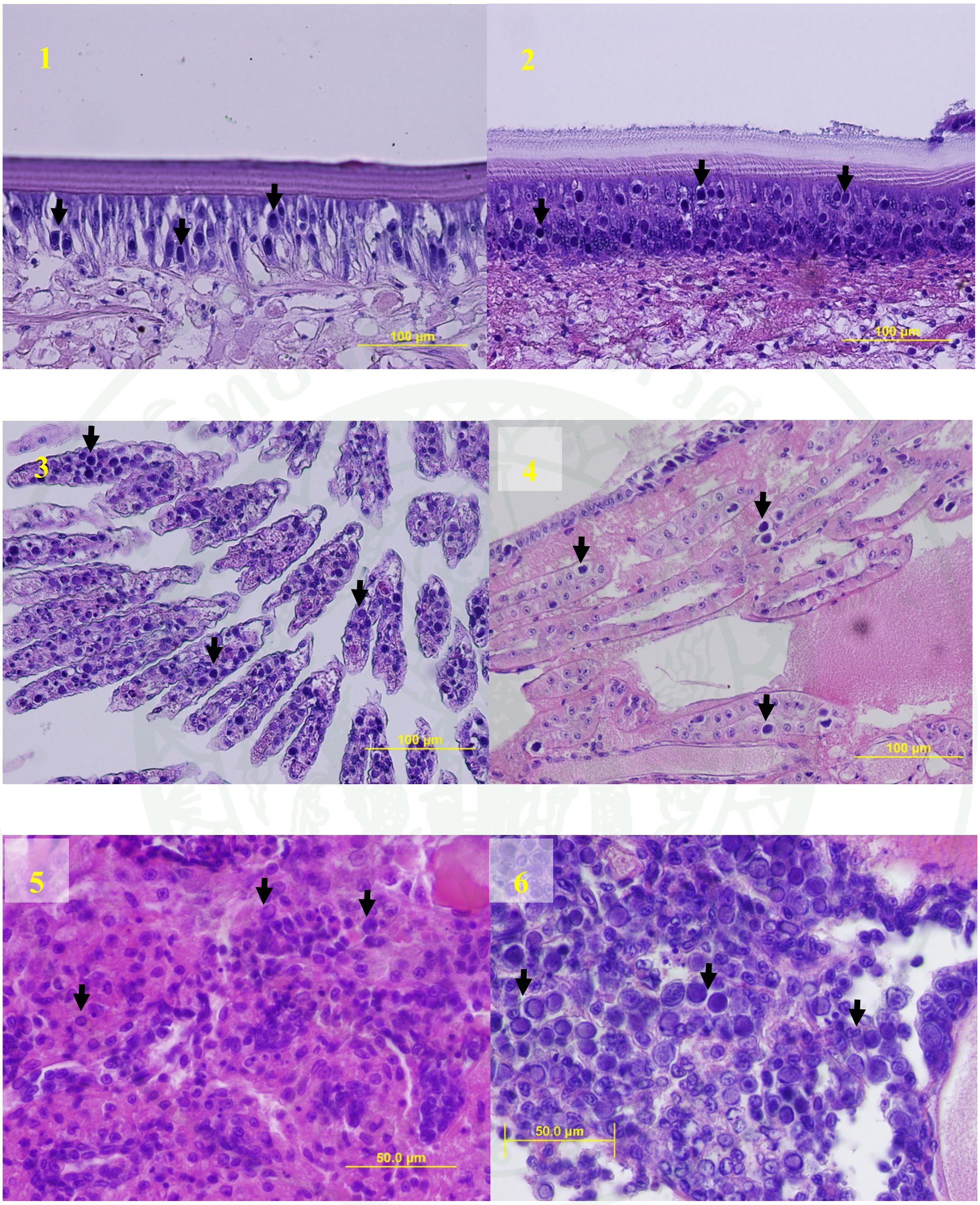
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 55 กุ้งขาวเริ่มแสดงอาการป่วยมีลำตัวสีชมพูจนถึงแดงและไม่กินอาหาร



ภาพที่ 56 กุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV มีดวงขาวบริเวณเปลือกคลุมหัว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-2.0 มิลลิเมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 57 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส ที่มีเชื้อ WSSV ที่พักเป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน พบ hypertrophied nuclei และ inclusion bodies (ลูกศรชี้) ใน (1) เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (2) เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร (3) เหงือก (4) antennal gland (H&E, bar = 100 µm) (5) อวัยวะต่อมน้ำเหลือง และ (6) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (H&E, bar = 50 µm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกัน (24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส) ต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม โดยการให้กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV การฉีดเชื้อ WSSV และการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และในลูกกุ้งระยะ PL_{15} โดยการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV พบว่า ที่อุณหภูมิของน้ำ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส เชื้อ WSSV มีความรุนแรงทำให้กุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม และลูกกุ้งระยะ PL_{15} ตายหมดภายใน 7 วัน ส่วนที่อุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส ไม่พบกุ้งป่วยและตายจากเชื้อ WSSV ดังนั้นอุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพที่จะป้องกันการเกิดโรคดวงขาวและลดอัตราการตายในกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV ได้

2. การศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส ต่อความรุนแรงของการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาว ในส่วนของการศึกษาผลของการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำจาก 28-29 องศาเซลเซียส เป็น 32-33 องศาเซลเซียส ต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม โดยการให้กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV การฉีดเชื้อ WSSV และการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV พบว่า หลังจากกุ้งได้รับเชื้อ WSSV แล้วเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนปรับเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเป็น 32-33 องศาเซลเซียส ของทั้ง 3 ชุดการทดลอง สามารถทำให้เกิดผลลัพธ์ได้ 2 แบบ ที่ตรงกันข้ามกันขึ้นอยู่กับระยะของการติดเชื้อ คือ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของน้ำจาก 28-29 องศาเซลเซียส เป็น 32-33 องศาเซลเซียสในระยะแรกของการติดเชื้อ (ภายใน 12 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ WSSV) หรือก่อนที่กุ้งจะแสดงอาการป่วย จะสามารถหยุดการจำลองตัวเองของไวรัสได้ ส่งผลให้กุ้งที่ติดเชื้อในระยะนี้ไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น ส่วนการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำจาก 28-29 องศาเซลเซียส เป็น 32-33 องศาเซลเซียส ในระยะหลังการติดเชื้อ (มากกว่า 12 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับเชื้อ WSSV) หรือกุ้งเริ่มแสดงอาการป่วย จะเป็นการเร่งให้เกิดโรคและการตายให้เร็วขึ้น การเพิ่มอุณหภูมิของน้ำจาก 28-29 องศาเซลเซียส เป็น 32-33 องศาเซลเซียส ไม่สามารถลดอัตราการตายในกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป เนื่องจากการจำลองตัวเองของเชื้อ WSSV จะอยู่ในช่วงระหว่าง 12-24 ชั่วโมงหลังจากเข้าไปในตัวกุ้ง ดังนั้นอุณหภูมิของน้ำที่ 32-33 องศาเซลเซียส สามารถป้องกันการเกิดโรคดวงขาวในกุ้งขาวที่ติดเชื้อ WSSV ได้ แต่ต้องเป็นระยะแรก ๆ ของการติดเชื้อ WSSV เท่านั้น สำหรับการศึกษาผลของการลดอุณหภูมิของน้ำจาก 32-33 องศาเซลเซียส เป็น 28-29 องศาเซลเซียส ต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม โดยการให้กิน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กุ้งที่ติดเชื้อ WSSV การฉีดเชื้อ WSSV และการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และในลูกกุ้งระยะ PL_{15} โดยการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV พบว่า กุ้งในกลุ่มที่ควบคุมอุณหภูมิน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน หลังจากกินกุ้งที่ติดเชื้อและเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV และกุ้งในกลุ่มที่ควบคุมอุณหภูมิน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน หลังจากฉีดเชื้อ WSSV ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส มีอาการป่วยและอัตราการตายที่ช้าลง อย่างไรก็ตามกุ้งทั้งหมดของกลุ่มเหล่านี้จะตายภายใน 7 วัน มีเพียงกุ้งในกลุ่มที่ควบคุมอุณหภูมิน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากกินกุ้งที่ติดเชื้อและเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV แต่กุ้งที่ได้รับเชื้อ WSSV โดยการฉีดเชื้อ WSSV จะต้องควบคุมอุณหภูมิน้ำให้อยู่ที่ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานถึง 14 วัน ก่อนปรับอุณหภูมิของน้ำเป็น 28-29 องศาเซลเซียส จะไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้นเหมือนกับกุ้งในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส จนสิ้นสุดการทดลอง นอกจากนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP28 (ซึ่งเป็นโปรตีนของ envelope) ของ WSSV เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสนั้นให้ผลเป็นลบ แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิของน้ำที่สูงสามารถยับยั้งการแสดงออกของ VP28 ในตัวกุ้งได้อย่างสมบูรณ์ คือไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน VP28 ในเซลล์ของกุ้งที่ได้รับเชื้อ WSSV

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส ต่อการทำให้เชื้อ WSSV หมดไปในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม ที่ติดเชื้อ WSSV โดยการให้กินกุ้งที่ติดเชื้อ ฉีดเชื้อ WSSV และเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV แล้วสุ่มกุ้งในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14 และ 21 หลังจากได้รับเชื้อ WSSV ศึกษาการติดเชื้อWSSV ด้วยวิธี nested-PCR การศึกษาทางพยาธิสภาพและวิธี immunohistochemistry พบว่า ไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งตัวอย่างในกลุ่มที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ ฉีดเชื้อและเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ในวันที่ 7, 14 และ 7 หลังจากได้รับเชื้อ ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อปรับลดอุณหภูมิลงให้อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส พบว่า กุ้งทั้งหมดไม่มีอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น กุ้งตัวอย่างที่สุ่มให้ผลเป็นลบกับทุกวิธีที่ใช้ตรวจการติดเชื้อ WSSV จนกระทั่งในวันที่ 21 กุ้งตัวอย่างที่สุ่มก็ยังให้ผลเป็นลบกับทุกวิธีที่ใช้ตรวจการติดเชื้อ WSSV แสดงให้เห็นว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส มีกลไกที่สามารถกำจัดเชื้อ WSSV ออกจากร่างกาย แต่ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัด

4. การศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำและปริมาณการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่แตกต่างกันต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม โดยการเลี้ยงกุ้งในน้ำอุณหภูมิ 24-25, 28-29 และ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของน้ำที่ใช้เลี้ยง พบว่า กุ้งที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 24-25 และ 28-29 องศาเซลเซียส ไม่ว่าจะมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำมากหรือน้อยจะมีกุ้งตายจากเชื้อ WSSV ใกล้เคียงกัน ในขณะที่การเปลี่ยนถ่ายน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ใช้เลี้ยง มีอัตราการตายสะสม 80.0-83.3 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับกลุ่มที่เปลี่ยนถ่ายน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ใช้เลี้ยง ซึ่งมีอัตราการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส หลังจากมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่มีเชื้อ WSSV ปริมาตร 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีกุ้งป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้นตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา

5. การศึกษาอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันต่อการคงอยู่ในภาวะที่ก่อให้เกิดโรคของเชื้อ WSSV ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งขาวน้ำหนัก 5-6 กรัม โดยการพักน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่อุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดจะปิด heater และนำกุ้งขาวใส่ลงไปในน้ำที่พักไว้ พบว่ากุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ผ่านการพักไว้ที่อุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน จะทยอยตายหมดภายใน 7 วัน ในขณะที่กุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ผ่านการพักเป็นเวลาตั้งแต่ 5 วัน ขึ้นไป ไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีการตายเกิดขึ้น ส่วนกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ผ่านการพักที่อุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 2 วัน ทยอยตายจนหมดภายใน 7-8 วัน แต่กุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ WSSV ที่ผ่านการพักที่อุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลาตั้งแต่ 3 วันขึ้นไป ไม่แสดงอาการป่วยและไม่มีการตาย ดังนั้นในสภาวะห้องปฏิบัติการ เชื้อ WSSV สามารถคงอยู่ในน้ำอุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส ได้นาน 5 วัน ส่วนในน้ำที่มีอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส เชื้อ WSSV สามารถคงอยู่ได้นาน 3 วัน

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับอุณหภูมิของน้ำ 32-33 องศาเซลเซียส มีผลต่อการจำลองตัวเองและการลดจำนวนลงของเชื้อ WSSV จนไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อในกุ้งได้อย่างไรและควรมีการศึกษาเพิ่มเติมทางด้านชีวเคมีว่าอุณหภูมิของน้ำที่สูงมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อ WSSV หรือไม่ ถ้ามีผลแล้วมีผลต่อเอนไซม์ตัวใด รวมถึงการศึกษาหากลไกที่กุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงใช้ในการกำจัดเชื้อ WSSV ออกจากร่างกาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรรณิการ์ สิริสิงห์. 2522. **เคมีของน้ำ น้ำโสโครกและการวิเคราะห์.** โรงพิมพ์บริษัทสารมวลชน จำกัด, กรุงเทพฯ.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2534. **คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.** สำนักพิมพ์ฐานเศรษฐกิจ, กรุงเทพฯ.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543. **กุ้งไทย 2000 สู่ความยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม.** โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.** สนับสนุนการจัดพิมพ์โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ. 2547. บริษัทเมจิคพับบลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2553. การเลี้ยงกุ้งระบบผสมผสานเกษตรกรรมเพื่อลดภาวะโลกร้อนที่ประเทศเปรู. **Aqua Biz Magazine** 32(4): 11-18.

ประวิทย์ โตวัฒนะ และ พิภพ ปราบณรงค์. 2539. การสะสมตัวและการเคลื่อนที่ของไอออนจากน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงกุ้งในหน้าดินตัดที่มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและทรัพยากรดินในอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา. **วารสารสงขลานครินทร์.** 18(1): 113-127.

ปิยนุช พรมภมร. 2550. **โรคสำคัญในการเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิกในประเทศไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. 2525. **แหล่งน้ำกับปัญหามลภาวะ.** สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฝน ตันสกุล. 2550. **การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมิสทรีและวิธีพีซีอาร์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

พรเทพ ปลอดภัย. 2537. **การศึกษาช่วงระยะเวลาการมีชีวิตของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในน้ำทะเลและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2539. ประมวลแนวทางการป้องกันโรคตัวแดงดวงขาว. **วารสารข่าวโรคสัตว์น้ำ.** 6 (1): 8-11.

ศิริเพ็ญ ตรัยไชยาพร. 2543. **การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สมเจตน์ จันทวัฒน์, ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, จงรัก จันทร์เจริญสุข, วิโรจน์ อิ่มพิทักษ์ และ อัญชลี สุทธิประการ. 2529. **ปฐพีวิทยาเบื้องต้น.** ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุเทพ สุวรรณหงษ์. 2546. **ประสิทธิภาพของฟอร์มาลินในการควบคุมโรคไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุธี วงศ์มณีประทีป. 2549. **ผลของ Sodium Nitrate Base (Nutrilake) ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) ระบบปิด.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุธี เกื้อเกตุ. 2543. **การสะสมและการกระจายของไอออนจากน้ำทะเลในแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำเขตน้ำจืด: กรณีศึกษาที่อำเภอบ้านสร้าง จังหวัดปราจีนบุรี.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Alday de Graindorge, V. and T.W. Flegel. 1999. **Diagnosis of Shrimp Diseases with Emphasis on the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*)**. Multimedia Asia Co. Ltd, Bangkok.

Allan, E.L., P.W. Froneman and A.N. Hodgson. 2006. Effects of temperature and salinity on the standard metabolic rate (SMR) of the caridean shrimp *Palaemon peringueyi*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 337: 103-108.

Alongi, D.M., P. Dixon, D.J. Johnston, D.V. Tien and T.T. Xuan. 1999. Pelagic processes in extensive shrimp ponds of the Mekong delta, Vietnam. **Aquaculture** 175: 121-141.

Amrane, A. and Y. Prigent. 1998. A new turbidimetric device for on-line monitoring of growth of filamentous microorganisms. **J. Microbiol. Methods** 33: 37-43.

Anil, T.M., K.M. Shankar and C.V. Mohan. 2002. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. **Dis. Aquat. Org.** 51: 67-75.

APHIS-USDA. 2005. **Impact Worksheet White Spot Disease in Brazil**. APHIS-USDA, Natural Resources Research: Fort Collins, CO Center.

Barajas, F.J. M., R.S. Villegas, G.P. Clark and B.L. Moreno. 2006. *Litopenaeus vannamei* (Boone) post-larval survival related to age, temperature, pH and ammonium concentration. **Aquac. Res.** 37: 492-499.

Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1984. IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. **Aquaculture** 38: 185-194.

Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1988. **A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bonami, J.R., K.W. Hasson, B.T. Poulos and D.V. Lightner. 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. **J. Gen. Virol.** 78: 313-319.

Bondad-Reantaso, M.G., S.E. Mcgladdery, I. East and R.P. Subasinghe. 2001. **Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases**. FAO, Rome, Italy.

Boonyaratpalin, S., K. Supamattaya, J. Kasornchandra, S. Direkbusaracom, U. Aekpanithanpong and C. Chantanachookin. 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow-head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish Pathol**. 28: 103-109.

Boyd, C.E. 1982. **Water Quality in Management for Fish Pond Culture**. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Netherlands.

Boyd, C.E. 1987. **Evaluation of Water Quality and Water Quality Management Techniques for Brackishwater Aquaculture in Ponds in Thailand**. Report for the Asian Development Bank, Manila, Phillippines.

Boyd, C.E. 1989. **Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming Series 2**. Fisheries and Allied Aquaculture Department, Auburn University, Auburn, Alabama.

Boyd, C.E. 1990. **Water Quality in Ponds for Aquaculture of Fisheries.** Department of Fisheries and Allied Aquaculture Department, Auburn University, Auburn, Alabama.

Brawn, T.E., A.W. Morley., N.T. Sanderson and R.D. Tait. 1983. Report of a large fish kill resulting from natural acid water condition in Austrawa. **J. Fish. Biol**. 22(1): 43-47.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Brock, J.A. and D.V. Lightner. 1990. Chapter 3: Diseases of crustacean, pp. 245-424. *In* O. Kinne, ed. **Diseases of Marine Animal. Vol. 3**. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg.

Brock, J.A. and K. Main. 1994. **A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei***. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii.

Castille, J. R., L. Frank and A. L. Lawrence. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentration in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. **Comp. Boichem. Physiol**. 68A: 75-80.

Chang, P.S., C.F. Lo, Y.C. Wang and G.H. Kou. 1996. Identification of white spot syndrome virus associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. **Dis. Aquat. Org.** 27: 131-139.

Chang, P.S, L.J. Chen and Y.C. Wang. 1998a. The effect ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome associated baculovirus. **Aquaculture** 166: 1-17.

Chang, P.S., H.C. Chen and Y.C. Wang. 1998b. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by *in situ* hybridization. **Aquaculture** 164: 233-242.

Chaivisuthangkura, P., J. Tangkhabuanbutra, S. Longyant, W. Sithigorngul, S. Rukpratanporn, P. Menasveta and P. Sithigorngul, 2004. Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. **Science Asia** 30: 359-363.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chanratchakool, P. and C. Limsuwan. 1998. Application of PCR and formalin treatment to prevent white spot disease in shrimp, pp. 287-289. *In* T. W. Flegel, ed. **Advances in Shrimp Biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

Chantanachookin, C., S. Boonyaratpalin, J. Kasornchandra, S. Direkbusarakom, U. Ekpanithanpong, K. Supamataya, S. Sriurairatana and T.W. Flegel. 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. **Dis. Aquat. Org**. 17: 145-157.

Chayaburakul, K., G. Nash, P. Pratanpipat, S. Sriurairata and B. Withyachumnarnkul. 2004. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. **Dis. Aquat. Org.** 60: 89-96.

Chen, L.L., H.C. Wang, C.J. Huang, S.E. Peng, Y.G. Chen, S.J. Lin, W.Y. Chen, C.F. Dai, H.T. Yu, C.H. Wang, C.F. Lo and G.H. Kou. 2002. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. **Virology** 301: 136-147.

Cheng, W., L.U. Wang and J.C. Chen. 2005. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture** 250: 592-601.

Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang and C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Dis. Aquat. Org.** 23: 165-173.

Claydon, K., B. Cullen and L. Owens. 2004. OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. **Dis. Aquat. Org.** 62: 265-268.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Corbel, V., Z. Zuprisal, C. Shi, I. Huang, C. Sumartono, J.M. Arcier and J.R. Bonami. 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). **J. Fish Dis.** 24: 377-382.

Cowley, J.A., C.M. Dimmock, C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim and P. J. Walker. 1999. Yellow head virus from Thailand and gill associated-virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. **Dis. Aquat. Org.** 36: 153-157.

Cowley, J.A., C.M. Dimmock, K.M. Spann and P.J. Walker. 2000. Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF 1a and ORF 1b genes related to arteri- and coronaviruses. **J. Gen. Virol.** 81: 1473-1484.

Dall, W., B. J. Hill, P.C. Rothlisberg and D.J. Staples. 1990. **The Biology of the Penaeidae**. **Advances in Marine Biology. Vol. 27**. Academic press, Sydney.

Dieu, B.T.M., H. Marks, J.J. Siebenga, R.W. Goldbach, D. Zuidema, T.P. Duong and J.M. Vlak. 2004. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. **J. Gen. Virol.** 85: 3607-3618.

Du, H.H., W.F. Li, Z.R. Xu and Z.S. Kil. 2006. Effect of hyperthermia on the replication of white spot syndrome virus (WSSV) in *Procambarus clarkii*. **Dis. Aquat. Org.** 71: 175-178.

Du, H.H., W. Dai, X.Y. Han, W.F. Li, Y.X. Xu and Z.R. Xu. 2008. Effect of low water temperature on viral replication of white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. **Aquaculture** 227: 149-151.

Dupuy, J.W., J.R. Bonami and P.H. Roch. 2004. A synthetic antibacterial peptide from *Mytilus galloprovincialis* reduces mortality due to white spot syndrome virus in palaemonid shrimp. **J. Fish. Dis.** 27: 57-64.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Durand, S.V. and D.V. Lightner. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. **J. Fish Dis.** 25: 381-389.

Durand, S., D.V. Lightner, L.M. Nunan, R.M. Redman, J. Mari and J.R. Bonami. 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Org.** 27: 59-66.

Durand, S., D.V. Lightner, R.M. Redman and J.R. Bonami. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus. **Dis. Aquat. Org.** 29: 205-211.

Edgerton, B.F. 2004. Susceptibility of the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor albidus* to white spot syndrome virus (WSSV). **Dis. Aquat. Org.** 59: 187-193.

Escobedo-Bonilla, C.M., M. Wille, V. Alday-Sanz, P. Sorgeloos, M.B. Pensaert and H.J. Nauwynck. 2005. In vivo titration of white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen free *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. **Dis. Aquat. Org.** 66: 163-170.

Escobedo-Bonilla, C.M., M. Wille, V. Alday-Sanz, P. Sorgeloos, M.B. Pensaert, H.J. Nauwynck. 2007. Pathogenesis of a Thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile, specific pathogen free *Litopenaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.** 74: 85-94.

Escobedo-Bonilla, C.M., V. Alday-Sanz, M. Wille, P. Sorgeloos, M.B. Pensaert and H.J. Nauwynck. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **J. Fish Dis.** 31: 1-18.

Fan, X., K. Thirunavukkarasu and R.F. Weaver. 1996. Temperature-sensitive mutations in the protein kinase-1 (*pk*-1) gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus that block very late gene expression. **Virology** 224: 1-9.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

FAO. 1994. **Aquaculture Production 1986-1992**. FAO Fisheries Circular 815 (Rev. 6). FAO, Rome.

Fauquet, C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball. 2004. **VIII th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier, Amsterdam.

Fegan, D.F. and H.C. III Clifford. 2001. Health management for viral diseases in shrimp farms, pp. 168-192. *In* C.L. Browdy and D.E. Jory, eds. **The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture**, Aquaculture 2001, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Flegel, T.W. 1997. Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World J. Microbiol. Biotechnol**. 13: 433-442.

Flegel, T.W. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture** 258: 1-33.

Flegel, T.W. and V. Alday-Sanz. 1998. The crisis in Asian shrimp aquaculture: current status and future needs. **J. Appl. Ichthyol.** 14: 269-273.

Flegel, T.W., S. Boonyaratpalin and B. Withyachumnarnkul. 1997. Progress in research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand, pp. 285-296. *In* T. W. Flegel and I.H. MacRae, eds. **Diseases in Asian Aquaculture III.** Fish Health Session, Asian Fisheries Society, Manila.

Frelier, P.F., R.F. Sis, T.A. Bell and D.H. Lewis. 1992. Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei)* cultured in Texas. **Vet. Pathol.** 29: 269-277.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Frelier, P.F., J.K. Loy and R. Kruppenbach. 1993. Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. **J. Invertebr. Pathol.** 61: 44-48.

Gilad, O., S. Yun, M.A. Adkison, K. Way, N.H. Willits, H. Bercovier and R.P. Hedrick. 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. **J. Gen. Virol.** 84: 2661-2668.

Goarant, C., D. Ansquer, J. Herlin, D. Domalain, F. Imbert and S. De Decker. 2006. "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. **Aquaculture** 253: 105-113.

Gopalakrishnan, A. and A. Parida. 2005. Incidence of loose shell syndrome disease of the shrimp *Penaeus monodon* and its impact in the grow-out culture**. Curr. Sci.** 88: 1148-1154.

Granja, C.B., L.F. Aranguren, O.M. Vidal, L. Aragón and M. Salazar. 2003. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*? **Dis. Aquat. Org.** 54: 73-78.

Granja, C.B., O.M. Vidal, G. Parra and M. Salazar. 2006. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.** 68: 175-180.

Grant, E.C., D.P. Philipp, K.R. Inendino and T.L. Goldberg. 2003. Effects of temperature on the susceptibility of largemouth bass to largemouth bass virus. **J. Aquat. Anim. Health** 15: 215-220.

Guan, Y., Z. Yu and C. Lia. 2003. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. **J. Invertebr. Pathol.** 83: 257-260.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Guzmán, G.A. and F.A. Valle. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. **Resent Res. Devl. Microbiology** 4: 333-348.

Han, F., J. Xu and X. Zhang. 2007. Characterization of an early gene (wsv477) from white spot syndrome virus (WSSV). **Virus Genes** 37: 193-198.

Hasson, K.W., D.V. Lightner, B.T. Poulos, R.M. Redman, B.L. White, J.A. Brock and J.R. Bonami. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. **Dis. Aquat. Org**. 23: 115-126.

Hasson, K.W., D.V. Lightner, L.L. Mohney, R.M. Redman, B.T. Poulos and B. L. White. 1999a. Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.** 36: 81-93.

Hasson, K.W., D.V. Lightner, L.L. Mohney, R.M. Redman and B.M. White. 1999b. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org**. 38: 93-105.

Hewitt, D.R. and P.F. Duncan. 2001. Effect of high water temperature on the survival, moulting and food consumption of *Penaeus* (*Marsupenaeus*) *japonicus* (Bate, 1888). **Aquac. Res.** 32: 305-313.

Holthuis, L.B. 1980. **FAO Species Catalog. Vol. 1-Shrimp and Prawns of the World**. FAO Fisheries Synopsis No. 125, FAO, Rome.

Horowitz, A. and S. Horowitz. 2001. Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective, pp. 199-218. *In* C.L. Browdy and D.E. Jory, eds. **The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture**, Aquaculture 2001, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hossain, S., A. Chakraborty, B. Joseph, S.K. Otta, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2001. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. **Aquaculture** 198: 1-11.

Hossain, M.S., S.K. Otta, A. Chakraborty, H.S. Kumar, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2004. Detection of WSSV in cultured shrimps, captured brooders, shrimp postlarvae and water samples in Bangladesh by PCR using different primers. **Aquaculture** 237: 59-71.

Hsu, H.C., C.F. Lo, S.C. Lin, K.F. Liu, S.E. Peng, Y.S. Chang, L.L. Chen, W.J. Liu and G.H. Kou. 1999. Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders. **Dis. Aquat. Org.** 39: 13-19.

Hu, C. and B. Tao. 2000. Penaeid shrimp vibriosis and immune prevention: a review**. Trop. Oceanol. Redai Haiyang** 19: 84-94.

Huang, C.H., L.R. Zhang, J.H. Zhang, L.C. Xiao, Q.J. Wu, D.H. Chen and J.K.K. Li. 2001. Purification and characterization of white spot syndrome virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkii*. **Virus Res.** 76: 115-125.

Huang, C., X. Zhang, Q. Lin, X. Xu and C.L. Hew. 2002a. Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. **J. Gen. Virol.** 83: 2385-2392.

Huang, C., X. Zhang, Q. Lin, X. Xu, Z. Hu and C.L. Hew. 2002b. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. **Mol. Cell. Proteomics** 1: 223-231.

Huang, R., Y. Xie, J. Zhang and Z. Shi. 2005. A novel envelope protein involved in white spot syndrome virus infection. **J. Gen. Virol.** 86: 1357-1361.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Iida, T. and M. Sano. 2005. Koi herpesvirus disease. **Uirusu** 55: 145-151.

Inouye, K., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano, T. Kimura, K. Momoyama and M. Hiraoka. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. **Fish Pathol.** 29: 149-158.

Inouye, K., K. Yamano, N. Ikeda, T. Kimura, H. Nakano, K. Momoyama, J. Kobayashi and S. Miyajima. 1996. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia. **Fish Pathol.** 31: 39-45.

Jayasree, L., P. Janakiram and R. Madhavi. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). **J. World Aquac. Soc.** 37: 523-532.

Jian, X.F., L. Lu, Y.G. Chen, S.M. Chan and J.G. He. 2005. Comparison of a novel *in situ* polymerase chain reaction (ISPCR) method to other methods for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.** 67: 171-176.

Jiravanichpaisal, P., E. Bangyeekhun, K. Söderhäll and I. Söderhäll. 2001. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Dis. Aquat. Org.** 47: 151-157.

Jiravanichpaisal, P., K. Söderhäll and I. Söderhäll. 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. **Fish Shellfish Immunol.** 17: 265-275.

Jiravanichpaisal, P., K. Söderhäll and I. Söderhäll. 2006. Characterization of white spot syndrome virus replication in *in vitro*-cultured haematopoietic stem cells of freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. **J. Gen. Virol.** 87: 847-854.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kanchanaphum, P., C. Wongteerasupaya, N. Sitidilokratana, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul and T.W. Flegel. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.** 34: 1-7.

Karunasagar, I., S.K. Otta and I. Karunasagar. 1997. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. **Aquaculture** 153: 9-13.

Kasornchandra, J., S. Boonyaratpalin and T. Itami. 1998. Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: microscopic observation and polymerase chain reaction. **Aquaculture** 164: 243-251.

Khoa, L.V., K. Hatai and T. Aoki. 2004. *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, with black gill disease cultured in Vietnam. **J. Fish Dis.** 27: 507-515.

Kiatpathomchai, W., V. Boonsaeng, A. Tassanakajon, C. Wongteerasupaya, S. Jitrapakdee and S. Panyim. 2001. A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.** 47: 235-239.

Kobayashi, M., S. Inagaki and S. Kawase. 1981. Effect of high temperature on the development of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm *Bombyx mori*. **J. Invertebr. Pathol.** 38: 386-394.

Kono, T., R. Savan, M. Sakai and T. Itami. 2004. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. **J. Virol. Methods** 115: 59-65.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kou, G.H., C.H. Chen, C.H. Ho and C.F. Lo. 1997. White spot syndrome virus (WSSV) in wild-caught black tiger shrimp: WSSV tissue tropism with a special emphasis on reproductive organs, pp. 262-263. *In* **World Aquaculture'97 Book of Abstracts**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Kou, G.H., S.E. Peng, Y.L. Chiu and C.F. Lo. 1998. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs, pp. 267-271. *In* T.W. Flegel, ed. **Advances in Shrimp Biotechnology.** National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

Le Moullac, G. and P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. **Aquaculture** 191: 121-131.

Lester, L. J. and J. R. Pante. 1991. Penaeid temperature and salinity response, pp. 515-534. *In* A. W. Fast and L. J. Lester, eds. **Marine Shrimp Culture Principle and Practices.** Elsevier Amsterdam.

Leu, J.H., J.M. Tsai, H.C. Wang, A.H. Wang, C.H. Wang, G.H. Kou and C.F. Lo. 2005. The unique stacked rings in the nucleocapsid of the white spot syndrome virus virion are formed by the major structural protein VP664, the largest viral structural protein ever found**. J. Virol.** 79: 140-149.

Lewis, D.H., J.K. Leong and C. Mock. 1982. Aggregation of penaeid shrimp larvae due to microbial epibionts. **Aquaculture** 27: 335-341.

Li, L., X. Xie and F. Yang. 2005. Identification and characterization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein VP31. **Virology** 340: 125-132.

Li, H., Y. Zhu, X. Xie and F. Yang. 2006a. Identification of a novel envelope protein (VP187) gene from shrimp white spot syndrome virus. **Virus. Res.** 115: 76-84.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Li, L., S. Lin and F. Yang. 2006b. Characterization of an envelope protein (VP110) of white spot syndrome virus. **J. Gen. Virol.** 87: 1909-1915.

Li, L.J., J.F. Yuan, C.A. Cai, W.G. Gu and Z.L. Shi. 2006c. Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish. **Arch. Virol.** 151: 1309-1317.

Lightner, D.V. 1977. Shrimp diseases, pp. 10-77. *In* C.J. Sindermann, ed. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture, Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Vol. 6**. Elsevier, New York.

Lightner, D.V. 1983**.** Disease of culture penaeid shrimp, pp. 289-485. *In* J**.** P. McVey, ed. **Handbook of Mariculture. Vol. I, Crustacean Aquaculture**. CRC Press Inc., Boca Raton. FL.

Lightner, D.V. 1985. A review of the diseases of cultured penaeid shrimp and prawns with emphasis on recent discoveries and development, pp. 79-103. *In* Y. Taki, J.H. Primavera and J.A. Llobrera, eds. **Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawn/Shrimps**, Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, lloilo, Philippines.

Lightner, D.V. 1988. Disease of culture penaeid shrimp and prawn, pp. 8-127. *In* C. J. Sindermann and D. V. Lightner, eds. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. 2 nd ed.**, Elsevier, New York.

Lightner, D.V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp, pp. 393-486. *In* J. P. McVey, ed. **Handbook of Mariculture. Vol. I. 2 nd ed., Crustacean Aquaculture**. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lightner, D. V. 1996. **A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Lightner, D.V. and R.M. Redman. 1994. An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. **Aquaculture** 122: 9-18.

Lightner, D.V. and R.M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture** 164: 201-220.

Lightner, D.V., R.M. Redman and J.R. Bonami. 1992. Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). **Dis. Aquat. Org.** 13: 235-239.

Lightner, D.V., R.M. Redman, L.M. Nunan, L.L. Mohney, J.L. Mari and B.T. Poulos. 1997a. Occurrence of WSSV, YHV and TSV in Texas shrimp farms in 1995: Possible mechanisms for introduction, p. 288. *In* **World Aquaculture' 97 Book of Abstracts**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Lightner, D.V., R. M. Redman, B. T. Poulos, L.M. Nunan, J. L. Mari and K. W. Hasson. 1997b. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. **Rev. Sci. Technol. Off. Int. Epiz.** 16: 146-160.

Lightner, D.V., K.W. Hasson, B.L. White and R.M. Redman. 1998. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. **J. Aquat. Anim. Health** 10: 271-281.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lightner, D.V.,C.R. Pantoja, B.T. Poulos, K.F.J. Tang, R.M. Redman, T. Andreas and J.R. Bonami. 2004a. Infectious myonecrosis (IMN): A new virus disease of *Litopenaeus vannamei*, p. 353. *In* **Aquaculture 2004 Book of Abstracts**. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA.

Lightner, D.V., C.R. Pantoja, B.T. Poulos, K.F.J. Tang, R.M. Redman, T.P.D. Andrade and J.R. Bonami. 2004b. Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. **Glob. Aquac. Advocate.** 7: 85.

Lightner, D.V., R.M. Redman, B.T. Poulos, , K.F.J. Tang-Nelson, C.R. Pantoja, L.M. Nunan, S.A. Navarro, B.L. Noble and L.L. Mohney. 2005. The current shrimp disease situation in the Americas with emphasis on WSSV, TSV, NHP-B and the emerging disease IMN. *In* **Special Presentation on Biosecurity**. Oceanic Institute, Waimanalo, Hawaii.

Limsuwan, C. 1991. **Handbook for Cultivation of Black Tiger Prawns**. Tansetakit, Bangkok, Thailand.

Limsuwan, C. 2003. Diseases of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Thailand. **AAHRI**. 12: 1-4.

Liu, W., Y.T. Wang, D.S. Tian, Z.C. Yin and J. Kwang. 2002. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). **Dis. Aquat. Org.** 49: 11-18.

Liu, Y., J. Wu, J. Song, J. Sivaraman and C.L. Hew. 2006. Identification of a novel nonstructural protein, VP9, from white spot syndrome virus: its structure reveals a ferredoxin fold with specific metal binding sites. **J. Virol.** 80: 10419-10427.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lo, C.F., J.H. Leu, C.H. Ho, C.H. Chen, S.E. Peng, Y.T. Chen, C.M. Chou, P.Y. Yeh, C.J. Huang, H.Y. Chou, C.H. Wang and G.H. Kou. 1996a. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. **Dis. Aquat. Org.** 25: 133-141.

Lo, C.F., C.H. Ho, S.E. Peng, C.H. Chen, H.C. Hsu, Y.L. Chiu, C.F. Chang, K.F. Liu, M.S. Su, C.H. Wang and G.H. Kou. 1996b. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Dis. Aquat. Org.** 27: 215-225.

Lo, C.F., C.H. Ho, C.H. Chen, K.F. Liu, Y.L. Chiu, P.Y. Yeh, S.E. Peng, H.C. Hsu, H.C. Liu, C.F. Chang, M.S. Su, C.H. Wang and G.H. Kou. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. **Dis. Aquat. Org.** 30: 53-72.

Lo, C.F., Y.S. Chang, C.T. Cheng and G.H. Kou. 1998. PCR monitoring of cultured shrimp for white spot syndrome virus (WSSV) infection in growout ponds, pp. 281-286. *In* T.W. Flegel, ed. **Advances in Shrimp Biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

Lo, C.F., H.C. Hsu, M.F. Tsai, C.H. Ho, S.E. Peng, G.H. Kou and D.V. Lightner. 1999. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. **Dis. Aquat. Org.** 35: 175-185.

Loy, J.K., F.E. Dewhirst, W. Weber, P.F. Frelier, T.L. Garbar, S.I. Tasca and J.W. Templeton. 1996. Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3439-3445.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lu, Y., L.M. Tapay, J.A. Brock and P.C. Loh. 1994. Infection of the yellow head baculovirus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). **J. Fish Dis.** 17: 649-656.

Lu, Y., L.M. Tapay, P.C. Loh, R.B. Gose and J.A. Brock. 1997. The pathogenicity of a baculo-like virus isolated from diseased penaeid shrimp obtained from China for cultured penaeid species in Hawaii**.** **Aquac. Inter.** 5: 277-282.

Lua, L.H. and S. Reid. 2000. Virus morphogenesis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* serum-free suspension culture. **J. Gen. Virol.** 81: 2531-2543.

Madenjian, C.P. 1990. Patterm of oxygen production and consumption in intensively managed shrimp ponds. **Aquac. Eng.** 21: 407-417.

Madrid, R.M. 2005. A crise econômica da carcinicultura. **Panorama da Aquicultura** 90: 22-29.

Magbanua, F.O., K.T. Natividad, V.P. Migo, C.G. Alfafara, F.O. de la Peña, R.O. Miranda, J.D. Albaladejo, E.C.B. Nadala, P.C. Loh and L.M. Tapay. 2000. White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. **Dis. Aquat. Org.** 42: 77-82.

Makesh, M., A. Koteeswaran, N.D.J. Chandaran, B.M. Manohar and V. Ramasamy. 2006. Development of monoclonal antibodies against VP28 of WSSV and its application to detect WSSV using immunocomb. **Aquaculture** 261: 64-71.

Mari, J., J.R. Bonami and D.V. Lightner. 1993. Partial cloning of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. **J. Gen. Virol.** 74: 2637-2643.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Marks, H. 2005. **Genomics and Transcriptomics of White Spot Syndrome Virus**. Ph.D. Thesis, Wageningen University.

Mayo, M.A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Arch. Virol**. 147: 1655-1663.

Mazid, M.A. and A.N.H. Banu. 2002. An overview of the social and economic impact and management of fish and shrimp disease in Bangladesh, with an emphasis on small-scale aquaculture, pp. 21-25. *In* J.R. Arthur, M.J. Phillips, R.P. Subasinghe, M. Bondad-Reantaso and I.H. Macrae, eds. **Primary Aquatic Animal Health Care in Rural, Small-Scale Aquaculture Development**. FAO Fisheries Technical Paper 406, FAO, Rome, Italy.

Mohan, C.V., P.M. Sudha, K.M. Shankar and A. Hegde. 1997. Vertical transmission of white spot baculovirus in shrimps-a possibility? **Curr. Sci.** 73:109-110.

Mohan, C.V., K.M. Shankar, S. Kulkarni and P.M. Sudha. 1998. Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. **Dis. Aquat. Org**. 34: 9-12.

Montgomery-Brock, D.R., R.Y. Shimojo and R.A. Bullis. 2002. The reduced impact of Taura syndrome on *Litopenaeus vannamei* held under hyperthermic conditions, pp. 4-7. *In* **Center for Tropical and Subtropical Aquaculture (CTSA).** Aqua Tips, vol. 13.

Montgomery-Brock, D.R., R.Y. Shimojo, K. Cochran, L. Bouthillette, B.T. Poulos, S. Navarro and D.V. Lightner. 2004. Significant reduction in the replication rate of Taura syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* held in hyperthermic conditions, p. 409. *In* **World Aquaculture Society Conference Book of Abstracts**, World Aquaculture Society, Honolulu, Hawaii.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Montgomery-Brock, D.R., A.G.J. Tacon, B.T. Poulos and D.V. Lightner. 2007. Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. **Aquaculture** 265: 41-48.

Musthaq, S.S., R. Sudhakaran, V.P.I. Ahmed, G. Balasubramanian and A.S. Sahul Hameed. 2006. Variability in the tandem repetitive DNA sequences of white spot syndrome virus (WSSV) genome and suitability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India. **Aquaculture** 256: 34-41.

Nadala, E.C.B. and P.C. Loh. 1998. A comparative study of three different isolates of white spot virus. **Dis. Aquat. Org.** 33: 231-234.

Nadala, E.C.B., L.M. Tapay, S. Cao and P.C. Loh. 1997. Detection of yellow head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the western blot technique. **J. Virol. Methods** 69: 39-44.

Nash, G.L., A. Akarajamorn and B. Withyachumnarnkul. 1995. Histology and rapid haemocytic diagnosis of yellow-head disease in *Penaeus monodon*, pp. 89-98. *In* M. Shariff, R. P. Subasinghe and J. R. Arthur, eds. **Diseases in Asian Aquaculture. Vol. II. Fish Health Section**, Asian Fisheries Society, Manila.

Nunan, L.M., D.V. Lightner, M.A. Oduori and G.E. Gasparich. 2005. *Spiroplasma penaei sp nov*., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 2317-2322.

Nunes, A.J.P., P. Cunha-Martins and T.C. Vasconselos-Gesteira. 2004. Carcinicultura ameacada. **Rev. Panoram. Aquic.** 83: 37-51

O'Brien, V. 1998. Viruses and apoptosis. **J. Gen. Virol.** 79: 1833-1845.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

OIE. 2009. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2009**. World Organization for Animal Health. Paris.

Otta, S.K., S.B. Joseph, A. Chakraborty, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 1999. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. **Dis. Aquat. Org.** 38: 67-70.

Park, J.H., Y.S. Lee, S. Lee and Y. Lee. 1998. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. **Dis. Aquat. Org.** 34: 71-75.

Ponce-Palafox, J., C.A. Martinez-Palacios and L.G. Ross. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. **Aquaculture** 157: 107-115.

Poulos, B.T., C.R. Pantoja, D. Bradley-Dunlop, J. Aguilar and D.V. Lightner. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Org.** 47: 13-23.

Poulos, B.T., K.F.J. Tang, C.R. Pantoja, J.R. Bonami and D.V. Lightner. 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **J. Gen. Virol.** 87: 987-996.

Ramírez-Douriet, C., R. De Silva-Dávila, J. Méndez-Lozano, D. Escobedo-Urias, I. Leyva-Arana and M. López-Meyer. 2005. White spot syndrome virus detection in zooplankton of coastal lagoons and shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico. *In* **The American Fisheries Society 135th Annual Meeting of the American Fisheries Society,** poster. Anchorage, Alaska.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rahman, M. M. 2007. **Differences in Virulence between White Spot Syndrome Virus (WSSV) Isolates and Testing of Some Control Strategies in WSSV Infected Shrimp**. Ph. D. Thesis, Ghent University.

Rahman, M. M., C. M. Escobedo-Bonilla, M. Corteel, J. J. Dantas-Lima, M. Wille, V. Alday-Sanz, M. B. Pensaert, P. Sorgeloos and H. J. Nauwynck. 2006. Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** 261: 842-849.

Rahman, M.M., M. Corteel, J.J. Dantas-Lima, M. Wille, V. Alday-Sanz, M.B. Pensaert, P. Sorgeloos and H.J. Nauwynck. 2007a. Impact of daily fluctuations of optimum (27 °C) and high water temperature (33 °C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). **Aquaculture** 269: 107-113.

Rahman, M. M., M. Corteel, M. Wille, V. Alday-Sanz, M. B. Pensaert, P. Sorgeloos and H. J. Nauwynck. 2007b. The effect of raising water temperature to 33 °C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). **Aquaculture** 272: 240-245.

Rajan, P.R., P. Ramasamy, V. Purushothaman and G.P. Brennan. 2000. White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp *Penaeus monodon* and *P. indicus*. **Aquaculture** 184: 31-44.

Rajendran, K.V., K.K. Vijayan, T.C. Santiago and R.M. Krol. 1999. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crayfish and lobsters from India. **J. Fish Dis.** 22: 183-191.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Reyes, A., M. Salazar and C. Granja. 2007. Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus infected *Litopenaeus vannamei*. **Dev. Comp. Immunol.** 31: 23-29.

Rodríguez, J., B. Bayot, Y. Amano, F. Panchana, I. de Blas, V. Alday and J. Calderón. 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. **J. Fish Dis.** 26: 439-450.

Rosenberry B. 1993. **World Shrimp Farming 1993**. Aquaculture Digest, December, San Diego, CA.

Rosenberry, B. 1996. **World Shrimp Farming 1996**. Shrimp News International, San Diego, CA.

Rosenberry, B. 2001. **World Shrimp Farming 2000.** Shrimp News International, San Diego, CA.

Ruiz-Fernández, A.C. and F. Páez-Osuna. 2004. Comparative survey of the influent and effluent water quality of shrimp ponds on Mexican farms. **Water Environ. Res.** 76: 5-14.

Sahtout, A.H., M.D. Hassan and M. Shariff. 2001. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). **Dis. Aquat. Org**. 44: 155-159.

Sahul Hameed, A.S., M. Anilkumar, M.L.S. Raj and K. Jayaraman. 1998. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. **Aquaculture** 160: 31-45.

Sahul Hameed, A.S., M.X. Charles and M. Anilkumar. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. **Aquaculture** 183: 207-213.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sahul Hameed, A.S., K. Yoganandhan, S. Sathish, M. Rasheed, V. Murugan and K. Jayaraman. 2001. White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomus* and *P. pulvinata*). **Aquaculture** 201: 179-186.

Sahul Hameed, A.S., B.L.M. Murthi, M. Rasheed, S. Sathish, K. Yoganandhan, V. Murugan and K. Jayaraman. 2002. An investigation of *Artemia* as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. **Aquaculture** 204: 1-10.

Sahul Hameed, A.S., G. Balasubramanian, S. Syed Musthaq and K. Yoganandhan. 2003. Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). **Dis. Aquat. Org.** 57: 157-161.

Samocha, T.M., A.D. Davis, A.L. Lawrence, C.R. Collins, and P. Van Wyk. 2001. Intensive and super-intensive production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in greenhouse-enclosed raceway systems, p. 573. *In* **Book of Abstract, Aquaculture 2001**, Lake Buena Vista, FL.

Sarathi, M., A.N. Basha, M. Ravi, C. Venkatesan, B.S. Kumar and A.S. Sahul Hameed. 2008. Clearance of white spot syndrome virus (WSSV) and immunological changes in experimentally WSSV-injected *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish Shellfish Immunol.** 25: 222-230.

Senapin, S., K. Phewsaiya, M. Briggs and T. W. Flegel. 2007. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture** 266: 32-38.

Shekhar, M.S., I.S. Azad and P. Ravichandran. 2006. Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*. **Aquaculture** 261: 1122-1127.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Shi, Z., C. Huang, J. Zhang, D. Chen and J.R. Bonami. 2000. White spot syndrome virus (WSSV) experimental infection of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. **J. Fish Dis.** 23: 285-288.

Shikata, M., Y. Sano, Y. Hashimoto and T. Matsumoto. 1998. Isolation and characterization of a temperature-sensitive mutant of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus for a putative RNA polymerase gene. **J. Gen. Virol.** 79: 2071-2078.

Sindermann, C.J. 1990. **Principal Disease of Marine Fish and Shellfish. Vol. 2. 2nd ed.** Academic Press, New York.

Sithigorngul, P., S. Rukpratanporn, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul and P. Menasveta. 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.** 49: 71-76

Sithigorngul, W., S. Rukpratanporn, N. Pecharaburanin, S. Longyant , P. Chaivisuthangkura and P. Sithigorngul. 2006. A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. **Dis. Aquat. Org.** 72: 101-106.

Sittidilokratna, N., R.A.J. Hodgson, J.A. Cowley, S. Jitrapakdee, V. Boonsaeng, S. Panyim and P.J. Walker. 2002. The complete ORF1b-gene sequence indicates yellow head virus is an invertebrate nidovirus. **Dis. Aquat. Org.** 50: 87-93.

Smith, L.L. and A.L. Lawrence. 1990. Feasibility of penaeid shrimp culture in inland saline ground water-fed pond. **Tex. J. Sci.** 42(1): 3-12.

Snieszko, S.F. 1973. Diseases of fishes and their control in the U.S., pp. 55-66. *In* **The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report**. Jansen, London.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sritunyalucksana, K., J. Srisala, K. McColl, L. Nielsen and T.W. Flegel. 2006. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. **Aquaculture** 255: 95-104.

Sudha, P.M., C.V. Mohan , K.M. Shankar and A. Hegde. 1998. Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. **Aquaculture** 167: 95-101

Supamataya, K., R.W. Hoffmann, S. Boonyaratpalin and P. Kanchanaphum. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. **Dis. Aquat. Org.** 32: 79-85.

Tan, L.T., S. Soon, K.L. Lee, M. Shariff, M.D. Hassan and A.R. Omar. 2001. Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* Fabricus using competitive polymerase chain reaction. **J. Fish. Dis.** 24: 315-323.

Tang, K.F.J. and D.V. Lightner. 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. **Aquaculture** 189: 11-21.

Tapay, L.M., E.C.B. Nadala and P.C. Loh. 1999. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. **J. Virol. Methods** 82: 39-43.

Thongrak, S., T. Prato, S. Chiayvareesajja and W. Kurtz. 1997. Economic and water quality evaluation of intensive shrimp production systems in Thailand. **Agric. Syst.** 53: 121-141.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Tian, X., S. Dong, F. Wang and L. Wu. 2004. The effects of temperature changes on the oxygen consumption of juvenile Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* Osbeck**. J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 310: 59-72.

Tsai, J.M., H.C. Wang, J.H. Leu, H.H. Hsiao, A.H. Wang, G.H. Kou and C.F. Lo. 2004. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. **J. Virol.** 78: 11360-11370.

Tsai, J.M., H.C. Wang, J.H. Leu, A.H. Wang, Y. Zhuang, P.J. Walker, G.H. Kou and C.F. Lo. 2006. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. **J. Virol**. 80: 3021-3029.

Tucker, C.S. and C.E. Boyd. 1985. Water quality, pp. 135-227. *In* C. S. Tucker, ed. **Channel Catfish Culture**. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Netherlands.

van Hulten, M.C.W. and J.M. Vlak. 2001. Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus. **Virus Genes** 22: 201-207.

van Hulten, M.C.W., M. Westenberg, S.D. Goodall and J.M. Vlak. 2000. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. **Virology** 266: 227-36.

van Hulten, M.C.W., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R. Klein-Langhorst and J.M. Vlak. 2001a. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology** 286: 7-22.

van Hulten, M.C.W., J. Witteveldt, M. Snippe and J.M. Vlak. 2001b. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. **Virology** 285: 228-233.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

van Hulten, M.C.W., M. Reijns, A.M. Vermeesch, F. Zandbergen and J.M. Vlak. 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. **J. Gen. Virol.** 83: 257-265.

Venegas, C.A., L. Nonaka, K. Mushiake, T. Nishizawa and K. Muroga. 2000. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). **Dis. Aquat. Org.** 42: 83-89.

Vidal, O.M., C.B. Granja, L.F. Aranguren, J.A. Brock and M. Salazar. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. **J. World Aquac. Soc.** 32: 364-372.

Vijayan, K.K. and A.D. Diwan. 1995. Influence of temperature, salinity, pH and light on molting and growth in the Indian white prawn *Penaeus indicus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) under laboratory conditions. **Asian Fish. Sci.** 8: 63-72.

Vijayan, K.K., V. Stalin Raj, C.P. Balasubramanian, S.V. Alavandi, V. Thillai Sekhar and T.C. Santiago. 2005. Polychaete worms-a vector for white spot syndrome virus (WSSV). **Dis. Aquat. Org.** 63: 107-111.

Wahab, M.A., A. Bergheim and B. Braaten. 2003. Water quality and partial mass budget in extensive shrimp ponds in Bangladesh. **Aquaculture** 218: 413-423.

Walker, P.J., J.A. Cowley, K.M. Spann, R.A.J. Hodgson, M. Hall and B. Withyachumnarnkul. 2001. Yellow head complex viruses: transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific region, pp. 292-302. *In* C.L. Browdy and D.E. Jory, eds. **The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture**, Aquaculture 2001, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wang, Y.C., C.F. Lo, P.S. Chang and G.H. Kou. 1998a. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. **Aquaculture** 164: 221-231.

Wang, C.S., Y.J. Tsai and S.N. Chen. 1998b. Detection of white spot disease virus (WSDV) infection in shrimp using *in situ* hybridization. **J. Invert. Pathol.** 72: 170-173.

Wang, Q., B.T. Poulos and D.V. Lightner. 2000. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. **Arch. Virol**. 145: 263-274.

Wang, Y. B., Z. R. Xu and M. S. Xia. 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. **Fish. Sci.** 71: 1036-1041.

Wang, Y.G., M.D. Hassan, M. Shariff, S.M. Zamri and X. Chen. 1999a. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. **Dis. Aquat. Org.** 39: 1-11.

Wang, Q., B.L. White, R.M. Redman and D.V. Lightner. 1999b. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. **Aquaculture** 170: 179-194.

Wang, C.H., C.F. Lo, J.H. Leu, C.M. Chou, P.Y. Yeh, H.Y. Chou, M.C. Tung, C.F. Chang, M.S. Su and G.H. Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.** 23: 239-242.

Wedemeyer, G.A., P.M. Fred and L. Smith. 1976. **Diseases of Fish**, Book V. T.F.H. Publication, Inc. Ltd., England.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wickins, J. F. and D.O'C. Lee. 2002. **Crustacean Farming Ranching and Culture.** Blackwell Science Ltd, Oxford.

Withyachumnarnkul, B. 1999. Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). **Dis. Aquat. Org.** 39: 21-27.

Withyachumnarnkul, B., V. Boonsaeng, R. Chomsoong, T.W. Flegel, S. Muangsin and G.L. Nash. 2003. Seasonal variation in white spot syndrome virus-positive samples in broodstock and post-larvae of *Penaeus monodon* in Thailand. **Dis. Aquat. Org.** 53: 167-171.

Witteveldt, J., J.M. Vlak and M.C.W. van Hulten. 2006. Increased tolerance of *Litopenaeus vannamei* to white spot syndrome virus (WSSV) infection after oral application of the viral envelope protein VP28. **Dis. Aquat. Org.** 70: 167-170.

Wongteerasupaya, C., J.E. Vickers, S. Sriurairatana, G.L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul and T. W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Dis Aquat. Org**. 21: 69-77.

Wongteerasupaya, C., S. Wongwisansri, V. Boonsaeng, S. Panyim, P. Pratanpipat, G.L. Nash, B. Withyachumnarnkul and T.W. Flegel. 1996. DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. **Aquaculture** 143: 23-32.

Wu, W., L. Wang and X. Zhang. 2005. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. **Virology** 332: 578-583.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wu, J.L., A. Namikoshi, T. Nishizawa, K. Mushiake, K. Teruya and K. Muroga. 2001. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. **Dis. Aquat. Org.** 47: 129-135.

Wyban, J., W. A. Walsh and D. M. Godin. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture** 138: 267-279.

Xiao, N., X. Zhang, L. Dai, L. Yuan, Y. Wang, M. Zhang, T. Xu and H. Dai. 2006. Isolation and identification of a novel WSSV nucleocapsid protein by cDNA phage display using an scFv antibody. **J. Virol. Methods** 137: 272-279.

Xie, X. and F. Yang. 2006. White spot syndrome virus VP24 interacts with VP28 and is involved in virus infection. **J. Gen. Virol.** 87: 1903-1908.

Xie, X., L. Xu and F. Yang. 2006. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. **J. Virol.** 80: 10615-10623.

Yan, D.C., S.L. Dong, J. Huang, X.M. Yu and M.Y. Feng. 2004. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. **Dis. Aquat. Org.** 59: 69-73.

Yang, F., J. He, X. Lin, Q. Li, D. Pan, X. Zhang and X. Xu. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. **J. Virol.** 75: 11811-11820.

Yi, G., Z. Wang, Y. Qi, L. Yao, J. Qian and L. Hu, 2004. VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. **J. Biochem. Mol. Biol.** 37: 726-734.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Yoganandhan, K., R.B. Narayanan and A.S. Sahul Hameed. 2003. Larvae and early post-larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius) experimentally infected with white spot syndrome virus (WSSV) show no significant mortality. **J. Fish Dis**. 26: 385-391.

Yoganandhan, K., S.S. Musthaq, R.B. Narayanan and A.S. Sahul Hameed. 2004. Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. **J. Fish. Dis.** 27: 517-522.

You, Z., E.C.B. Nadala, J. Yang, M.C.W. van Hulten and P.C. Loh. 2002. Production of polyclonal antiserum specific to the 27.5 kDa envelope protein of white spot syndrome virus. **Dis. Aquat. Org.** 51: 77-80.

Zhan, W.B., Y.H. Wang, J.L. Fryer, K.K. Yu, H. Fukuda and Q.X. Meng. 1998. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. **J. Aquat. Anim. Health** 10: 405-410.

Zhang, X., C. Huang, X. Xu and C.L. Hew. 2002. Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. **J. Gen. Virol.** 83: 1069-1074.

Zhu, Y., Q. Ding and F. Yang. 2007. Characterization of a homologous-region-binding protein from white spot syndrome virus by phage display. **Virus Res.** 125: 145-152.

Zhu, Y., X. Xie and F.Yang. 2005. Transcription and identification of a novel envelope protein (VP124) gene of shrimp white spot syndrome virus. **Virus Res**. 113: 100-106.

Zhu, Y.B., J.Y. Li and F. Yang. 2006. Identification of an envelope protein (VP39) gene from shrimp white spot syndrome virus. **Arch. Virol.** 151: 71-82.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

1. วิธีการ fixed ตัวอย่าง

นำตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมแช่ในน้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative) โดยให้น้ำยามีปริมาตรประมาณ 10-20 เท่าของปริมาตรเนื้อเยื่อ ซึ่งวิธีการ fixed จะขึ้นอยู่กับขนาดของกุ้ง ดังนี้

1.1 กุ้งระยะโพสลาร์วาจะเก็บรักษาสภาพทั้งตัวได้ในน้ำยา Davidson's fixative

1.2 กุ้งขนาด 5-6 กรัม ฉีดด้วยน้ำยา Davidson's fixative เข้าไปในช่องปาก ส่วนหัวด้านหลังใต้เปลือก ตับและตับอ่อน ส่วนท้องบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ถึงขาเดินคู่สุดท้ายและลำตัวทั้งด้านท้องและด้านหลังให้ทั่ว ตัดเปลือกกุ้งตามแนวยาวตั้งแต่เปลือกช่วงท้องปล้องที่ 6 จนถึงส่วนหัว

หลังจากแช่ตัวอย่างในน้ำยา Davidson's fixative ปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเมื่อครบกำหนดย้ายกุ้งตัวอย่างไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ (เอทานอล) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (%) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ตัดชิ้นเนื้อกุ้งบริเวณที่ต้องการศึกษา

2. การเตรียมสารเคมีเพื่อการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

2.1 น้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative)

เอทานอล 95 %	30.0	มิลลิลิตร
ฟอร์มาลินเข้มข้น 100 %	20.0	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30.0	มิลลิลิตร

2.2 Hematoxylin และ Eosin (H&E)

2.2.1 การเตรียม Mayer's hematoxylin

hematoxylin crystals	1.0	กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

sodium iodate	0.8	กรัม
potassium or ammonium alum	200.0	กรัม
citric acid	1.0	กรัม
chloral hydrate	200.0	กรัม
น้ำกลั่น	2,000.0	มิลลิลิตร

ละลาย alum ในน้ำกลั่น แล้วเติม hematoxylin ลงไป คนให้ละลาย จึงเติม sodium iodate ผสมให้เข้ากัน เติม citric acid และ chloral hydrate คนให้เข้ากัน เขย่าจนสารผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้สีแดงอมม่วง (reddish violet) ควรทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้

2.2.2 การเตรียม eosin

eosin Y, CI 45380	0.9	กรัม
35% ethyl alcohol	300.0	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	1.5	มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน แล้วเติม glacial acetic acid 2-3 หยดก่อนใช้

3. วิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา

3.1 การเตรียมชิ้นเนื้อในกุ้งขนาดเล็กจะใช้กุ้งทั้งตัว ห่อด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ ส่วนในกุ้งขนาดใหญ่จะตัดเฉพาะส่วนที่ต้องศึกษา ได้แก่ อวัยวะในระบบห่อหุ้มร่างกาย ระบบกล้ามเนื้อ ระบบหมุนเวียนเลือด ระบบหายใจ ระบบย่อยอาหาร โดยตัดให้มีความหนาของชิ้นเนื้อไม่เกิน 4 มิลลิเมตร

3.2 นำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างมาบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration) clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processor ตามวิธีมาตรฐานของ Bell and Lightner (1988) ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	50% propanol	30-60
2	70%propanol	30-60
3	95% propanol I	30-60
4	95% propanol II	30-60
5	95% propanol III	30-60
6	100% propanol I	30-60
7	100% propanol II	30-60
8	100% propanol III	30-60
9	Histosolve I (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Thermo Shandon)	60
10	histosolve II	90
11	paraplast I	90
12	paraplast II	120

3.3 จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างวางในแม่พิมพ์ (mold) เพื่อทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน โดยเครื่อง paraffin embedding (Shandon Histocentre 2)

3.4 นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้ มาตัดแต่งหน้าให้เรียบ

3.5 นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome รุ่น Leica RM-2145) ให้มีความหนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร ใช้ปากคีบปลายแบนคีบเนื้อเยื่อที่ตัดได้วางลงบนแผ่นสไลด์ ใช้หลอดหยดเอทานอล 1.5 % ลงบนแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อที่ตัดแล้ว หลังจากนั้นนำไปลอยบนน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 35-45 องศาเซลเซียส เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์แล้วช้อนด้วยแผ่นสไลด์ นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (warmer plate) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมงถึงตลอดคืน

3.6 นำเนื้อเยื่อที่ติดสไลด์ดีแล้วนำมาย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธี Bell and Lightner (1988) ตามขั้นตอน ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	xylene	5
2	xylene	4
3	100 % alcohol	1
4	100 % alcohol	1
5	95 % alcohol	1
6	95 % alcohol	1
7	ล้างน้ำ	2
8	Hematoxylin	2
9	ล้างน้ำ	2
10	Blueing Solution (Dilute)	จุ่ม10-20 ครั้ง
11	ล้างน้ำ	1
12	95 % alcohol	จุ่ม10-20 ครั้ง
13	Eosin	1
14	95 % alcohol	0.15
15	95 % alcohol	0.15
16	100 % alcohol	1
17	100 % alcohol	1
18	xylene	1
19	xylene	2
20	xylene	2

3.7 ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) โดยใช้น้ำยา permount

3.8 นำสไลด์ถาวรที่ได้มาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง (light microscope) พร้อมถ่ายภาพบันทึกไว้

หมายเหตุ นิวเคลียส-ติดสีน้ำเงิน

ไซโทพลาสซึม-ติดสีชมพูถึงแดง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษา immunohistochemistry (IHC)

1. วิธีการ fixed ตัวอย่าง

วิธีเดียวกันกับการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

2. การเตรียมสารเคมีเพื่อการศึกษา immunohistochemistry

2.1 น้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative)

เอทานอล 95 %	30.0	มิลลิลิตร
ฟอร์มาลินเข้มข้น 100 %	20.0	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30.0	มิลลิลิตร

2.2 สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

เจลาติน	1.0	กรัม
โครเมียมโพแทสเซียมซัลเฟต ($CrK(SO_4)_2.12H_2O$)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

2.3 Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.00	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.20	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.20	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.00	มิลลิลิตร

2.4 สารละลาย calf serum 10% ($P1^+$)

Calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5 สี eosin Y 0.2% ในเอทานอล 95%

สี eosin Y	0.2	กรัม
เอทานอล 95%	100.0	มิลลิลิตร

3. การตรวจการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี immunohistochemistry และวิธี indirect immunoperoxidase (Sithigorngul *et al.*, 2002)

3.1 การเตรียมชิ้นเนื้อในกุ้งขนาดเล็กจะใช้กุ้งทั้งตัว ห่อด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ ส่วนในกุ้งขนาดใหญ่จะตัดเฉพาะส่วนที่ต้องศึกษา ได้แก่ อวัยวะในระบบห่อหุ้มร่างกาย ระบบกล้ามเนื้อ ระบบหมุนเวียนเลือด ระบบหายใจ ระบบย่อยอาหาร โดยตัดให้มีความหนาของชิ้นเนื้อไม่เกิน 4 มิลลิเมตร

3.2 นำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างมาบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration), clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processor ตามวิธีมาตรฐานของ Bell and Lightner (1988) ดังนี้คือ

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	50% propanol	30-60
2	70%propanol	30-60
3	95% propanol I	30-60
4	95% propanol II	30-60
5	95% propanol III	30-60
6	100% propanol I	30-60
7	100% propanol II	30-60
8	100% propanol III	30-60
9	Histosolve I (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Thermo Shandon)	60
10	histosolve II	90
11	paraplast I	90
12	paraplast II	120

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างวางในแม่พิมพ์ (mold) เพื่อทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน โดยเครื่อง paraffin embedding (Shandon Histocentre 2)

3.4 นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้ มาตัดแต่งหน้าให้เรียบ

3.5 นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome รุ่น Leica RM-2145) ให้มีความหนาประมาณ 8 ไมโครเมตร ใช้ปากคีบปลายแบนคีบเนื้อเยื่อที่ตัดได้วางลงบนแผ่นสไลด์ ใช้หลอดหยดเอทานอล 1.5 % ลงบนแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อที่ตัดแล้ว หลังจากนั้นนำไปลอยบนน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 35-45 องศาเซลเซียส เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์แล้วช้อนด้วยแผ่นสไลด์ที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (warmer plate) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมงถึงตลอดคืน

3.6 นำสไลด์ที่มีเซคชันมาละลายเอาพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffization) โดยวางสไลด์ลงบนตะกร้า (slide basket) แล้วนำไปจุ่มในโถแก้วที่บรรจุไซลีน และดึงนำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กัน ดังนี้

ขั้นตอนที่	**สารละลาย**	**เวลา (นาที)**
1	xylene	5-10
2	xylene	5
3	xylene	5
4	xylene:butanol (1:1)	5
5	butanol	5
6	95 % alcohol	5
7	90 % alcohol	5
8	80 % alcohol	5
9	70 % alcohol	5
10	ล้างน้ำกลั่น	5
11	10 % formalin	10
12	น้ำกลั่น	5
13	น้ำกลั่น	5
14	น้ำกลั่น	5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
15	PBS	5
16	PBS	5
17	PBS	5

3.7 การป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะ (blocking) โดยหยดสารละลาย P1$^+$ ให้คลุมแต่ละเนื้อเยื่อด้วยไมโครปิเปต บ่มในที่ชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3.8 ดูดสารละลาย P1$^+$ ในแต่ละเนื้อเยื่อออกการใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ VP28 (W29; Chaivisuthangkura *et al.*, 2004) ของ WSSV ที่เป็นแอนติบอดีตัวแรกให้คลุมแต่ละเนื้อเยื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.9 ล้างแอนติบอดีตัวแรกออกจากเนื้อเยื่อโดยการจุ่มลงในน้ำกลั่น 3 ครั้ง หลังจากนั้นแช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3.10 ดูด PBS ในแต่ละเนื้อเยื่อออก หยดแอนติบอดีตัวที่สอง คือ goat anti mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจาง 1:1000 ในสารละลาย P1$^+$ ลงในทุกเซคชัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.11 ล้างแอนติบอดีตัวที่สองออกจากเนื้อเยื่อโดยการจุ่มลงในน้ำกลั่น 3 ครั้ง หลังจากนั้นแช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3.12 นำเนื้อเยื่อมาทำปฏิกิริยากับ 3, 3’ diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 0.03 % และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 0.006 % ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำประปา 3-5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การย้อมเนื้อเยื่อทับด้วยสีอิโอซิน

4.1 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อและย้อม eosin

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	70 % alcohol	10
2	80 % alcohol	10
3	90 % alcohol	10
4	95 % alcohol	10
5	eosin	2
6	95 % alcohol	0.5-1
7	butanol	10
8	butanol:xylene (1:1)	10
9	xylene	10
10	xylene	10
11	xylene	10

4.2 ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) โดยใช้น้ำยา permount

4.3 นำสไลด์ถาวรที่ได้มาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงซึ่งเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาลพร้อมถ่ายภาพบันทึกไว้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

1. Fixation

1.1 นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ต้องการมาตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ขนาด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

1.2 นำตัวอย่างทั้งหมดมา pre-fix ด้วย glutaraldehyde 3 % ใน buffer 0.1 M potassium phosphate พีเอช 7.2 นาน 4 ชั่วโมง หรืออาจเก็บไว้ข้ามคืนที่ 20 องศาเซลเซียสในตู้เย็น

1.3 ล้างออกด้วย 0.1 M potassium phosphate pH 7.2 จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10-30 นาที

1.4 post-fix ด้วย osmium tetroxide 1 % ในน้ำกลั่นนาน 1-2 ชั่วโมง

1.5 ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 10-30 นาที

2. Dehydration

2.1 นำเนื้อเยื่อมาผ่านกระบวนการ dehydration โดยผ่าน graded series of ethanol ซึ่งจะแทนที่น้ำในตัวอย่างด้วยเอทานอลเข้มข้น 50, 70, 80, 95 และ 99.9 % โดยในแต่ละความเข้มข้นใช้เวลานาน 10-15 นาที และตามด้วย propylene oxide 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที-1 ชั่วโมง

2.2 ทำเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1 แต่เปลี่ยนอัตราส่วน organic solvent: resin = 1:2 นาน 30-60 นาที หรือทิ้งไว้ข้ามคืนก็ได้

2.3 Fresh pure resin ที่มี accelerator นาน 1-2 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน ทำ 2-3 ครั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. Embedding

นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปผ่านกระบวนการ embedding ใน plastic block โดยวางตัวอย่างลงในแบบพิมพ์ชนิด capsule หรือ embedding mold เติม fresh pure resin (Epon 812; Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA) ที่มี accelerator ให้ล้นเล็กน้อย

4. Polymerization

ขั้นตอนนี้อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของ resin เช่น epon และ araldite อบที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วอบต่อที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงก็ได้ ส่วน spur นั้นอบที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง

5. Cutting

นำ plastic block ที่เตรียมได้มาตัด semithin และ ultrathin sections ซึ่งจะตัดโดยเครื่อง ultramicrotome โดยใช้ใบมีดที่เป็นแก้วและเพชร (glass and diamond knife)

6. Staining

6.1 semithin sections ย้อมสีด้วย toluidine blue และนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง เพื่อหาตำแหน่งเนื้อเยื่อบริเวณที่ต้องการนำไปตัดเป็น ultrathin sections ต่อไป

6.2 ultrathin sections ย้อมสีด้วย uranyl acetate และ lead citrate ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ คือ

6.2.1 uranyl acetate เข้มข้น 2 % จนถึงอิ่มตัวในน้ำกลั่นหรือในเอทานอล 50 % วิธีการ คือ หยดสีลงบน parafilm 1 หรือ wax paper ทำให้คงตัวเป็นหยดไม่กระจายตัวออกไป คว่ำกริดด้านที่มี section ลงบนหยดสีดังกล่าว นาน 15 นาที ถึง 1 ชั่วโมง ข้อควรระวังคือ แสงทำให้ uranyl acetate ตกตะกอนได้ ดังนั้นจึงควรใช้ภาชนะปิดกันแสง ขวดที่เก็บสารควรหุ้มไม่ให้แสงเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ เมื่อย้อมครบตามเวลา ล้างออกด้วยน้ำกลั่นไม่ให้สีหลงเหลืออยู่ เพื่อป้องกันการเกิดตะกอน ซับพอหมาด ๆ แล้วย้อมต่อด้วย lead citrate

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2.2 ย้อม lead citrate นาน 5-15 นาที วิธีการย้อมเช่นเดียวกับ uranyl acetate แต่ต้องทำในภาชนะที่ปิดสนิท และมีสารดูด CO_2 เช่น เกล็ด NaOH บรรจุด้วย เนื่องจาก lead citrate จะทำปฏิกิริยากับ CO_2 เกิดตะกอน lead carbonate ขึ้น เมื่อย้อมครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว จุ่มล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ซับให้แห้ง แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) (JEOL, JEM1210; Tokyo, Japan)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายสุธี วงศ์มณีประทีป
เกิดวันที่	12 มกราคม 2525
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ประมง) เกียรตินิยมอันดับสอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วท.ม. (วิทยาศาสตร์การประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัท ไทยยูเนี่ยน ฟีดมิลล์ จำกัด
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์